

# Gyermekkori medulloblastoma in vitro vizsgálata

Doktori értekezés

**Pócza Tímea**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Hauser Péter, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Jermendy Ágnes, Ph.D., egyetemi tanársegéd  
Dr. Nagy Gábor, Ph.D., megbízott osztályvezető

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kulka Janina, Ph.D., egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Reiniger Lilla, Ph.D., egyetemi adjunktus  
Dr. Bagó Attila György, Ph.D., osztályvezető  
helyettes főorvos

Budapest  
2016

**Tartalomjegyzék**

<b>Rövidítések jegyzéke</b>	<b>4</b>
<b>1. Bevezetés</b>	<b>8</b>
1.1. Medulloblastoma	8
1.1.1. A medulloblastoma előfordulása, kialakulása	8
1.1.2. A medulloblastoma tünetei, kezelése, mellékhatások	10
1.1.3. A medulloblastoma szövettani jellemzői	15
1.1.4. Molekuláris markerek	17
1.1.5. A medulloblastoma molekuláris osztályozása	18
1.2. Az mTOR jelátviteli út	22
1.2.1. Felépítés és funkció	22
1.2.2. Az mTOR szerepe a daganatok kialakulásában	25
1.3. A DNS-metiltranszferázok és szerepük a daganatok kialakulásában	27
<b>2. Célkitűzések</b>	<b>32</b>
<b>3. Módszerek</b>	<b>33</b>
3.1. Immunhisztokémiai vizsgálatok	33
3.1.1. Betegek és tumorminták	33
3.1.2. TMA - blokk készítése	33
3.1.3. Immunhisztokémiai reakciók	33
3.1.4. Az immunhisztokémiai reakciók értékelése	35
3.2. Sejttenyészeteken végzett vizsgálatok	35
3.2.1. Sejtvonalak és tenyésztés	35
3.2.2. A sejtek kezelése	36
3.2.3. Proliferációs teszt	36
3.2.4. Immuncitokémia	36
3.3. Online elérhető génexpressziós adatbázis felhasználása	37
3.4. Statisztikai értékelés	37
<b>4. Eredmények</b>	<b>39</b>
4.1. A jellemző útvonalak aktiválódása	41

4.2. Az mTORC1 útvonal aktiválódása humán medulloblastomás betegekben	42
4.2.1. Szövettani vizsgálatok	42
4.2.2. Különböző hatásmechanizmusú mTOR-gátlók hatásának vizsgálata	46
4.2.3. Immuncitokémiai vizsgálatok	48
4.3. A DNS-metiltranszferázok expressziója humán medulloblastomás betegekben	50
<b>5. Megbeszélés</b>	<b>56</b>
5.1. A WNT és SHH útvonalak aktiválódásának vizsgálata	56
5.2. Az mTOR útvonal vizsgálata	57
5.3. A DNS-metiltranszferázok vizsgálata	62
<b>6. Következtetések</b>	<b>65</b>
<b>7. Összefoglalás</b>	<b>66</b>
<b>8. Summary</b>	<b>67</b>
<b>9. Irodalomjegyzék</b>	<b>68</b>
<b>10. Saját publikációk jegyzéke</b>	<b>78</b>
10.1. A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények	78
10.2. A disszertációtól független saját közlemények	78
<b>11. Köszönetnyilvánítás</b>	<b>80</b>

**Rövidítések jegyzéke**

4E-BP1	eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E kötő fehérjéje (eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1)
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (PKB protein kináz B)
AML	akut mieloid leukémia (acute myeloid leukemia)
AMP	adenozin monofoszfát
AMPK	AMP által aktivált protein-kináz (AMP activated protein kinase)
APC	adenomatous polyposis coli
ATP	adenozin trifoszfát
AT/RT	atípusos teratoid-rhabdoid tumor (atypical teratoid/rhabdoid tumor)
AXIN1	axis inhibition protein 1
CDK6	ciklinfüggő kináz 6 (cyclin-dependent kinase 6)
CGNP	kisagyi szemcsesejt prekuzora (cerebellar granule neuron precursor)
CMML	krónikus mielomonocitás leukémia (chronic myelomonocytic leukemia)
CTNNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1
CUSA	Cavitron Ultrasonic Surgical Aspirator
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DEPTOR	DEP domain containing mTOR-interacting protein
DKK1	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNMT	DNS-metiltranszferáz (DNA-methyltransferase)
EGL	külső szemcsesejt réteg (external granular layer)
eIF4E	eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E)
ERBB2/4	erb-b2 receptor tyrosine kinase 2/4
ERK	extracelluláris szignál-regulált kináz (extracellular signal-regulated kinase)
ETANTR	embryonal tumor with abundant neuropil and true rosettes
ETMR	embryonal tumor with multilayered rosettes
FDA	Food and Drug Administration
FR	fossa rhomboidea

FRB-domén	FK506-rapamycin kötő domén (FK506-rapamycin binding domain)
FKBP12	FK506 kötő fehérje 12kDa (12 kDa FK506-binding protein)
GAB1	GRB2-associated binding protein 1
GDP	guanozin-difoszfát
GFAP	gliális fibrilláris acidikus protein (glial fibrillary acidic protein)
GLI1/2	GLI family zinc finger 1/2
GSK3 $\beta$	glikogén szintáz kináz 3-béta
GTP	guanozin-trifoszfát
Gy	Gray
HDAC	hiszton-deacetiláz (histone deacetylase)
HES1	hes family bHLH transcription factor 1 (hairy and enhancer of split 1)
IGF	inzulinszerű növekedési faktor (insulin-like growth factor)
IGL	belső szemcsesejt réteg (internal granular layer)
IHC	immunhisztokémia
INI1	integráse interactor 1
IRS1	inzulin receptor szubsztrát 1 (insulin receptor substrate)
KCNA1	feszültség-függő kálium csatorna (potassium channel, voltage gated shaker related subfamily A)
MCL	köpenysejtes limfóma (mantle cell lymphoma)
MDS	mielodiszpláziás szindróma (myelodysplastic syndrome)
mLST8	mammalian lethal with SEC13 protein 8
MR	mágneses rezonancia
mSin1	mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC1/2	mTOR-komplex 1/2 (mTOR complex 1/2)
MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NeuN	neuronal nuclei
NMYC	neuroblastoma-derived v-myc avian myelocytomatosis viral related oncogene
NPR3	nátriuretikus peptid receptor 3 (natriuretic peptide receptor 3)
OXT2	orthodenticle homeobox 2
PC	plexus chorioideus

PDK1	foszfatidil-inozitol-dependens kináz-1 (phosphoinositide-dependent protein kinase 1)
PI3K	foszfatidilinozitol-3-kináz (phosphatidylinositol 3-kinase)
PKC- $\alpha$	protein kináz C- $\alpha$
p-mTOR	foszforilált mTOR (phospho-mTOR)
PNET	primitív neuroektodermális tumor (primitive neuroectodermal tumor)
PRAS40	40 kDa proline-rich AKT substrate
Protor-1/2	protein observed with Rictor-1/2
p-S6	foszforilált S6 (phospho-S6)
PTCH1/2	patched 1/2
PTEN	phosphatase and tensin homolog
Raptor	regulatory-associated protein of mTOR
RASSF1A	ras association domain-containing protein 1
Rheb	Ras-homolog enriched in brain
Rictor	rapamycin insensitive companion of mTOR
RL	rombuszárók (rhombic lip)
RPS6K	ribosomal protein S6 kinase
RTK	receptor tirozin kináz (receptor tyrosine kinase)
S6	ribosomal protein S6 (RPS6)
SFRP1	secreted frizzled-related protein 1
SGK1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1
SHH	sonic hedgehog
SMO	smoothened, frizzled family receptor
SREBP1/2	sterol regulatory element-binding protein 1/2
SUFU	suppressor of fused homolog
TE	Tris-EDTA
Tel2	telomere length regulation protein TEL2 homolog
TMA	szöveti microarray (tissue microarray)
TP53	tumor protein p53
TrkC	tirozin kináz C (tyrosine kinase receptor C)
TSC1/2	tuberous sclerosis 1/2
Tti1	TELO2 interacting protein 1

VZ	ventrikuláris zóna
WHO	World Health Organization
WNT	wingless
YAP-1	Yes-associated protein 1

## 1. Bevezetés

### 1.1. Medulloblastoma

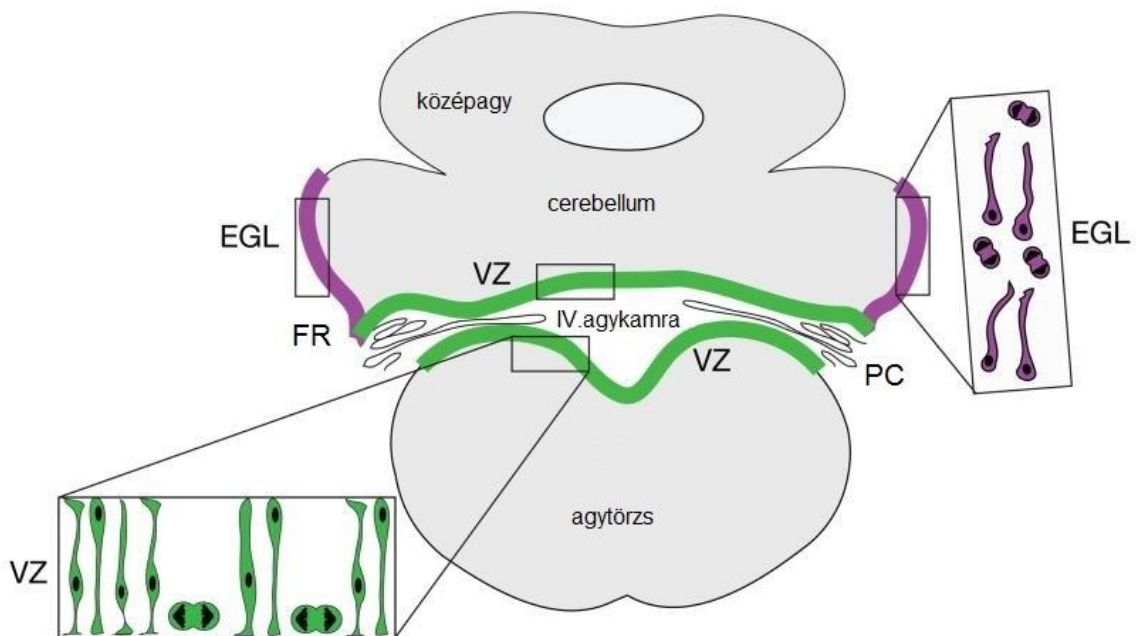
#### 1.1.1. A medulloblastoma előfordulása, kialakulása

A gyermekkorban előforduló malignitások közül leggyakoribbak a leukémiák, ezt követik a központi idegrendszeri daganatok, és a tumorról összefüggő halálozás jelentős részéért felelősek (Pritchard-Jones és mtsai 2006). A gyermekkori daganatos megbetegedések közül a központi idegrendszeri daganatok incidenciája Magyarországon 2001–2010 között 38,4/millió volt (Garami és mtsai 2014). A medulloblastoma a leggyakoribb malignus központi idegrendszeri daganat gyermekkorban, előfordulási aránya 12-25%, míg felnőttkorban 1% alatt van. A fiúk körében és korai gyermekkorban gyakoribb, incidenciája 3-4 és 8-9 éves korban a legmagasabb. A csecsemőkori megbetegedések az esetek 10-15%-át teszik ki. Felnőttkorban a 35 év alattiak a leginkább érintettek (Crawford és mtsai 2007, Massimino és mtsai 2011, Bartlett és mtsai 2013). A legtöbb eset sporadikus előfordulású, de bizonyos környezeti hatások, pl. peszticidek, ionizáló sugárzás és vírusok növelhetik a kialakulás kockázatát (Massimino és mtsai 2011). Kialakulásának oka még nem teljesen tisztázott, néhány ritka előfordulású csírvonalas mutáció hajlamosít medulloblastoma kialakulására. Ilyen öröletes szindrómák például a Gorlin, Turcot, Li-Fraumeni és Rubinstein-Taybi szindróma (Jozwiak és mtsai 2007).

A medulloblastoma általában a vermis területén lokalizálódik, ritkábban a kisagyféltekékben is előfordul. Olyan neuronális progenitoroktól származik, amelyekben a normál cerebellum fejlődésében és növekedésében szerepet játszó jelátviteli utakban támadt zavar. A molekuláris változás lehet egy gén funkcióvesztéses („loss of function”), vagy funkciónyeréses („gain of function”) mutációja, az mRNS vagy a fehérje expressziós szintjének változása. A kisagy fejlődésében a sonic hedgehog (SHH), wntless (WNT) és Notch jelátvitel mellett az inzulinszerű növekedési faktor (IGF) jelátviteli útnak is jelentőséget tulajdonítanak. A kisagykéreg neuronjai, a Purkinje sejtek, a kisagyi magvak, és több interneuron a negyedik agykamra mentén húzódó ventrikuláris zónából (VZ) alakul ki. Egy másodlagos neurogén zóna is megjelenik a rombuszárak (RL) elülső részében. A progenitor sejtek egy populációja kilép a rombuszárakból, elfoglalja a kisagykezdemény



felszínét és a külső szemcsesejtek rétegét (EGL) hozza létre. Ez a zóna az osztódó kisagyi szemcsesejt prekursorok (CGNP) zónája, amelyekből a kisagy szemcsesejtjei lesznek (1. ábra). A CGNP-k kilépnek a sejtciklusból és a belső területekre vándorolnak, a Purkinje-sejtek rétege alá és létrehozzák a belső szemcsesejtek rétegét (IGL). A medulloblastoma kialakulása szempontjából fontos a VZ és az EGL, de nemcsak ezek a területek lehetnek a tumor kialakulás forrásai. Elkötelezett progenitorok, amelyek továbbvándorolnak ezektől a zónákból, vagy a szomszédos agyterületekről invázióval bejutó transzformálódott sejtek is lehetnek a medulloblastoma kialakulásáért felelős sejtek (Hatten és Roussel 2011, Roussel és Hatten 2011, Markant és Wechsler-Reya 2012, Wang és Wechsler-Reya 2014).



**1. ábra:** Embriionális kisagy fejlődése, neurogén zónák (frontális sík)

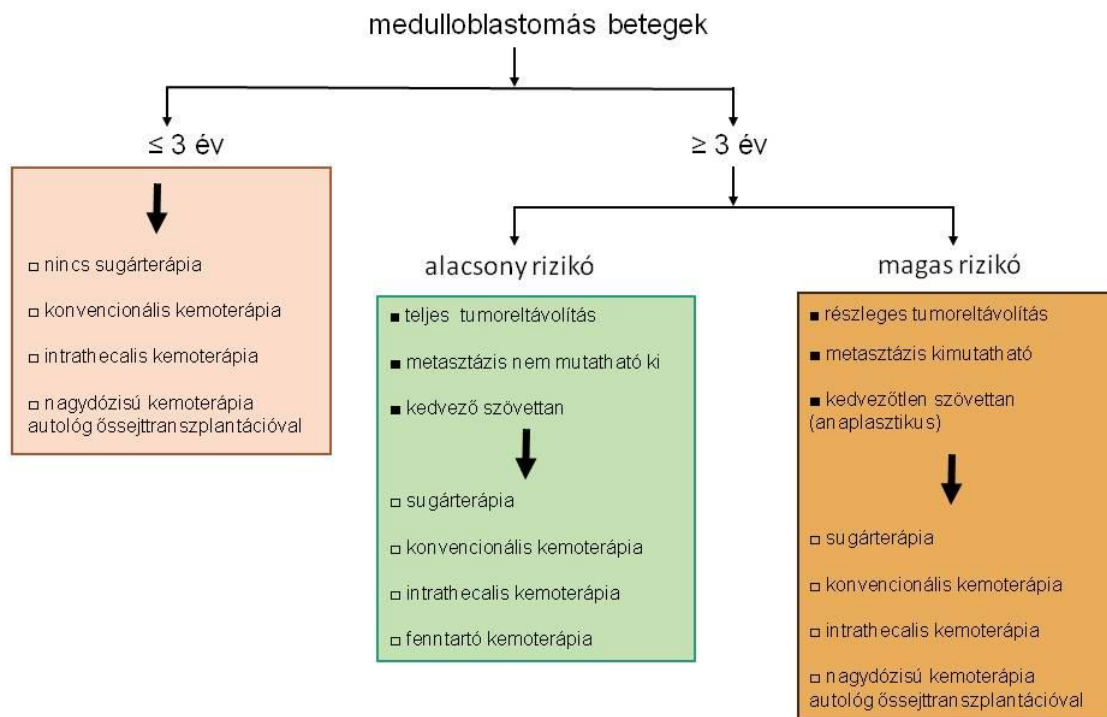
A Purkinje-sejtek, a kisagyi magvak neuronjai, többféle interneuron és asztroglia a IV. agykamrát szegélyező VZ-ből alakul ki. A VZ sejtjeinek többsége sugárirányban vándorol, egy másik része laterálisan mozog a rombuszárók felé. Ezek a sejtek elkötelezik magukat a szemcsesejt irányban. A rombuszárók progenitor sejtjei (CGNP) a kisagy primordium felszínére vándorolnak, ahol létrehozzák az EGL-t. A Purkinje sejtek által termelt SHH hatására a születés után gyorsan osztódni kezdenek, aztán kilépnek a sejtciklusból, és befele vándorolnak létrehozva az IGL-t (PC: plexus chorioideus, FR: fossa rhomboidea) (Forrás: Hatten és Roussel 2011)

### 1.1.2. A medulloblastoma tünetei, kezelése, mellékhatások

A klinikai tünetek az intracranialis nyomás megnövekedésével (hydrocephalus) lehetnek összefüggésben, amely legtöbbször a IV. agykamrát érintő elzáródás miatt bekövetkező agyvízkeringési zavar eredménye. Tünetei között általában fejfájás, ingerlékenység, émelygés, hányás, tarkókööttség, letargia fordulnak elő. A flocculonodularis lebeny érintettsége esetén egyensúlyzavar, járászavar és a szemmozgás zavara is megfigyelhető (Crawford és mtsai 2007, Bartlett és mtsai 2013). Gerincvelői szóródás esetén az érintett szegmensnek megfelelő gerincvelői tünetek jelentkezhetnek. A klinikai diagnózis felállítása képalkotó eljárással, általában mágneses rezonancia (MR) vizsgálattal történik. A tumor heterogén, hipointenz masszának tűnik az MR képen (Crawford és mtsai 2007, Massimino és mtsai 2011, Bartlett és mtsai 2013). Szövetteni diagnózis csak az idegsebészeti műtét során eltávolított szövetmintából állapítható meg. A műtét célja, hogy lehetőség szerint minél nagyobb mértékben eltávolítsa a tumort, a neurológiai károsodás pedig minél kisebb mértékű legyen (Gerber és mtsai 2014). A reziduális tumor megítélésére a műtétet követő 24-72 órán belül elvégzett MR vizsgálat adhat választ. Amennyiben a reziduum bármely síkban meghaladja a 1,5 cm<sup>2</sup>-t, akkor magasabb rizikócsoportha soroljuk a betegeket (Crawford és mtsai 2007, Massimino és mtsai 2011, Bartlett és mtsai 2013). Magyarországon, mivel korábban nem volt lehetőség a közvetlen posztoperatív MR elvégzésére, a rizikócsoporthoz szerinti besorolásnál a műtét után 6 héttel végzett MR képen látható bármekkora reziduum már magasabb rizikócsoporthoz szerinti besorolást jelent. Az áttétek felkutatására gerinc MR vizsgálat és likvorvizsgálat végzése javasolt. Metasztázist legtöbbször a cerebrospinalis folyadékban keresztül ad, gyakran megfigyelhető a gerincvelő lumbosacralis és thoracalis területein (Jozwiak és mtsai 2007, Massimino és mtsai 2011).

A betegek további kezelését a kockázati besorolásuktól teszik függővé. A különböző prognózisú betegek eltérő kezelésben részesülnek. A rizikó megállapításánál a betegek életkorát, a tumor szövettanát, a metasztázis esetleges jelenlétét és a műtét utáni reziduális tumor méretét veszik figyelembe. Eltérő kezelési séma szerint kezelik a 3 év alatti betegeket, az alacsony kockázatú és magas kockázatú betegeket (2. ábra). Alacsony rizikójú (vagy a nemzetközi irodalomban átlagos kockázatúnak nevezett) a beteg, ha 3 évnél idősebb, a közvetlen műtét utáni reziduális tumora bármely nézetben kisebb, mint 1,5 cm<sup>2</sup> (nemzetközi gyakorlat), vagy a 6 hetes MR-en nincs kimutatható

reziduum (magyarországi gyakorlat) és képpalkotó eljárásokkal, illetve a cerebroszpinális folyadék vizsgálatával áttéte utaló jel nem észlelhető. Magas rizikójúnak tekintik a beteget, ha a reziduális tumor mérete a közvetlen posztoperatív MR képen nagyobb, mint  $1,5 \text{ cm}^2$ , vagy a 6 hetes MR-en jelen van reziduum, illetve kimutatható metasztázis, vagy kedvezőtlen a szövettana (nagysejtes/anaplasztikus). A 3 éves kor alatti betegek nem kapnak sugárkezelést a súlyos mellékhatások miatt. Mindhárom csoport konvencionális és intrathecalis kemoterápiában részesül. Az alacsony rizikójú betegek fenntartó kemoterápiás kezelést kapnak, magas kockázatúaknál nagy dózisú kemoterápiát alkalmazunk autológ csontvelői őssejtátültetéssel. Utóbbi kezelést a 3 év alatti csoportban is alkalmazzuk (Crawford és mtsai 2007, Hauser és mtsai 2009, Schuler 2010, Massimino és mtsai 2011, Bartlett és mtsai 2013).



**2. ábra:** A medulloblastomás betegek kockázat szerinti besorolása (Massimino és mtsai 2011 nyomán, módosítva a Magyarországon alkalmazott gyakorlatnak megfelelően)

A hazánkban alkalmazott kezelési sémák - MBL2004 és MBL2008 - különböző összetételű kemoterápiás blokkokból állnak, amelyeket többször egymás után, meghatározott sorrendben kapnak meg a betegek. A 2008-ban bevezetett kezelési

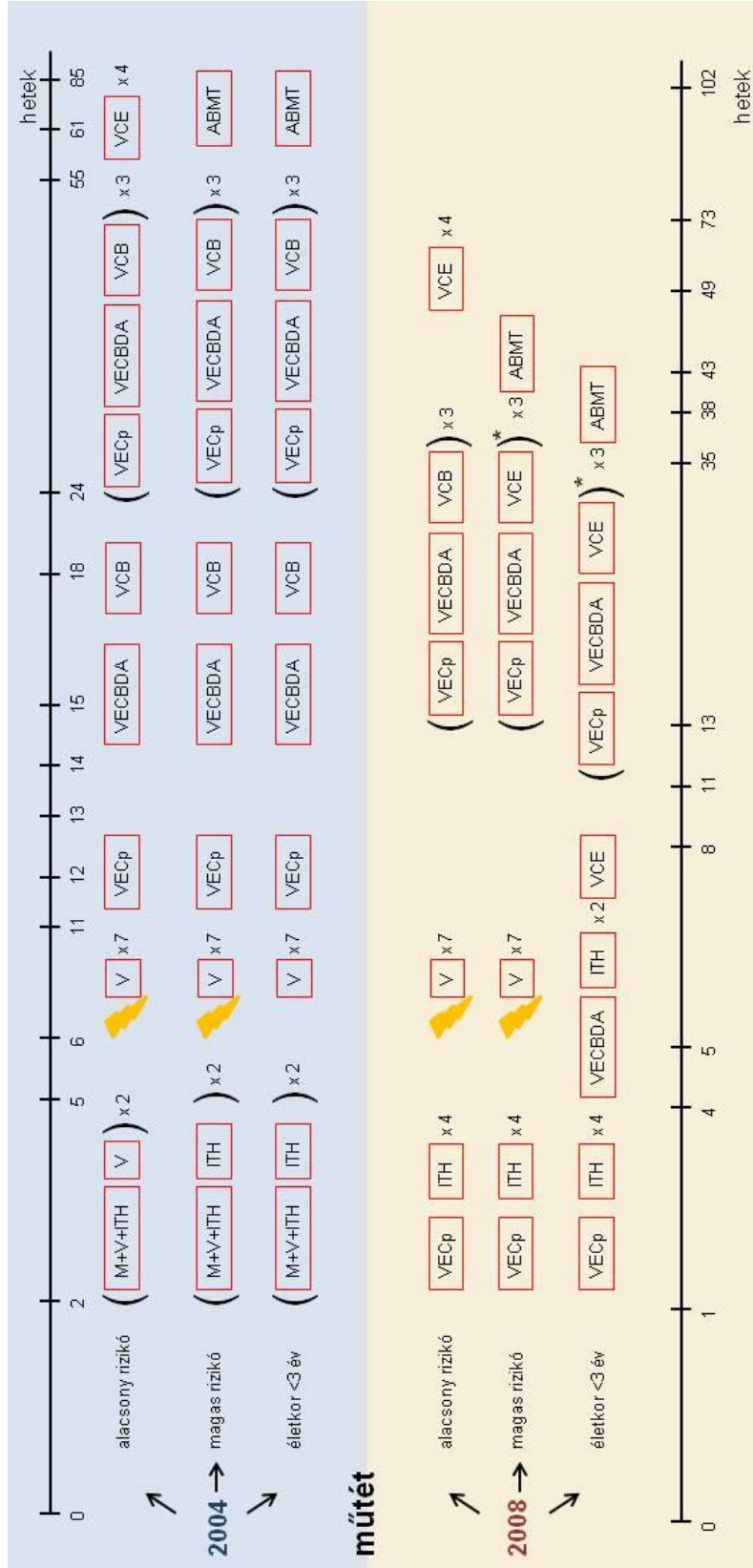
protokoll (MBL2008) szerint a műtétet először intravénásan adott vincristine-t, ciklofoszfamidot és etoposide-ot tartalmazó blokk, illetve intrathecalisan adott methotrexate blokkok követik, ezután történik meg a sugárkezelés, majd folytatódik a különböző kemoterápiás blokkokkal (Hauser és mtsai 2009, Schuler 2010). A 2004-től, illetve 2008-tól bevezetett kezelési sémákat részletesen bemutatja a 3. ábra. A sugárkezelés tumorági és craniospinalis besugárzásból tevődik össze. Az alacsony rizikójú betegek kisebb dózisú sugárkezelésben részesülnek, 30 Gy craniospinalis és 24 Gy boost (fossa posterior), a magas rizikójúak 36 Gy craniospinalis és 24 Gy boost dózis kapnak. A kezelési protokollok fejlődésével (multimodális terápia) mostanra a kedvező csoportba tartozó betegek 5 éves túlélése 70-90% között van, azonban a magas kockázatú betegeké ennél rosszabb (Crawford és mtsai 2007, Gottardo és Gajjar 2008, Massimino és mtsai 2011, Packer és mtsai 2013).

A medulloblastoma kezelése az elmúlt évszázadban radikális fejlődésen ment keresztül, ami a betegek túlélésének jelentős javulásával járt, azonban a kezelés során a terápia hosszútávú mellékhatásaival számolni kell. A craniospinalis irradáció miatt a neuro-endokrin rendszer működésében zavarok lehetnek, a neurokognitív képességek is károsodhatnak, pszichológiai és viselkedési problémák, halláskárosodás is felléphet. Mind a sugárzás, mind pedig a kemoterápiás szerek megnövelik egy második tumor kialakulásának esélyét (Crawford és mtsai 2007, Massimino és mtsai 2011). A klinikai kezelésben ma már fontos szempont, hogy optimális legyen mind a túlélés, mind az életminőség szempontjából.

A műtéthez kapcsolódó neurológiai komplikációk közül említést érdemel a posterior fossa szindróma, amely a betegek kb. negyedét érinti, és hosszútávon neurokognitív problémákat okoz (Crawford és mtsai 2007, Massimino és mtsai 2011, Gerber és mtsai 2014, Gudrunardottir és mtsai 2014). A XX. század első évtizedeiben a túlélés hónapokban volt mérhető, a műtétet palliatív jelleggel végezték. A 60-as években kezdték alkalmazni a ventriculo-peritonealis shunt-öt az intracranialis hipertenzió megszüntetésére, és nagyítók használatával a minél teljesebb tumoreltávolításra törekedtek. A 70-es években további előrelépést jelentett az operációs mikroszkóp megjelenése, ami tovább fokozta a tumoreltávolítás mértékét. A 80-as években ezt még tovább segítette az ultrahangos sebészeti eszköz (CUSA) megjelenése. Gyorsabbá és biztonságosabbá tette a műtétet. A 80-as években vált

világossá, hogy a túlzottan agresszív tumoreltávolítás cerebelláris mutizmushoz vezet, amit feltehetően a nucleus dentatus megsértése okoz. A cerebelláris mutizmussal érintett betegek többségében hosszútávú viselkedésbeli, neurológiai problémák is fellépnek (posterior fossa szindróma). Az Egyesült Államokban a betegek kb. 25%-nál diagnosztizálták, a műtéti technikák módosításával csökkent az előfordulása (Gudrunardottir és mtsai 2014).

A műtéti eltávolításban a legnagyobb kockázatot a tumor agytörzshöz való közelsége jelenti, a túlzott radikalitás megnövelheti a műtéti komplikációk gyakoriságát, egyúttal pedig a műtéthez kapcsolódó halálozást, és súlyosbíthatja a kései mellékhatásokat is. A szubtotális eltávolítás miatt a betegeket magas rizikójúnak tekintik, és ennek megfelelően intenzívebb terápiában részesülnek, ami fokozza a hosszútávú mellékhatások súlyosságát. Jelenleg a minél nagyobb mértékű tumoreltávolítás a cél, lehetőleg minél kevesebb neurológiai károsodást okozva (Cochrane és mtsai 1994, Levisohn és Cronin-Golomb 2000, Crawford és mtsai 2007, Massimino és mtsai 2011, Gerber és mtsai 2014).



**3. ábra:** A Magyar Agytumor Protokoll 2004-ben és 2008-ban bevezetett kezelési sémája

A különböző kemoterápiás blokkokat meghatározott sorrendben és időpontban kapják a betegek. A kemoterápiás blokkok összetétele: M = methotrexate; V = vincristine; ITH = intratechális methotrexate; V = vincristine; VECp = vincristine + ciklofoszfamid + etoposide; VECBDA = vincristine + carboplatin + etoposide; VCB = vincristine + carmustin + cisplatin; VCE= vincristine + cisplatin + etoposide; ABMT= nagy dózisú kemoterápia autológ csontvelői őssejtátültetéssel; \* addig alkalmazandó, ameddig reziduális tumor észlelhető MR-rel, max 3x

### 1.1.3. A medulloblastoma szövettani jellemzői

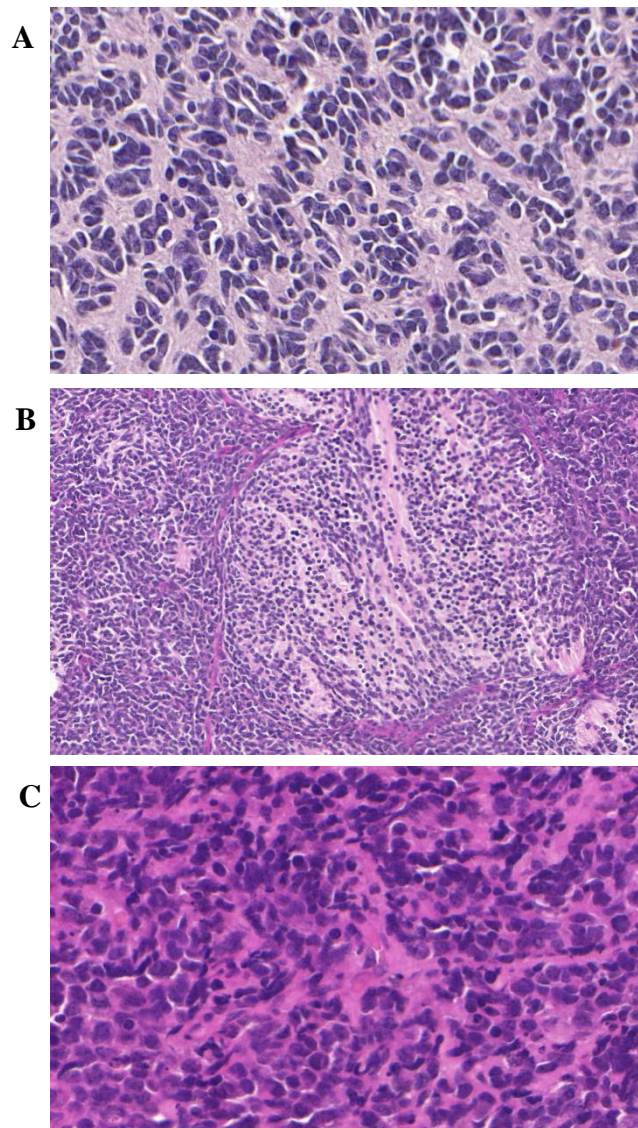
Az agytumороkat a World Health Organization (WHO) eredet, klinikai lefolyás, szövettani megjelenés, immunhisztokémiai, molekuláris és citológiai jellemzők alapján sorolja csoportokba. A WHO 2007 megjelenése óta azonban több új típusú tumort írtak le önálló entitásként (Crawford és mtsai 2007, Bartlett és mtsai 2013, Massimino és mtsai 2011, Pogorzala és Styczynski 2010, Turányi és mtsai 2013). A medulloblastoma a neuroepitheliális, ezen belül az embrionális tumorokhoz tartozik, a központi idegrendszeri primitív neuroektodermális tumorról (PNET) és az atípusos teratoid/rhabdoid tumorról (AT/RT) együtt. Mindegyik embrionális tumor agresszív, grade IV. besorolású. A PNET supratentorialisan helyezkedik el, a medulloblastoma minden esetben infratentorialis loklizációjú (Fisher 2004). A legújabb kutatások indokolják az embrionális tumorokon belül egy újabb entitás bevezetését, embryonal tumor with multilayered rosettes (ETMR) néven, amely magában foglalja az embryonal tumor with abundant neuropil and true rosettes (ETANTR), az ependymoblastomát és a medulloepitheliomát (Nobusawa és mtsai 2014, Korshunov és mtsai 2014).

A medulloblastomának szövettanilag többféle altípusát lehet elkülöníteni, a WHO 2007 évi ajánlása alapján klasszikus, dezmoplasztikus, extenzív noduláris, nagysejtes és anaplasztikus típusba sorolják a patológusok. Az egyes szövettani típusok prognózisa eltérő.

A klasszikus megjelenésűeket kicsi kerek-ovális, vagy hosszúkas sejtek jellemzik, hiperkromatikus sejtmaggal és keskeny citoplazmával. Gyakran megfigyelhetők Homer-Wright rosetták (a tumorsejtek fibrilláris mátrixot vesznek körül), de ez nem feltétele a diagnózisnak. Ez a leggyakoribb típus, kb. 66%-os arányban fordul elő. A dezmoplasztikus medulloblastomában két jellegzetes szövettani képet lehet elkülöníteni, a noduláris, retikulin-mentes zónákat retikulinban gazdag zóna veszi körül. Extenzív noduláris medulloblastomának írják le, amennyiben kiterjedt lobuláris szerkezet jellemzi, ami a retikulinmentes zóna extrém kiterjedtségének köszönhető. A noduláris zónára jellemző a sejtek neuronális érettsége, a fibrilláris mátrixban a sejtek neurocitikus megjelenésűek. A nodulusokat sűrű, kerek, mitotikusan aktív sejtek zónája veszi körül. A dezmoplasztikus medulloblastoma gyakorisága 7% körüli, az extenzív noduláris típusé 3%. Az anaplasztikus változatot jellegzetes nukleáris pleomorfizmus jellemzi. A nagysejtes változat monomorfikus sejtekből áll



kerek sejtmagokkal és jelentős nukleólusszal, citoplazmája sokkal nagyobb, mint a klasszikus típusé. Mindkét típusban magas a mitotikus aktivitás és jelentős apoptózis figyelhető meg. Az anaplasztikus és nagysejtes változat jellemzői részben azonosak, ezért szokás egy csoportként (nagysejtes/anaplasztikus) kezelni a két típust. Gyakorisága 10-22% körül van. A dezmozplasztikus típus prognózisa kedvezőbb, a nagysejtes/anaplasztikus változat agresszívabb, lényegesen rosszabb prognózissal társul (Massimino és mtsai 2011, Crawford és mtsai 2007, Jozwiak és mtsai 2007). A 4. ábra különböző megjelenésű medulloblastomák szövettani képét mutatja.



**4. ábra:** A medulloblastoma különböző szövettani megjelenése

(A) klasszikus (B) dezmozplasztikus (C) anaplasztikus, (nagyítás (A)(B) 300x, (C) 120x)



Bizonyos markerek immunhisztokémiai kimutatása segít a differenciáldiagnózisban. A medulloblastoma habár embrionális prekursor sejtekből származik, általában mutat neuronális differencióra jellemző markereket. A medulloblastoma immunoreaktivitást mutat a szinaptofizinre, amit neuronális markerként használnak, de pozitivitást mutat a gliális fibrilláris acidikus proteinre (GFAP) is, ami gliasejtekre jellemző fehérje. A gliális differenciáció a medulloblastomában csak kisebb területekre korlátozódik, általában nem differenciálódnak érett asztroglíáká. A neuronal nuclei (NeuN) az érett neuronokra jellemző marker általában negatív vagy gyengén expresszálódik. Az AT/RT részben hasonló megjelenése miatt szokták az integrase interactor 1 (INI1) pozitivitást vizsgálni, ez hiányzik az AT/RT-ből, medulloblastomában erős diffúz sejtmagi pozitív festődést mutat (Takei és mtsai 2007).

A medulloblastoma genetikai jellegzettségei közül leggyakrabban az izokromoszóma 17 figyelhető meg, a betegek 30-40%-ában megtalálható. A MYC és NMYC gének amplifikációját az esetek kb. 10%-ban figyelték meg, rossz prognózissal társulnak, főként nagysejtes/anaplasztikus típusban fordulnak elő. A  $\beta$ -katenin kódoló CTNNB1 gén aktiváló pontmutációja figyelhető meg az esetek 4-10%-ban. A  $\beta$ -katenin nukleáris lokalizációja a WNT útvonal markere, immunohisztokémiával (IHC) változó arányban figyelték meg (18-27%). Az SHH útvonal komponensei - patched 1/2 (PTCH1, PTCH2), smoothed (SMO), és suppressor of fused homolog (SUFU) - között is megfigyeltek szomatikus mutációkat. A TP53 mutációt változó arányban figyelték meg, legfeljebb 15%-ban. Az orthodenticle homeobox 2 (OXT2) és ciklin-dependens kináz 6 (CDK6) amplifikációját is megfigyelték (Pfister és mtsai 2010, Massimino és mtsai 2011).

#### 1.1.4. Molekuláris markerek

A klasszikus klinikai és patológiai adatok alapján történő osztályozás ellenére betegség kimenetele a különböző csoportokban elég heterogén (Gerber és mtsai 2014). A molekuláris biológia fejlődésével egyre több olyan markert azonosítottak, amelyek javíthatják a prognózisbecslést. Rossz prognózissal társul a survivin, HES1, ErbB2, ErbB4 túlzott expressziója, MYC és NMYC amplifikációja. A magas tirozin kináz C (TrkC) és  $\beta$ -katenin mutáció kedvező lefolyásra utal (Crawford és mtsai 2007, Pfister és

mtsai 2010, Massimino és mtsai 2011, Bartlett és mtsai 2013). A jövőben a géneexpressziós mintázaton alapuló legújabb molekuláris osztályozás (SHH, WNT, 3-as és 4-es alcsoport) további finomítása és klinikai gyakorlatba integrálódása várható (Gerber és mtsai 2014).

#### 1.1.5. A medulloblastoma molekuláris osztályozása

A medulloblastoma molekuláris biológiáját tekintve is heterogén tumor. Intenzív kutatások irányultak a medulloblastoma molekuláris alapon történő osztályozására. Az eredményekből született konszenzus alapján jelenleg 4 alcsoportba osztják a medulloblastomákat: WNT, SHH, 3-as és 4-es alcsoportok. A molekuláris alcsoportokon belül is megfigyelhető különbség a prognózisban, a WNT alcsoportú betegek jobb prognózist mutatnak, a 3-as és 4-es alcsoportok prognózisa a legrosszabb (Northcott és mtsai 2011, Taylor és mtsai 2012, DeSouza és mtsai 2014, Gerber és mtsai 2014).

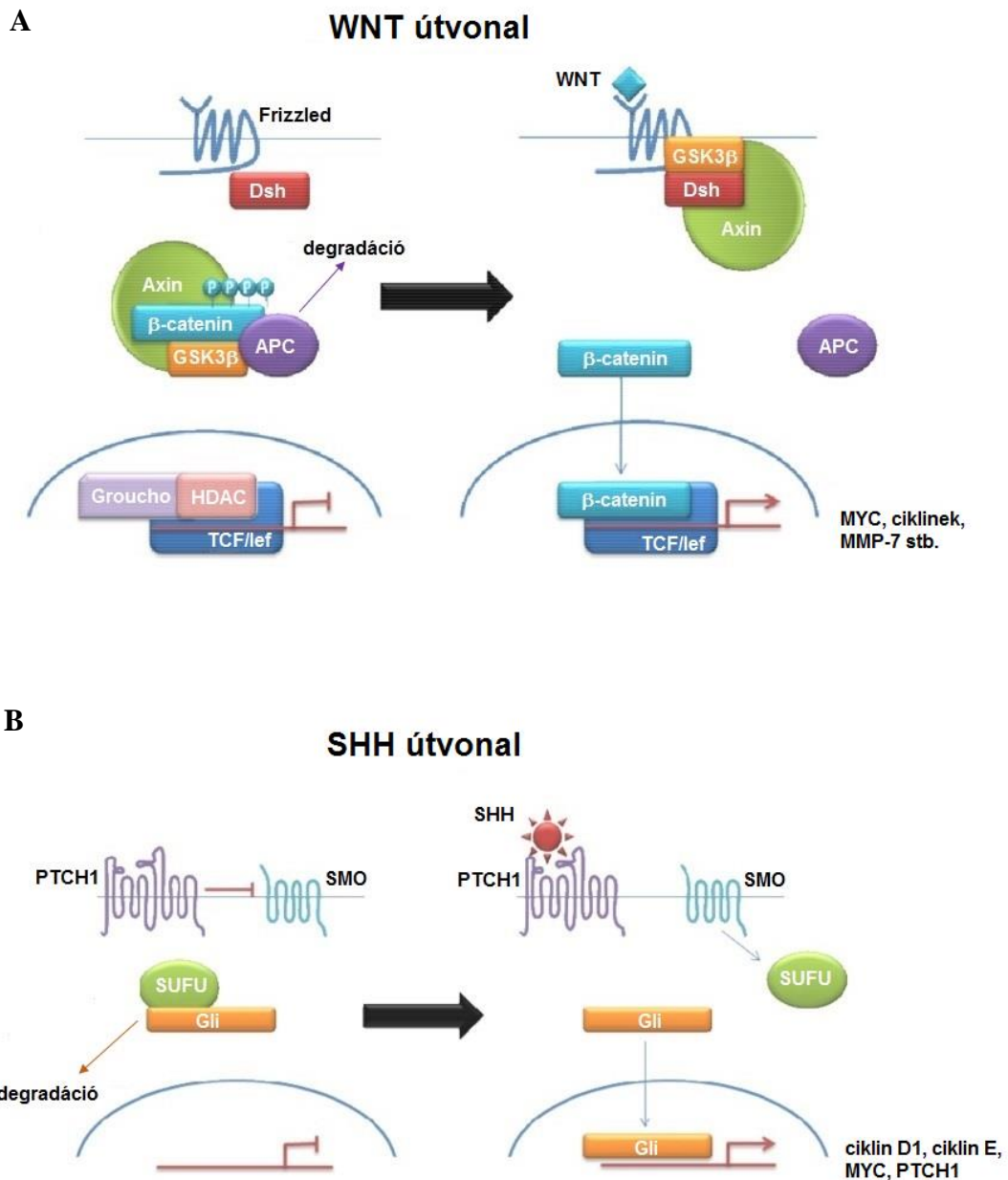
A WNT alcsoportra jellemző a WNT jelátviteli út abnormális aktivációja. A  $\beta$ -katenin normálisan a citoplazmában helyezkedik el multiprotein komplexben, amelynek tagja a tumorsuppresszor adenomatous polyposis coli (APC), ezenkívül a glikogén szináz kináz-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) és axis inhibition protein 1 (AXIN1) fehérje is. A GSK3 $\beta$  foszforilálja a  $\beta$ -katenint, ami annak proteozómális degradációját indukálja. A WNT útvonal aktivációja a GSK3 $\beta$  foszforilációjához, ezáltal gátlásához vezet, így a  $\beta$ -katenin transzlokálódik a sejtmagba, ahol transzkripciós komplexet aktivál, ezáltal számos gén expresszióját serkenti, pl. ciklinekét (5. ábra). A medulloblastomás esetek egy részében megfigyelhető a  $\beta$ -katenin (CTNNB1 gén) vagy az APC mutációja (Jozwiak és mtsai 2007, DeSouza és mtsai 2014, Samkari és mtsai 2015). A  $\beta$ -katenin nem bomlik le, akkumulálódik és transzlokálódik a sejtmagba, így az általa szabályozott gének túlzott expressziója következik be.

A WNT alcsoportban többnyire a klasszikus típus fordul elő, ritkán nagysejtes/anaplasztikus előfordulhat. Ritkán ad metasztázist, jó prognózisú. Feltételezések szerint a WNT-tumorer a dorsalis agytörzs külső részéről származnak. Immunhisztokémiailag ezen típus elkülönítésére a  $\beta$ -katenin sejtmagi expressziója jellemző. Ezen kívül a dickkopf-related protein1 (DKK1) és Yes-associated protein 1

(YAP-1) is használható a kimutatására (Taylor és mtsai 2012, DeSouza és mtsai 2014, Gerber és mtsai 2014, Samkari és mtsai 2015).

Az SHH alcsoport jellemzője az SHH jelátviteli út aktivációja. Az SHH egy szekretált protein, az általa közvetített jelet a PTCH1 és SMO transzmembrán fehérjék közvetítik tovább. SHH hiányában a PTCH1 gátolja a SMO aktivitását, SHH kötődés hatására ez a gátlás feloldódik, és a GLI1 transzkripciós faktor működésbe lép. Szabályozza több sejtciklusban szereplő gén átíródását. A GLI1 negatív regulátora a SUFU (5. ábra) (Jozwiak és mtsai 2007, DeSouza és mtsai 2014, Samkari és mtsai 2015).

Az SHH alcsoportban a leggyakoribb a dezomoplasztikus szövettani típus, de megfigyelhető klasszikus és nagysejtes/anaplasztikus változat is. Jellemzően újszülöttekben vagy fiatal felnőttekben fordul elő. Az SHH útvonal fontos szerepet játszik a normális kisagy fejlődésében. Az EGL-ben elhelyezkedő szemcsesejt prekursorokat (CGNP) tekintik az SHH-medulloblastomák eredetének. A secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1) immunhisztokémiai vizsgálatával megbízhatóan elkülöníthető, továbbá a GRB2-associated binding protein 1 (GAB1) kimutatása is ígéretesnek tűnik. A betegek prognózisa az alcsoportban változó, általában közepes (Taylor és mtsai 2012, DeSouza és mtsai 2014, Gerber és mtsai 2014, Samkari és mtsai 2015).



**5. ábra:** A medulloblastoma kialakulásában szerepet játszó útvonalak, a WNT és SHH útvonal sematikus ábrája

(A) A  $\beta$ -katenin normálisan a citoplazmában komplexhez kötve helyezkedik el, a GSK3 $\beta$  foszforilálja. A foszforilált  $\beta$ -katenin lebomlik. A WNT kötődésének hatására a  $\beta$ -katenin transzlokálódik a sejtmagba, ahol aktiválja számos gén expresszióját. (B) SHH hiányában a PTCH1 gátolja a SMO aktivitását, SHH kötődés hatására felszabadul a gátlás alól, a GLI1 transzkripciós faktor aktiválódik és több sejtciklusban szereplő gén átíródását szabályozza (Forrás: DeSouza és mtsai 2014)

A 3-as és 4-es alcsoport kevésbé jól definiált. A 3-as alcsoportba rossz prognózisú betegek tartoznak, főként csecsemők és gyermekek, jellemző rá primeren a metasztázisok jelenléte. A csoportban a fiúk aránya kétszerese a lányokénak. Klasszikus és nagysejtes/anaplasztikus változat is előfordul. Immunhisztokémiai elkülönítésére az atrial natriuretic peptide receptor 3 (NPR3) tűnik megfelelőnek. MYC amplifikáció az egyik legjellegzetesebb markere.

A 4-es alcsoport esetében is kevés ismeretünk van a biológiai mechanizmusról. Minden korban előfordul, ebben a csoportban is jellemző a fiú dominancia és a metasztázisok jelenléte. Klasszikus típusú a többségében, de nagysejtes/anaplasztikus változat is előfordul. A MYCN és a feszültség-függő kálium csatorna (KCNA1) vizsgálatával próbálják azonosítani. A két legmegbízhatóbb markere a 11-es kromoszóma hiánya és a 17-es kromoszóma poliszómia (Taylor és mtsai 2012, DeSouza és mtsai 2014, Gerber és mtsai 2014, Samkari és mtsai 2015). Az egyes molekuláris alcsoportok jellemzőit az I. táblázat foglalja össze.

**I. táblázat: A medulloblastoma molekuláris alcsoportjainak jellemzői**

	<b>WNT</b>	<b>SHH</b>	<b>3-as alcsoport</b>	<b>4-es alcsoport</b>
<b>demográfiai jellemzők</b>				
gyakoriság	~10%	~30%	~25%	~35%
kor	késői gyermekkor serdülőkor	csecsemőkor felnőttkor	főként csecsemőkor	késői gyermekkor serdülőkor felnőttkor
nemek aránya	1:1	1:1	2:1	2:1
<b>klinikai jellemzők</b>				
szövettan	klasszikus ritkán nagys./anapl.	dezmoplasztikus klasszikus nagys./anapl. ritkán extenzív nod.	klasszikus nagys./anapl.	klasszikus ritkán nagys./anapl.
metasztázis	ritka 5%–10%	mérsékelt 15%–20%	nagyon gyakori 40%–45%	gyakori 35%–40%
prognózis	nagyon jó	átlagos csecsemőkorban jó	rossz	átlagos
teljes túlélés	~95%	~75%	~50%	~75%
feltételezett eredet	a rombuszárak alsó részének progenitor sejtjei	az EGL –ben lokalizálódó CGNP sejtek	prominin+ lin- neuronális őssejtek az EGL –ben lokalizálódó CGNP sejtek	ismeretlen
<b>genetikai jellemzők</b>				
komozómaváltozás	6-	3q+ 9p+ 9q- 10q- 14q- 17p-	1q+ 7+ 17q+ 18+ 8- 10q- 11- 16q- 17p- i17q	4+ 7+ 17q+ 18+ 8- 10- 11- 17p- X- i17q
génváltozás	$\beta$ -katenin mutáció	PTCH/SMO/SUFU mutáció GLI1, GLI2 amplif. MYCN amplifikáció	MYC amplifikáció	CDK6 amplifikáció MYCN amplifikáció
jellemző génextpresszió	WNT útvonal	SHH útvonal	fototranszdukció GABAerg jelátvitel	neuronális/glutamát jelátvitel
immunhisztokémiai marker	$\beta$ -katenin DKK1 FilaminA YAP	GLI1 SFRP1 GAB1 FilaminA YAP	NPR3	KCNA1

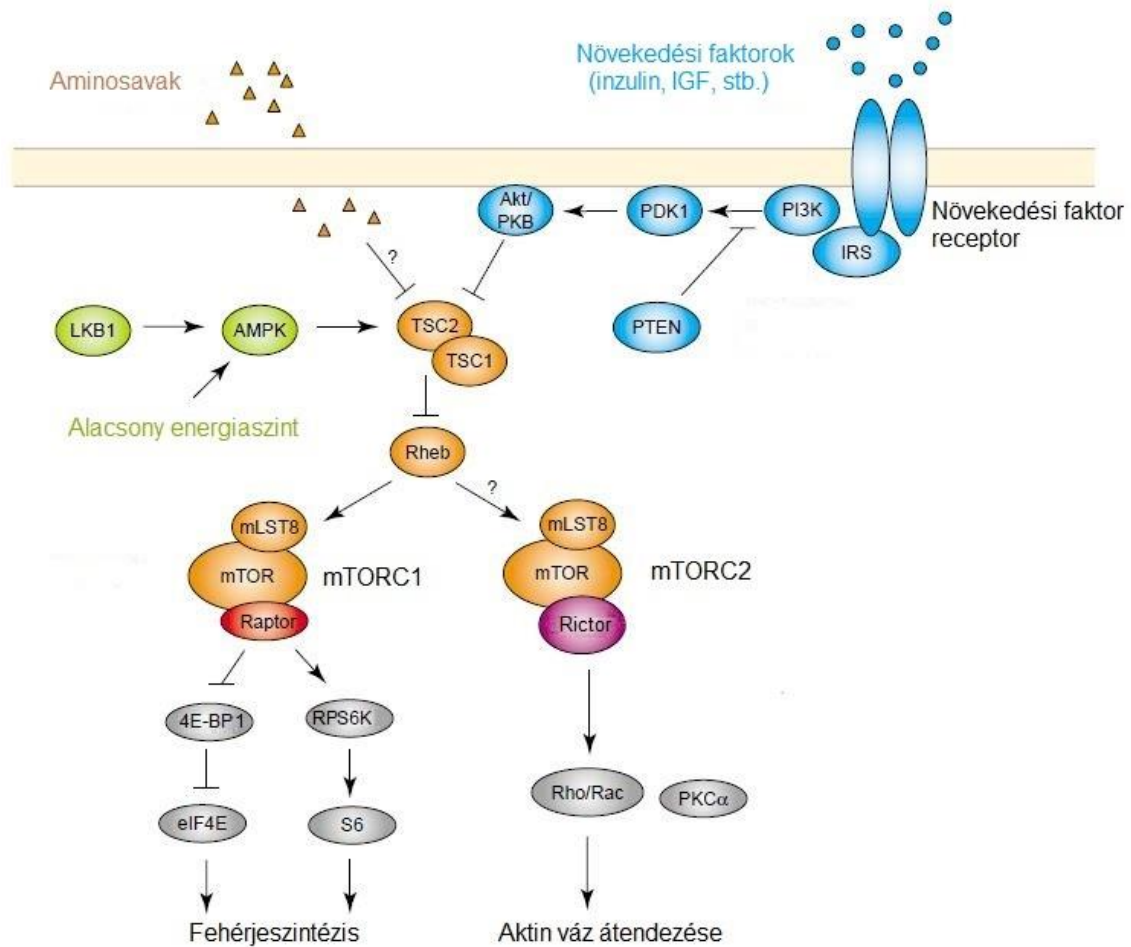
## 1.2. Az mTOR jelátviteli út

### 1.2.1. Felépítés és funkció

A sejtnövekedés és anyagcsere-folyamatok egyik fontos szabályozója a mammalian target of rapamycin (mTOR) útvonal (6. ábra). A fehérje egy szerin-treonin-kináz, kétfajta komplex formájában fordul elő, mTORC1 és mTORC2 (Martin és Hall 2005, Laplante és Sabatini 2012, Pópulo és mtsai 2012). A két komplexet részben közös, részben eltérő fehérjék alkotják. Mindkét komplex képzésében részt vesz az mLST8, DEPTOR és a Tti1/Tel2 komplex. A regulatory-associated protein of mammalian target

of rapamycin (Raptor) és proline-rich AKT substrate 40 kDa (PRAS40) specifikusak az mTORC1-re, rapamycin insensitive companion of mTOR (Rictor) a mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1 (mSin1), valamint a protein observed with Rictor-1 és -2 (protor1/2) csak az mTORC2 komplexre jellemző (Laplante és Sabatini 2012, Pópulo és mtsai 2012). Az mTORC1 komplex gátolható rapamicinnel, az mTORC2 viszont nem, habár újabb eredmények szerint a hosszan tartó rapamicin kezelésnek van mTORC2 gátló hatása egyes sejtvonalakon, ennek magyarázata nem ismert (Sarbasov és mtsai 2006).

A mTORC1-hez érkező jelzések lehetnek extra- és intracellulárisak, növekedési faktorok, stressz, energiaállapot, oxigén és aminosavak. A tuberous sclerosis 1/2 (TSC1/TSC2) komplex közvetíti a szignálokat az mTORC1 felé, pl. a foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K) útvonalon érkező növekedési faktorok szignálját. A TSC1/TSC2 az mTORC1 legfontosabb szabályozója, amely GTPáz aktivitással rendelkezik, a Rheb által kötött GTP GDP-vé alakulását katalizálja. Így a Rheb inaktív állapotba kerül, és nem tudja aktiválni az mTOR komplexet. A PI3K útvonal effektor kinázai foszforilálják TSC1/TSC2 komplexet, miáltal az inaktiválódik, így az mTORC1 felszabadul a gátlás alól. Az alacsony energia- vagy oxigénszint is aktivál a TSC1/TSC2-n keresztül. A TSC1/TSC2 komplexben a TSC1 funkciója, hogy stabilizálja a TSC2-t aminek GTPáz aktivitása van. Az adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) hipoxiás, vagy alacsony energiaállapot esetén foszforilálja a TSC2-t, megnövelve annak GTPáz aktivitását, így a Rheb gátolja az mTORC1-et. Aminosavak, főként a leucin és arginin aktiválják az mTORC1-et. Az aminosavak érzékelésének pontos mechanizmusa nem ismert (Martin és Hall 2005, Laplante és Sabatini 2012, Pópulo és mtsai 2012).



**6. ábra:** Az mTOR útvonal sematikus ábrája

Az mTOR útvonal aktiválódását befolyásolja a növekedési faktorok és az aminosavak jelenléte, illetve a sejt energiaszintje. A TSC1/TSC2 komplex gátolja az mTOR útvonalat, a növekedési faktorok a PI3K/AKT útvonalon keresztül, az aminosavak feltehetően közvetlenül gátolják a TSC1/TSC2 komplexet, így az mTOR felszabadul a gátlás alól. Az mTOR fehérje kétféle komplexben fordul elő. Az mTORC2 aktiválódásának folyamata még nem teljesen ismert (Martin és Hall 2005 nyomán)

Az mTORC1 többféle folyamat szabályozásában részt vesz, ilyen a protein és lipid szintézis, riboszóma képződés és autofágia. Fő effektorai a p70 ribosomal protein S6 kinase (RPS6K) és az eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 (4E-BP1). A foszforilált 4E-BP1-hez már nem kötődik az eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E), így az elindítja a cap-dependens transzlációt. Számos olyan transzkriptom (mRNS-ek) transzlációját befolyásolja, amelyek a sejtciklus



progressziójához szükséges fehérjéket kódolják, pl. ciklin D1, ornitin-dekarboxiláz. Az RPS6K számos további effektorot aktivál, amelyek az mRNS-szintézis, transláció és elongáció iniciációjában vesznek részt. Az RPS6K több helyen foszforilálja a riboszómális S6 alegységet, így lehetővé téve a 40S alegység toborzását és a poliszóma kialakulást. Ez elősegíti az 5' terminális oligopirimidin tartalmú mRNS-ek translációját (ezek kódolják a riboszómális fehérjéket és a translációs apparátus komponenseit). Az mTORC1 szabályozza a lipidszintézist is a sterol regulatory element-binding protein 1/2 (SREBP1/2) transzkripció faktorokon keresztül. Hatással van a sejt metabolizmusra és ATP-szintézisre is. A sejtnövekedésre negatív hatása is van, az autofágia szabályozásán keresztül (Martin és Hall 2005, Yecies és Manning 2011, Laplante és Sabatini 2012, Pópulo és mtsai 2012).

Az mTORC2 aktiválódásáról jóval kevesebbet tudunk, mint az mTORC1-ről. A tápanyag-ellátottság nem befolyásolja működését, a növekedési faktorokra viszont reagál. Az mTORC2 szabályozza az AKT fehérjét, a serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1-t (SGK1) és a protein kináz C- $\alpha$  (PKC- $\alpha$ )-t. Az AKT számos folyamatot szabályoz, mint a proliferáció, metabolizmus, apoptózis, túlélés. Az mTORC2 közvetlenül képes foszforilálni az AKT fehérjét a Ser473 pozícióban, amely szükséges a maximális aktivitáshoz. Az SGK1 aktivitás viszont teljes mértékben az mTORC2-től függ. Az PKC- $\alpha$  kinázon keresztül további szerepe van az aktin sejtváza átrendeződésében, a sejtalkak kialakításában (Martin és Hall 2005, Laplante és Sabatini 2012, Pópulo és mtsai 2012).

### 1.2.2. Az mTOR szerepe a daganatok kialakulásában

Az mTOR útvonalhoz, minthogy központi szerepet játszik a fehérjeszintézis, proliferáció és túlélés szabályozásában, számos malignitáshoz vezető defektus társul. Feltehetően az eiF4E olyan proteinek translációját serkenti, amelyek a sejtciklus progressziójában, a sejt túlélésében és metasztázisok képzésében fontosak. A proliferációt a megnövekedett ribszóma biogenezis is elősegíti a fehérjeszintetizáló apparátus biztosításával. Az mTORC2 tumorképzésben való közreműködésére is egyre több bizonyíték van. A tumorsejtekben bekövetkező metabolikus változásokhoz hozzájárul az mTOR aktiválódása. Az mTOR útvonal effektorai, az RPS6K és a 4E-BP1 a fehérjeszintézis serkentésével járulnak hozzá a tumoros sejtnövekedéshez, a

lipidszintézis is fokozódik az SREBP1 aktiválásán keresztül. Serkenti a glikolitikus gén-expressziót (Warburg-effektus), a pentózfoszfát útvonalat, a mitochondriumok képződését és az oxidatív metabolizmust, valamint gátolja az autofágiát (Dazert és Hall 2011, Laplante és Sabatini 2012, Pópulo és mtsai 2012).

Számos tumortípusban (pl. emlő-, colorectalis tumorok, glioblastoma, leukémiák stb.) leírták az mTOR-útvonat komponenseinek (PI3K, PTEN, AKT, Ras és Raf) mutációit. Az mTOR maga ritkán mutálódik. Öröklődő tumorszindrómákban azonosították már a TSC1, TSC2 vagy PTEN mutációit, amelyek az mTOR útvonat fokozott aktivitásához vezetnek (Dazert és Hall 2011). Korábban egyes medulloblastomás esetekben az AKT és extracelluláris signal-regulated kinase (ERK) útvonatok abnormális regulációját figyelték meg. Az ERK emelkedett szintjét találták western blot-tal, az AKT csak kis mértékben emelkedett (Wlodarski és mtsai 2006, Wlodarski és mtsai 2008). Egy extenzív noduláris medulloblastomás esetben az mTOR effektorok foszforilált formáinak, valamint az AKT és ERK emelkedett szintjét mutatták ki (Józwiak és mtsai 2011). A medulloblastomás betegek egy kis részében TSC1 deléciót találtak, mivel közvetetten gátolja az mTOR-t, így károsodása az mTOR útvonat aktivációjához vezethet. Az IGF-mTOR és SHH útvonat kapcsolatát írták le CGNP sejtekben, amely elősegíti a tumor kialakulását (Parathath és mtsai 2008, Bhatia és mtsai 2009, Bhatia és mtsai 2010, Mainwaring és Kenney 2011).

Az mTOR útvonat hozzájárulása a tumorok kialakulásához felvetette annak farmakológiai gátlását a daganatok terápiájában. Az mTOR útvonat legkorábban ismert inhibitora a rapamycin. A rapamycint és analógjait klasszikus mTOR-gátlóknak nevezik. A rapamycin a 12kDa FK506-binding protein (FKBP12) fehérjével alkot komplexet, ez a komplex közvetlenül gátolja az mTOR-t amennyiben az az mTORC1 komplex része, viszont nem tud kötődni az mTORC2 komplexhez, habár a hosszantartó kezelésnek lehet hatása az mTORC2 komplexre is (Sabatini 2006, Sarbassov és mtsai 2006, Dazert és Hall 2011, Laplante és Sabatini 2012, Pópulo és mtsai 2012).

Számos rapamycin származék, úgynevezett rapalóg, áll klinikai kipróbálás alatt. A temsirolimus az első rapalóg, amit a Food and Drug Administration (FDA) elfogadott tumoros betegség kezelésére előrehaladott stádiumú vesekarcinómában. Az everolimust sclerosis tuberosa kezelésében fogadták el. Ezt a genetikai betegséget a TSC1 vagy TSC2 gén hibája okozza, és több szervet érintő benignus daganatok kialakulásával jár. Egyre többféle tumorban tesztelik alkalmazhatóságát, a hatás azonban sokszor elmarad

a várttól. A rapalógok alkalmazhatóságát korlátozzák az mTOR útvonalból induló negatív visszacsatoló mechanizmusok. Az mTORC1 aktiválódása során az RPS6K foszforilálja az inzulin-receptor-szubsztrát-1-et (IRS1), ami ezáltal lebomlik, és csökkenti a PI3K/AKT által közvetített jelet. Az mTORC1 gátlásával ez a visszacsatoló mechanizmus is gátlódik, így a PI3K/AKT útvonal túlzott aktivációja következhet be.

A rapamycin alkalmazhatóságának másik korlátja, hogy csak részben gátolja a 4E-BP1 foszforilációját. Az mTOR-gátlók egy újabb fejlesztésű csoportját alkotják azok az inhibitorok, amelyek az mTORC1 és az mTORC2 komplexet is gátolják. Ezek a molekulák az mTOR kináz-aktivitását gátolják, ATP-kompetitív inhibitorok. Ezek a szerek teljesen blokkolják a 4E-BP1 foszforilációját, így jóval hatékonyabbak a rapalógoknál. Az mTOR és a PI3K katalitikus doménjének hasonlósága vezetett a mindkét kinázt gátló duál-inhibitorok fejlesztéséhez (tehát az mTORC1-t, az mTORC2-t, és a PI3K-t is gátolják). Az NVP-BEZ235 (Novartis) vagy XL-765 (Exelixis) kezeléssel ígéretes eredményeket értek el többféle tumorban (Easton és Houghton 2006, Fouladi és mtsai 2007, Guertin és Sabatini 2007, Maira és mtsai 2008, Dunlop és Tee 2009, Willems és mtsai 2012). A rapamycin és származékai bizonyos medulloblastoma sejtvonalakban hatékonyak, amit *in vivo* kísérletek is alátámasztanak (Buonamici és mtsai 2010, Georger és mtsai 2001, Pei és mtsai 2012).

### 1.3. A DNS-metiltransferázok és szerepük a daganatok kialakulásában

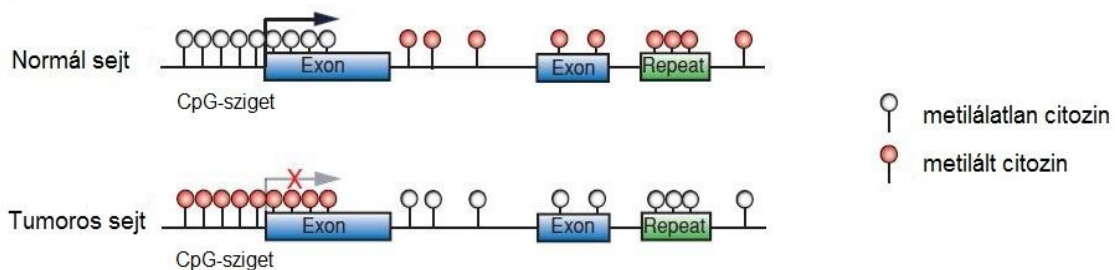
Egyre több adat szól amellett, hogy az epigenetikai változások hozzájárulnak a tumorképződéshez. Az epigenetika olyan molekuláris mechanizmusokat vizsgál, amelyek a DNS bázisszekvenciájának megváltoztatása nélkül befolyásolják a gén működését és öröklődnek az utódsejtekbe. A legtöbbet vizsgált epigenetikai mechanizmusok a hiszton-modifikáció, DNS-metiláció, nukleoszóma remodeling és szabályozás miRNS-ekkel. A hisztonok többféle módosításon mehetnek keresztül (foszforiláció, acetiláció, metiláció), befolyásolva ezzel a kromatin nyitott vagy zárt szerkezetét, ezáltal a transzkripciót segítik vagy gátolják. A DNS-metiláció biztosítja, hogy a megfelelő gén a megfelelő időben expresszálódjon. A tumor kialakulása és fejlődése során az epigenom számos változáson megy keresztül, aberráns metilációs mintázat alakul ki, megváltozik a nukleoszóma szerkezete és a hisztonok modifikációja. Ezek a különböző epigenetikai folyamatok egymással nagyon szoros kapcsolatban

vannak, és a megváltozott génexpresszió kedvez a tumoros folyamatoknak. A genetika és epigenetika együttes működése a tumorfejlődés minden stádiumában kimutatható (Gal-Yam és mtsai 2008, Gros és mtsai 2012, Choi és Lee 2013, Sciuscio és Hegi 2013).

A DNS-metiláció folyamatát a DNS-metiltranszferázok (DNMT-k) végzik, ezek az enzimek katalizálják a S-adenozil-L-metionin metilcsoportjának átkerülését a citozin 5' szénatomjára főként CpG dinukleotidot tartalmazó helyeken. A CpG dinukleotidok sokszor szigetként fordulnak elő, a humán gének promótereinek kb. 60-70%-a tartalmaz CpG-szigetet, aminek metiláltsága a hozzá kapcsolódó gén gátlásához vezet (Saxonov és mtsai 2006, Jurkowska és mtsai 2011, Gal-Yam és mtsai 2008, Gros és mtsai 2012). A DNS-metiláció folyamatában emlősökben háromféle enzim vesz részt, a DNMT1, DNMT3A és DNMT3B. A fehérjecsaldának ismert még egy aktivitással nem rendelkező tagja is (DNMT3L). Az aktív DNMTk egy N-terminális regulációs domént és egy C-terminális katalitikus domént tartalmaznak. A DNMT3A és DNMT3B enzimeket de novo metiltranszferázként tartják számon, a kezdeti metilációs mintázat kialakítását végzik. Fokozottan vannak jelen embrionális szövetben és csírasejtekben. Ezek az enzimek egyforma preferenciát mutatnak a hemimetilált és a metilálatlan DNS-szál iránt. A DNMT3A felel az imprintingért és főként a pericentromerikus DNS régió metiláltságáért, a DNMT3B pedig a centromer régió metilálásáért. A DNMT1 a későbbi metilációs mintázat fenntartásért felel, a DNS-replikáció idején felismeri a hemimetilált DNS-szálat és átmásolja a metilációs mintázatot, preferenciát mutat a hemimetilált DNS-szál iránt. A sejtosztódásnál a DNMT3A és DNMT3B is közreműködik. A DNS-metilációnak tehát fontos szerepe van az embrionális fejlődésben, az őssejtspecifikus gének csendesítésében vagy a pluripotencia fenntartásában, az imprintingben, az X kromoszóma inaktivációjában és a repetitív szakaszok, transzpozonok csendesítésében (Okano és mtsai 1999, Gal-Yam és mtsai 2008, Jurkowska és mtsai 2011, Gros és mtsai 2012, Choi és Lee 2013).

A tumorokban megfigyelték, hogy a DNS általánosan hipometilált, viszont bizonyos promóterek hipermetiláltak (7. ábra). A repetitív DNS-szakaszok alulmetiláltsága és tumorszupresszor gének túlmetiláltsága hozzájárulhat a kromoszómális instabilitáshoz és abnormális génexpresszióhoz, amely elősegíti a tumor kialakulását. A DNS-hibajavító gének hipermetiláltsága azok redukált expresszióját eredményezi, ezek a gének pedig szükségesek a genetikai stabilitás fenntartásához.

Továbbá zavart okozhat a kromoszómális stabilitás fenntartásában azáltal, hogy nem represszálja a repeat és transzpozon elemeket, így megnő az inzerciók valószínűsége. A repetitív szakaszok metiláltsága megvéd a kromoszómális instabilitástól azáltal is, hogy gátolja a homológ rekombinációt (Putiri és Robertson 2011, Gros és mtsai 2012, Sciuscio és Hegi 2013). Genomszintű vizsgálatok alátámasztották, hogy a normál sejtekben metilálatlan promótereknek 5-10%-a metilált különböző tumorokban. Tumorszupresszor gének hipermetiláltságát többféle tumorban megfigyelték már, pl. emlő, vastagbél-daganatok, valamint agytumrok - mint például glioma és medulloblastoma - esetében is. A daganatsejtekben több száz vagy több ezer gén lehet hipermetilált (Dawson és Kouzarides 2012, Choi és Lee 2013). A DNMT-k túlzott expresszáldását is megfigyelték számos daganattípusban, mind mRNS, mind pedig fehérje szinten. Emelkedett DNMT1 expressziót detektáltak gyomorrákban, DNMT1 és DNMT3A emlő és pancreas tumorban, illetve DNMT1 és DNMT3B gliomában (Etoh és mtsai 2004, He és mtsai 2011, Rajendran és mtsai 2011, Subramaniam és mtsai 2014, Yu és mtsai 2015).



**7. ábra:** DNS metilációs mintázat normál és tumoros sejtekben

*Az egészséges sejtekben csaknem az összes CpG dinukleotid metilált és a gének többsége az 5' régióban metilálatlan. A tumoros sejtekben számos CpG-sziget hipermetilálódik, aminek géncsendesítés lesz a következménye, míg globálisan, főként a repetitív szakaszokon alulmetiláltság figyelhető meg (Forrás: Gal-Yam és mtsai 2008)*

A DNS metilációs vizsgálatok medulloblastomában az agytumrok kialakulásában ismertén szerepet játszó tumorszupresszor génekre irányultak, azonban ellentmondásos eredmények születtek. Kivételt képez a RASSF1A gén, amely több vizsgálat szerint is hipermetilált a medulloblastomás esetek nagy részében (Sexton-

Oates és mtsai 2015). Ezekben a korábbi tanulmányokban alkalmazott módszerek (pl. metilációs-specifikus PCR) csak korlátozott számú, specifikus gének metiláltságának vizsgálatát tették lehetővé. Az elmúlt években ugrásszerűen fejlődő genomikai technológia az epigenetikai vizsgálatok lehetőségeit is jelentősen bővítette, és ugrásszerűen megnövelte ismereteinket az epigenomról. Az új-generációs szekvenálás fejlődésével lehetővé vált a dagnatok metilációs mintázat alapú csoportosítása (Gal-Yam és mtsai 2008, Dawson és Kouzarides 2012, Hovestadt és mtsai 2013, Schwalbe és mtsai 2013, Sexton-Oates és mtsai 2015).

A medulloblastoma molekuláris osztályozása eredetileg RNS-alapon történt. Azonban a patológiai laborokban rutinszerűen formalin-fixált paraffinba ágyazott szövetet használnak, az ilyen mintákon végzett osztályozás pontossága elmarad a friss fagyasztott metszetekétől. Vannak vizsgálatok arra, hogy fehérje-alapon immunhisztokémiai módszerrel végezzük a csoportosítást, azonban ennek standardizálása nehéz a különböző patológiai laborok között, a reprodukálhatóság nem biztosított. Ezért előnyös lehet a DNS-alapú csoportosítás, ugyanis stabilabb, mint az RNS, így alkalmasabb archív minták vizsgálatára is. Schwalbe és mtsai (2013) egy több száz gént vizsgáló panelt használtak. A metilációs mintázat alapján 4 csoportot sikerült elkülöníteni, ami jó korrelációt mutatott a más módszerekkel meghatározott korábbi csoportosítással (WNT, SHH, 3-as és 4-es alcsoportok). A minták egy kis csoportját (kb. 6 %) nem sikerült egyetlen kategóriába sem besorolni (Schwalbe és mtsai 2013). Hovestadt és mtsai (2013) egy újabb fejlesztésű egész genomra kiterjedő metilációs tesztet alkalmaztak (Infinium Human Methylation 450 BeadChip array, Illumina). A metilációs csoportosítás itt is nagyon szorosan korrelált a génexpressziós csoportosítással, és szintén alkalmas paraffinos anyag analízisére is (Hovestadt és mtsai 2013).

A DNS-metiláció reverzibilis folyamat, így a DNMT enzimek gátlása terápiás lehetőséget is nyújt. A gátlószerek egyik csoportját a nukleozid-analógok alkotják. Az 5-azacitidin (azacitidine) és az 5-aza-2'-deoxicitidin (decitabine) az FDA által elfogadott gyógyszer, az azacitidine mielodiszpláziás szindrómában (MDS), akut mieloid leukémiában (AML) és krónikus mielomonocitás leukémiában (CMML), a decitabine MDS-ben, AML-ben. Ezek az analógok beépülnek a nukleinsavakba az S-fázis során, és a DNMT-eket irreverzibilisen a DNS-hez kötik. Toxikusságuk és instabilitásuk miatt további analógokat is fejlesztettek. Ezek a szerek hatékonyabbak,

azonban hátrányuk, hogy nem specifikusak a különböző DNMT-kre és súlyos mellékhatással járnak. A DNMT-gátlók másik csoportja a nem-nukleozid inhibitorok, amelyek a DNMT-k katalitikus doménjéhez kötődnek. Ezeket még nem vonták be klinikai tesztelésbe, azonban hozzájárulnak a DNMT-k működésének jobb megértéséhez és a további terápiás fejlesztések alapjául szolgálnak (Gal-Yam és mtsai 2008, Song és mtsai 2011, Gros és mtsai 2012). A DNMT-gátlókkal többféle daganattípusban végeztek már klinikai vizsgálatokat, mint például hematológiai malignitásoknál, melanománál, emlő-, petefészek- és colorectalis daganatoknál. Egyelőre azonban még csak hematológiai malignitásokban mutatkozott biztató eredmény, szolid tumorokban nem sikerült tumorelles hatást igazolni (Goffin és Eisenhauer 2002, Gal-Yam és mtsai 2008, Song és mtsai 2011, Dawson és Kouzarides 2012, Gros és mtsai 2012, Subramaniam és mtsai 2014).

Medulloblastomában *in vitro* és *in vivo* kísérletekben tesztelték a DNMT-gátlókat. A decitabin reaktíválta a tumor supresszor PTCH1 gént medulloblastoma sejtvonalban, kombinálva multi-kináz inhibitorral serkentette az apoptózist. PTCH-knockout egéren végzett kísérletek azt mutatták, hogy DNMT gátló kombinálva hiszton-deacetiláz (HDAC) inhibitorral késleltette a medulloblastoma kifejlődését, bár előrehaladott betegségben nem volt hatásos. További sejtvonalakon végzett vizsgálatok is arra utalnak, hogy DNMT-, HDAC- és tirozin-kináz-gátlók kombinálva hatékonyak lehetnek medulloblastoma kezelésében (Ecke és mtsai 2009, Diede és mtsai 2010, Marino és mtsai 2014).

## 2. Célkitűzések

A medulloblastoma klinikai és molekuláris biológiai jellemzőket tekintve is heterogén. Intenzív kutatások irányulnak a különböző csoportok elkülönítésére, annak érdekében, hogy az eltérő biológiai háttérű tumorokkal rendelkező betegek célzott kezelést kapjanak. A molekuláris biológia fejlődésével a kutatások a molekuláris terápia felé irányulnak. Célunk az volt, hogy új molekuláris markerek vizsgálatával tovább finomítsuk és pontosítsuk a medulloblastoma biológiai háttérének megismerését és új prognosztikai markereket találjunk, amelyek terápiás szempontból is fontosak lehetnek. Az alábbi kérdéseket vizsgáltuk:

- a) az mTOR útvonal mTORC1 ágának aktiválódása megfigyelhető-e primer humán medulloblastoma mintákban (p-mTOR és p-S6 vizsgálata)?
- b) mutat-e az mTORC1 komplex két jellemző fehérjéje, a p-mTOR és p-S6 expressziója összefüggést a betegek klinikai és patológiai jellemzőivel, használható-e prediktív markerként?
- c) a p-mTOR és a p-S6 expressziója mutat-e összefüggést a  $\beta$ -katenin, illetve SFRP1 ellenanyagokkal meghatározott WNT, SHH és nem-WNT/SHH molekuláris alcsoportokkal humán medulloblastomában?
- d) az mTOR útvonal gátlószerei - az mTORC1 komplexet gátló rapamycin és a mTORC1 és mTORC2 komplexet is gátló NVP-BEZ235 – hogyan hatnak medulloblastoma sejtvonalak proliferációjára, és hogyan hatnak kombinálva a medulloblastoma kezelésében használt citosztatikumokkal?
- e) az mTORC1 és mTORC2 komplex fehérjéinek jelenléte *in vitro* medulloblastoma sejtvonalakon hogyan befolyásolja a különböző mTOR-gátlók hatását?
- f) a DNS-metiltransferázok közül a 3 aktív tag, DNMT1, DNMT3a és DNMT3b expresszálódik-e primer humán medulloblastoma mintákban?
- g) mutat-e a DNS-metiltransferázok expressziója összefüggést a betegek klinikai és patológiai jellemzőivel, használható-e prediktív markerként?
- h) van-e összefüggés a DNS-metiltransferázok expressziója és a  $\beta$ -katenin, illetve SFRP1 ellenanyagokkal meghatározott WNT, SHH és nem-WNT/SHH molekuláris alcsoportok között humán medulloblastomában?



### 3. Módszerek

#### 3.1. Immunhisztokémiai vizsgálatok

##### 3.1.1. Betegek és tumorminták

A vizsgálatokhoz 44, 2004 és 2010 között medulloblastomával diagnosztizált beteg formalinban fixált paraffinba ágyazott tumormintáit használtuk fel. A diagnózis felállítása a WHO kritériumok alapján történt. A szövettani alcsoportokat a vizsgálat kapcsán revidáltuk Dr. Turányi Eszter patológus segítségével. A betegek adatai a Magyar Gyermekek Tumor Regiszterből származnak. A betegek kezelése az MBL2004, illetve MBL2008 magyarországi agytumor kezelési sémák szerint történt (Hauser és mtsai 2009).

##### 3.1.2. TMA - blokk készítése

A szöveti microarray (TMA) blokkokat számítógép-vezérelt, a 3DHistech által gyártott TMA Master készülék segítségével állítottuk össze. Előzetesen a hematoxin-eozin festett lemezekon kijelöltük a reprezentatív területeket. A paraffinba ágyazott mintákból 2 mm átmérőjű szövethengereket szűrtünk ki a reprezentatív területnek megfelelő helyekről. Ahol a minta minősége és mennyisége megfelelő volt, két párhuzamossal dolgoztunk. Az ellenanyagok működésének ellenőrzésére egyéb szöveteket (máj, nagyagy, colorectalis tumor, lymphoma, tonsilla, vese, bőr, uterus) vontunk be a TMA blokk készítésébe. A szövetek az Országos Klinikai Idegtudományi Intézetből és a Semmelweis Egyetem I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetből származnak (Etikai engedélyek: TUKEB 100/2012 és 30/2015).

##### 3.1.3. Immunhisztokémiai reakciók

Az elkészített TMA blokkokból 4 µm-es metszeteket vágunk. A metszeteket deparaffinizáltuk xilol és alkohol sorban. Az endogén peroxidázt blokkoltuk metanol-hidrogén-peroxidáz oldatban. Az ellenanyagokat és a felhasználás módját a II. Táblázat foglalja össze. Az mTOR jelátviteli út vizsgálatához anti-pS6 (#2211, Cell Signaling, USA; hígítás 1:150) és anti-p-mTOR (#2976, Cell Signaling, USA; hígítás 1:100) ellenanyagokat használtunk. Az antigénfeltáráshoz citrát pufferben (pH=6,0) elektromos kuktában 20 percig forraltuk a lemezeket. A lószérummal történt blokkolás után 1,5

óráig inkubáltuk az elsődleges ellenanyaggal. A DNS-metiltranszferázok jelöléséhez anti-DNMT1 (hígítás 1:200; Ab19905, AbCam, UK, Cambridge), anti-DNMT3a (hígítás 1:600; Ab13888, AbCam, UK, Cambridge) és anti-DNMT3b (hígítás 1:200; Ab13604, AbCam, UK, Cambridge) ellenanyagokat használtunk. Az antigénfeltárás Tris-EDTA (TE) pufferben (pH=9,0) történt mikrohullámú sütőben 45 percig. A WNT és SHH útvonal aktiválódásának vizsgálatára anti- $\beta$ -katenin (hígítás 1:150; M-3539, DAKO, Denmark) és anti-SFRP1 ellenanyagot (hígítás 1:1500; ab-4193, AbCam, UK, Cambridge) használtunk. Az antigénfeltárást elektromos kuktában végeztük 20 percig történő forralással TE pufferben. A metszeteket az elsődleges ellenanyaggal egy éjszakán át inkubáltuk. Másodlagos jelölő rendszerként Novolink Polymer Detection System (Novocastra, Germany, Wetzlar) kit-et használtunk, 3,3'-diaminobenzidine (DAB) kromogénnel tettük láthatóvá a reakciót, amit hematoxin sejtmagfestés követett. A használt másodlagos antitest alkalmas többféle elsődleges antitest felismerésére (egér IgG, egér IgM és nyúl IgG). A technika polimer alapú, polimer vázra több másodlagos antitestet és tormaperoxidázt kapcsolnak, így a kapott jel jóval erősebb, mint a hagyományos streptavidin-biotinos rendszer.

**II. táblázat:** *A kísérletben felhasznált antitestek*

antitest	feltárás			inkubálás	
	hígítás	puffer	idő	idő	hőmérséklet
anti-p-mTOR	1:100	citrát pH=6	20 perc	1.5 óra	25°C
anti-p-S6	1:150	citrát pH=6	20 perc	1.5 óra	25°C
anti-SFRP1	1:1500	TE pH=9	20 perc	1 éjszaka	25°C
anti- $\beta$ -katenin	1:150	TE pH=9	20 perc	1 éjszaka	25°C
anti-DNMT1	1:200	TE pH=9	45 perc	1 éjszaka	25°C
anti-DNMT3A	1:600	TE pH=9	45 perc	1 éjszaka	25°C
anti-DNMT3B	1:200	TE pH=9	45 perc	1 éjszaka	25°C

### 3.1.4. Az immunhisztokémiai reakciók értékelése

A p-mTOR és p-S6 fehérjék citoplazmatikus reakcióját értékeltük. A p-mTOR esetében a festődés intenzitása egységes volt, 4 kategóriába soroltuk a festődött sejtek aránya alapján: negatív (0 pont; nem volt festődés, vagy 1% alatti), gyenge (1 pont; 1-10%), közepes (2 pont; 11-50%) és erős (3 pont; 51-100%). A p-S6 festődés egyik minta esetében sem haladta meg a 10%-ot, így 3 kategóriát állítottunk fel, negatív (0 pont; nem volt festődés, vagy 1% alatti), gyenge (1 pont; 1-5%) és közepes (2 pont; 6-10%) expresszió. A DNMT-k expressziójánál a sejtmagi jelölődés intenzitását és a festődött sejtek arányát vettük figyelembe. Az intenzitásnak megfelelően 4 pontértéket határoztunk meg, 0 (negatív), 1 (gyenge festődés), 2 (mérsékelt festődés) és 3 (erős festődés). Az immunpozitív sejtek arányát figyelembe véve 5 pontértéket határoztunk meg: 0 (negatív), 1 (1-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%) és 4 pont (76-100% pozitívítás). A két pontérték szorzata alapján (0-12) soroltuk be a mintákat, a 0-3 ponttal rendelkező mintákat negatív/gyenge expressziójú mintaként, a 4-12 ponttal rendelkező mintákat mérsékelt/erős expressziójú mintaként vettünk figyelembe. A mintákat WNT- vagy SHH-aktiválnak tekintettük, ha a sejtmagi  $\beta$ -catenin, vagy SFRP1-t expresszáló sejtek aránya nagyobb volt, mint 10% (Neben és mtsai 2004, Ellison és mtsai 2011, Northcott és mtsai 2011).

## 3.2. Sejttenyészeteken végzett vizsgálatok

### 3.2.1. Sejtvonalak és tenyésztés

Két medulloblastoma sejtvonalat használtunk a vizsgálatokhoz, az egyik a Daoy (ATCC American Type Tissue Culture) a másik pedig az UW228-2 (Dr. J. Silber, University of Washington, Seattle, WA, USA). Mindkét sejtvonalat EMEM (Minimum Essential Medium Eagle, Alpha Modification, M8042, Sigma, St. Louis, USA) tápfolyadékban tenyésztettük kiegészítve 10% hőinaktivált magzati borjú savóval (FCS, Gibco), antibiotikummal (Gentamycin, Sandoz), Na-piruváttal, nem-eszenciális aminosavakkal, és L-glutaminnal (Sigma, St. Louis, USA). A sejteket 37°C hőmérsékleten 5%-os CO<sub>2</sub> koncentráció mellett inkubáltuk 25 vagy 75 mm<sup>2</sup> alapterületű tenyésztőflaskákban. Mindkét sejtvonal adherens, a passzálásuk 3-4 naponta történt Trypsin-EDTA (Sigma) oldat felhasználásával.

### 3.2.2. A sejtek kezelése

A növekedés exponenciális fázisában lévő sejteket tripszin-EDTA kezeléssel eltávolítottuk a tenyésztőflaskák felszínéről, tápfolyadékban összegyűjtöttük, centrifugáltuk, és sejt számolás után 96 lyukú plate-be helyeztük ( $3 \times 10^3$  sejt/lyuk). Miután kitapadtak (24 óra után) a tápfolyadékot lecseréltük a kezelőszert tartalmazó tápfolyadékra. A kezelés időtartama 72 óra volt. Kétféle kezelőszert alkalmaztunk, az egyik az mTORC1 komplexet gátló rapamycin (Sigma) (alkalmazott dózisok 0,5, 5 és 50 ng/ml), a másik szer az NVP-BEZ235 (Cayman Europe, Estonia) - gátolja a PI3K-t és az mTORC1, illetve mTORC2 komplexet is - (alkalmazott dózisok: 0,1 és 1  $\mu$ M). Az mTOR gátlókat kombináltuk citosztaikumokkal. Cisplatint (Ebewe Pharma, Austria) 1  $\mu$ M koncentrációban használtunk mindkét sejt vonalon, etoposide-ot (Ebewe Pharma, Austria) 0,1  $\mu$ M koncentrációban az UW228-2 sejt vonalon, 1  $\mu$ M koncentrációban a Daoy sejt vonalon. Minden kísérletet háromszor végeztünk. A kezeléseknél a választott koncentráció-tartomány korábbi dózishatás vizsgálatokon alapult, illetve mTOR-gátlók esetében a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben más sejt vonalokon hatásos koncentráció-tartományt teszteltük a medulloblastoma sejt vonalokon. A kombinált kezelésnél mérsékelten hatásos koncentrációt (IC:10-20) választottunk.

### 3.2.3. Proliferációs teszt

A sejtek proliferációjának gátlását MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma, St. Louis, USA) teszttel vizsgáltuk 72 órás kezelési idő után. A teszt az élő sejtek arányát méri, azok mitokondriális aktivitásán alapul. A mitokondriálisan ép sejtek a tetrazolium só formázán kristályvá alakítják. A lila formázán kristályokat dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk, és spektrofotometriásan mértük az abszorbanciát 570 nm-en.

### 3.2.4. Immuncitokémia

Tripszines kezelés után 100 000 Daoy és UW228-2 sejtet lemezekre centrifugáltuk Cytospin (Shandon Scientific LTD) centrifugával. A sejteket ezután 10 percig fixáltuk 80%-os metanolban. A lemezeket 4°C-on inkubáltuk egy éjszakán át az elsődleges ellenanyagokkal. A következő antitesteket használtuk, p-mTOR (ab51044, Abcam,

Cambridge, UK), Rictor (ab56578, Abcam, Cambridge, UK), Raptor (ab40768, Abcam, Cambridge, UK) és p-S6 (#2211, Cell Signaling, USA), mindegyiket 1:100 hígításban. Másodlagos antitestként Novolink Polymer Detection System (Novocastra, Wetzlar, Germany) rendszert használtunk, majd DAB kromogénnel tettük láthatóvá. A sejtek festődése homogén volt, így az értékelésnél az intenzitást vettük figyelembe, három fokozatban osztályoztuk: + (gyenge), ++ (közepes) és +++ (erős).

### 3.3. Online elérhető génexpressziós adatbázis felhasználása

Az 'R2: Genomics Analysis and Visualization Platform' (<http://r2.amc.nl>) mRNS experssiós adatait használtuk fel a gének közötti kapcsolat vizsgálatára. Medulloblastomából összesen 11 adatszettet tartalmaz, ezek közül 2-2 azonos eseteket, amelyek a normalizálás módjában, illetve a próbaszettben különböznek. Egy mérés nem volt sikeres. Így összesen 8 adatbázis adatait elemeztük, ezeket a III. táblázat mutatja. Az adatokat log2 transzformációban töltöttük le.

**III. táblázat:** Az R2 segítségével letöltött adatok

	<b>Név</b>	<b>Esetszám</b>
1	Gilbertson	76
2	Kim	30
3	Thompson (MAS5.0)	46
4	Northcott (Core Exon)	103
5	Mack	22
6	Northcott	285
7	Kool	62
8	Delattre	57

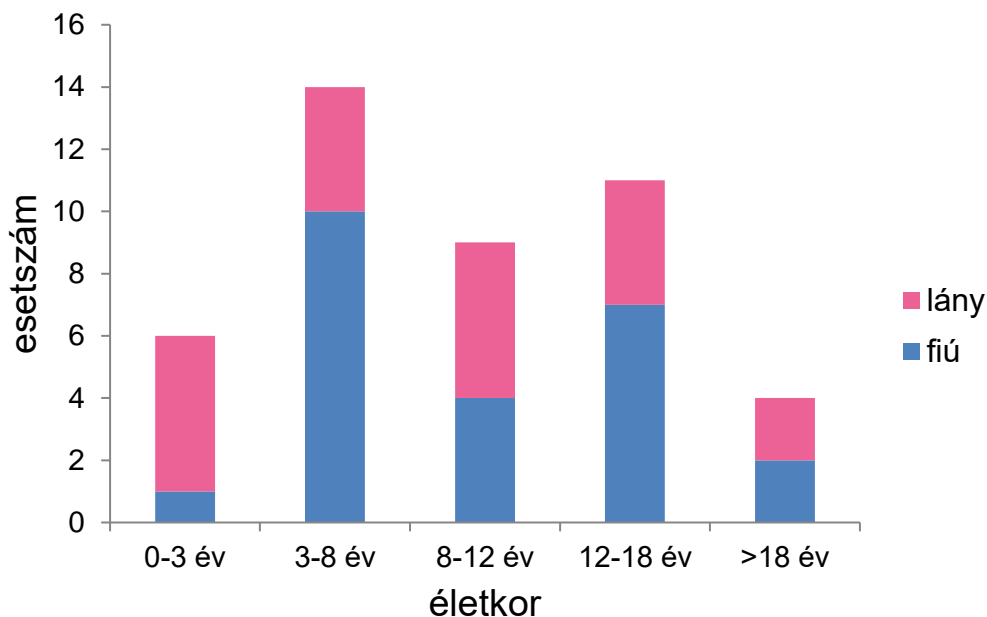
### 3.4. Statisztikai értékelés

Statistica 9.0 (StatSoft) szoftvert használtunk az adatok elemzéséhez. A p-mTOR, p-S6, és a DNMT-k expressziója közötti korrelációt Spearman rank order tesztel vizsgáltuk. A kísérletekben vizsgált fehérjék és a szövettani típus, a betegek neme, a megbetegedési kor (diagnózis) és az egyes molekuláris alcsoportok közötti kapcsolat vizsgálatára Fisher-féle egzakt tesztet és Mann-Whitney U-tesztet használtunk. A túléléssel való kapcsolatot Kaplan-Meier analízissel végeztünk, a statisztikai szignifikancia mérésére

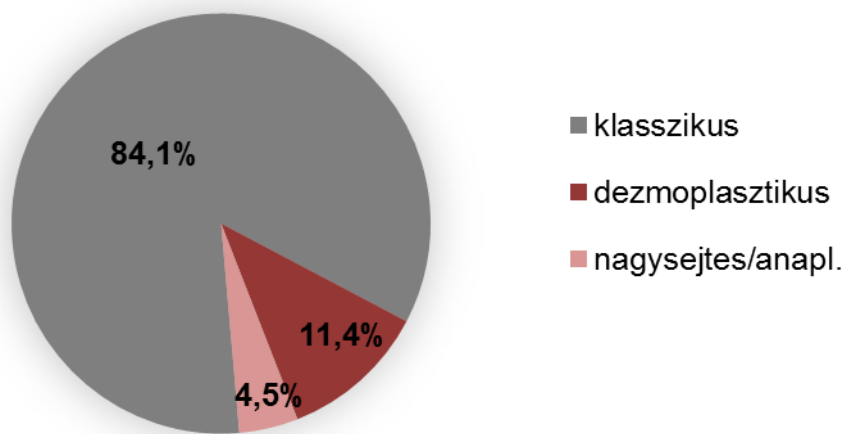
log-rank tesztet alkalmaztunk. Az mTORC1-aktív mintákat hasonlítottuk a nem aktív mintákhoz, az mTORC1 aktivitást mindkét vizsgált fehérje, a p-mTOR és p-S6 együttes expressziójával definiáltuk. A DNMT1, DNMT3a és DNMT3b pozitív és negatív minták túlélését hasonlítottuk össze. Az adatbázisból származó génexpressziós adatok értékelésénél a két gén mRNS expressziója közötti korrelációt Pearson-féle korrelációval vizsgáltuk. A különböző csoportok DNMT1 expresszióját kétoldali t-próbával hasonlítottuk össze. A sejtvonalakon végzett különböző kezelések hatását szintén kétoldali t-próbával vizsgáltuk. A statisztikai szignifikancia szintje  $p < 0.05$ .

#### 4. Eredmények

A páciensek medián életkora 8,5 év (1,1-28,7 év), köztük négyen (10%) fiatal felnőttként (>18 év) betegedtek meg, a fiúk aránya 55%. A 0-3 éves korcsoportban a lányok aránya jóval magasabb (5:1) volt a fiúkénál. A különböző korok szerinti nem megoszlást mutatja a 8. ábra. A tumorminták 84,1%-a mutatott klasszikus, 11,4%-a dezmozoplasztikus és 4,5%-a nagysejtes/anaplasztikus szövettani típust (9. ábra). A túlélési adatok az esetek 90,9% -ában voltak elérhetőek, a medián követési idő 5,6 év. A betegek adatait és az immunhisztokémiai vizsgálatok értékelésének eredményét foglalja össze a IV. táblázat.



8. ábra: A vizsgált medulloblastomás betegek életkor és nemek szerinti megoszlása



9. ábra: A vizsgált medulloblastomás betegek szövettani altípusainak megoszlása

**IV. táblázat:** A vizsgálatba bevont betegek adatai és az immunhisztokémiai reakciók eredménye

(KL: klasszikus, DEZ: dezmozplasztikus, NSA: nagysejtes/anaplasztikus, na: nincs adat, né: nem értékelt, megh.: meghalt)

eset	szöveti diagnózis	nem	kor (év)	állapot	követés (év)	$\beta$ -katenin	SFRP1	p-S6	p-mTOR	DNMT1	DNMT3a	DNMT3b
1	KL	lány	1,18	megh.	0,18	0	0	0	0	0	0	0
2	NSA	fiú	7,84	megh.	1,47	0	1	1	2	9	4	6
3	KL	lány	5,99	megh.	4,56	0	0	0	0	4	9	3
4	KL	lány	14,04	megh.	0,00	0	0	0	0	4	6	8
5	KL	fiú	10,81	megh.	7,98	0	1	2	1	4	8	8
6	KL	lány	3,31	él	9,38	0	0	0	3	6	8	12
7	KL	fiú	13,54	él	9,74	0	0	né	né	8	12	12
8	KL	fiú	17,09	él	8,99	0	1	0	0	2	0	8
9	KL	lány	10,09	megh.	3,07	0	0	1	2	2	8	8
10	DEZ	fiú	14,54	él	9,08	0	0	0	0	1	2	3
11	DEZ	fiú	5,14	megh.	0,59	0	0	1	0	4	4	6
12	KL	lány	17,90	megh.	5,02	0	0	0	0	4	2	8
13	KL	fiú	3,11	megh.	0,92	0	0	1	2	2	1	4
14	KL	lány	4,71	él	8,54	0	0	0	0	4	6	12
15	KL	fiú	15,30	él	7,80	1	0	né	né	2	4	2
16	KL	lány	8,48	él	7,24	0	0	0	1	12	2	2
17	KL	lány	14,28	él	8,09	0	0	1	3	4	8	8
18	DEZ	fiú	6,63	él	7,90	0	1	0	0	3	12	8
19	NSA	fiú	13,84	megh.	1,94	0	1	1	1	4	3	12
20	DEZ	fiú	4,34	megh.	0,09	0	0	1	2	9	12	4
21	KL	fiú	8,56	él	7,00	0	0	0	0	2	4	12
22	KL	fiú	15,46	él	6,52	0	0	né	né	2	8	12
23	DEZ	fiú	2,59	él	6,52	0	1	0	0	4	2	4
24	KL	fiú	4,50	megh.	1,92	0	0	0	1	4	12	3
25	KL	lány	9,30	megh.	5,54	0	0	0	0	8	12	12
26	KL	fiú	6,81	él	6,63	0	0	0	0	4	2	3
27	KL	lány	8,50	él	6,07	0	0	1	2	8	0	12
28	KL	fiú	7,70	él	6,02	0	0	2	0	2	8	8
29	KL	lány	1,77	él	6,76	0	1	0	0	9	8	8
30	KL	lány	4,92	él	6,56	0	0	1	2	6	8	6
31	KL	fiú	22,90	na	na	0	1	0	0	6	4	8
32	KL	fiú	10,76	megh.	5,22	0	0	0	0	2	2	4
33	KL	lány	21,43	na	na	0	1	1	0	6	0	12
34	KL	lány	16,71	él	5,67	0	0	né	né	2	12	1

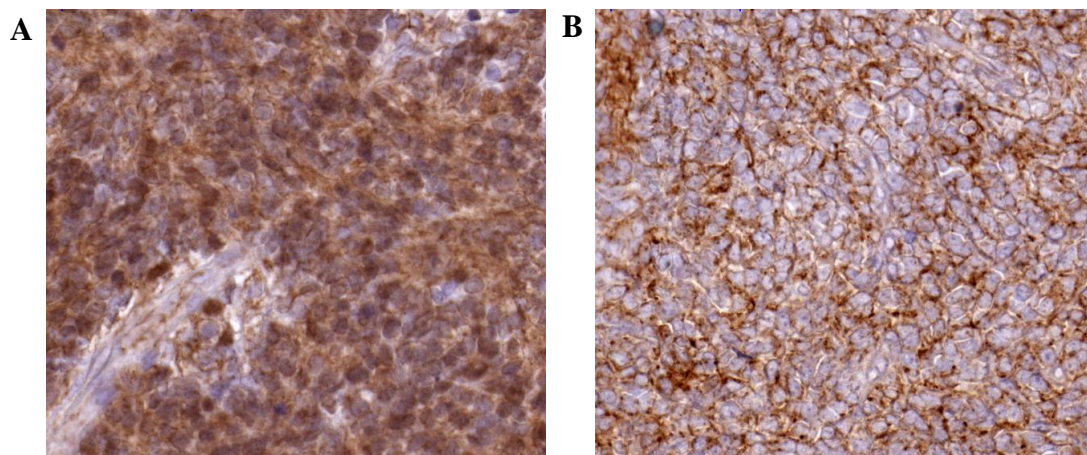


## IV. táblázat folytatása

eset	szöveti diagnózis	nem	kor (év)	állapot	követés (év)	$\beta$ -katenin	SFRP1	p-S6	p-mTOR	DNMT1	DNMT3a	DNMT3b
35	KL	fiú	7,92	él	5,48	0	0	0	0	1	1	4
36	KL	lány	10,75	él	5,65	0	0	1	0	4	4	3
37	KL	lány	1,78	megh.	0,48	0	0	0	0	2	8	6
38	KL	fiú	4,63	él	4,99	0	0	0	0	4	3	4
39	KL	fiú	28,25	na	na	0	1	0	0	9	4	6
40	KL	lány	1,07	él	3,23	0	0	0	0	6	12	3
41	KL	lány	2,84	él	3,12	0	0	0	0	2	8	2
42	KL	fiú	13,18	él	2,80	0	0	0	0	2	8	8
43	KL	lány	28,69	na	na	0	1	0	1	9	12	2
44	KL	fiú	9,68	él	2,12	0	1	0	0	9	12	12

## 4.1. A jellemző útvonalak aktiválódása

A medulloblastomában jellegzetesen hibás jelátviteli utak közül a WNT és SHH útvonalak aktiválódását vizsgáltuk egy-egy jellemző fehérje immunhisztokémiai reakcióval. A 44 páciens közül mindössze 1 esetben figyeltünk meg nukleáris  $\beta$ -katenin expressziót, gyenge intenzitással, így a kis esetszám miatt a WNT-útvonal aktiválódását nem tudtuk bevonni a statisztikai analízisbe. Az SHH útvonalra jellemző SFRP1 fehérje expresszióját 12 beteg (27,3%) mutatta (10. ábra).

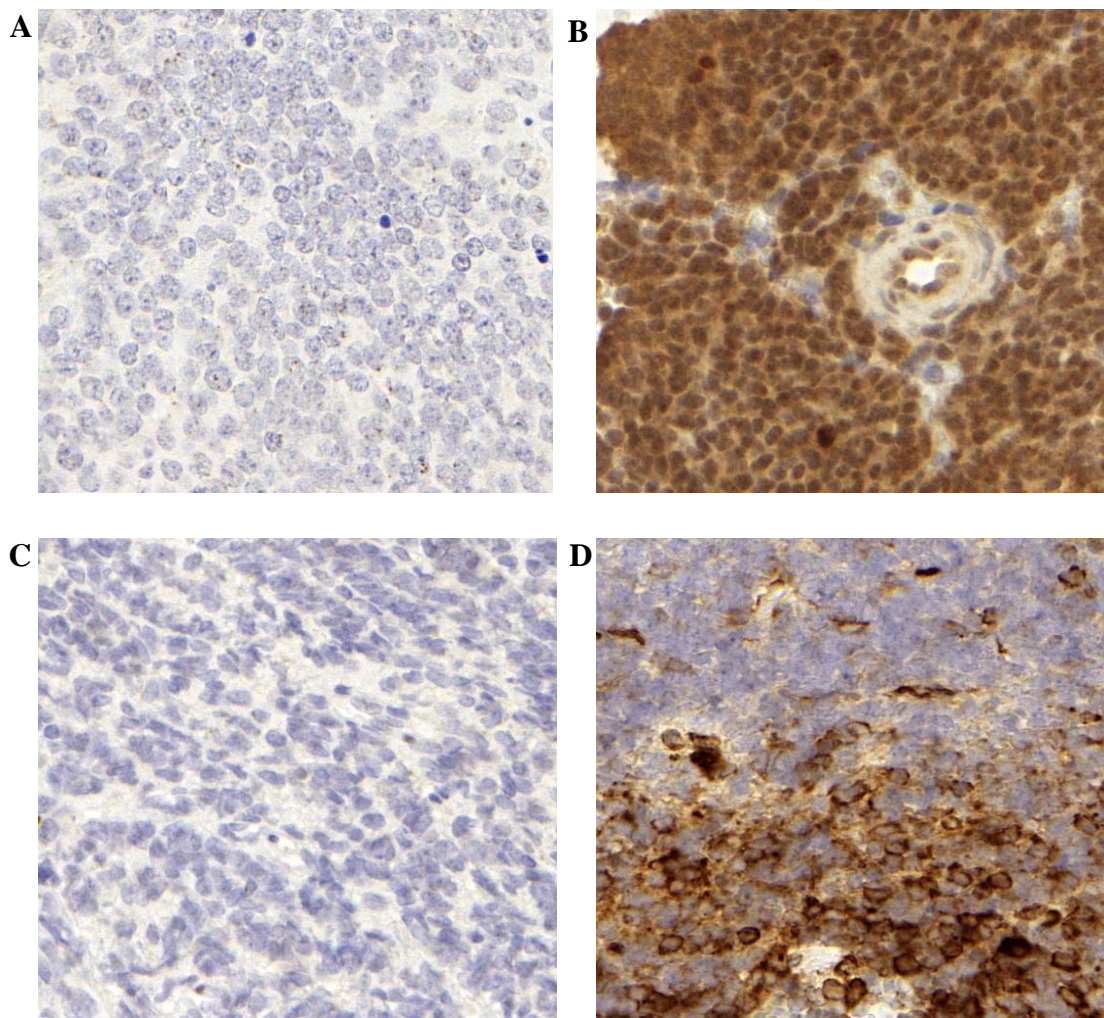


**10. ábra:** WNT és SHH molekuláris alcsoportok meghatározása  $\beta$ -katenin (A) és SFRP1 (B) immunhisztokémiai kimutatásával (nagyítás 340x)

## 4.2. Az mTORC1 útvonal aktiválódása humán medulloblastomás betegekben

### 4.2.1. Szövettani vizsgálatok

Az mTORC1 útvonal aktiválódásának meghatározására magának az mTOR fehérjének, és egyik célmolekulájának foszforilált formáját (p-mTOR és p-S6) teszteltük. A riboszómális S6 fehérje az mTORC1 komplex útvonalán keresztül foszforilálódik, így a két vizsgált fehérje együttes kifejeződése alapján feltehető az mTORC1 útvonal aktivációja. A vizsgálat során 40 páciens értékeltünk. A p-mTOR fehérje expresszióját négy (0-3), a p-S6 fehérje expresszióját három (0-2) fokozatú skálán pontoztuk, a pont értékeket a IV. táblázat mutatja. A betegek 32,5%-a mutatott pozitívítást p-mTOR-ra (1-3 pont), ugyanilyen arányban figyeltünk meg p-S6 pozitívítást (1-2 pont). Reprezentatív immunhisztokémiai reakciókat mutat a 11. ábra. A két fehérje együttes expressziója 9 esetben (22,5%) volt megfigyelhető szignifikáns korrelációt mutatva ( $R=0,55$ ;  $p=0,0002$ ). A p-mTOR-, illetve p-S6-expresszió és a klinikai, illetve patológiai adatok közötti összefüggések vizsgálatának eredményeit az V. táblázat mutatja. Nem találtunk kapcsolatot sem a tumor szövettani típusával, sem a molekuláris altípussal, sem az életkorral, sem pedig a betegek nemével. A molekuláris alcsoportok közül a WNT alcsoport alapján nem elemeztünk, ugyanis csak egy beteg tartozott ebbe a csoportba. A túlélés vizsgálatához a betegeket 2 csoportba osztottuk, a p-mTOR és p-S6 együttes expressziójával definiáltuk az mTORC1 aktivitást mutató betegcsoportot ( $N=9$ ), minden más beteget az mTORC1-inaktív csoportba ( $N=27$ ) soroltunk. A túlélési adatok 36 esetben voltak elérhetőek. A Kaplan-Meier grafikon alapján az a trend látható, hogy az mTORC1 aktív betegeknek alacsonyabb a túlélése, a statisztikai értékelés szerint a különbség nem szignifikáns ( $p=0,13$ ) (12. ábra).



**11. ábra:** *mTORC1* aktivitás kimutatása humán medulloblastoma szövetben  
(A) hiányzó *p-mTOR* expresszió (B) *p-mTOR*-t expresszáló minta (C) hiányzó *p-S6* expresszió (D) *p-S6*-ot expresszáló minta (nagyítás 420x)

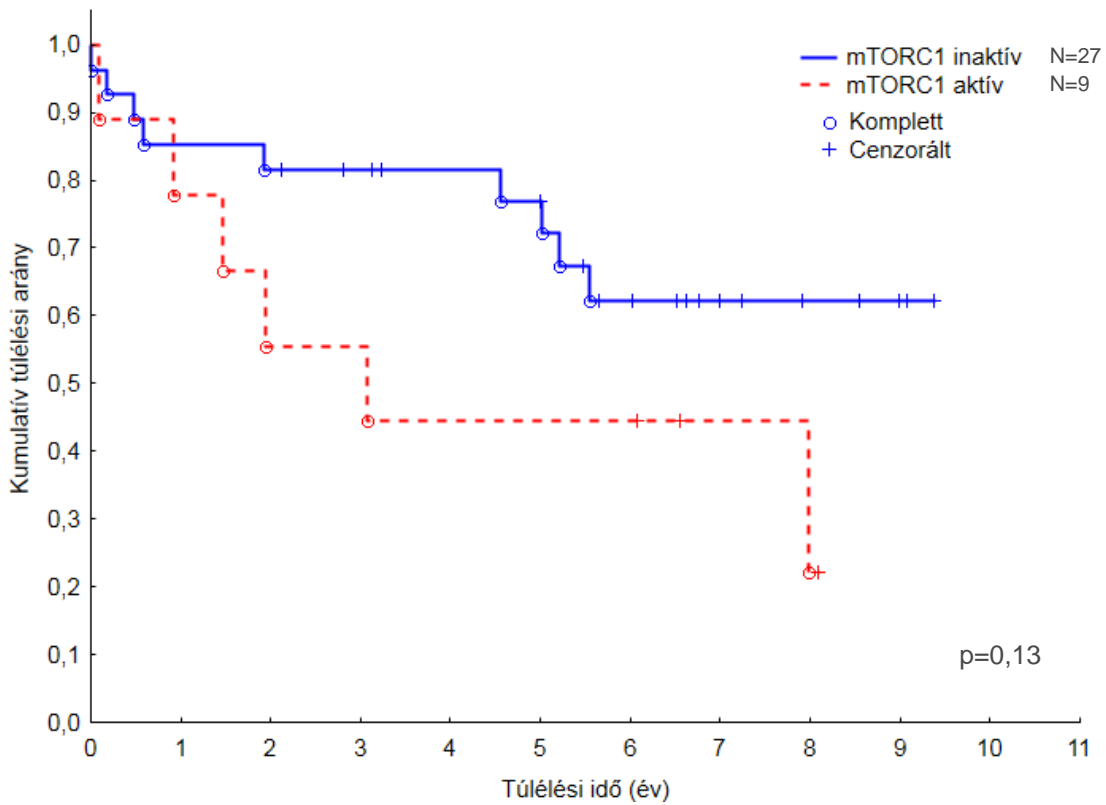
**V. táblázat:** A p-mTOR és p-S6 expresszió és a medulloblastomás betegek klinikai-patológiai jellemzőinek kapcsolata

	Összes	p-mTOR negatív	p-mTOR pozitív	p érték	p-S6 negatív	p-S6 pozitív	p érték
<b>Esetszám (%)</b>	40	27 (67,5%)	13 (32,5%)		27 (67,5%)	13 (32,5%)	
<b>Életkor (median év)</b>	8,2	7,9	8,5	<b>0,97<sup>a</sup></b>	7,9	8,5	<b>0,59<sup>a</sup></b>
<b>Nem</b>							
<b>Fiú</b>	21	15	6	<b>0,74<sup>b</sup></b>	14	5	<b>1,00<sup>b</sup></b>
<b>Lány</b>	19	12	7		13	6	
<b>Szöveti típus</b>							
<b>Klasszikus</b>	33	23	10	<b>1,00<sup>b</sup></b>	24	9	<b>0,62<sup>b</sup></b>
<b>Dezmoplasztikus</b>	5	4	1		3	2	
<b>Nagysejtes/Anapl.</b>	2	0	2	#	0	2	#
<b>Molekuláris altípus</b>							
<b>WNT</b>	0	0	0	#	0	0	#
<b>SHH</b>	12	8	4	<b>1,00<sup>b</sup></b>	8	4	<b>1,00<sup>b</sup></b>
<b>Nem-WNT/SHH</b>	28	19	9		19	9	

<sup>a</sup> Mann-Whitney U-teszt

<sup>b</sup> Fisher-féle egzakt teszt, kétoldali

# nem értelmezhető

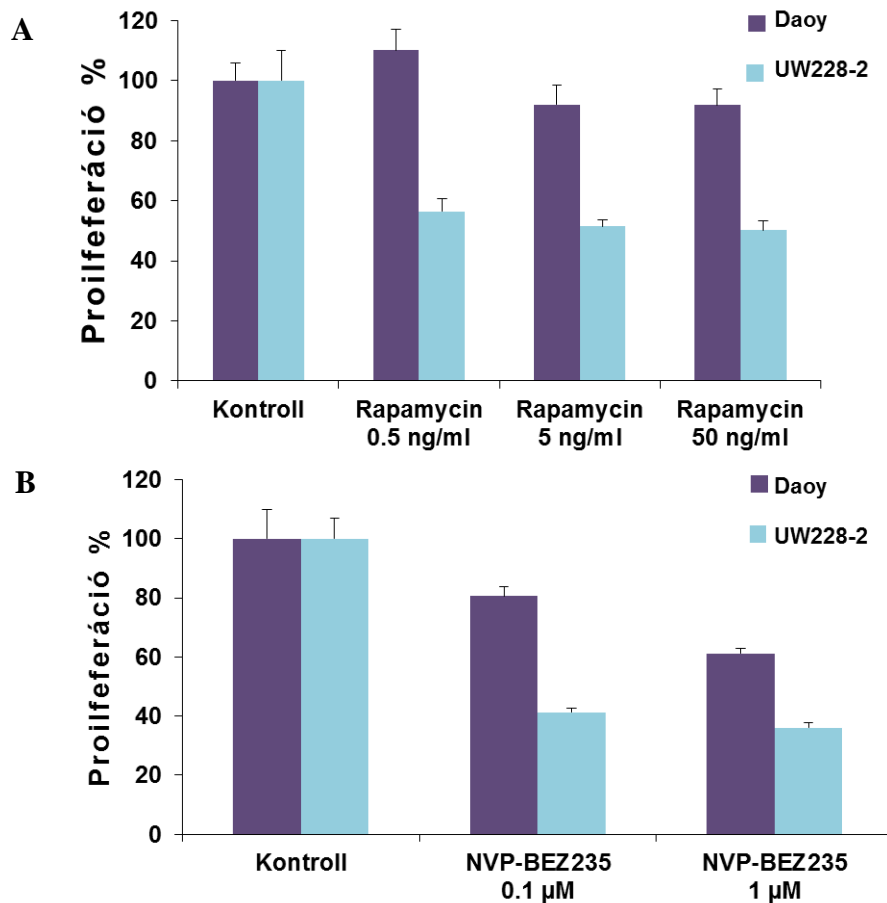


**12. ábra:** Kaplan-Meier túlélési analízis grafikonja, az *mTORC1* aktivitást mutató és *mTORC1* inaktív betegcsoport összehasonlítása

Habár az *mTORC1* aktivitást mutató betegekben a túlélési arány alatta marad az *mTORC1*-et nem expresszáló betegekben, a log-rank teszt alapján a különbség nem szignifikáns ( $N=36$ )

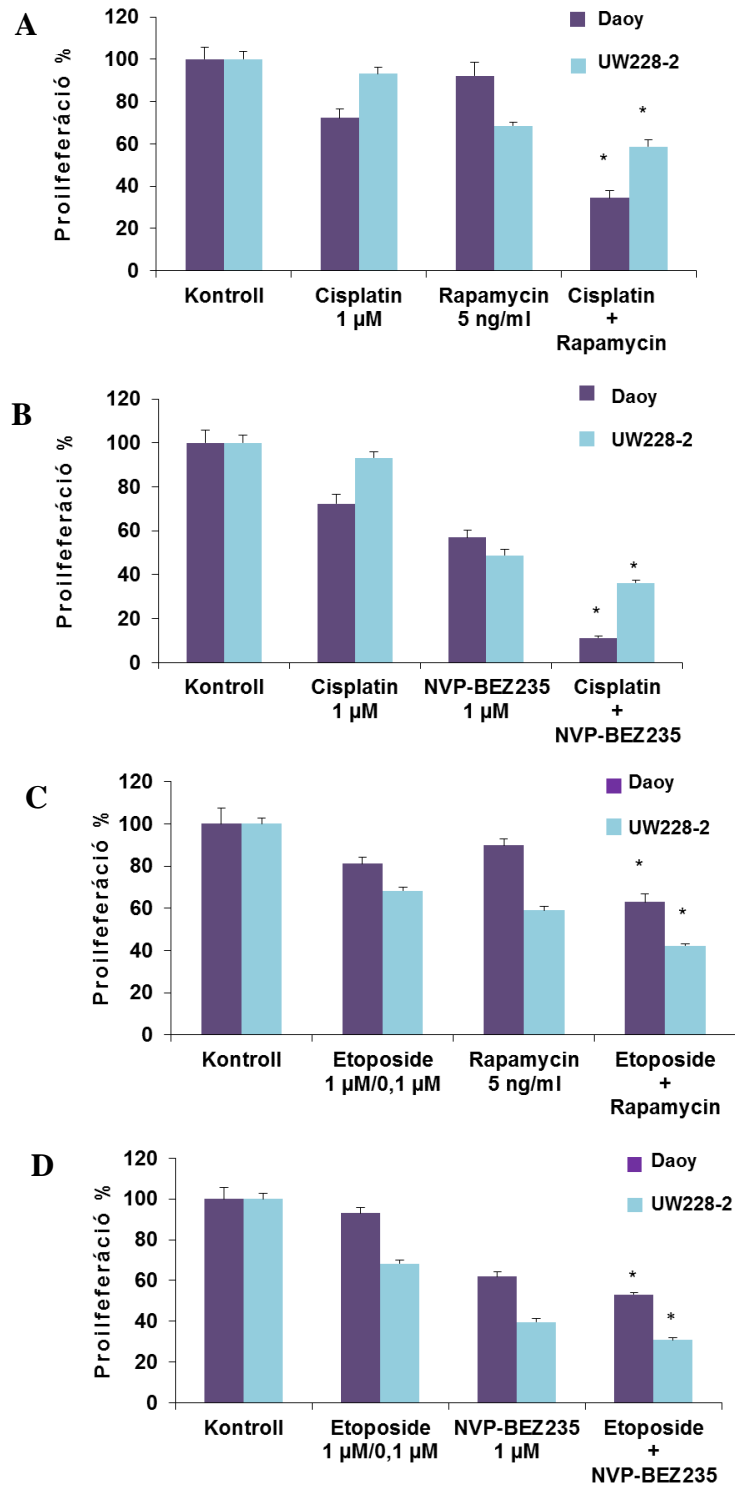
## 4.2.2. Különböző hatásmechanizmusú mTOR-gátlók hatásának vizsgálata

Két medulloblastoma sejtvonalon, Daoy és UW228-2, teszteltük a csak az mTORC1 komplexre ható rapamycin és az mTORC1 és mTORC2 komplexet is gátló NVP-BEZ235 vegyületek hatását. A rapamycin önmagában is gátolta az UW228-2 sejtvonallal proliferációját, a Daoy sejtvonallal proliferációjára viszont nagyon gyenge hatása volt. Az NVP-BEZ235 mindkét sejtvonalon hatásos volt önmagában is, bár az UW228-2 mindkét szerre érzékenyebb volt (13. ábra). Az mTOR-gátlókat kombináltuk citosztatikus szerekkel (etoposide és cisplatin). Mind cisplatinnal, mind etopozide-dal kombinálva, mindkét mTOR-inhibítor szignifikánsan csökkentette a proliferációt az egyik szerrel történő kezeléshez képest (14. ábra).



**13. ábra:** mTOR-gátlók - rapamycin (A) és NVP-BEZ235 (B) - hatása medulloblastoma sejtvonalak (Daoy és UW228-2) proliferációjára

Az UW228-2 sejtvonallal nagyobb érzékenységet mutat mindkét inhibítorra, a Daoy sejtek kevésbé érzékenyek a rapamycinre az alkalmazott koncentrációkban (Az ábra egy reprezentatív kísérletet mutat be három párhuzamosból)



**14. ábra:** mTOR inhibitorok (rapamycin és NVP-BEZ235) és citosztatikus szerek (cisplatin és etoposide) hatása MB sejtvonalakban (Daoy és UW228-2) kombinált kezelésben (folyt.)

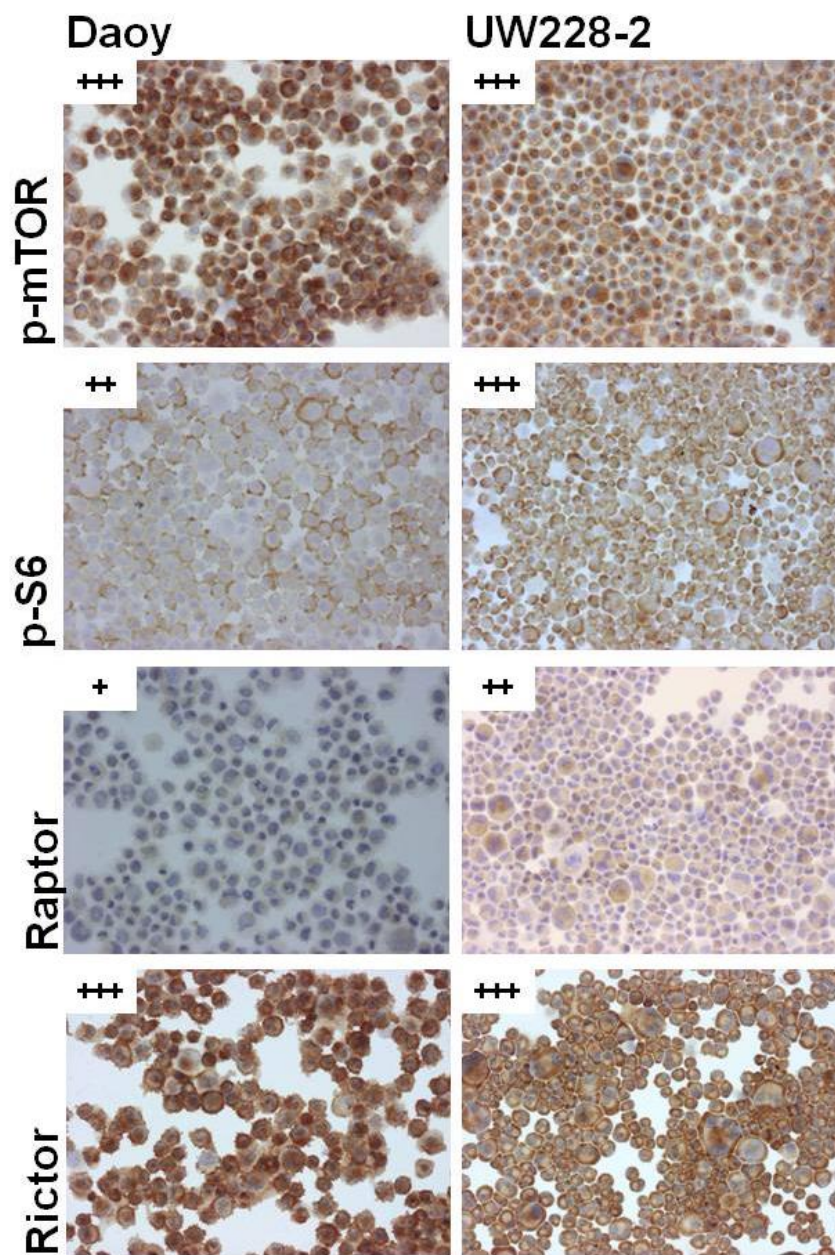


*A proleferáció mértékét a kezeletlen sejtekhez hasonlítottuk. A kombinált kezelés mindkét sejtvonalban szignifikánsan csökkentette a proliferációt a monoterápiában alkalmazott kezelésekhez képest: (A) cisplatin és rapamycin kombinációja (B) cisplatin és NVP-BEZ235 kombinációja (C) etoposide és rapamycin kombinációja (D) etoposide és NVP-BEZ235 kombinációja (Az ábra egy reprezentatív kísérletet mutat be három párhuzamosból, \*  $p < 0,05$ , kétoldali t-próbával értékelve)*

#### 4.2.3. Immuncitokémiai vizsgálatok

Mindkét sejtvonalon teszteltük az mTOR-komplex jellemző fehérjéit, a p-S6-ot, p-mTOR-t, a Raptort és a Rictort. A Daoy sejtek erős p-mTOR és Rictor-pozitivitást mutattak, a p-S6 mérsékelten, a Raptor pedig gyengén expresszáldott. Ez arra utal, hogy a Daoy sejtvonalban az mTORC2 komplex a domináns, az mTORC1 kevésbé aktív. Az UW228-2 sejtek a Raptor kivételével mindegyik fehérjét erősen expresszálják, a Raptor közepes expressziót mutat. Az immuncitokémiai adatok alapján mind az mTORC1 és mTORC2 aktív lehet ebben a sejtvonalban (15. ábra).





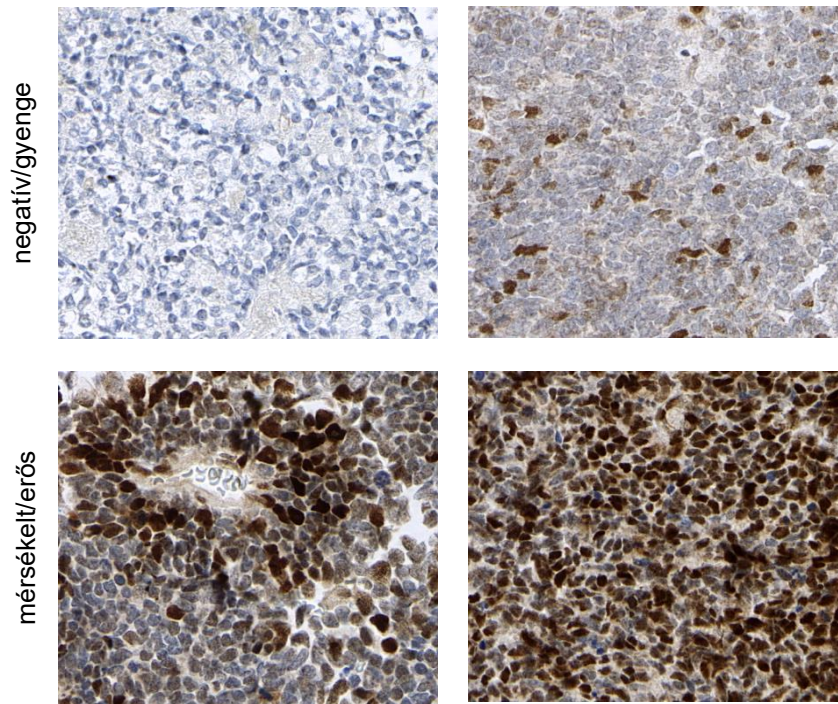
*15. ábra: p-mTOR, p-S6, Rictor és Raptor fehérjék immuncitokémiai reakciója Daoy és UW228-2 sejtvonalakon (nagyítás 200x)*

#### 4.3. A DNS-metiltranszferázok expressziója humán medulloblastomás betegekben

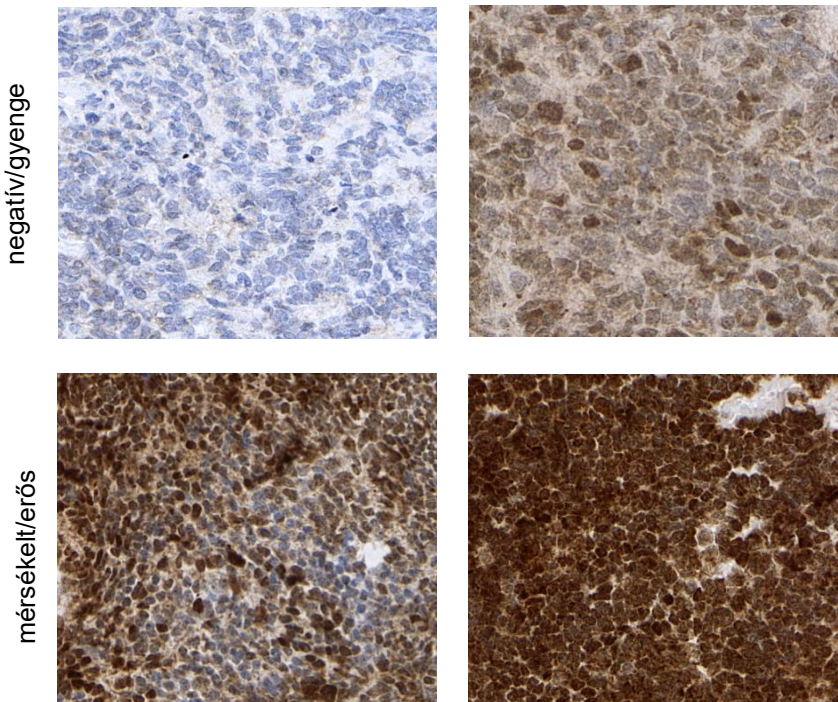
A DNMT-k 3 aktív tagjának, DNMT1, DNMT3A és DNMT3B-nek teszteltük az expresszióját és analizáltuk a betegek adatainak függvényében. A vizsgálat során 44 esetet értékeltünk. A DNMT1, DNMT3A és DNMT3B enzimek emelkedett expresszióját (mérsékelt/erős) figyeltük meg az esetek 63,6%, 68,2% és 72,7% -ában. Jellegzetes immunhisztokémiai festődéseket mutat a 16. ábra. Az egyes DNMT-k nem mutatnak szignifikáns ko-expressziót egymással. A DNS-metiltranszferázok és a klinikai-patológiai paraméterek közti összefüggést teszteltük (VI. táblázat). A nagysejtes/anaplasztikus típust, hasonlóan az mTOR vizsgálatánál, itt is kihagytuk a statisztikai analízisből, a kategóriába tartozó túl kevés eset miatt (2 beteg). A DNMT1 és DNMT3B mindkét betegben mérsékelt/erős expressziót mutatott, a DNMT3A pedig egy esetben. Mérsékelt/erős DNMT1 expresszió figyelhető meg a klasszikus esetek 62,2%-ban és a dezmoplasztikus esetek 60%-ban. Hasonlóan, mérsékelt/erős DNMT3A expresszió figyelhető meg a klasszikus esetek 70,3%-ában és a dezmoplasztikus esetek 60%-ában, illetve DNMT3B a klasszikus esetek 70,3%-ában és a dezmoplasztikus esetek 80%-ában. Nem találtunk szignifikáns összefüggést a DNMT-k expressziója és a tumor szövettani típusa, életkora vagy a betegek neme között. Egyik DNMT expressziója sincs összefüggésben a betegek túlélésével (17. ábra). Az SHH-alcsoport szignifikánsan magasabb DNMT1 expressziót mutat ( $p=0,02$ ). A többi DNMT nem mutatott ilyen összefüggést. Megvizsgáltuk, hogy az adatbázisból elérhető génexpressziós adatok alátámasztják-e a DNMT1 és SFRP1 expresszió közötti kapcsolatot. Az R2 adatbázis több mint 50 000 humán minta mRNS génexpressziós profilját tartalmazza. Az adatok elérhetőek analízis és vizualizáció számára (R2: Genomics Analysis and Visualization Platform, <http://r2.amc.nl>). Az R2 adatbázisból 8 medulloblastoma kohortnak (összesen 681 páciens) a DNMT1 és SFRP1 gének log<sub>2</sub> transzformált génexpressziós adatait töltöttük le. A gének expressziója közötti összefüggést Pearson-féle korreláció-számítással teszteltük. Nem találtunk kapcsolatot a két gén expressziója között ( $R=0.015$ ) (18. ábra).



DNMT1

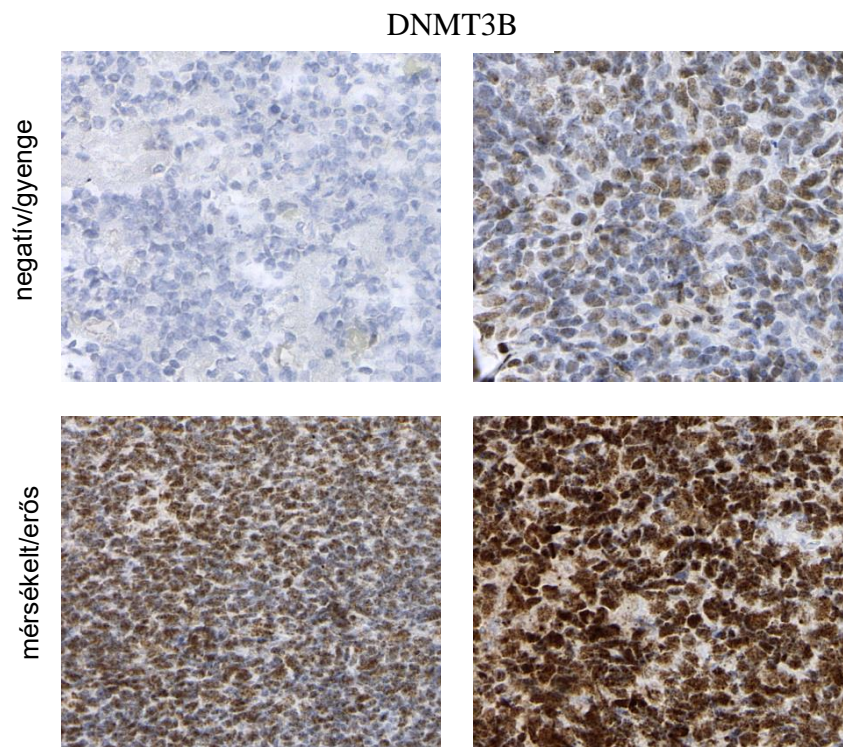


DNMT3A

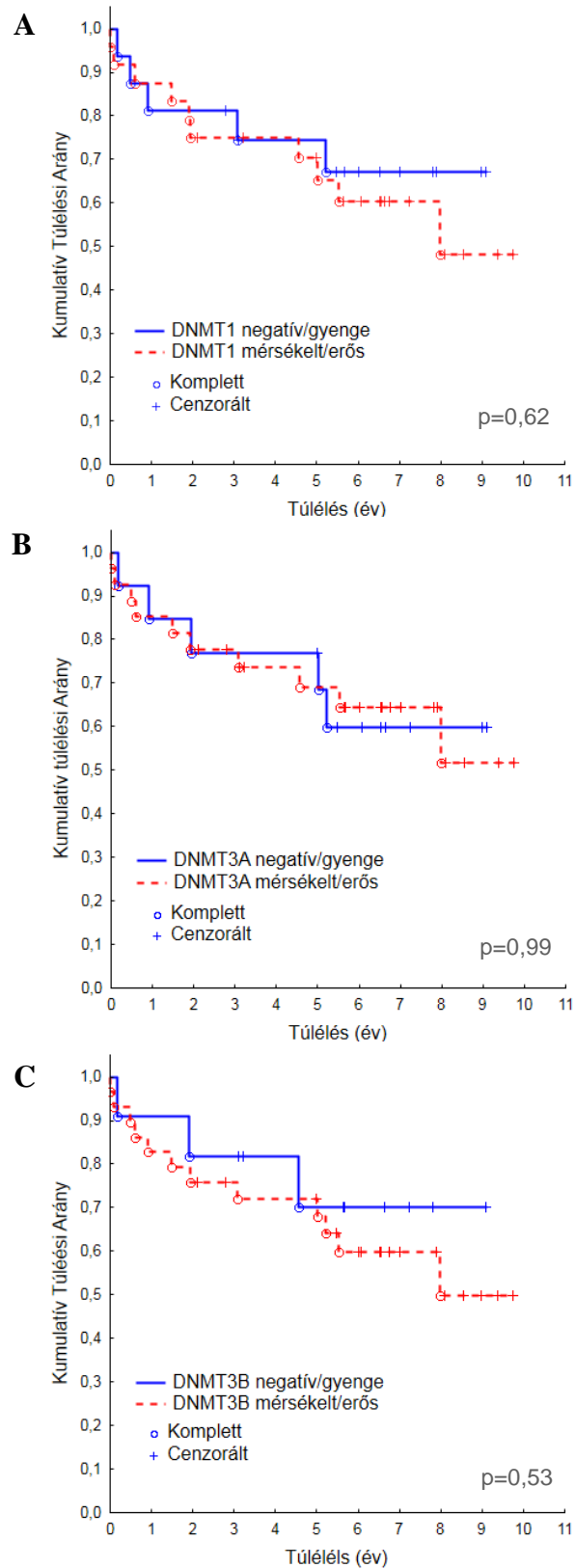


**16. ábra:** DNS-metiltranszferázok immunhisztokémiai kimutatása humán medulloblastoma szöveten (nagyítás 280x)

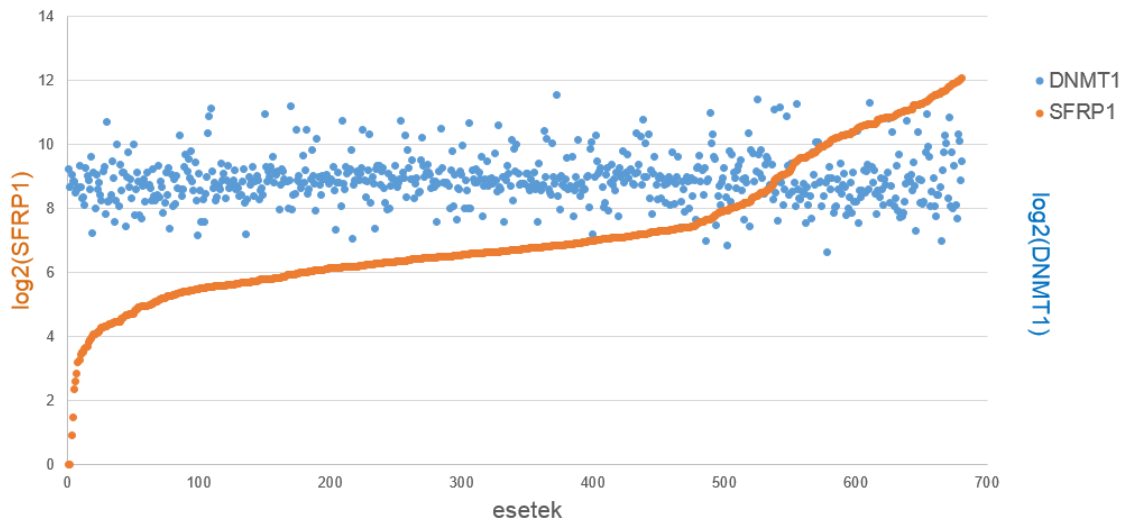
Egy típuson belül a felső két ábra negatív/gyenge, az alsó két ábra mérsékelt/erős expresszióra mutat példát (folyt.)



*16. ábra folytatása*



**17. ábra:** A betegek túlélésének összehasonlítása Kaplan-Meier becslt túlélési vizsgálattal a DNMT1 (A), DNMT3A (B) és DNMT3B (C) expressziójának függvényében (N=40)



**18. ábra:** A DNMT1 és SFRP1 gének mRNA expressziós adatai ( $\log_2$ ) humán medulloblastomában

Az ábra az SFRP1 növekvő expressziója szerint rendezve mutatja a mintákat. A két gén expressziója között mRNA szinten nincs összefüggés

A molekuláris csoportosítás adatai 5 adatbázisnál voltak elérhetőek: „Gilbertson – 76”, „Thompson – 46”, „Northcott – 103”, „Northcott – 285”, és „Kool – 62”. Az SHH alcsoport DNMT1 expresszióját hasonlítottuk a többi alcsoport DNMT1 expressziójához. Összesen 572 mintát vontunk be az analízisbe, ezek közül 122 (21,3%) tartozott az SHH alcsoportba. Az összehasonlításhoz kétmintás t-próbát használtunk, nem volt szignifikáns különbség az SHH és nem-SHH csoport DNMT1 expressziója között ( $p=0,88$ ), abban az esetben sem, amikor a WNT alcsoportot kivettük a vizsgálatból ( $p=0,85$ ).

**VI. táblázat: A DNMT-k expressziójának és a medulloblastomás betegek klinikai-patológiai jellemzőinek kapcsolata**

	Össz.	DNMT1	p	DNMT3A	p	DNMT3B	p
<b>Esetszám (%)</b>	<b>44</b>	16 36,36%	28 63,64%	14 31,82%	30 68,18%	12 27,27%	32 72,73%
<b>Életkor (median év)</b>	<b>8,53</b>	9,33	8,49	8,49	8,93	7,65	8,93
<b>Nem</b>							
<b>Fiú</b>	<b>24</b>	11	13	9	15	4	20
<b>Lány</b>	<b>20</b>	5	15	5	15	8	12
<b>Szöveti típus</b>							
<b>Klasszikus</b>	<b>37</b>	14	23	11	26	11	26
<b>Dezmozlasztikus</b>	<b>5</b>	2	3	2	3	1	4
<b>Nagysejtes/Anapl.</b>	<b>2</b>	0	2	1	1	0	2
<b>Molekuláris altípus</b>							
<b>WNT</b>	<b>1</b>	1	0	0	1	1	0
<b>SHH</b>	<b>12</b>	2	10	4	8	1	11
<b>Nem-WNT/SHH</b>	<b>31</b>	13	18	10	21	10	21

<sup>a</sup> Mann-Whitney U-teszt # nem értelmezhető

<sup>b</sup> Fisher-féle egzakt teszt, kétoldali \* statisztikailag szignifikáns



## 5. Megbeszélés

A medulloblastoma a kisagy malignus daganata, a leggyakrabban előforduló központi idegrendszeri rosszindulatú daganat gyermekkorban. Többféle biológiai folyamat vezethet a kialakulásához, többek között az SHH, WNT, Notch és RTK jelátvitelnek is szerepet tulajdonítanak (Hatten és Roussel 2011, Roussel és Hatten 2011, Jozwiak és mtsai 2007). A jellegzetes útvonalak aktiválódása alapján molekuláris alcsoportokat állapítottak meg a kutatók, azonban az egyre bővülő ismeretek tovább finomítják, árnyalják a képet (Taylor és mtsai 2012, Schroeder és mtsai 2014). A daganatkutatásban és kezelésben egyre nagyobb hangsúlyt kap a személyre szabott és célzott terápia. A medulloblastoma kezelésének fontos kérdései, hogyan csökkenthetőek a terápia okozta mellékhatások, melyek azok a folyamatok, amelyek még befolyásolják a tumor kialakulását, melyek vannak összefüggésben a prognózissal. Munkámban a fehérjeszintézis szabályozásában fontos szerepet játszó mTOR útvonal, valamint az epigenetikai folyamatokban részt vevő DNS-metiltranszferázok prognosztikai szerepére fókuszáltam.

### 5.1. A WNT és SHH útvonalak aktiválódásának vizsgálata

Az utóbbi években derül fény arra, hogy a medulloblastoma molekuláris jellemzők alapján is csoportokra bontható, amelyek eltérnek a betegek demográfiai, patológiai és túlélési jellemzőik tekintetében is. Többféle csoportosítási rendszer látott napvilágot, 3, 4 vagy akár 5 csoportot elkülönítve. Jelenleg a 4 csoportos osztályozás az elfogadott, SHH, WNT, 3-as és 4-es alcsoportok. Az utóbbi két csoport kevésbé jól definiált, és várható hogy a jövőben ez a csoportosítási rendszer további alkategóriákra fog oszlani. A rutin patológiai laborokban nem mindenhol megoldható az RNS microarray módszerrel végzett csoportosítás friss fagyasztott anyagból, ezért törekvések vannak a fehérjealapon, IHC módszerrel történő csoportosításra paraffinos szövet felhasználásával. Ennek azonban hátránya, hogy a különböző laborokban nem feltétlenül reprodukálható. Ezt tapasztaltuk mi is a vizsgálatok során, a mintáinkat Northcott és mtsai (2011) nyomán próbáltuk IHC módszerrel elkülöníteni, azonban a 6 használt antitest közül csak 2 antitest reakciója sikerült értékelhetően. A  $\beta$ -katenin és SFRP1 antitest reakcióját értékeltük. Az SHH alcsoportra jellemző az SFRP1 fokozott



expressziója, a WNT alcsoportra pedig a  $\beta$ -katenin nukleáris akkumulációja (Ellison 2010, Northcott és mtsai 2011, Taylor és mtsai 2012).

Az általunk vizsgált kohortban egy esetben (2,3%) láttunk nukleáris  $\beta$ -katenin expressziót. A WNT-aktivált medulloblastoma gyakorisága 10-15% körül van (Ellison 2010, DeSouza és mtsai 2014, Gerber és mtsai 2014), ez a mi esetünkben jóval kevesebb. Hasonlót figyeltek már meg más tanulmányban is. Egyiptomi betegek hasonló méretű kohortjában (49 beteg) végzett vizsgálat során egy esetben sem mutattak ki  $\beta$ -katenin sejtmagi pozitivitást (Samaka és mtsai 2014). Az SHH-alcsoportba a medulloblastomák kb. 25-30%-a tartozik (Ellison 2010, DeSouza és mtsai 2014), vizsgálatunkban ez az arány hasonló (27,3%).

## 5.2. Az mTOR útvonal vizsgálata

Az mTOR útvonal zavara számos daganat kialakulásának és progressziójának fontos faktora. Integrálja a sejt energiállapotáról, tápanyag-ellátottságáról, a növekedési faktoroktól érkező jeleket és szabályozza a sejt növekedését a fehérjeszintézis, riboszómabiogenezis, lipidszintézis, autofágia folyamatán keresztül (Martin és Hall 2005, Yecies és Manning 2011, Laplante és Sabatini 2012, Pópulo és mtsai 2012).

Az mTOR felé jelet közvetítő PI3K/AKT útvonal és mTOR útvonal aktiválódása medulloblastomában még kevésbé ismert. Wlodarski és mtsai (2006) 10 medulloblastoma eseten vizsgálták a PI3K/AKT/mTOR útvonal foszforilált komponenseinek expresszálódását western blotlalt. A p-AKT és p-ERK emelkedett expresszióját találták az esetek 80%-ban, az mTOR mindössze 1 esetben, a p-S6 60%-ban és a p-4E-BP1 50%-ban mutatott emelkedett szintet. Wlodarsky és mtsai (2008) következő tanulmányában csak klasszikus típusú medulloblastomát választott be, ahol nem találtak jelentős emelkedést az AKT expresszójában. Az ERK-et viszont 75%-ban aktívnak találták. Baryawno és mtsai (2010) viszont az általuk vizsgált összes (36 eset) medulloblastomás mintát pozitívnak találtak p-AKT-ra. Egy extenzív noduláris medulloblastomában szintén kimutatták az mTOR effektorainak túlzott expresszióját (Jozwiak és mtsai 2011). Primer medulloblastoma minták egy kis csoportjában kimutatták TSC1 deléciót, a TSC1/TSC2 komplex elégtelen működése pedig az mTOR aktiválódásához vezethet (Bhatia és mtsai 2009). Ezek az eredmények arra utalnak,

hogy a primer humán medulloblastoma egy csoportjában szerepe lehet az mTOR útvonal aktiválódásának.

Mivel eddig csak kis esetszámon tesztelték az mTOR aktivációt és a patológiai összefüggéseket nem vizsgáltak, ezért humán medulloblastoma mintákon mTORC1 útvonal aktiválódását teszteltük két marker fehérje (p-mTOR és p-S6) immunhisztokémiai vizsgálatával, továbbá vizsgáltuk befolyását a betegek túlélésére vagy egyéb klinikai paraméterekre. Az általunk vizsgált populáció egy kis csoportja (22,5%) mutatott mTORC1 pozitivitást (p-mTOR és p-S6 pozitivitas együttesen jelen van). A p-mTOR és p-S6 expressziója szoros korrelációt mutat. Sem a p-S6 sem pedig a p-mTOR expressziója nem mutat összefüggést a betegek életkorával, nemével, szövettani vagy molekuláris alcsoporttal. Az mTORC1 aktivitást mutató betegek alacsonyabb túlélést mutatnak az mTORC1 inaktív betegekhez képest, bár a különbség nem szignifikáns. A vizsgálatot limitálta a Magyarországon elérhető hasonló módon kezelt betegek alacsony esetszáma. Az mTOR útvonal aktivációját számos tumorban leírták, mint rossz prognózissal társuló marker. Így például diffúz nagy B-sejtes limfómában (Sebestyén és mtsai 2012), leiomyosarcomában (Setsu és mtsai 2013), urothelialis carcinomában (Sun és mtsai 2011) de agydaganatokban is: glioblastomában, illetve gliomában, ahol magas p-S6 expressziót figyeltek meg a kevésbé differenciált tumorban (Yang és mtsai 2011, Pelloski és mtsai 2006). Viszont ovariumban a p-mTOR és p-eIF4E fokozott expressziója a betegek jobb túlélésével társult. Elképzelhető, hogy a fokozott mTORC1 aktivitás egy negatív visszacsatoló körön keresztül gátolja az AKT működését, ami jobb prognózissal társul (Noske és mtsai 2008). Hasonlót figyeltek meg a tüdő adenokarcinómájában, bár ott a teljes (nem-foszforilált) mTOR fehérjét nézték (a formalinos mintákon az idő előrehaladtával csökkent foszforiláció miatt). Az mTOR funkciója nagyon komplex és más útvonalakkal való interakció is befolyásolja a tumorprogresszióban betöltött szerepét (Anagnostou és mtsai 2009). Az mTOR útvonal működése és interakciója más jelátviteli utakkal a különböző tumorokban még további kutatás tárgya.

A személyre szabott és célzott terápia szempontjából fontos kérdés, hogy mely markerek jelzik a páciens érzékenységét a terápiára (Wolff és mtsai 2012). Az mTOR útvonal komponenseinek jelenléte indikálhatja az mTOR útvonal aktiválódását és a páciens érzékenységét az útvonal gátlóival szemben. Ezért kétféle hatásmechanizmusú

mTOR-gátló proliferációgátló hatását teszteltük medulloblasoma sejtvonalakon, megvizsgálva immuncitokémiai módszerrel a két mTOR-komplex jelenlétét ezekben a sejtvonalakban. Teszteltük a p-mTOR jelenlétét, amely mind az mTORC1 mind az mTORC2 komplexben jelen van, illetve a csak az mTORC1-ben szereplő Raptor, és az mTORC1 útvonal targetje a p-S6, valamint a csak az mTORC2 komplexre jellemző Rictor fehérjéket.

A használt gátlószerek a rapamycin, amely egy klasszikus mTOR-gátló, illetve egy újabb fejlesztésű szer, az NVP-BEZ235, amely ún. duál inhibitor. A rapamycinre csak az mTORC1 komplex érzékeny, FKBP-12 proteinhez kötődik, ezáltal megakadályozza a Raptor és mTOR fehérje asszociációját, és az mTORC1 aktiválódását (Sabatini 2006, Dazert és Hall 2011, Laplante és Sabatini 2012, Pópulo és mtsai 2012). Az NVP-BEZ235 kettős inhibitor, a PI3K és mTOR kinázt is gátolja, azáltal hogy ezen enzimek ATP-kötő helyéhez kapcsolódik, így mind az mTORC1 és mTORC2 jelút gátlását eredményezi (Maira és mtsai 2008).

Az eddigi tanulmányok szerint a medulloblastoma sejtvonalak különböző érzékenységet mutatnak az mTOR-gátlókra (Georeger és mtsai 2001, Baryawno és mtsai 2010). Hasonló jelenséget megfigyeltek más sejtvonalak esetében is, pl. emlőtumor sejtvonalakon (Noh és mtsai 2004). Georeger és mtsai (2001) szerint a Daoy érzékeny sejtvonal, és a rapamycin, valamint temsirolimis (CCI-779 rapamycin-analóg) kezelés additív citotoxikus hatást mutatott platinaszármazékkal és topoizomeráz-gátlóval kombinálva. Xenograft modellben a CCI-779 késleltette a tumornövekedést és sejthalált indukált (Georeger és mtsai 2001). Baryawno és mtsai (2010) az AKT részleges foszforilációjáért felelős PDK1-et gátló szer hatását tesztelték medulloblastoma sejtvonalakon, és medulloblastoma xenografton egérben, kombinálva rapamycinnel és rapamycin-analóggal. *In vitro* szinergista hatást figyeltek meg, *in vivo* pedig a rapalóg csökkentette a tumor növekedését, PDK1 inhibitorral kombinálva a gátlás még jelentősebb volt. Buonamici és mtsai (2010) medulloblastoma allograft modellen tesztelték SMO antagonistá szer elleni szerzett rezisztencia kialakulását, amit mind a PI3K-gátló, mind pedig a duál mTOR/PI3K gátló késleltetett (Baryawno és mtsai 2010, Buonamici és mtsai 2010).

Eddig még medulloblastoma sejtvonalon nem tesztelték duál mTOR-inhibitor, és kemoterápiával való kombinált kezelés hatását, ezért kísérletünkben elvégeztük a

kombinációs kezelést a medulloblastoma terápiájában használt citosztatikumokkal. Az eddigi tanulmányok alapján mindkét általunk vizsgált sejtvonal mTOR-gátlók iránti érzékenységét vártuk, habár az általunk használt UW228-2 sejtvonallal azonos tumorból származik az UW228-3, amely klonogén assay-ben érzékenységet mutatott temsirolimusra (dózis  $3\mu\text{M}$  kb, 50%-ra csökkentve a klonogén kapacitást), ezek a sejtvonalak fenotípusosan különböznek (Keles és mtsai 1995, Baryawno és mtsai 2010). Geoerger és mtsai eredményeivel ellentétben a Daoy sejtvonalat nem találtuk érzékenynek a rapamycinre. Geoerger és mtsai kísérletében Daoy sejtvonalban a rapamycin  $1\text{ ng/ml}$  koncentrációban éri el a maximális hatást,  $1\text{-}1000\text{ ng/ml}$  tartományban a dózis növelésével már nem nő a citotoxicitás. Ebben a tartományban a proliferációgátlás 50-60% között van, az általunk használt dózisok közül az  $5\text{-}50\text{ ng/ml}$  koncentrációnál váránk ekkora hatást. Geoerger kísérletéhez képest a mi kísérletünkben más hatásmechanizmusú mTOR-gátlót is alkalmaztunk, amelyre a Daoy sejtvonal érzékeny volt.

Kísérletünkben az UW228-2 mindkét szerre nagyobb érzékenységet mutatott, mint a Daoy sejtvonal. Az mTOR útvonal komponenseinek expressziója a sejtvonalakban tükrözte a sejtek szenzitivitását. Az UW228-2 sejtek magasabb Raptor és p-S6 expressziót mutattak, mint a Daoy sejtek, indikálva az előbbieket nagyobb rapamycin-érzékenységét. A Rictor mennyisége mindkét sejtvonalban magas volt, amely korrelációban van azzal, hogy az NVP-BEZ235 mindkét sejtvonalban hatékonyan gátolta a proliferációt, viszont az UW228-2 sejtvonalban nagyobb mértékben. Tehát a proliferációs teszt eredménye azt mutatta, amit az expressziós mintázat alapján váránk.

Az mTOR-gátlókat kombinálva a medulloblastoma kezelésében használt citosztatikumokkal azt találtuk, hogy a rapamycin és NVP-BEZ235 is szignifikánsan növelte az etoposide és cisplatin hatását. A legerősebb interakciót a Daoy sejteken történő cisplatin és mTOR-gátlók kombinációja mutatta.

A rapamycint kezdetben antifungális szerként használták, később fedezték fel immunszuppresszív hatását, majd daganatellenes szerként is felfedezték. A rapamycin az FKBP12-vel képez komplexet, mely közvetlenül kötődik az mTORC1-hez, gyengíti az interakciót a Raptorral. Az FKBP12-rapamycin komplex nem tud közvetlenül kötődni az mTORC2-höz, ezért gondolták inszenzitívnek. Azonban úgy tűnik,

hosszantartó kezelésnek hatása van az mTORC2-re és az AKT-ra. Bizonyos esetekben feltételezések szerint az FKBP12-rapamycin mTOR-hoz kötődése gátolja a Rictor mSin1 kötődését az mTORC2-ben, de az egyes sejtvonalak közti különbség oka nem ismert. Az mTORC2 rapamycin érzékenysége idő, dózis és sejtfüggő. Tehát a rapamycin univerzálisan gátolja az mTORC1-et, és bizonyos sejtekben az mTORC2-AKT-ot. Az mTOR-inhibitorra való érzékenységet valószínűleg még más faktorok is befolyásolják. Azokban a sejtekben, ahol az mTORC2 gátlás nem működik, az mTORC1 gátlás az AKT aktivációjához vezethet (Sabatini 2006, Sarbassov és mtsai 2006, Guertin és Sabatini 2007, Dunlop és Tee 2009, Dazert és Hall 2011, Laplante és Sabatini 2012, Pópulo és mtsai 2012, Willems és mtsai 2012). A rapamycin klinikai kipróbálása eltérő eredményeket hozott a különböző típusú daganatokban (Easton és Houghton 2006).

Bhatia és mtsai (2009 és 2010) egéren és primer CNGP sejtkultúrán végzett kísérletek alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a TSC-defektus elősegíti az SHH-medulloblastoma kialakulását, medulloblastomás betegek tesztelése során a betegek egy kis csoportjában TSC1 deléciót találtak (Bhatia és mtsai 2009, Bhatia és mtsai 2010). Más tanulmányok szerint az SHH-kezelés megnöveli az eIF4E expresszióját, ami az mTOR útvonaltól függetlenül történik, viszont szupresszálja az RPS6K-t (Parathath és mtsai 2008, Mainwaring és Kenney 2011). Az általunk vizsgált mintákon teszteltük van-e összefüggés az SHH-útvonal aktivációja és a p-S6 expressziója között. Azt találtuk, hogy a p-S6 hasonló mértékű expressziót mutat mind az SHH, mind pedig a nem-WNT/SHH alcsoportban. Ugyanezt tapasztaltuk a p-mTOR, illetve p-S6 és p-mTOR együttes expressziója esetében is.

Eredményeink alapján az mTOR és p-S6 fehérjéknek nincs prognosztikai jelentősége, az mTORC1 aktivált betegek alacsonyabb túlélését statisztikailag nem sikerült igazolni. Azonban nem zárható ki, hogy ennek háttérében elsősorban a rendelkezésünkre álló kis esetszám állhat, és nagyobb esetszámmal esetleg szignifikáns összefüggés lenne igazolható. Sejtvonalakon végzett kísérleteink megerősítik, hogy a mTOR útvonal gátlásának terápiás jelentősége lehet a betegek egy csoportjában. Az mTORC1-gátló klinikai tesztelése gyermekkori szolid tumorokban ezidáig nem hozott eredményt, bár a kemoterápiás kezelésre nem reagáló betegeket vontak be a tesztelésbe (Fouladi és mtsai 2007). Különböző hatásmechanizmusú mTOR-gátlókat fejlesztettek

ki, az mTORC1 és mTORC2 mennyisége kísérletünk szerint tükrözi a különböző gátlókra való érzékenységet. Amennyiben terápiás alkalmazásukra kerülne sor, feltétlenül indokolt lenne az adott beteg tumormintájának vizsgálata annak tisztázása, melyik mTOR-komplex van jelen, és ennek megfelelő gátlószer alkalmazása merülne fel.

### 5.3. A DNS-metiltranszferázok vizsgálata

A DNS-metiltranszferázok felelősek az egyik legfontosabb epigenetikai folyamatért, a DNS citozinjának metilálásáért, vagyis a metilációs mintázatért, amely meghatározza, mely gének csendesedjenek el, vagy expresszálódnak (Gal-Yam és mtsai 2008, Gros és mtsai 2012, Choi és Lee 2013). Kutatások irányulnak arra, hogy az agytumrok különböző típusait elkülönítsék a metilációs profiljuk alapján (Hovestadt és mtsai 2013, Schwalbe és mtsai 2013). A metilációért felelős enzimekről azonban kevés ismeretünk van medulloblastomában. A DNMT családnak négy tagja van, ezek a DNMT1, DNMT3A, DNMT3B és DNMT3L, ez utóbbi nem aktív. A DNMT1 felelős a metilációs mintázat fenntartásáért a sejtek osztódása során, a DNMT3A és DNMT3B enzimeket de novo metiltranszferázként tartják számon és nagy mennyiségben expresszálódnak az embrionális fejlődés során. Egyre több vizsgálat támasztja alá, hogy az epigenetikai változások hozzájárulnak a tumor kialakulásához. A DNS-metiltranszferázok terápiás szempontból is fontosak lehetnek, ugyanis gátolhatóak nukleozid-analógokkal vagy nem-nukleozid inhibitorokkal. Több klinikai vizsgálatot is indítottak ilyen gátlószerekkel, többféle tumorban, többek között hematológiai malignitásokban, melanóma, emlő-, ovárium-, petefészek- és kolorektális daganatokban. Az eredmények a limfoid daganatok esetében biztatóak voltak, azonban a szolid tumoroknál mérsékelt volt terápiás válasz (Goffin és Eisenhauer 2002, Gal-Yam és mtsai 2008, Gros és mtsai 2012, Subramaniam és mtsai 2014).

Munkánk során megvizsgáltuk a DNMT-k expresszióját medulloblastomás betegekben, és ezek összefüggését a betegek klinikai jellemzőivel. Mindhárom DNMT emelkedett expresszióját megfigyeltük a betegek több mint 50%-ában, ami azt sugallja, hogy a DNS-metilációs folyamatok is hozzájárulhatnak a MB kialakulásához. Nem találtunk korrelációt a betegek korával, nemével vagy a tumor szövettani jellemzőivel. A DNMT-k más tanulmányokban sem mutattak összefüggést a betegek kora vagy neme

között (Daniel és mtsai 2010). Számos tumorban megfigyelték, hogy a DNMT-k expressziója rossz prognózissal társul. Például a megnövekedett DNMT1 expresszió a betegség kedvezőtlen kimenetelére utal gyomor, hepatocellularis carcinoma, hasnyálmirigy duktlális adenocarcinómája esetén (Saito és mtsai 2003, Mutze és mtsai 2011, Gao és mtsai 2013). Kísérletünk azt indikálja, hogy a három DNMT közül egyik sem befolyásolja a betegek túlélését. Vizsgálataink alapján tehát úgy tűnik, hogy a DNMT-k expressziójának nincs prognosztikai jelentősége medulloblastomában.

Az SHH alcsoportban szignifikánsan magasabb DNMT1 szintet találtunk. Ennek egyik magyarázata lehet, hogy a DNMT1 az SHH útvonalon keresztül túlszabályozódik ebben a csoportban. Hasonlót figyeltek meg hasnyálmirigy tumorban és MDS-ben (He és mtsai 2011, Zou és mtsai 2015). Medulloblastoma sejtvonalakon végzett kísérletek azt mutatták, hogy DNMT1 gátlószelrel kezelve a sejteket az SFRP1 fehérje expressziója csökken (Kongkham és mtsai 2010). Habár Triscott és mtsai (2013) szerint mindkét sejtvonal az SHH-alcsoportba áll legközelebb génexpressziós vizsgálatok alapján, az SFRP1 gént tekintve a négy vizsgált sejtvonal közül 3-ban, köztük az UW228-ban, alacsony volt az SFRP1 expresszió, csak a Daoy sejtből volt emelkedett. Kongkham és mtsai (2010) azt találták, hogy az SFRP1 a medulloblastoma sejtvonalakban alacsonyabban expresszálódik az SHH-alcsoportba tartozó humán mintákhoz képest. Az eredmények alapján úgy tűnik, habár a sejtvonalakat SHH-alcsoportba sorolták, mégis van különbség az SHH-alcsoportba tartozó primer szövet és a sejtvonalak között. A nem-SHH alcsoportban megfigyelt emelkedett DNMT1 expresszió hátterében más folyamatok lehetnek. A DNS-metiláció és az SHH-útvonal kapcsolatának tisztázására további vizsgálatok szükségesek. Eredményeink megerősítésére megvizsgáltuk a SHH alcsoport és a DNMT1 expresszió összefüggését mRNS szinten, adatbázisban elérhető adatokon. Azonban a statisztikai analízis nem mutatott szignifikáns kapcsolatot, bár az mRNS szintű expresszió nem feltétlenül függ össze a protein mennyiségével.

Az epigenetika és a tumoros folyamatok kapcsolatának feltárása még korai szakaszban jár. A DNS-metiláció reverzibilis folyamat, ezért terápiás gátlása vonzó lehetőség. Így újraaktiválhatóak azok a gének, amelyek a tumoros folyamatok során gátlódtak a hipermetiláció által. Hátránya azonban, hogy nem specifikus, tehát olyan gének is aktiválódhatnak, amelyek éppenhogy károsak (onkogének).

Használhatóságukat tovább korlátozzák a súlyos mellékhatások. Azonban folynak fejlesztések újabb DNMT-inhibitorokra. A különböző epigenetikai folyamatok összefonódása miatt felmerült a HDAC-gátlók és DNMT-gátlók együttes alkalmazása (Goffin és Eisenhauer 2002, Gal-Yam és mtsai 2008, Gros és mtsai 2012). Még mindig keveset tudunk az epigenetikai folyamatok tumorok kialakulásában betöltött szerepéről, azonban a kutatások alapján várható, hogy a jövőben az epigenetikai adatokat is hasznosítja majd a klinikai gyakorlat. Sejteken végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a DNMT-gátlás medulloblastomában apoptózist indukál, egérben végzett vizsgálatok a HDAC és DNMT együttes gátlásának hatását támasztották alá (Fulda és Debatin 2006, Ecke és mtsai 2009). A medulloblastoma metilációs profiljának vizsgálata igazolta, hogy az egyes alcsoportok metilációs mintázatban is eltérnek, és ez alapján megbízhatóan osztályozhatók a 4 molekuláris alcsoportnak megfelelően (Hovestadt és mtsai 2013, Schwalbe és mtsai 2013).

A molekuláris alcsoportok klinikai gyakorlatba történő bevonásával a jövőben várhatóan változni fog a medulloblastoma kockázati besorolása és terápiája. Az újabb és újabb molekuláris markerek segítségével tovább finomodik az osztályozás, és a molekuláris háttér minél pontosabb megismerése hozzásegít a molekulárisan célzott és minél inkább személyre szabott kezelések bevezetéséhez.



## 6. Következtetések

Kutatásaink során először teszteltük az mTORC1 komplexhez köthető jelátvitel és a DNMT-k prognosztikai szerepét medulloblastomában.

- a) Az mTORC1 útvonal a medulloblastomás betegek egy kisebb csoportjában aktív.
- b) Az mTORC1 útvonal aktiválódása a betegség rosszabb prognózisával társulhat, azonban nem érte a statisztikai szignifikancia szintjét. Az mTORC1 útvonal aktiválódása nem mutat összefüggést a tumor szövettani típusával, a betegek életkorával, vagy nemével.
- c) Az mTORC1 útvonal aktiválódása nem mutat összefüggést WNT, SHH vagy nem-WNT/SHH alcsoporttal.
- d) *In vitro* eredményeink megerősítik az eddigi tanulmányokat, és arra utalnak, hogy az mTOR-inhibítorok, az mTORC1 komplexet gátló rapamycin és az mTORC1 és mTORC2 komplexet is gátló NVP-BEZ235, növelhetik a kemoterápia hatékonyságát mTOR-aktivált medulloblastomás betegekben.
- e) *In vitro* vizsgálatunk azt mutatta, hogy az mTOR útvonal komponenseinek expressziója összhangban van a sejtek különböző hatásmechanizmusú mTOR-gátlókra mutatott érzékenységgel.
- f) A humán medulloblasztomák többségében emelkedett a DNMT1, DNMT3A és DNMT3B expressziója, ami felveti a DNMT-inhibítorok terápiás alkalmazásának lehetőségét.
- g) A DNMT-k nem mutatnak összefüggést a betegség kimenetelével, a tumor szövettani típusával, a betegek életkorával, vagy nemével.
- h) A DNMT1 erősebben expresszálódik az SHH alcsoportban. A DNMT3A és DNMT3B nem mutat összefüggést WNT, SHH, vagy nem-WNT/SHH alcsoporttal.

## 7. Összefoglalás

A medulloblastoma a leggyakoribb agytumor gyermekkorban. A multimodális kezelés úgy tűnik elérte maximumát, a betegek 5 éves túlélése 70-90% között van. Az új diagnosztikai markerek és a célzott kezelési stratégiák javíthatják a túlélést és hosszútávon az életminőséget.

Vizsgálataink során a fehérjeszintézis szabályozásában fontos szerepet játszó mTOR útvonal, valamint az epigenetikai folyamatokban részt vevő DNS-metiltransferázok prognosztikai szerepét vizsgáltuk. Paraffinos szövettmintákból TMA blokkot készítettünk és IHC segítségével detektáltuk az mTORC1 útvonal markerfehérjéit (p-mTOR és p-S6), illetve a háromféle aktív DNMT-t. Teszteltük továbbá a WNT alcsoportra jellemző  $\beta$ -katenint és az SHH útvonalra jellemző SFRP1 expresszióját. Kétféle medulloblastoma sejtvonalon vizsgáltuk az mTORC1 gátló rapamycin és mTORC1/mTORC2/PI3K-gátló NVP-BEZ235 hatását a proliferációra citosztatikumokkal kombinálva.

Immunhisztokémiai vizsgálataink alapján az mTORC1 komplex a betegek egy kis csoportjában (22,5%) mutat aktivitást, a DNMT-k a betegek többségében (>50%) emelkedett expressziót mutatnak. Habár az mTORC1-aktív betegek rosszabb túlélést mutattak az mTORC1-inaktív csoporthoz képest, a különbség nem volt szignifikáns. Sem a DNMT1, sem pedig a DNMT3a vagy a DNMT3b expressziója nem befolyásolta a betegek túlélését. A DNMT1 fehérje magasabb expresszióját figyeltük meg az SHH alcsoportban. Adatbázisokból származó mRNS-expressziós adatokat is megvizsgáltunk, mRNS szinten azonban nem találtunk összefüggést. *In vitro* kísérletünkben a rapamycin és NVP-BEZ235 kombinálva kemoterápiás szerrel (cisplatin, etoposide) szignifikánsan nagyobb gátlást eredményezett a monoterápiás kezeléshez képest. A sejtvonalakon végzett ICC vizsgálat alapján az egyes kopmplexekre jellemző fehérjék expressziójának mértéke összhangban van az mTORC1 és mTORC2 gátlókra mutatott érzékenységgel.

Az mTORC1 és a DNMT-k expressziója a medulloblastomás betegek egy részében felveti a specifikus terápiás gátlás lehetőségét, amit mTOR-gátlók esetében *in vitro* is megerősítettünk. A klinikai alkalmazáshoz azonban további kutatások szükségesek.

## 8. Summary

Medulloblastoma is the most common malignant brain tumor in childhood. Multimodal therapy seems to have reached its maximal efficiency, patients can reach even 70-90% 5-years survival. Nowadays, aims of researchers are new diagnostic markers and targeted molecular therapy to improve survival, even at high-risk patients, and to reduce side-effects of therapy.

Our research is focused on the prognostic role of the mTOR pathway, which plays a crucial role in protein synthesis, and of the DNMTs, which are involved in epigenetic processes. TMA block was created from formalin-fixed paraffin-embedded human medulloblastoma samples, and marker proteins for mTORC1 pathway (p-mTOR and p-S6), and the three active DNMTs were detected by IHC. Further, we tested  $\beta$ -catenin and SFRP1 characteristics for WNT and SHH molecular subgroups of medulloblastoma, respectively. *In vitro* cell cultures were used to examine the antiproliferative effect of mTORC1 inhibitor rapamycin and of mTORC1/mTORC2/PI3K inhibitor NVP-BEZ235 combined with cytostatic drugs.

Examining primer human medulloblastoma samples, we have shown that mTORC1 complex was activated in a small subgroup of medulloblastoma (22,5%), and that DNMTs are moderately/highly expressed in the majority of medulloblastoma samples (>50%). Based on our IHC results, neither mTORC1 activation nor DNMT expression could be used as a prognostic marker for medulloblastoma, however, mTORC1-active patients showed inferior survival to mTORC1-inactive patients, difference was not statistically significant. We have found that DNMT1 showed increased expression level in the SHH subgroup. We have analysed mRNA expression data of DNMT1 from *in silico* database, but we did not find correlation with molecular subgroup at mRNA level. According to our *in vitro* examinations, the effect of cytostatic drugs was significantly enhanced by mTOR inhibitors, compared to single-agent treatment. Our ICC studies showed that the expression of mTOR pathway components may predict the sensitivity to mTOR inhibitors in medulloblastoma. Based on our clinicopathological and *in vitro* studies, mTOR and DNMT inhibitors may have a role in the future treatment of a subset of patients with medulloblastoma, but further studies are needed for its application in clinical practise.

## 9. Irodalomjegyzék

- Anagnostou VK, Bepler G, Syrigos KN, Tanoue L, Gettinger S, Homer RJ, Boffa D, Detterbeck F, Rimm DL. (2009) High expression of mammalian target of rapamycin is associated with better outcome for patients with early stage lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 15: 4157-4164.
- Bartlett F, Kortmann R, Saran F. (2013) Medulloblastoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 25: 36-45.
- Baryawno N, Sveinbjörnsson B, Eksborg S, Chen CS, Kogner P, Johnsen JI. (2010) Small-molecule inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling inhibit Wnt/beta-catenin pathway cross-talk and suppress medulloblastoma growth. *Cancer Res*, 70: 266-276.
- Bhatia B, Northcott PA, Hambarzumyan D, Govindarajan B, Brat DJ, Arbiser JL, Holland EC, Taylor MD, Kenney AM. (2009) Tuberous sclerosis complex suppression in cerebellar development and medulloblastoma: separate regulation of mammalian target of rapamycin activity and p27 Kip1 localization. *Cancer Res*, 69: 7224-7234.
- Bhatia B, Nahlé Z, Kenney AM. (2010) Double trouble: when sonic hedgehog signaling meets TSC inactivation. *Cell Cycle*, 9: 456-459.
- Buonamici S, Williams J, Morrissey M, Wang A, Guo R, Vattay A, Hsiao K, Yuan J, Green J, Ospina B, Yu Q, Ostrom L, Fordjour P, Anderson DL, Monahan JE, Kelleher JF, Peukert S, Pan S, Wu X, Maira SM, García-Echeverría C, Briggs KJ, Watkins DN, Yao YM, Lengauer C, Warmuth M, Sellers WR, Dorsch M. (2010) Interfering with resistance to smoothed antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. *Sci Transl Med*, 2: 51ra70.
- Choi JD, Lee JS. (2013) Interplay between Epigenetics and Genetics in Cancer. *Genomics Inform*, 11: 164-173.
- Cochrane DD, Gustavsson B, Poskitt KP, Steinbok P, Kestle JR. (1994) The surgical and natural morbidity of aggressive resection for posterior fossa tumors in childhood. *Pediatr Neurosurg*, 20: 19-29.
- Crawford JR, MacDonald TJ, Packer RJ. (2007) Medulloblastoma in childhood: new biological advances. *Lancet Neurol*, 6: 1073-1085.

- Daniel FI, Rivero ER, Modolo F, Lopes TG, Salum FG. (2010) Immunohistochemical expression of DNA methyltransferases 1, 3a and 3b in oral leukoplakias and squamous cell carcinomas. *Arch Oral Biol*, 55: 1024-1030.
- Dawson MA, Kouzarides T. (2012) Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*, 150: 12-27.
- Dazert E, Hall MN. (2011) mTOR signaling in disease. *Curr Opin Cell Biol*, 23: 744-755.
- DeSouza RM, Jones BR, Lowis SP, Kurian KM. (2014) Pediatric medulloblastoma - update on molecular classification driving targeted therapies. *Front Oncol*, 4: 176.
- Diede SJ, Guenthoer J, Geng LN, Mahoney SE, Marotta M, Olson JM, Tanaka H, Tapscott SJ. (2010) DNA methylation of developmental genes in pediatric medulloblastomas identified by denaturation analysis of methylation differences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 234-239.
- Dunlop EA, Tee AR. (2009) Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms. *Cell Signal*, 21: 827-835.
- Easton JB, Houghton PJ. (2006) mTOR and cancer therapy. *Oncogene*, 25: 6436-6446.
- Ecke I, Petry F, Rosenberger A, Tauber S, Mönkemeyer S, Hess I, Dullin C, Kimmina S, Pirngruber J, Johnsen SA, Uhmman A, Nitzki F, Wojnowski L, Schulz-Schaeffer W, Witt O, Hahn H. (2009) Antitumor effects of a combined 5-aza-2'deoxyctidine and valproic acid treatment on rhabdomyosarcoma and medulloblastoma in *Ptch* mutant mice. *Cancer Res*, 69: 887-895.
- Ellison DW. (2010) Childhood medulloblastoma: novel approaches to the classification of a heterogeneous disease. *Acta Neuropathol*, 120: 305-316.
- Ellison DW, Kocak M, Dalton J, Megahed H, Lusher ME, Ryan SL, Zhao W, Nicholson SL, Taylor RE, Bailey S, Clifford SC. (2011) Definition of disease-risk stratification groups in childhood medulloblastoma using combined clinical, pathologic, and molecular variables. *J Clin Oncol*, 29: 1400-1407.
- Etoh T, Kanai Y, Ushijima S, Nakagawa T, Nakanishi Y, Sasako M, Kitano S, Hirohashi S. (2004) Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers. *Am J Pathol*, 164: 689-699.

- Fisher PG. Embryonal Tumors. In: Gupta N, Banerjee A, Haas-Kogan A (szerk.), Pediatric CNS Tumors, Part of the series Pediatric Oncology. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2004: 83-105.
- Fouladi M, Laningham F, Wu J, O'Shaughnessy MA, Molina K, Broniscer A, Spunt SL, Luckett I, Stewart CF, Houghton PJ, Gilbertson RJ, Furman WL. (2007) Phase I study of everolimus in pediatric patients with refractory solid tumors. *J Clin Oncol*, 25: 4806-4812.
- Fulda S, Debatin KM. (2006) 5-Aza-2'-deoxycytidine and IFN-gamma cooperate to sensitize for TRAIL-induced apoptosis by upregulating caspase-8. *Oncogene*, 25: 5125-5133.
- Gal-Yam EN, Saito Y, Egger G, Jones PA. (2008) Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy. *Annu Rev Med*, 59: 267-280.
- Gao J, Wang L, Xu J, Zheng J, Man X, Wu H, Jin J, Wang K, Xiao H, Li S, Li Z. (2013) Aberrant DNA methyltransferase expression in pancreatic ductal adenocarcinoma development and progression. *J Exp Clin Cancer Res*, 32: 86.
- Garami M, Schuler D, Jakab Z. (2014) Az Országos Gyermektumor Regiszter jelentősége a gyermekonkológiai ellátásban. *Orvosi Hetilap*, 155: 732–739.
- Geoerger B, Kerr K, Tang CB, Fung KM, Powell B, Sutton LN, Phillips PC, Janss AJ. (2001) Antitumor activity of the rapamycin analog CCI-779 in human primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma models as single agent and in combination chemotherapy. *Cancer Res*, 61: 1527-1532.
- Gerber NU, Mynarek M, von Hoff K, Friedrich C, Resch A, Rutkowski S. (2014) Recent developments and current concepts in medulloblastoma. *Cancer Treat Rev*, 40: 356-365.
- Goffin J, Eisenhauer E. (2002) DNA methyltransferase inhibitors-state of the art. *Ann Oncol*, 13: 1699-1716.
- Gottardo NG, Gajjar A. (2008) Chemotherapy for malignant brain tumors of childhood. *J Child Neurol*, 23: 1149-1159.
- Gros C, Fahy J, Halby L, Dufau I, Erdmann A, Gregoire JM, Ausseil F, Vispé S, Arimondo PB. (2012) DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches. *Biochimie*, 94: 2280-2296.

- Gudrunardottir T, Lannering B, Remke M, Taylor MD, Wells EM, Keating RF, Packer RJ. (2014) Treatment developments and the unfolding of the quality of life discussion in childhood medulloblastoma: a review. *Childs Nerv Syst*, 30: 979-990.
- Guertin DA, Sabatini DM. (2007) Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell*, 12: 9-22.
- Hatten ME, Roussel MF. (2011) Development and cancer of the cerebellum. *Trends Neurosci*, 34: 134-142.
- Hauser P, Jakab Z, Kiss C, Szegedi I, Bárdi E, Batyik K, Ottóffy G, Kajtár P, Szűcs R, Nagy K, Cservák J, Masát P, Bálint K, Kordás M, Bognár L, Kocsis B, Vízkeleti J, Kriván G, Kállay K, Benyó G, Schuler D, Garami M. (2009) Előzetes eredmények a medulloblastoma/primitív neuroektodermális tumor (PNET) kezelésében a magyar MBL 2004 kezelési sémával. *Magyar Belorvosi Archívum*, pp 196-201.
- He S, Wang F, Yang L, Guo C, Wan R, Ke A, Xu L, Hu G, Xu X, Shen J, Wang X. (2011) Expression of DNMT1 and DNMT3a are regulated by GLI1 in human pancreatic cancer. *PLoS One*, 6: e27684.
- Hovestadt V, Remke M, Kool M, Pietsch T, Northcott PA, Fischer R, Cavalli FM, Ramaswamy V, Zapatka M, Reifenberger G, Rutkowski S, Schick M, Bewerunge-Hudler M, Korshunov A, Lichter P, Taylor MD, Pfister SM, Jones DT. (2013) Robust molecular subgrouping and copy-number profiling of medulloblastoma from small amounts of archival tumour material using high-density DNA methylation arrays. *Acta Neuropathol*, 125: 913-916.
- Jozwiak J, Grajkowska W, Wlodarski P. (2007) Pathogenesis of medulloblastoma and current treatment outlook. *Med Res Rev*, 27: 869-890.
- Józwiak J, Sontowska I, Bikowska B, Grajkowska W, Galus R, Roszkowski M. (2011) Favourable prognosis in medulloblastoma with extensive nodularity is associated with mitogen-activated protein kinase upregulation. *Folia Neuropathol*. 49: 257-261.
- Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A. (2011) Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem*, 12: 206-222.
- Keles GE, Berger MS, Srinivasan J, Kolstoe DD, Bobola MS, Silber JR. (1995) Establishment and characterization of four human medulloblastoma-derived cell lines. *Oncol Res*, 7: 493-503.

- Kongkham PN, Northcott PA, Croul SE, Smith CA, Taylor MD, Rutka JT. (2010) The SFRP family of WNT inhibitors function as novel tumor suppressor genes epigenetically silenced in medulloblastoma. *Oncogene*, 29: 3017-3024.
- Korshunov A, Sturm D, Ryzhova M, Hovestadt V, Gessi M, Jones DT, Remke M, Northcott P, Perry A, Picard D, Rosenblum M, Antonelli M, Aronica E, Schüller U, Hasselblatt M, Woehrer A, Zheludkova O, Kumirova E, Puget S, Taylor MD, Giangaspero F, Peter Collins V, von Deimling A, Lichter P, Huang A, Pietsch T, Pfister SM, Kool M. (2014) Embryonal tumor with abundant neuropil and true rosettes (ETANTR), ependymoblastoma, and medulloepithelioma share molecular similarity and comprise a single clinicopathological entity. *Acta Neuropathol*, 128: 279-289.
- Laplane M, Sabatini DM. (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149: 274-293.
- Levisohn L, Cronin-Golomb A, Schmahmann JD. (2000) Neuropsychological consequences of cerebellar tumour resection in children: cerebellar cognitive affective syndrome in a paediatric population. *Brain*, 123: 1041-1050.
- Mainwaring LA, Kenney AM. (2011) Divergent Functions for eIF4E and S6 Kinase by Sonic Hedgehog Mitogenic Signaling in the Developing Cerebellum. *Oncogene*, 30:1784–1797.
- Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C, Brachmann S, Chène P, De Pover A, Schoemaker K, Fabbro D, Gabriel D, Simonen M, Murphy L, Finan P, Sellers W, García-Echeverría C. (2008) Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol Cancer Ther*, 7: 1851-1863.
- Marino AM, Frijhoff J, Calero R, Baryawno N, Ostman A, Johnsen JI. (2014) Effects of epigenetic modifiers in combination with small molecule inhibitors of receptor tyrosine kinases on medulloblastoma growth. *Biochem Biophys Res Commun*, 450: 1600-1605.
- Markant SL, Wechsler-Reya RJ. (2012) Review: personalized mice: modelling the molecular heterogeneity of medulloblastoma. *Neuropathol Appl Neurobio*, 38: 228-240.



- Martin DE, Hall MN. (2005) The expanding TOR signaling network. *Curr Opin Cell Biol*, 17: 158-166.
- Massimino M, Giangaspero F, Garrè ML, Gandola L, Poggi G, Biassoni V, Gatta G, Rutkowski S. (2011) Childhood medulloblastoma. *Crit Rev Oncol Hematol*, 79: 65-83.
- Mutze K, Langer R, Schumacher F, Becker K, Ott K, Novotny A, Hapfelmeier A, Höfler H, Keller G. (2011) DNA methyltransferase 1 as a predictive biomarker and potential therapeutic target for chemotherapy in gastric cancer. *Eur J Cancer*, 47: 1817-1825.
- Neben K, Korshunov A, Benner A, Wrobel G, Hahn M, Kokocinski F, Golanov A, Joos S, Lichter P. (2004) Microarray-based screening for molecular markers in medulloblastoma revealed STK15 as independent predictor for survival. *Cancer Res*, 64: 3103-3111.
- Nobusawa S, Orimo K, Horiguchi K, Ikota H, Yokoo H, Hirato J, Nakazato Y. (2014) Embryonal tumor with abundant neuropil and true rosettes with only one structure suggestive of an ependymoblastic rosette. *Pathol Int*, 64: 472-477.
- Noh WC, Mondesire WH, Peng J, Jian W, Zhang H, Dong J, Mills GB, Hung MC, Meric-Bernstam F. (2004) Determinants of rapamycin sensitivity in breast cancer cells. *Clin Cancer Res*, 10: 1013-1023.
- Northcott PA, Korshunov A, Witt H, Hielscher T, Eberhart CG, Mack S, Bouffet E, Clifford SC, Hawkins CE, French P, Rutka JT, Pfister S, Taylor MD. (2011) Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol*, 29: 1408-1414.
- Noske A, Lindenberg JL, Darb-Esfahani S, Weichert W, Buckendahl AC, Röske A, Sehouli J, Dietel M, Denkert C. (2008) Activation of mTOR in a subgroup of ovarian carcinomas: correlation with p-eIF-4E and prognosis. *Oncol Rep*, 20: 1409-1417.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99: 247-257.
- Packer RJ, Zhou T, Holmes E, Vezina G, Gajjar A. (2013) Survival and secondary tumors in children with medulloblastoma receiving radiotherapy and adjuvant

- chemotherapy: results of Children's Oncology Group trial A9961. *Neuro Oncol*, 15: 97-103.
- Parathath SR, Mainwaring LA, Fernandez-L A, Campbell DO, Kenney AM. (2008) Insulin receptor substrate 1 is an effector of sonic hedgehog mitogenic signaling in cerebellar neural precursors. *Development*, 135: 3291-3300.
- Pei Y, Moore CE, Wang J, Tewari AK, Eroshkin A, Cho YJ, Witt H, Korshunov A, Read TA, Sun JL, Schmitt EM, Miller CR, Buckley AF, McLendon RE, Westbrook TF, Northcott PA, Taylor MD, Pfister SM, Febbo PG, Wechsler-Reya RJ. (2012) An animal model of MYC-driven medulloblastoma. *Cancer Cell*, 21: 155-167.
- Pelloski CE, Lin E, Zhang L, Yung WK, Colman H, Liu JL, Woo SY, Heimberger AB, Suki D, Prados M, Chang S, Barker FG, Fuller GN, Aldape KD. (2006) Prognostic associations of activated mitogen-activated protein kinase and Akt pathways in glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 12: 3935-3941.
- Pfister SM, Korshunov A, Kool M, Hasselblatt M, Eberhart C, Taylor MD. (2010) Molecular diagnostics of CNS embryonal tumors. *Acta Neuropathol*, 120: 553-566.
- Pogorzala M, Styczynski J. (2010) Central nervous system malignancies. *Journal of Pediatric Sciences*, 2: e27.
- Pópulo H, Lopes JM, Soares P. (2012) The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci*, 13: 1886-1918.
- Putiri EL, Robertson KD. (2011) Epigenetic mechanisms and genome stability. *Clin Epigenetics*, 2: 299-314.
- Pritchard-Jones K, Kaatsch P, Steliarova-Foucher E, Stiller CA, Coebergh JW. (2006) Cancer in children and adolescents in Europe: developments over 20 years and future challenges. *Eur J Cancer*, 42: 2183-90.
- Rajendran G, Shanmuganandam K, Bendre A, Muzumdar D, Mujumdar D, Goel A, Shiras A. (2011) Epigenetic regulation of DNA methyltransferases: DNMT1 and DNMT3B in gliomas. *J Neurooncol*, 104: 483-494.
- Roussel MF, Hatten ME. (2011) Cerebellum development and medulloblastoma. *Curr Top Dev Biol*, 94: 235-282.
- Sabatini DM. (2006) mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer*, 6: 729-734.

- Saito Y, Kanai Y, Nakagawa T, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, Hirohashi S. (2003) Increased protein expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 is significantly correlated with the malignant potential and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. *Int J Cancer*, 105: 527-532.
- Samaka RM, Abd El-Wahed MM, Kandil MA, Abdelzaher E, Shaaban MI, Abd Allah R. (2014) Immunohistochemical localization of  $\beta$ -catenin in medulloblastoma. *Menoufia Med J*, 27: 10-15.
- Samkari A, White JC, Packer RJ. (2015) Medulloblastoma: toward biologically based management. *Semin Pediatr Neurol*, 22: 6-13.
- Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. (2006) Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*, 22: 159-168.
- Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. (2006) A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 1412-1417.
- Schuler D. (2010) A kemoterápia szerepe a gyermekkori medulloblastoma kezelésében. *Hungarian Oncology*, 54: 145–152.
- Schwalbe EC, Williamson D, Lindsey JC, Hamilton D, Ryan SL, Megahed H, Garami M, Hauser P, Dembowska-Baginska B, Perek D, Northcott PA, Taylor MD, Taylor RE, Ellison DW, Bailey S, Clifford SC. (2013) DNA methylation profiling of medulloblastoma allows robust subclassification and improved outcome prediction using formalin-fixed biopsies. *Acta Neuropathol*, 125: 359-371.
- Sciuscio D, Hegi ME. Epigenetics and Brain Cancer. In: Watts C (szerk), *Emerging Concepts in Neuro-Oncology*. Springer-Verlag, London, 2013: 21-40
- Sebestyén A, Sticz TB, Márk A, Hajdu M, Timár B, Nemes K, Nagy N, Váradi Z, Kopper L. (2012) Activity and complexes of mTOR in diffuse large B-cell lymphomas--a tissue microarray study. *Mod Pathol*, 25: 1623-1628.
- Setsu N, Kohashi K, Endo M, Yamamoto H, Tamiya S, Takahashi Y, Yamada Y, Ishii T, Matsuda S, Yokoyama R, Iwamoto Y, Oda Y. (2013) Phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 in soft tissue leiomyosarcoma is associated with a better prognosis. *Int J Cancer*, 132: 109-115.

- Sexton-Oates A, MacGregor D, Dodgshun A, Saffery R. (2015) The potential for epigenetic analysis of paediatric CNS tumours to improve diagnosis, treatment and prognosis. *Ann Oncol*, 26: 1314-1324.
- Song SH, Han SW, Bang YJ. (2011) Epigenetic-based therapies in cancer: progress to date. *Drugs*, 71: 2391-2403.
- Subramaniam D, Thombre R, Dhar A, Anant S (2014) DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Front Oncol*, 4: 80.
- Sun CH, Chang YH, Pan CC. (2011) Activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway correlates with tumour progression and reduced survival in patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Histopathology*, 58: 1054-1063.
- Takei H, Bhattacharjee MB, Rivera A, Dancer Y, Powell SZ. (2007) New immunohistochemical markers in the evaluation of central nervous system tumors: a review of 7 selected adult and pediatric brain tumors. *Arch Pathol Lab Med*, 131: 234-241.
- Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho YJ, Clifford SC, Eberhart CG, Parsons DW, Rutkowski S, Gajjar A, Ellison DW, Lichter P, Gilbertson RJ, Pomeroy SL, Kool M, Pfister SM. (2012) Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol*, 123: 465-472.
- Triscott J, Lee C, Foster C, Manoranjan B, Pambid MR, Berns R, Fotovati A, Venugopal C, O'Halloran K, Narendran A, Hawkins C, Ramaswamy V, Bouffet E, Taylor MD, Singhal A, Hukin J, Rassekh R, Yip S, Northcott P, Singh SK, Dunham C, Dunn SE. (2013) Personalizing the treatment of pediatric medulloblastoma: Polo-like kinase 1 as a molecular target in high-risk children. *Cancer Res*, 73: 6734-6744.
- Turányi E, Hanzély Z, Bálint K, Reiniger L. (2013) A patológus szerepe a központi idegrendszer tumorainak diagnosztikájában, a terápia tervezésben. Prognosztikus és prediktív markerek vizsgálata. *Magyar Onkológia*, 57: 215–221.
- Wang J, Wechsler-Reya RJ. (2014) The role of stem cells and progenitors in the genesis of medulloblastoma. *Exp Neurol*, 260: 69-73.
- Willems L, Tamburini J, Chapuis N, Lacombe C, Mayeux P, Bouscary D. (2012) PI3K and mTOR signaling pathways in cancer: new data on targeted therapies. *Curr Oncol Rep*, 14: 129-138.

- Włodarski P, Grajkowska W, Łojek M, Rainko K, Józwiak J. (2006) Activation of Akt and Erk pathways in medulloblastoma. *Folia Neuropathol*, 44: 214-220.
- Włodarski PK, Boszczyk A, Grajkowska W, Roszkowski M, Jozwiak J. (2008) Implication of active Erk in the classic type of human medulloblastoma. *Folia Neuropathol*, 46: 117-122.
- Wolff JE, Brown RE, Buryanek J, Pfister S, Vats TS, Rytting ME. (2012) Preliminary experience with personalized and targeted therapy for pediatric brain tumors. *Pediatr Blood Cancer*, 59: 27-33.
- Yang J, Liao D, Wang Z, Liu F, Wu G. (2011) Mammalian target of rapamycin signaling pathway contributes to glioma progression and patients' prognosis. *J Surg Res*, 168: 97-102.
- Yecies JL, Manning BD. (2011) mTOR links oncogenic signaling to tumor cell metabolism. *J Mol Med (Berl)*, 89: 221-228.
- Yu Z, Xiao Q, Zhao L, Ren J, Bai X, Sun M, Wu H, Liu X, Song Z, Yan Y, Mi X, Wang E, Jin F, Wei M. (2015) DNA methyltransferase 1/3a overexpression in sporadic breast cancer is associated with reduced expression of estrogen receptor-alpha/breast cancer susceptibility gene 1 and poor prognosis. *Mol Carcinog*, 54: 707-719.
- Zou J, Hong Y, Tong Y, Wei J, Qin Y, Shao S, Wang C, Zhou K. (2015) Sonic hedgehog produced by bone marrow-derived mesenchymal stromal cells supports cell survival in myelodysplastic syndrome. *Stem Cells Int*, 2015: 957502.

## 10. Saját publikációk jegyzéke

### 10.1. A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények

1. **Pócza T**, Sebestyén A, Turányi E, Krenács T, Márk Á, Sticz TB, Jakab Z, Hauser P. (2014) mTOR pathway as a potential target in a subset of human medulloblastoma. *Pathol Oncol Res*, 20: 893-900.

**IF: 1,855**

2. **Pócza T**, Krenács T, Turányi E, Csáthy J, Jakab Z, Hauser P. (2016) High expression of DNA methyltransferases in primary human medulloblastoma. *Folia Neuropathol*, 54: 105-113.

**IF: 1,233**

### 10.2. A disszertációtól független saját közlemények

1. Himer L, Csóka B, Selmeczy Z, Koscsó B, **Pócza T**, Pacher P, Németh ZH, Deitch EA, Vizi ES, Cronstein BN, Haskó G. (2010) Adenosine A2A receptor activation protects CD4+ T lymphocytes against activation-induced cell death. *FASEB J*, 24: 2631-2640.

**IF: 6,515**

2. Hauser P, Vancsó I, **Pócza T**, Schuler D, Garami M. (2013) Gyermekkori központi idegrendszeri daganatok éréjdonképződés-gátló kezelésének magyarországi eredményei a Kieran-sémával. *Magyar Onkológia*, 57: 259–263.

**IF: -**

3. Thompson EM, Hielscher T, Bouffet E, Remke M, Luu B, Gururangan S, McLendon RE, Bigner DD, Lipp ES, Perreault S, Cho YJ, Grant G, Kim SK, Lee JY, Rao AA, Giannini C, Li KK, Ng HK, Yao Y, Kumabe T, Tominaga T, Grajkowska WA, Perek-Polnik M, Low DC, Seow WT, Chang KT, Mora J, Pollack IF, Hamilton RL, Leary S, Moore AS, Ingram WJ, Hallahan AR, Jouvét A, Fèvre-Montange M, Vasiljevic A, Faure-Contier C, Shofuda T, Kagawa N, Hashimoto N, Jabado N, Weil AG, Gayden T, Wataya T, Shalaby T, Grotzer M, Zitterbart K, Sterba J, Kren L, Hortobágyi T, Klekner A, László B, **Pócza T**,

Hauser P, Schüller U, Jung S, Jang WY, French PJ, Kros JM, van Veelen MC, Massimi L, Leonard JR, Rubin JB, Vibhakar R, Chambless LB, Cooper MK, Thompson RC, Faria CC, Carvalho A, Nunes S, Pimentel J, Fan X, Muraszko KM, López-Aguilar E, Lyden D, Garzia L, Shih DJ, Kijima N, Schneider C, Adamski J, Northcott PA, Kool M, Jones DT, Chan JA, Nikolic A, Garre ML, Van Meir EG, Osuka S, Olson JJ, Jahangiri A, Castro BA, Gupta N, Weiss WA, Moxon-Emre I, Mabbott DJ, Lassaletta A, Hawkins CE, Tabori U, Drake J, Kulkarni A, Dirks P, Rutka JT, Korshunov A, Pfister SM, Packer RJ, Ramaswamy V, Taylor MD. (2016) Prognostic value of medulloblastoma extent of resection after accounting for molecular subgroup: a retrospective integrated clinical and molecular analysis. *Lancet Oncol*, 17: 484-495.

**IF: 26,509**

## 11. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki mindazoknak, akik segítségemre voltak és támogattak munkám során:

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Hauser Péternek, akihez mindig bizalommal fordulhattam, köszönöm segítségét, útmutató tanácsait és pozitív hozzáállását.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Patológiai Doktori Iskola volt, és jelenlegi vezetőjének, Prof. Dr. Kopper Lászlónak, és Prof. Dr. Kovalszky Ilonának támogatását.

Köszönöm Prof. Dr. Matolcsy András igazgató úrnak, hogy lehetővé tette számomra kísérleteim elvégzését az I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben. Köszönettel tartozom az I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet munkatársainak, akikhez bármikor fordulhattam kérdéseimmel, kéréseimmel. Köszönöm Dr. Turányi Eszternek, hogy megismertette velem a medulloblastoma szövettanát és segítséget nyújtott a kiértékelésben. Köszönöm Dr. Sebestyén Annának és Dr. Krenács Tibornak a kísérletek elvégzésében nyújtott segítségét, és hogy szakmai kérdéseimmel mindig fordulhattam hozzájuk. Köszönöm a Tumorbiológia és a Digitális Patomorfológia Munkacsoport többi munkatársának segítségét is. Külön köszönet Dr. Márk Ágnesnek és Dr. Sticz Tamásnak a rengeteg technikai segítségért és biztatásért. Csorba Gézáné Maricának nagy hálával tartozom a sejttenyésztésben nyújtott segítségéért és baráti támogatásáért. Köszönettel tartozom Makrainé Parsch Editnek és Kaminszky Zsuzsának a metszetek elkészítéséért és Editnek az immunfestésben nyújtott segítségért, valamint Kiss Renátának és Bratu Zitának a megfestett metszetek digitalizálásáért.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Szabó Andrásnak, hogy lehetővé tette a munkámat a II. sz. Gyermekgyógyászati Klinikán, továbbá a Klinika munkatársainak, Dr. Garami Miklósnak a medulloblastoma molekuláris csoportosításának biztosításáért, és Dr. Jakab Zsuzsannának a betegek adatainak biztosításáért. Köszönöm Csáthy Jánosnak a metszetek kiértékelésében nyújtott segítségét. Köszönöm Dr. John Silbernek (University of Washington) az UW228-2 sejtvonal biztosítását.

Külön köszönöm jelenlegi főnökömnek, Prof. Dr. Oláh Editnek (Országos Onkológiai Intézet), hogy támogatta doktori munkám befejezését.

Hálásan köszönöm családomnak, páromnak és barátaimnak a támogatást, türelmet és bátorítást.