

Prognosztikus biomarkerek vizsgálata különböző daganattípusokban

Doktori tézisek

Nagy Ádám

Semmelweis Egyetem

Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Györfly Balázs D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Tantos Ágnes Ph.D., tudományos főmunkatárs

Dr. Hritz István Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Alpár Alán D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Vannay Ádám Ph.D., tudományos főmunkatárs

Dr. Szüts Dávid Ph.D., tudományos főmunkatárs

Dr. Than Nándor Gábor Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest

2020

1. Bevezetés

A doktori értekezésemben rosszindulatú daganatok prognosztikus biomarkereinek vizsgálatával foglalkozom. Az első vizsgált biomarker a KRAS mutáció volt nem-kissejtes tüdőrákban, amelynek a túlélésben, valamint a terápiás válasz kialakításában való szerepe vitatott. A KRAS mutációk prognosztikus hatását először vastagbél-daganatban írták le, azonban ezeket az eredményeket későbbi tanulmányok nem tudták alátámasztani.

A második témában vizsgált, az akut mieloid leukémiában leggyakrabban mutált NPM1 génnek kiemelt szerepe van a sejtek citoplazmikus fehérjéinek megváltozásában, amely hozzájárul a leukemogenezis folyamatához. Az NPM1 mutációk főként a mieloid sejtekre jellemzőek, mivel a fehérjék aberráns citoplazmatikus lokalizációja, a csontvelőből vagy a perifériális vérből származó limfoid sejtek esetében nem figyelhető meg. Az NPM1 szomatikus mutációk gyakran együtt fordulnak elő az FLT3 génben található „internal tandem duplikációkkal” (ITD), DNMT3A, IDH1 és IDH2 mutációkkal. Fontos kiemelni, hogy az NPM1 mutációk kiemelkedő prognosztikus markerek az akut mieloid leukémiában, valamint az optimális kezelési stratégia kiválasztásában is jelentős szerepük van, azonban ennek a molekuláris háttere jelenleg még kevésbé ismert.

A hepatocelluláris karcinómában számos olyan biomarkert azonosítottak, amelyek lehetővé teszik a daganat pontosabb molekuláris besorolását, előrejelzik a várható túlélést és a terápiára adott választ. A korábban publikált mikro-RNS és mRNS alapú biomarkerek prognosztikus értékének alacsony

reprodukálhatósága jelzi egy összetettebb vizsgálati módszer kidolgozásának szükségességét a változatos etiológiájú daganatokban.

A daganatok kialakulásában számos gén játszik szerepet, ezeket korábbi tanulmányok nyolc nagy funkcionális csoportba – úgymint a sejtosztódás fenntartása, a tumorszuppresszorok gátlása, az érképződés serkentése, a genom instabilitás fenntartása, az energia metabolizmus átprogramozása, a metasztázis indukálása, a sejthalál rezisztencia kialakítása és a DNS replikáció fenntartása –, úgynevezett daganat jellemzőkbe sorolták. Azonban jelenleg nincs olyan vizsgálat, amely különböző daganattípusokban vizsgál a fentebb említett nyolc daganattényezővel kapcsolt génkifejeződési változásokat, valamint ezek hatását a betegek túlélésére.

2. Célkitűzés

A munkám során a célkitűzéseim a következők voltak az egyes témákkal kapcsolatban:

2.1. Céлом volt a szomatikus KRAS mutációkkal összefüggő transzkriptomikus mintázat prognosztikus hatásának vizsgálata nem-kissejtes tüdőrákban.

2.2. A dolgozatom második részében céлом volt megvizsgálni, az NPM1 mutációk génexpresszióra és a betegek túlélésre gyakorolt hatását akut mieloid leukémiában és ezeket a változásokat igazolni klinikai betegmintákon is.

2.3. A kutatásom során további célom volt a korábban publikált mRNS és mikro-RNS alapú prognosztikus biomarkerek prognosztikus szerepének igazolása több független génkifejeződési adatbázis felhasználásával a máj hepatocelluláris karcinómában.

2.4. A munkám utolsó részében célom volt a daganattényezőkkel összefüggő gének kifejeződése és a túlélés közötti kapcsolat vizsgálata, valamint a nyolc fő daganatjellemező által meghatározott transzkriptomikus mintázatok prognosztikus hatásának vizsgálata, különböző daganattípusokban.

3. Módszerek

3.1. mRNS expressziós adatok feldolgozása

Az mRNS expressziós adatokat két nyilvánosan elérhető adatbázisból töltöttem le: a teljes RNS szekvenálási adatok a The Cancer Genome Atlas (TCGA) genomikai együttműködési programból származtak. Az mRNS kifejeződési adatoknak egy másik típusa, a microarray génexpressziós adatok, a National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus (NCBI GEO) adatbázisból származott.

A TCGA programból összesen 28 tumortípus adata került letöltésre és feldolgozásra, amelyek esetében legalább 100 minta volt elérhető. A nyers adatok normalizálását DESeq

algoritmussal végeztem, amely a negatív binomiális eloszláson alapul.

A microarray génexpressziós adatokat a nem-kissejtes tüdőrák, akut mieloid leukémia és a máj hepatocelluláris karcinóma esetén használtam fel. A génexpressziós adatok normalizálását MAS5 algoritmussal végeztük, amely az „affy” R Bioconductor programcsomag része.

3.2. miRNS expressziós adatok feldolgozása

Az mRNS expressziós adatokhoz hasonlóan, a mikro-RNS expressziós adatok is a TCGA és az NCBI GEO adatbázisokból származtak. Klinikai adatokkal összekapcsolt mikro-RNS expressziós adatbázist a máj hepatocelluláris karcinóma esetén hoztunk létre.

Az Illumina HiSeq 2000 eljárásán alapuló máj hepatocelluláris karcinóma mikro-RNS expressziós adatok esetében a már „reads per million mirna mapped” (RPM) eljárással normalizált mikro-RNS expressziós adatokat használtam fel.

A microarray alapú máj hepatocelluláris karcinóma mikro-RNS expressziós adatokat újrnormalizálás nélkül használtuk fel.

3.3. Mutációs adatok feldolgozása

A nem-kissejtes tüdőrákos betegek tumoros és a hozzá tartozó normál mintáinak teljes exom szekvenálási adatát a GDC TCGA adatbázisból töltöttük le. A szomatikus mutációk azonosítására a MuTect algoritmust alkalmaztuk, az alapértelmezett beállítási paraméterek mellett. Referencia

szekvenciaként, az emberi GRCh37 (hg19) verziójú genomot használtuk.

A nem-kissejtes tüdőrákos betegek már feldolgozott kópiaszám eltérési (CNV) adatát szintén a GDC TCGA adatbázisból töltöttük le. Génamplifikáció esetén a szegmensek átlaga 0,2 feletti, gén deléció esetén pedig -0,2 alatti.

Az akut mieloid leukémia esetén a TCGA program már azonosított, feldolgozott mutációit használtam fel, az úgynevezett mutation annotated format (MAF) fájlok formájában. Mind a MuTect2, a MUSE, a VarScan és a SomaticSniper variánsazonosító algoritmusok eredményét felhasználtam és integráltam. Az adatok aggregálására és vizualizálására a „maftools” R Bioconductor programcsomagot alkalmaztam.

3.4. Statisztikai számítások

A szomatikus mutációk génexpresszióra gyakorolt hatását Mann-Whitney teszttel vizsgáltuk. A kiválasztott gén szomatikus mutációs státusza alapján a betegek RNS szekvenálási adatát két csoportra osztottuk: az egyik betegcsoport hordozta az adott génmutációt, a másik betegcsoport pedig nem. Mann-Whitney teszt segítségével megvizsgáltuk, hogy a mutáns és a vad betegcsoport között mely gének kifejeződése mutat szignifikáns változást. Minden gén esetén meghatároztuk a génexpressziós változás mértékét (fold change) a két betegcsoport között, a mutáns és a vad betegcsoport medián génkifejeződési értékeinek hányadosával. Fontos kiemelni, hogy a munkám során Mann-Whitney teszttel vizsgáltuk a kópiaszám eltérések génkifejeződésre kifejtett

hatását nem-kissejtes tüdőrákban, az NPM1 mutációk transzkriptomikus hatását akut mieloid leukémiában, továbbá a génkifejeződés és a vaszkuláris invázió közötti összefüggést máj hepatocelluláris karcinómában.

A génkifejeződés és a túlélés közötti kapcsolatot Cox regressziós modellel és Kaplan-Meier túlélés elemzéssel vizsgáltam. A Cox regressziós elemzéshez a „survival” R programcsomagot használtuk. Az elemzések során a hazard ratio (HR), 95 % konfidencia intervallumok (CI) és a log-rank *P*-értékek kerültek kiszámításra. A túlélés elemzés során a Kaplan-Meier plotok készítésére a „survplot” R programcsomagot használtam.

3.5. Klinikai minták

Az *in vitro* validációra használt akut mieloid leukémiás klinikai minták a Semmelweis Egyetem I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetből származtak. A minták NPM1 mutációs státuszának meghatározására Sanger szekvenálást, a génkifejeződés változásának vizsgálatára pedig kvantitatív polimeráz láncreakciót (qPCR) alkalmaztunk. A perifériális vér és csontvelő mintákból DNS-t preparáltunk a High Pure PCR Template kit segítségével. A DNS koncentrációját UV spektrofotométerrel ellenőriztük.

4. Eredmények

4.1. KRAS mutáció függő génexpressziós változások vizsgálata nem-kissejtes tüdőrákban

A nem-kissejtes tüdőrák adatok a TCGA és az NCBI GEO adatbázisból származtak. A TCGA program esetén azokat a betegeket választottam ki, amelyek teljes exom, RNS szekvenálási, valamint kópiaszám változási adattal is rendelkeznek, így a teljes mintaszám 555 beteg volt. Az NCBI GEO adatbázisból 2347 nem-kissejtes tüdőrákos beteg microarray génexpressziós adatát dolgoztam fel. A túlélés elemzések során a megbízhatóbb eredmények érdekében a nagyobb mintaszámmal rendelkező microarray génexpressziós adatokat használtam fel.

Megvizsgáltam, hogy a KRAS mutációk és a KRAS kifejeződés közvetlenül befolyásolják-e a betegek túlélését. A vizsgálataim alapján elmondható, hogy sem a KRAS mutációk (HR=1,02; $P=0,95$), sem pedig a KRAS kifejeződés (HR=1,1; $P=0,43$) nem mutatott szignifikáns összefüggést a teljes túléléssel.

Az elemzés további részében Mann-Whitney teszt segítségével összehasonlítottam a 11500 gén kifejeződését a KRAS mutáns és vad típusú nem-kissejtes tüdőrákos betegcsoportok között, az RNS szekvenálási adatok felhasználásával. Azonosítottam az öt legszignifikánsabb gént – FOXRED2, PEX3, KRAS, TOP1 és ABL2 –, amelyek kifejeződése korrelált a KRAS génben található szomatikus mutációkkal. Ezt követően kiszámoltam a KRAS szomatikus mutációkkal összefüggő transzkriptomikus mintázatot, ahol az öt gén átlagos kifejeződését vettem a micorarray génchip adatok alapján. A túlélés elemzés során, a medián vágópont használatával szignifikáns összefüggést azonosítottam a

transzkriptomikus mintázat és a teljes túlélés között (HR=2,4; $P=1,24E-12$). A módszer validálása során a második (HR=1,9; $P=4,7E-08$), valamint a harmadik (HR=2,5; $P=4,4E-14$) leszignifikánsabb öt gén által képzett KRAS transzkriptomikus mintázat is szignifikáns összefüggést mutatott a teljes túléléssel.

A KRAS génben található amplifikációkkal és deléciókkal összefüggő transzkriptomikus mintázat vizsgálata esetén csak a KRAS deléciókkal asszociált expressziós mintázat mutatott szignifikáns összefüggést a teljes túléléssel (HR=2,3; $P=1,8E-11$).

4.2. Az NPM1 mutációk transzkriptomikus lenyomata és validálása akut mieloid leukémiában

A vizsgálatunk első részében adatbázist építettem, amely négy, egymástól független génexpressziós, mutációs és klinikai adatokkal rendelkező akut mieloid leukémiás betegcsoportot – GSE6891 (460 beteg), TCGA (116 beteg), GSE1159 (247 beteg) és a Semmelweis mintacsoport (169 beteg) – tartalmazott.

Az első vizsgálati csoporton (tanulólalmazon) – GSE6891 – végzett Mann-Whitney elemzés során 85 gént azonosítottam, amelyek expressziója különbözött az NPM1 mutáns és vad típusú betegek között.

A második (TCGA) és a harmadik (GSE1159) tanulólalmaz adatait felhasználva a korábban azonosított 85 génből 49 gén esetén azonosítottam szignifikáns génexpressziós eltérést az NPM1 mutáns és a vad betegcsoport között.

Elsőként a TCGA és a GSE1159-es mintacsoportok alapján, a 49 eltérő expressziót mutató génből 32 gént szűrtem ki, amelyek esetében az NPM1 mutáns és a vad betegcsoportok

medián kifejeződési értékeinek a hányadosai nagyobbak voltak, mint 2, vagy kisebbek voltak, mint 0,5. Továbbá ezen gének közül kiválasztottam azt a 27 gént, amelyeknél a génkifejeződés és a teljes túlélés között a Cox regresszió során szignifikáns összefüggést tapasztaltam. A TCGA mintacsoport esetén nem végeztünk túlélés elemzést azért, mert kevesebb, mint 100 beteghez tartozott túlélési adat.

Ezt követően a klinikai mintákon történő validációra a 27 génből azt a hat gént választottam ki – HOXA5, HOXB5, HOXA10, PBX3, MEIS1 és az ITM2A –, amelyek mind a túlélés elemzés során, mind pedig a Mann-Whitney elemzés során a legszignifikánsabb összefüggést mutatták. Ezen gének között az ITM2A volt az egyedüli gén, amelynek a kifejeződése csökkent NPM1 mutáns tumorokban. Kaplan-Meier elemzés alapján a gének magas kifejeződése rosszabb túléléssel társult, szemben az ITM2A génnel, amely esetében a betegek rossz túlélésével az alacsony génkifejeződés korrelált.

A kiválasztott hat gén expressziós eltéréseinek igazolása az NPM1 mutáns és a vad típusú akut mieloid leukémia betegcsoport között, kvantitatív-PCR reakcióval történt. A vizsgálat során a HOXA5, HOXA10, HOXB5, MEIS1 és a PBX3 gének kifejeződése nőtt, míg az ITM2A gén kifejeződése szignifikánsan csökkent az NPM1 mutáns daganatokban. Túlélés elemzés során igazoltam a kiválasztott gének kifejeződése és teljes túlélés közötti szignifikáns kapcsolatot a klinikai mintacsoport felhasználásával is.

4.3. Prognosztikus biomarkerek azonosítása máj hepatocelluláris karcinómában

A máj hepatocelluláris karcinóma adatbázis építése során mRNS és mikro-RNS expressziós adatokat használtunk fel a TCGA és az NCBI GEO adatbázisokból. A mikro-RNS expressziós adatbázis összesen négy mintacsoport transzkriptomikus adatát tartalmazta: az NCBI GEO adatbázisból a GSE31384 (166 beteg), a GSE10694 (156 beteg) és GSE6857 (481 beteg) vizsgálatok microarray mikro-RNS expressziós adatát, valamint a TCGA programból (421 beteg) a mikro-RNS szekvenálási adatokat tartalmazta. Az mRNS expressziós adatok közül 372 minta a TCGA programból, 91 minta a GSE9843 és a 135 minta pedig a GSE20017 microarray vizsgálatokból származott.

4.3.1. mikro-RNS alapú biomarkerek vizsgálata

Az NCBI PubMed adatbázisban a „hepatocellular”, a „carcinoma” és a „miRNA” keresőszavak alkalmazásával, 173 közleményt sikerült azonosítanom, amelyek prognosztikus mikro-RNS-eket írtak le máj hepatocelluláris karcinómában.

A 173 mikro-RNS alapú prognosztikus biomarker validálása során 55 mikro-RNS esetében tapasztaltam szignifikáns összefüggést a génexpresszió és a teljes túlélés között a TCGA adatok alapján.

A 173 mikro-RNS expressziójának a hatását a teljes túlélésre a GSE31384 microarray adatok felhasználásával is vizsgáltam. Elmondható, hogy összesen 29 mikro-RNS-t azonosítottunk, amelyek kifejeződése mind a TCGA és a GSE31384 adatbázis esetén szignifikáns összefüggést mutatnak a teljes túléléssel.

Összehasonlítottam a 173 prognosztikus mikro-RNS kifejeződését a normál és a tumoros májszövet között a TCGA,

a GSE10694 és a GSE6857 vizsgálat expressziós adatainak a felhasználásával. Összesen 113 mikro-RNS mutatott eltérő expressziót a tumor és a normál májszövet között, amelyek közül a hsa-miR-199a, a hsa-miR-34a, a hsa-miR-106b, a hsa-miR-222 és a hsa-miR-221 mikro-RNS-ek mutatták a legszignifikánsabb eltérést a normál és a tumoros májszövet között.

4.3.2. mRNS alapú biomarkerek vizsgálata

Irodalmi keresés során 318 korábban publikált mRNS alapú biomarkert azonosítottunk, amelyek közül a validáció során 180 gén kifejeződése esetén tapasztaltunk szignifikáns összefüggést a teljes túléléssel az ázsiai betegpopulációban.

Megvizsgáltuk az összefüggést a 318 korábban publikált prognosztikus biomarker génkifejeződése és a teljes túlélés között a kaukázusi betegpopuláción belül is. Összesen 128 gén esetében tapasztaltunk szignifikáns összefüggést a génkifejeződés és a teljes túlélés között.

A vizsgált 318 biomarkerből, 82 biomarker kifejeződése, az ázsiai és a kaukázusi betegcsoportban szignifikáns összefüggést mutatott a teljes túléléssel. Az irodalmi keresés során ezen gének közül 72 gént eredetileg az ázsiai, 10 gént pedig a kaukázusi betegcsoportban írtak le.

További elemzés során megvizsgáltuk a 318 biomarker kifejeződése és a teljes túlélés közötti kapcsolatot a teljes mRNS expressziós adatbázis felhasználásával, azaz az elemzést az etnikai besorolástól függetlenül végeztük el. Összesen 178 gén esetén tapasztaltunk szignifikáns összefüggést a génexpresszió és a teljes túlélés között.

4.4. Daganat asszociált gének prognosztikus hatásának vizsgálata különböző tumortípusokban

Az adatbázis építés során összesen 26 különböző daganattípus, mintegy 9663 beteg RNS szekvenálási adatát használtuk fel, túlélési adattal együtt. A medián túlélési idő az összes daganattípust véve, a teljes túlélés esetén 24,3 hónap, a kiújulás mentes túlélés esetén pedig 23,8 hónap.

Cox regresszió során megvizsgáltam a nyolc fő daganatjellemző – sejtosztódás fenntartása, tumorszuppresszorok gátlása, érképződés serkentése, genom instabilitás fenntartása, energia metabolizmus átprogramozása, metasztázis indukálása, sejthalál rezisztencia kialakítása és a DNS replikáció fenntartása – kialakításában részt vevő 671 daganat asszociált gének kifejeződése és a teljes túlélés közötti kapcsolatot 26 különböző daganattípus RNS szekvenálási adatát felhasználva. A túlélés elemzést követően, hierarchikus klaszterezés során megfigyeltem, hogy a daganatok áttétképzésében, genom instabilitásában, a folyamatos sejtosztódás fenntartásában és a metabolikus folyamatok átprogramozásában részt vevő gének különálló csoportokat, úgynevezett klasztereket alkotnak. A világos sejtes veserák, a glióma, a melanóma, a thymoma és a máj hepatocelluláris karcinóma daganattípusok tartalmazták a legnagyobb számú teljes túléléssel összefüggő daganat asszociált gént.

Minden tumortípus esetén meghatároztuk a daganatjellemző asszociált génexpressziós mintázatot (az adott daganattényezőben részt vevő gének átlagos kifejeződése), majd daganattípusonként vizsgáltuk az összefüggését a teljes

túléléssel. A nyolc daganattényezőhöz kapcsolt transzkriptomikus mintázat közül a sejtosztódás fenntartása, genom instabilitás, energiametabolizmus átalakítása, metasztázis és invázió serkentése, valamint a sejthalál elkerülése mutatott szignifikáns összefüggést a teljes túléléssel legalább öt daganattípus esetén.

Összesen 39 gén volt, amelyek kifejeződése legalább 10 daganattípusban mutatott szignifikáns összefüggést a teljes túléléssel. A nyolc daganatjellemzőt képviselő géncsoportokban a legszignifikánsabb gének a következők voltak: a genom instabilitás fenntartásában részt vevő BRCA1 a gliómában, a sejthalál rezisztenciához köthető CDK1 a papilláris veserákban, a folyamatos DNS replikációban részt vevő EREG a méhnyaktumorban, a áttétképzésben részt vevő MYC a hólyagdaganatban, a folyamatos sejtosztódáshoz köthető RUNX1 a gliómában, az érképzésben részt vevő SERPINE1 szintén a gliómában, a tumorszuppresszor E2F1 a méhnyakdaganatban és az energia metabolizmus átprogramozásában részt vevő FBP1 gén a világos sejtes veserákban.

5. Következtetések

5.1. A KRAS mutációknak nincsen közvetlenül hatása a túlélésre a nem-kissejtes tüdőrákban, azonban a KRAS mutációkkal összefüggő génkifejeződési mintázatnak jelentős prognosztikus ereje van.

5.2. Az NPM1 mutációk transzkriptomikus lenyomatának vizsgálata során elmondható, hogy az NPM1 mutációk hatására nőtt a HOX gének (HOXA5, HOXA10, HOXB5) és a kofaktoraik (PBX3, MEIS1) kifejeződése, amely szignifikáns összefüggést mutatott a teljes túléléssel is akut mieloid leukémiában. A gének kifejeződésbeli eltérést és a túléléssel való összefüggésüket klinikai mintacsoport sikerült igazolnunk.

5.3. A korábban publikált 173 prognosztikus hepatocelluláris karcinóma mikro-RNS-ből mindössze 29 esetben azonosítottam szignifikáns összefüggést a kifejeződés és a teljes túlélés között, független mikro-RNS kifejeződési adatok felhasználásával. A mRNS alapú biomarkereknek csaknem kevesebb, mint felének maradt meg a prognosztikus tulajdonsága a túlélés elemzés során hepatocelluláris karcinómában.

5.4. A daganatjellemzők által képzett transzkriptomikus mintázatok daganatspecifikus összefüggést mutatnak a teljes túléléssel. Az egyes daganat kapcsolt gének kifejeződése szignifikáns összefüggést mutat a teljes túléléssel számos daganattípus esetén.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. Disszertációhoz kapcsolódó publikációk

- **Nagy Á**, Pongor LS, Szabó A, Santarpia M, Győrffy B. (2017) KRAS driven expression signature has prognostic

power superior to mutation status in nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer*, 140: 930-937. **IF=7,36**

- **Nagy Á, Ösz Á, Budczies J, Krizsán S, Szombath G, Demeter J, Bödör C, Győrffy B. (2019)** Elevated HOX gene expression in acute myeloid leukemia is associated with NPM1 mutations and poor survival. *J Adv Res*, 20: 105-116. **IF=6,992**
- **Nagy Á, Lánckzy A, Menyhárt O, Győrffy B. (2018)** Validation of miRNA prognostic power in hepatocellular carcinoma using expression data of independent datasets. *Sci Rep*, 8: 9227. **IF=4,011**
- Menyhárt O, **Nagy Á, Győrffy B. (2018)** Determining consistent prognostic biomarkers of overall survival and vascular invasion in hepatocellular carcinoma. *R Soc Open Sci*, 5: 181006. **IF=2,515**
- **Nagy Á, Munkácsy G, Győrffy B. (2020)** Pancancer survival analysis of cancer hallmark genes. Publikálás alatt.

6.2. Disszertációtól független publikációk jegyzéke

- **Nagy Á, Győrffy B. (2016)** Internet-based opportunities in breast cancer diagnostics and research. *Magy Onkol*, 60: 273-280.

- Lániczky A, **Nagy Á**, Bottai G, Munkácsy G, Szabó A, Santarpia L, Gyórfy B. (2016) miRpower: a web-tool to validate survival-associated miRNAs utilizing expression data from 2178 breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 160: 439-446. **IF=3,626**
- Szász AM, Lániczky A, **Nagy Á**, Förster S, Hark K, Green JE., Boussioutas A, Busuttill R, Szabó A, Gyórfy B. (2016) Cross-validation of survival associated biomarkers in gastric cancer using transcriptomic data of 1,065 patients. *Oncotarget*, 7: 49322-49333. **IF=5,168**