



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ  
ЦЕНТЪР ПО МОЛЕКУЛНА МЕДИЦИНА

---

ГЕРГАНА СТЕФАНОВА СТАНЧЕВА

**ГЕНЕТИЧНИ И ГЕНОМНИ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ГЛИАЛНИ ТУМОРИ**  
*МАРКЕРИ С ПРОГНОСТИЧНА И ПРЕДИКТИВНА СТОЙНОСТ*

## **АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд за присъждане на  
образователна и научна степен „ДОКТОР”

Област на висше образование: 4. „Природни науки, математика и информатика”

Професионално направление: 4.3. „Биологически науки”

Научна програма „Молекулярна биология“

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ

Чл.кор.Проф. д-р Ваньо Митев, дм, дбн

НАУЧЕН КОНСУЛТАНТ

Доц. д-р Радка Кънева, дб

д-р Теодора Горанова, дб

---

София, 2015г.

Докторантът е зачислен за редовна докторантура към Катедрата Медицинска Химия и Биохимия, Медицински факултет, Медицински университет – София със Заповед № Р-1624/09.12.2009г.

Включените в дисертацията изследвания са извършени в Центъра по Молекулна Медицина, Катедрата по Медицинска Химия и Биохимия при Медицински Университет – София. Изследванията по дисертационния труд са финансирани частично от:

- Фонд „Научни изследвания” към МОМН - № ДТК02-49/17.12.2009 г.

- СМН, Медицински Университет – София - Договор № 8-Д/2010г., Договор № 23-Д/2011г., Договор № 17-Д/2012г., Договор № 9/2013г.

Дисертационният труд обхваща 248 стандартни страници, от които 209 страници основен текст (въведение – 1 стр., литературен обзор – 36 стр., цел и задачи – 1 стр. материали и методи – 46 стр., резултати - 61 стр., обсъждане, изводи и приноси – 53 стр.). Литературната справка обхваща 781 източника. Дисертацията съдържа 78 фигури и 70 таблици.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за защита на заседание на разширен катедрен съвет на Катедрата Медицинска Химия и Биохимия, Медицински факултет, МУ – София на 19.12.2014 г. Материалите по защитата са на разположение в Катедрата Медицинска Химия и Биохимия, Център по Молекулна Медицина, Медицински университет – София, 14ти етаж, СБАЛАГ „Майчин дом”, ул. Здраве № 2, 1431 София.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 14 май 2015 г. от 13:00 часа във II-ра аудиторията на ПУЦ, Медицински Университет – София, ул „Здраве”№2, съгласно чл.76 и 77 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет– София и въз основа на заповед № РК36 – 157 от 04.02.2015г. на Ректора на МУ– София, пред научно жури в състав:

#### НАУЧНО ЖУРИ В СЪСТАВ:

Председател: - рецензент – доц. д-р Алексей Савов, дб

Членове: 1. – становище – чл.кор.Проф. Д-р Ваньо Митев, дм, дбн

2. – рецензент – проф. д-р Елена Георгиева, дб

3. – становище – чл.кор. проф. д-р Иван Иванов, дбн

4. – становище – чл.кор. проф. д-р Георги Русев, дбн

Номерацията на фигурите и библиографията не отговарят на тези в дисертационния труд.

## СЪДЪРЖАНИЕ:

<b>1. Въведение</b> .....	5
<b>2. Цел и задачи</b> .....	6
<b>3. Материали и методи</b> .....	8
<b>4. Резултати</b> .....	9
<b>4.1. Оценка на прогностичната стойност на клиничните параметри</b> .....	9
<b>4.2. Секвенционен анализ - <i>IDH1</i>, <i>IDH2</i> и <i>TP53</i></b> .....	10
4.2.1. Скрининг за мутации в гените <i>IDH1</i> и <i>IDH2</i> .....	10
4.2.2. Скрининг за мутации в гена <i>TP53</i> .....	12
4.2.3. Оценка на прогностичната стойност на генетичните изменения в <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> и <i>TP53</i> .....	14
<b>4.3. Анализ за наличие на големи делеции в хромозоми 1p и 19q</b> .....	16
<b>4.4. Анализ на <i>MGMT</i> промоторно хиперметиране</b> .....	19
<b>4.5. Анализ на микросателитна нестабилност</b> .....	20
<b>4.6. Анализ на експресионни маркери с прогностична стойност</b> .....	21
<b>4.7. Геномен анализ на глиалните тумори</b> .....	27
4.7.1. Агрегационен анализ.....	29
4.7.1.1. STAC.....	29
4.7.1.2. GISTIC.....	29
4.7.2. Йерархично групиране.....	29
4.7.3. Сравнителен анализ на пациентите по групи.....	30
4.7.3.1. Разделяне на пациентите според групите получени при CLHC.....	30
4.7.3.2. Разделяне на пациентите според <i>IDH1</i> мутационния статус.....	31
1. Пациенти без мутация в <i>IDH1</i> с ниска и висока преживяемост.....	31
2. Пациенти с мутация в <i>IDH1</i> с ниска и висока преживяемост.....	31
<b>5. Обсъждане</b> .....	35
<b>5.1. Прогностична стойност на клиничните характеристики</b> .....	35
<b>5.2. <i>IDH1</i>, <i>IDH2</i> и <i>TP53</i> в малигнените глиоми</b> .....	36
<b>5.3. Наличие на големи делеции в хромозоми 1p и 19q</b> .....	39
<b>5.4. <i>MGMT</i> промоторно хиперметиране и микросателитната нестабилност</b> .....	42
<b>5.5. Експресионни маркери с прогностична стойност</b> .....	44
<b>5.6. Сравнителна геномна хибридизация (aCGH)</b> .....	50
5.6.1. Агрегационен анализ.....	50
5.6.2. Йерархично групиране.....	52
5.6.3. Разделяне на пациентите според <i>IDH1</i> мутационния статус.....	53
1. Пациенти без мутация в <i>IDH1</i> с ниска и висока преживяемост.....	53
2. Пациенти с мутация в <i>IDH1</i> с ниска и висока преживяемост.....	53
<b>6. Изводи</b> .....	57
<b>7. Приноси</b> .....	58
<b>Библиография</b> .....	59
<b>Публикации във връзка с дисертационния труд</b> .....	68
<b>Благодарности</b> .....	70
<b>Резюме на английски език /SUMMARY/</b> .....	71

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

### Кирилица:

**2-HG** 2-хидроксиглутарат  
 **$\alpha$ -KG**  $\alpha$ -кетоглутарат  
**AA** Анапластичен Астроцитом  
**AK** Аминокиселина  
**АОА** Анапластичен олигоастроцитом  
**АОД** Анапластичен олигодендроглиом  
**АМФ** Аденозин монофосфат  
**АТФ** Аденозин трифосфат  
**ГБМ** Глиобластома мултиформе  
**ГТФ** Гуанозин трифосфат  
**ГН** Геномна нестабилност  
**ДА** Дифузен астроцитом  
**ИКМ** Извънклетъчния матрикс  
**КА** Карбокси анхидраза  
**КЖ** Качеството на живот  
**КТ** Компютърна томография  
**МГ** Малигнените глиоми  
**МСН** Микросателитна нестабилност  
**МСС** Микросателитна стабилност  
**НБК** Намален брой копия  
**н.дв.** Нуклеотидни двойки  
**НС** Нервната Система  
**ОД** Олигодендроглиом  
**ОА** Олигоастроцитом  
**РНК** Рибонуклеинова киселина  
**СЗО** Световната Здравна Организация  
**УБК** Убелечен брой копия  
**ХН** Хромозомната нестабилност  
**ЦНС** Централната Нервна Система

### Латиница:

**aCGH** Сравнителна геномна хибридизация  
**EGFR** Епидермалния растежен фактор  
**IDH1/2** Изоцитрат дехидрогеназа 1/2  
**CAIX** Карбокси анхидраза IX  
**CIC** Сариса ген  
**CIMP** метилаторният фенотип на CpG островите  
**CNVs** Вариациите в броя копияни ДНК  
**CpG** Цитозин-фосфат-гуанин  
**FLT1(VEGFR-1)** Fms-подобна тирозин киназа 1/ рецептор 1 на съдовия ендотелен растежен фактор  
**FUBP1** Far Upstream Element (FUSE) Свързващ белтък 1

**HIF1A/ARNT/** хипоксия-индуцирания фактор 1A/ arylhydrocarbon receptor nuclear translocator  
**HIF2A** хипоксия-индуцирания фактор 2A  
**HIF3A** хипоксия-индуцирания фактор 3A  
**HMG** high-mobility group  
**HRM** High-resolution melting  
**JHDMs** Jumonji-C домен хистонови деметилази  
**KDR(VEGFR-2)** Kinase insert domain рецептор/рецептор 2 на съдовия ендотелен растежен фактор  
**LOH** Загуба на хетерозиготност  
**KPS** Karnovsky performance status  
**MAPK** mitogen activated protein kinase  
**MDM** Murine Double Minute ген  
**MGMT** O6-метилгуанин метил-трансферазия ген  
**MLH1** Mut L хомолог 1 (белтък от MMR)  
**MMP-9** Матрикс металопротеиназа-9  
**MMR** Mismatch репарационна система варианти  
**MSH2** Mut S homologue 2 (белтък от MMR)  
**MYC** myelocytomatosis viral oncogene homolog  
**NF1/2** Неврофиброматоза 1/2  
**PET** Позитронна емисионна томография  
**PI3K** фосфатидил инозитол 3- киназа  
**PTEN** Фосфатазен and тензин хомолог  
**RTK** рецепторните тирозин киназа  
**PCR** Полимеразна Верижна Реакция  
**PIP3** фосфатидил-инозитол трифосфат  
**RB1** Ретинобластома 1  
**SOX** *SRY-type HMG box* гени  
**TCGA** The Cancer Genome Atlas  
**TGF- $\beta$ 2** Трансформиращ растежен фактор  $\beta$ 2  
**TMZ** Темозоломид  
**TP53** Тумотен Белтък 53  
**VEGFA** съдовия ендотелен растежен фактор A

## 1. ВЪВЕДЕНИЕ

Ракът е една от водещите причини за смърт в целия свят. Почти всеки трети човек ще развие рак на определен етап от живота си. Мозъчните тумори, в частност малигнените глиоми (МГ), които представляват най-често срещаните първични малигнени неоплазии се характеризират с висока смъртност. В същото време пред днешната медицина сериозен клиничен и терапевтичен проблем представлява хетерогенността както в клиничните характеристики, така и в поведението на глиалните тумори. Така при пациенти със сходни клинични данни (хистологична диагноза, локализация на тумора, обем, КТ/ЯМР, възраст и т.н.) се наблюдават разлики в поведението на тумора – някои неоплазии са много по-агресивни и резистентни към лечението, което води до бързо влошаване качеството на живот (КЖ) и кратка преживяемост. Следователно съществува необходимост от нови, прецизни методи за характеризиране на мозъчните тумори, които да отразяват поведението им и да се основават на показатели с по-добра прогностична стойност.

В последните години голям брой проучвания са проведени върху глиомите и в резултат на това са предложени различни прогностични фактори. Въпреки това, повечето изследвания са фокусирани върху индивидуални маркери и не са изследвали корелациите между тях, които биха посочили най-добрите показатели за прогнозиране на преживяемостта, КЖ и ефикасността на лечението. Поради тези причини темата на този дисертационен труд е опит да се обвържат хирургичните, клиничните и молекулните аспекти на малигнените глиални тумори с фокус върху тяхната прогностична и предиктивна стойност. В търсене на обективни прогностични и предиктивни фактори, настоящето проучване анализира данни засягащи различни показатели както демографски (възраст, пол и т.н.) и клинични (степен на резекция, туморна локализация и т.н.), така също генетични (мутации или експресионни промени в различни гени), геномни (вариации в броя на ДНК копията) и епигенетични (промоторно метилиране).

Целта на настоящия дисертационен труд е да изследва подробно молекулните основи засегнати в малигнените процеси на глиалната туморогенеза, както и да проучи потенциални кандидат-биомаркери с прогностична и предиктивна стойност при български пациенти с малигнени глиални тумори. Това ще подпомогне избора на терапия и консултирането на пациентите. Изучаването на факторите, влияещи върху ефикасността на лечението, ще доведе до индивидуален избор на лечение при всеки пациент.

## 2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

### 2.1. ЦЕЛ

Изследване на молекулните основи на малигнените глиални тумори и анализ на кандидат-биомаркери с прогностична и предиктивна стойност.

### 2.2. ЗАДАЧИ

#### 2.2.1. Изследване на генетичните изменения при глиални тумори

##### 2.2.1.1. Създаване на глиомна биобанка

##### 2.2.1.2. Секвенционен анализ на *IDH1*, *IDH2* и *TP53* гените

- Оптимизиране на условията и изследване за мутации в *IDH1* и *IDH2*;
- Оптимизиране на условията и секвенционен анализ в кодиращата област на гена *TP53*;
- Определяне на честотата на носителство;
- Статистическа обработка на резултатите. Търсене на връзка между носителския статус и клиничните, хистологични и биологични характеристики на туморите.

#### 2.2.2. Изследване на загубата на генетичен материал в хромозоми 1 и 19

- Оптимизиране на условията за MLPA анализ и изследване на всички случаи с глиални тумори;
- Анализ на корелациите между наличието на делеции в 1p и/или 19q хромозомни рамена с клиничните, хистологични, генетични и биологичните характеристики на туморите.

#### 2.2.3. Анализ на промоторно хиперметиране на *MGMT* гена

- Оптимизиране на условията и изследване за промоторно хиперметиране на *MGMT* гена с анализ чрез топене с висока резолюция на ДНК (HRMA);
- Оптимизиране на условията и потвърждение на резултатите чрез метода на Бисулфитно секвениране;
- Анализ на корелациите между промоторно хиперметиране на *MGMT* гена и клиничните, хистологични и биологичните характеристики на туморите.

#### 2.2.4. Изследване за микросателитна нестабилност

- Анализ на панел от 5 микросателитни маркера в здрава и туморна тъкан и определяне на МСН статуса на пациентите;
- Анализ на корелациите между микросателитната нестабилност и клиничните, хистологични и биологичните характеристики на туморите.

#### 2.2.5. Генно-експресионни изследвания на подобрени кандидат- гени с прогностична стойност при глиални тумори

- Подбор на група от пациенти и гени за анализ;

- Оптимизиране на условията и изследване генната експресия на подбраните гени;
- Статистическа обработка на резултатите. Търсене на връзка между генната експресия и клиничните, хистологични и биологични характеристики.

#### 2.2.6. Геномен анализ на глиалните тумори в търсене на нови биомаркери

- Подбор на група от пациенти;
- Изследване на геномни аберации при тумори чрез сравнителна геномна хибридизация и анализ на получените резултати за наличието на делеции/амплификации;
- Клъстерен анализ на получените данни за молекулно профилиране на изследваните тумори;
- Анализ на геномните аберации, специфични за подгрупи от тумори според генетичните им характеристики *IDH1/IDH2* мутации и връзка с общата им преживяемост.

### 3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### 3.1. МАТЕРИАЛИ

Пациентите са насочени от Клиника по Неврохирургия на УМБАЛСМ”Н.И.Пирогов”. В настоящото изследване бяха включени 199 пациента с клинично и хистологично доказана диагноза.

*Таблица 3.1. Клинични показатели на изследваните пациенти/тумора*

Параметър	Брой (N)
Пол	Мъже 107
	Жени 92
Възраст (средна), години	11-85 (53)
Вид на операцията	Тотална резекция 93
	Субтотална резекция 85
	Частична резекция 19
	Биопсия 2
Тип тумор	Астроцитом 187
	Олигоастроцитом 6
	Олигодендроглиом 11
Локализация на тумора	Лява 83
	Дясна 104
	Билатерална 11
Степен на тумора	IV (вторични) 153 (23)
	III 38
	II 18
	I 3
KPS (средно)	20-90 (80)
Преживяемост (средна), месеци	0.1-269.73 (23.06)

Към настоящия момент в ЦММ е изградена глиална туморна биобанка състояща се от туморна и нормална тъкан – съдържаща 212 броя туморни и 14 проби от нормална тъкан от общо 199 пациента.

#### 3.2. МЕТОДИ

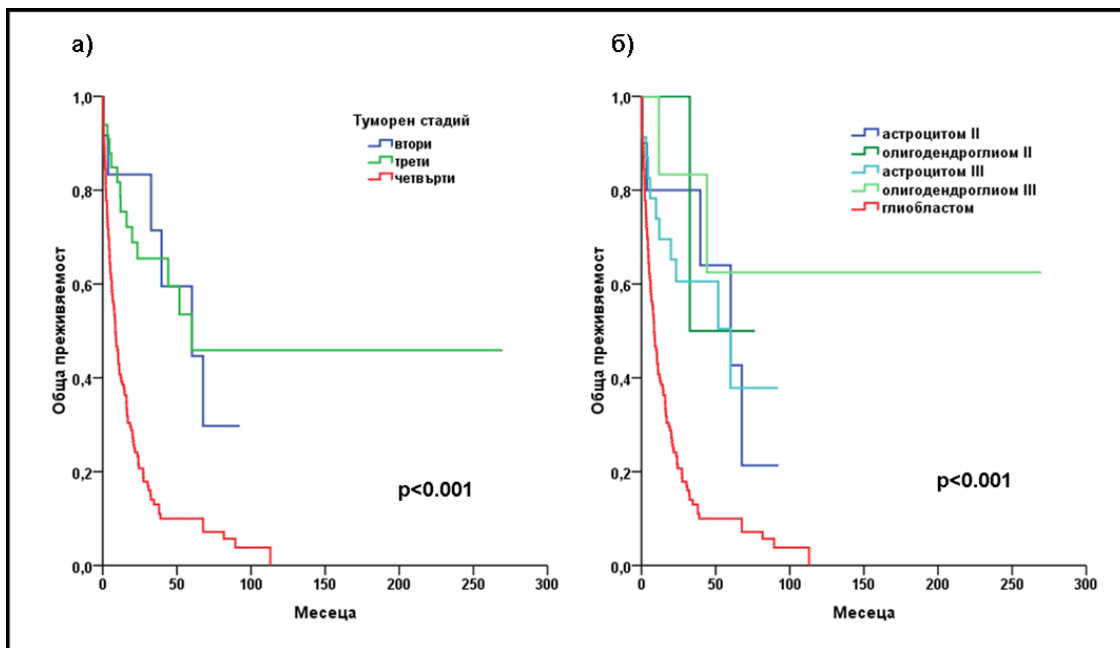
За постигане на поставените задачи бяха използвани следните молекулярно-генетични техники и методи:

- 3.2.1. Лазерна микродисекция на ракови и нормални клетки
- 3.2.2. Изолиране на ДНК от свежа и/или съхранена под формата на парафинов блок туморна, и нормална тъкан (или от венозна кръв)
- 3.2.3. Изолиране на РНК от свежа туморна и нормална тъкан
- 3.2.4. Бисулфитно третиране на ДНК
- 3.2.5. Синтез на кДНК чрез обратна транскрипция
- 3.2.6. Полимеразна верижна реакция (*polymerase chain reaction – PCR*)
- 3.2.7. Директно секвениране (по Sanger)
- 3.2.8. Анализ на микросателитна нестабилност
- 3.2.9. Мултиплексен амплификационен анализ на лигирани проби (MLPA)
- 3.2.10. Метил–специфичен високо чувствителен анализ на топене (MS-HRM)
- 3.2.11. Директно секвениране на бисулфитно третирана ДНК
- 3.2.12. PCR в реално време
- 3.2.13. Сравнителна геномна хибридизация (aCGH)
- 3.2.14. Статистически методи за анализ

## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. ОЦЕНКА НА ПРОГНОСТИЧНАТА СТОЙНОСТ НА КЛИНИЧНИТЕ ПАРАМЕТРИ

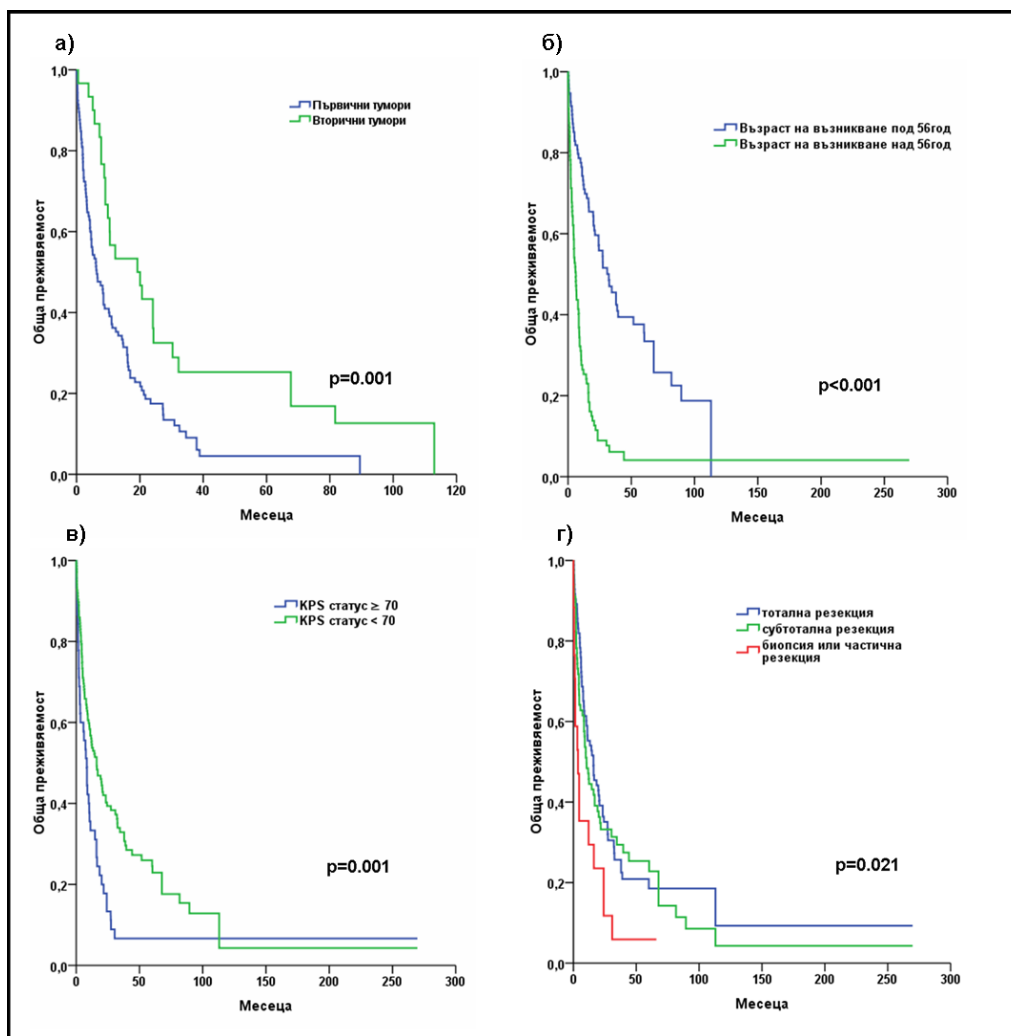
На **Фиг.4.1 а)** е показана връзката между преживяемостта и туморния стадий, като туморите с четвърти стадий на развитие, показват по-лоша преживяемост от туморите с втори и трети ( $p<0.001$ ). При анализа по тип тумор пациентите диагностицирани с глиобластом показаха значимо по-лоша прогноза, в сравнение с пациентите с астроцитом III, които пък показват по-лоша преживяемост от тези с астроцитом II стадий (**Фиг.4.1 б**).



**Фигура 4.1.** Преживяемост на пациентите с глиални тумори в зависимост от: **а)** туморен стадий; **б)** хистологична диагноза

При пациентите диагностицирани с олигодендроглиоми не се наблюдава значителна разлика между преживяемостта на II и III стадий най-вероятно поради малкия брой пациенти включени в изследването с такава диагноза (4 и 10 пациента съответно).

Аналогичен анализ беше извършен и за други клинични характеристики като възникване на тумора, KPS статус, вид операция и възраст на възникване. На **Фиг.4.2 а)** е показана връзката на вторичните тумори с по-добрата преживяемост ( $p=0.001$ ). Тъй като средната възраст на всички пациенти беше 56 год. разделихме пациентите на две групи – с възникване на болестта под 56 год. и над 56 год. възраст. Пациентите с болест възникнала преди 56 год. възраст показват по-добра преживяемост (**Фиг.4.2.б**). Освен това наличието на KPS статус над 70 ( $p=0.01$ ) (**Фиг.4.2 в**) и тоталната резекция на тумора са добри показатели за преживяемостта ( $p=0.021$ ). На **Фиг.4.4 г)** се вижда, че биопсията и частичната резекция имат по-лоша прогностична стойност от субтоталната и тоталната оперативна интервенция.

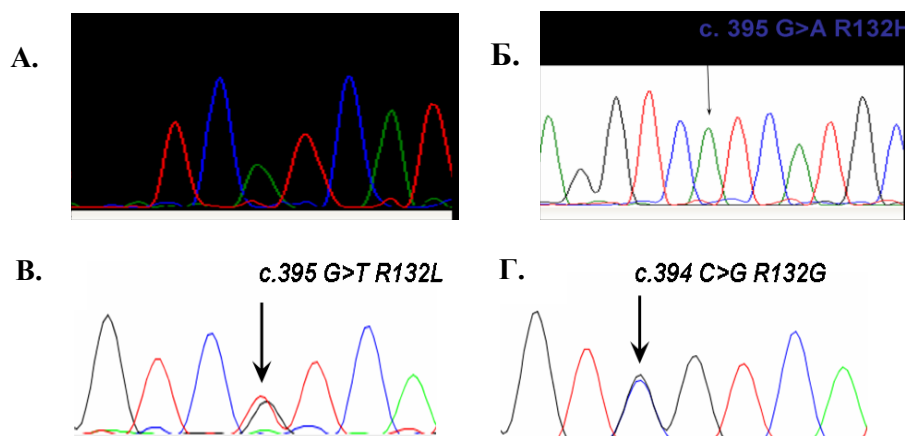


**Фигура 4.2.** Преживяемост на пациентите с глиални тумори в зависимост от: **а)** вида на тумора (първичен/ вторичен глиобластом); **б)** възраст; **в)** KPS; **г)** степен на резекция. На абсцисата е показана преживяемостта в месеци, а на ординатата – общата преживяемост.

## 4.2. СЕКВЕНЦИОНЕН АНАЛИЗ - *IDH1*, *IDH2* И *TP53*

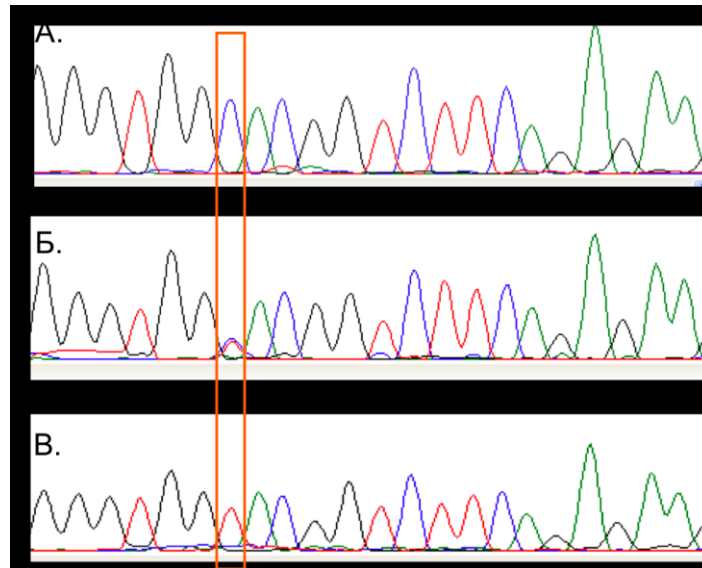
### 4.2.1. СКРИНИНГ ЗА МУТАЦИИ В ГЕНИТЕ *IDH1* И *IDH2*

Двеста и дванадесет тумора от 199 пациента бяха изследвани за мутации в *IDH1* и *IDH2* гените. В изследваната група от 212 проби мутация засягаща *IDH1* гена се наблюдава при 40 (18.9%) тумора от 35 пациента (17.6%). Най-честата мутация установена в кодон 132 - с.395G>A, която води до замяна на Arg с His (R132H), беше установена при 33 пациента (94% от откритите мутациите в *IDH1*) – **Фиг.4.3 А**.



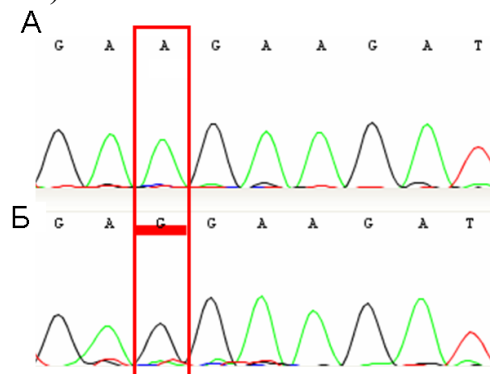
**Фигура 4.3.** Мутация в кодон 132 на *IDH1* гена **А.** Хетерозиготна с.395G>A мутация. **Б.** Хомозиготна с.395G>A мутация; **В.** с.395G>T; **Г.** с.394C>G;

Интересно е да се отбележи, че и в трите тумора, отстранени при 3 последователни хирургични резекции на един пациент (тумори 16, 41 и 52), беше открита една и съща замяна. При 1 от изследваните тумори откритата мутация засяга гореспоменатия кодон, но води до замяна на аминокиселината Arg с Leu -с.395G>Т (<0.5%) (**Фиг.4.3 В**). Открита е и още една мутация засягаща същия кодон, но съседния нуклеотид, водеща до замяната на Arg с Gly (**Фиг.4.3 Г**). При един от пациентите (№ 62) мутацията в кодон 132 беше в хомозиготно състояние – **Фиг.4.3 Б**. В екзон 4 на *IDH1* беше установен и един полиморфизъм - с.315C>Т G105G (rs11554137) – **Фиг.4.4**. Замяната на С с Т в позиция 315 беше детектирана при 19 тумора, в три от случаите – в хомозиготно състояние.



**Фигура 4.4.** Синонимна замяна в *IDH1* - с.315C>Т G105G. **А.** Генотип CC; **Б.** CT; **В.** TT.

При изследваните 212 тумора беше открита само една мутация в *IDH2* гена засягаща кодон 129 – с.386A>G, която води до замяна на Lys с Arg (K129R). Мутацията бе наблюдавана в хомозиготна състояние (**Фиг.4.5**).



**Фигура 4.5.** Хомозиготна мутация в кодон 129 на *IDH2* гена: **А.** див тип; **Б.** с.386A>G K129R

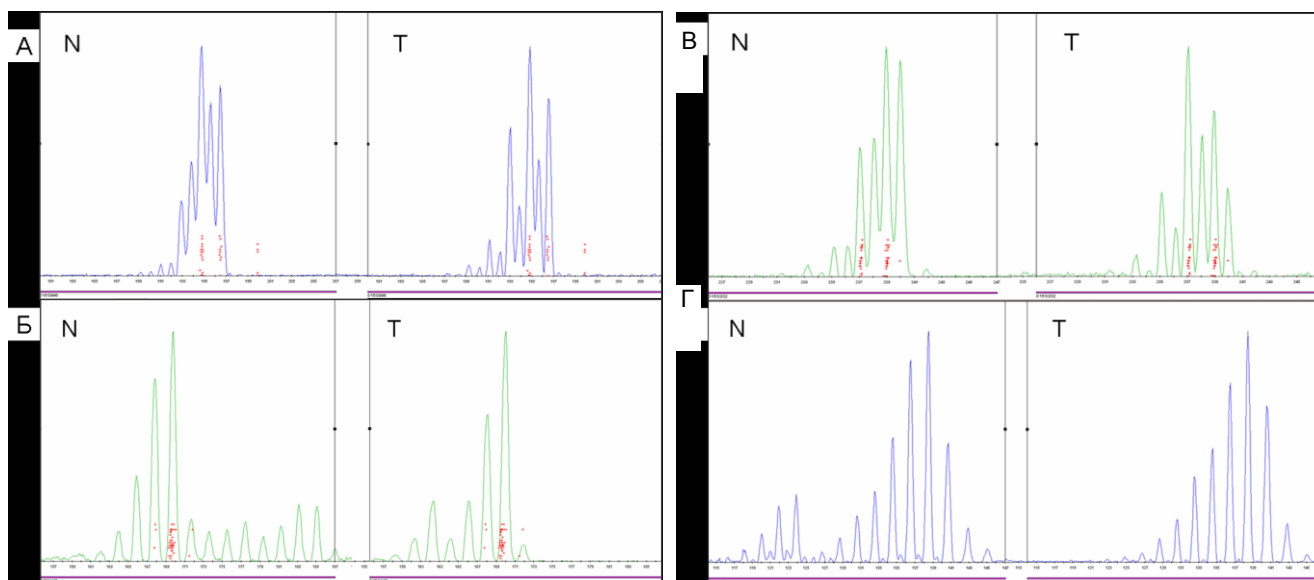
Три алгоритми бяха използвани, за да се предскаже влиянието на тази замяна върху активността на протеина. Тя е класифицирана като "с ниска вероятност да е патологична" със стойност 3.46 изчислена от предиктивната програма SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), като "доброкачествена" със стойност 0.270 определена използвайки PolyPhen-2 програмата (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) и като "не много надеждна" с помощта на SNPs & GO (<http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/>).

Мутацията в *IDH1* при един от пациентите беше наблюдавана в хомозиготно състояние. Хомозиготна мутация в *IDH1* (R132G) досега е била установена при един случай на левкемия<sup>(1)</sup> и само при едно пациент с мозъчни тумори<sup>(2)</sup>. Откриването на хомозиготна мутация и в гена *IDH2* при пациент №112 доведе до необходимостта за потвърждаването им. За целта бяха подбрани високо специфични и информативни микросателитни маркери, намиращи се от двете страни на изследваните райони. Получените резултати потвърдиха първоначалното ни

предположение за загуба на втория алел, като три от общо четирите изследвани микросателита показваха загуба на хетерозиготност (LOH). В **Табл.4.1** са показани обобщено резултатите получени от анализа на микросателитните маркери.

**Таблица 4.1.** Резултати, получени от анализа на 4 микросателита на хромозома 15

Пациент №	D15S996	D15S116	IDH2	D15S202	D15S127
	1	2		3	4
112	MCC	LOH		LOH	LOH



**Фигура 4.6.** Електрофореграми на 2 от микросателитните маркери при пациент №112; **А.** MCC на D15S996; **Б.** LOH на ДНК маркер D15S116; **В.** LOH на D15S202; **Г.** LOH на ДНК маркер D15S127

#### 4.2.2. СКРИНИНГ ЗА МУТАЦИИ В ГЕНА TP53

Осемдесет процента от анапластичните астроцитомии и глиобластомите с мутации в гените *IDH1* или *IDH2* носят мутации и в *TP53* <sup>(3)</sup>. Двеста и дванадесет тумора от 199 пациента бяха изследвани за мутации в екзони от 2<sup>-ти</sup> до 11<sup>-ти</sup> на *TP53* гена. Генетичните увреждания в *TP53* засягат предимно средната част на белтъка или ДНК-свързващия домен, кодирана от екзони 5-8. В изследваната група бяха намерени 30 мутации при 52 тумора (47 пациента) (23%). Въпреки това изследвани бяха и останалите шест кодиращи екзона (2, 3, 4, 9, 10 и 11). Мутационния анализ на останалите шест екзона доведе до идентифицирането на 15 различни мутации наблюдавани при общо 143 пациента (67%). Общият брой на детектираните аберации във всички екзони на гена е 45, като най-голям е броят им в екзон 8 - 11/45 (24.4%), следван от екзон 5 - 20% и т.н. Разнообразието от аберации в този ген включва: точкови мутации, в кодиращата и не кодиращата част на гена, делеции на 3 нуклеотида и SNP. Мутациите, водещи до промяна в кодираната аминокиселина (missense) представляват най-голяма част от точковите мутации. Мутациите, водещи до замяна на кодираната аминокиселина със Stop кодон (nonsense) са 8 на брой, засягащи единствено 10-ти екзон на гена. Броят на регистрираните делеции е 2. Мутациите в интронните последователности на гена представляват шест на брой точкови мутации, чийто ефект върху активността и функциите на протеина p53 е неясна (**Табл.4.2**).

**Таблица 4.2.** Открити варианти в гена TP53

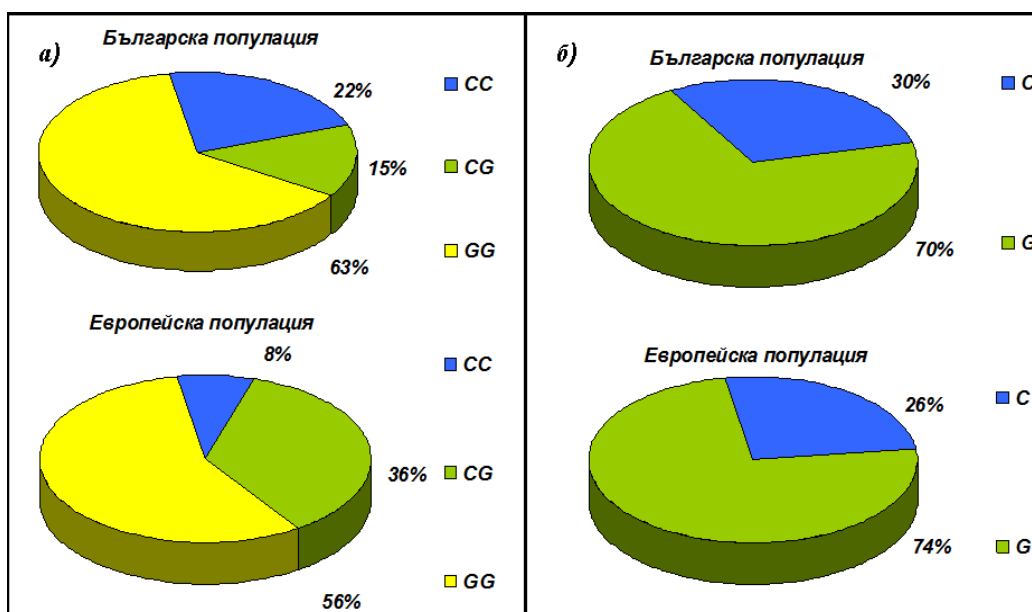
Брой	Точкови мутации					Други	
	Nonsense	Missense		Интронна	Синонимни	SNP (патогенни)	Делеции
		патогенни	неутрални				
2		35	9	6	3	18 (9)	2

В екзон 5 на *TP53* гена бяха намерени общо 9 мутации - с.395A>G, K132R; с.455C>T, P152L; с.524G>A, R175H; с.523C>A R175S и с.535C>A H179N; с.392A>G R132H; с.427G>A

V143M; с.469G>C V157L; с.473G>A R158H; с.496T>C S166T. Генетични изменения в екзон 6 бяха установени при 3 тумора. В този район беше намерена мутация с.639A>G, наблюдавана при два тумора – в хомозиготно и хетерозиготно състояние. При пациент 178 беше открита с.643A>G мутация в хетерозиготно състояние.

Генетични изменения в екзон 7 бяха установени при 10 тумора. В този район бяха намерени 2 делеции - del716\_21 при тумор 33 и del 759\_61 при тумор 16 и 52. Последната беше открита при 2 от туморите на един пациент (тумори 16 и 52), но не и при третия тумор (№ 41), отстранен при последната операция. Останалите 5 мутации, открити в екзон 7 на *TP53* гена - с.725G>A, р.C242Y; с.742C>T, р.R248W; с.773A>T, р.E258V; с.775G>C, р.D259N и с.734G>A, р.G245D. Най-честият обект на мутация в изследваната група тумори в ДНК свързващия домен на белтъка беше екзон 8 – 16 мутации при 28 тумора; а най-честата мутация - с.817C>T, р.R273C – установена при 11 тумора, при 6 от които – в хомозиготно състояние.

Докато в екзон 2, 3, 4, 9 и 10 бяха намерени множество мутации, в екзон 11 такива липсваха. В тези 5 екзона бяха намерени 15 различни мутации в общо 143 пациента (67%). Освен генетични изменения, водещи до промяна на аминокиселина (missense мутации) или замяна със стоп-кодон (nonsense мутации), беше установена и 1 делеция в екзон 4.



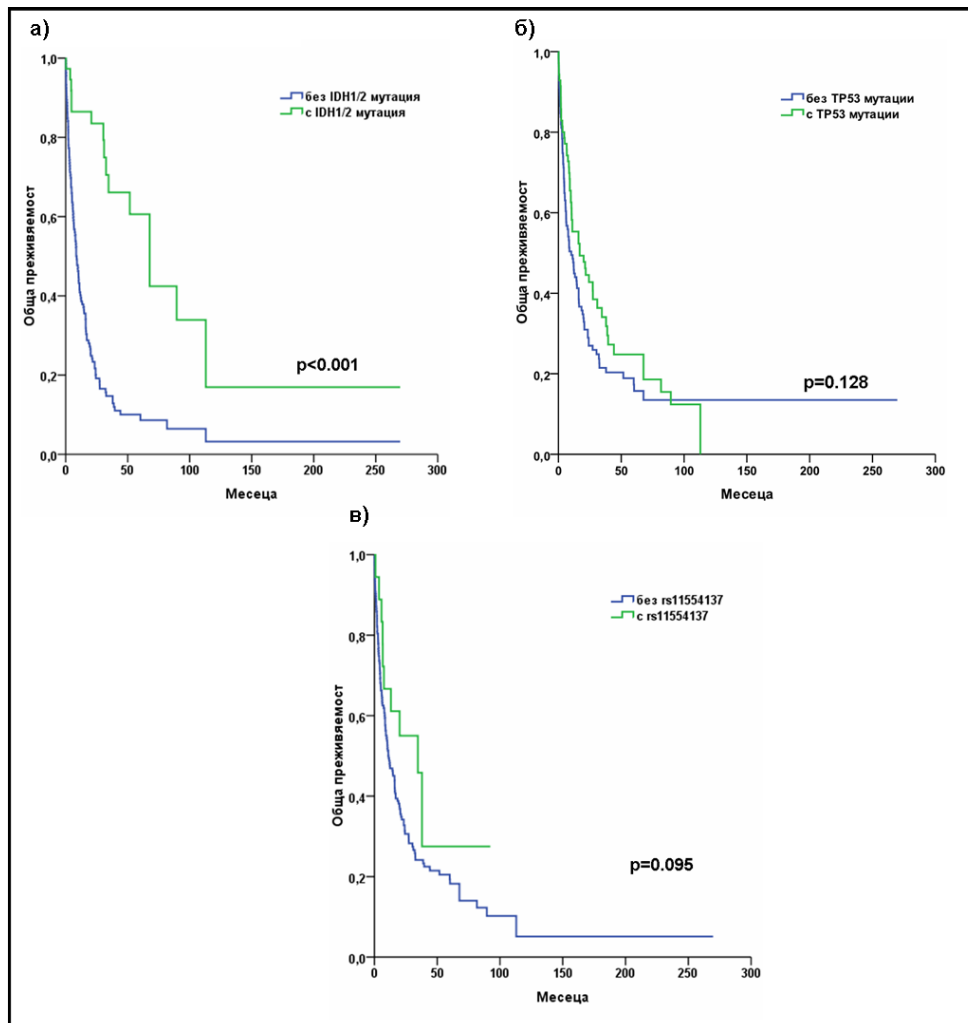
**Фигура 4.7.** Процентно съотношение на: а) различните генотипове в европейската и българската популация; б) различните аели в двете популации по отношение на rs1042522

Най-честият обект на генетични изменения в екзон 4 в изследваната група се оказва missense еднонуклеотидна замяна (SNP) - rs1042522 в позиция с.215C>G R72P, с неясна значимост за раковите заболявания. При 5 от пациентите освен наличие на rs1042522 (с.215C>G, р.R72P) беше установена и друга аберация в екзон 4 (с.299A>G, р.Q100R или с.151G>A, р.E51K или с.374C>T, р.T125M или с.338T>G F113S). При един от пациентите са открити 2 мутационни събития освен наличието на rs1042522 (с.155A>G, р.Q52R и с.374C>T, р.T125M). При един от пациентите беше открита и единствената делеция намерена в този екзон, засягаща последователност от три нуклеотида.

За допълнителен анализ на получените точкови мутации беше използвана Excel-базираната програма: MUT-TP53 II\_2.01, съдържаща информация от базата данни UMD и генерира информация относно функционалността на мутантния белтък, като процент остатъчна активност от активността на нормалния протеин. В допълнение дава информация относно честотата на дадената мутация, спрямо регистрираните мутации в UMD базата данни. Открити бяха 9 мутации в *TP53* гена непубликувани досега в базите данни.

### 4.2.3. ОЦЕНКА НА ПРОГНОСТИЧНАТА СТОЙНОСТ НА ГЕНЕТИЧНИТЕ ИЗМЕНЕНИЯ В *IDH1*, *IDH2* И *TP53*

По литературни данни мутациите в *IDH1* и *IDH2* корелират с по-дълга преживяемост при глиома и са характерни за по-млади пациенти<sup>(3)</sup>. Това беше потвърдено и в нашето проучване – наблюдавахме статистически значими разлики в преживяемостта на двете групи (с и без мутация;  $p < 0.001$ ) - **Фиг.4.8 а**).

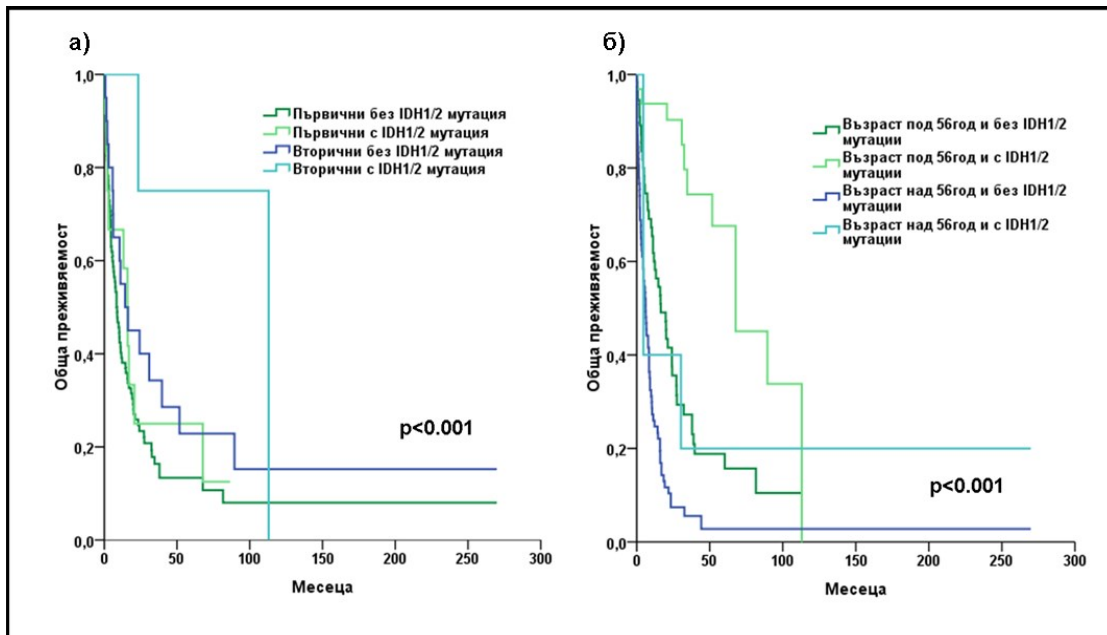


**Фигура 4.8.** Преживяемост на пациентите с глиални тумори в зависимост от наличието на: **а)** мутация в *IDH1/2*; **б)** мутация в *TP53*; **в)** полиморфизъм rs11554137 в *IDH1* гена. На абсцисата е показана преживяемостта в месеци, а на ординатата – общата преживяемост.

*IDH1/2* мутации бяха наблюдавани по-често при глиоми II и III степен, но поради малкия брой тумори II и III степен тази характеристика не показва статистическа значимост ( $p = 0.2$ ). Генетичните изменения в *IDH1/2* бяха по-чести при вторичните глиоми (26.7%) отколкото при първичните (8%). Статистически анализ беше извършен, независимо от откритите мутации и за намерения полиморфизъм rs11554137 в *IDH1* гена. Не беше открита статистическа значима връзка между наличието му и преживяемостта ( $p = 0.095$ ; **Фиг.4.8 в**). Същите изчисления бяха направени и за *TP53* гена – **Фиг.4.8 б**). Мутациите в *TP53* гена не показаха статистически значима корелация с никой от клинични показатели, нито с преживяемостта ( $p = 0.21$ ).

Тъй като генетичните изменения в *IDH1* се асоциират по-често с вторичните глиоми (60-90%) отколкото с първичните<sup>(4)</sup>, и съответно по литературни данни при вторичните тумори с наличие на *IDH1* или *IDH2* мутации се наблюдава връзка с прогнозата ние направихме статистически анализ, като разделихме пациентите според мутационния им статус и според възникването на тумора. На **Фиг.4.8 а**) се наблюдава, че пациентите с вторични тумори и наличие на *IDH1/2* мутация са с по-добра прогноза от пациентите, при които липсва мутация ( $p < 0.001$ ). Въпреки, че първичните тумори са с по-лоша преживяемост от вторичните, при тези с *IDH1/2* мутации се наблюдава по-добра прогноза от тези без мутация.

На **Фиг.4.9 б)** се наблюдава статистическа значима разлика в преживяемостта на пациентите в зависимост от възрастта и мутационния статус на *IDH1/2* – тези с мутация са с по-добра прогноза от пациентите, при които липсва мутация ( $p<0.001$ ). Въпреки, че пациентите с възраст на възникване на заболяването над 56 год. са с по-лоша преживяемост, при тези с *IDH1/IDH2* мутации се наблюдава по-добра преживяемост в сравнение с тези без мутация.



**Фигура 4.9.** Преживяемост на пациентите с глиални тумори в зависимост от наличието на *IDH1/2* мутации и: **а)** вида ГБМ тумор; **б)** възрастта на възникване на тумора.

Сох регресионния анализ беше използван с цел изграждане на модел изчисляващ рисковия коефициент за всеки от изследваните фактори. Фактори като наличието на *IDH1/IDH2* мутация ( $p<0.001$ ), възрастта на заболяемост под 56год. ( $p<0.001$ ), KPS статус над 70 ( $p=0.001$ ) и вид глиобластоми – първични или вторични ( $p=0.002$ ) показаха по –добра прогностична стойност. За разлика от тях вида оперативна резекция ( $p=0.173$ ), наличието на открития полиморфизъм в *IDH1* гена ( $p=0.100$ ) и наличието на мутация в *TP53* гена ( $p=0.132$ ) не показаха статистическа значима връзка с прогнозата – **Табл.4.3.**

**Таблица 4.3.** Моновариационен и мултивариационен Сох регресионен анализ за корелация между характеристиките на пациентите и общата преживяемост

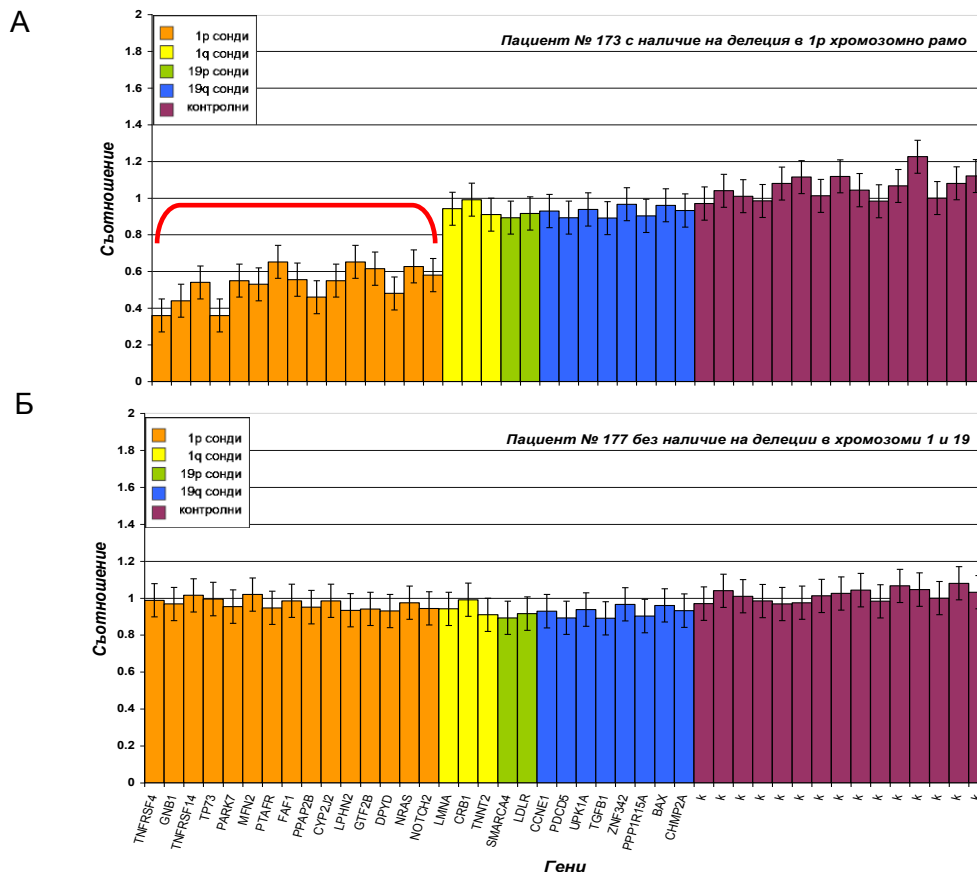
	Унивариационен Сох регресионен анализ			Мултивариационен Сох регресионен анализ		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
<b>Възраст (за година)</b>	1.048	1.029-1.067	<0.001	<b>1.045</b>	1.026-1.065	<b>&lt;0.001</b>
<b>Вторични vs.първични ГБМ</b>	0.483	0.306–0.761	0.002	0.628	0.383-1.272	0.065
<b>Вид операция (тотална vs. др)</b>	0.794	0.571-1.106	0.173	*	*	*
<b>KPS (за 10 единици)</b>	0.984	0.979-0.993	0.001	1.005	0.993-1.017	0.431
<b><i>IDH1/IDH2</i> (мутирал vs. немутирал)</b>	0.227	0.134–0.387	<0.001	<b>0.201</b>	0.137–0.565	<b>&lt;0.001</b>
<b>SNP rs11554137 (с vs. без)</b>	0.596	0.322-1.104	0.100	*	*	*
<b><i>TP53</i> (мутирал vs. нормален)</b>	0.770	0.548- 1.196	0.132	*	*	*

\* Показателят не е включен в мултивариационния анализ; HR – hazard ratio; CI – интервал на достоверност; p – p-стойност

Мултивариационният регресионен анализ показа, че единствено възрастта и наличието на *IDH1/IDH2* мутации имат статистическа значимост като независими прогностични фактори. Докато възрастта е предиктор за лоша преживяемост (HR=1.045, т.е. увеличаването с една година е съпроводено с влошаване на прогнозата на пациентите с 4.5 %), то наличието на *IDH1/IDH2* мутации е фактор асоцииран с по-дългата преживяемост (HR=0.201).

### 4.3. АНАЛИЗ ЗА НАЛИЧИЕ НА ГОЛЕМИ ДЕЛЕЦИИ В ХРОМОЗОМИ 1p И 19q

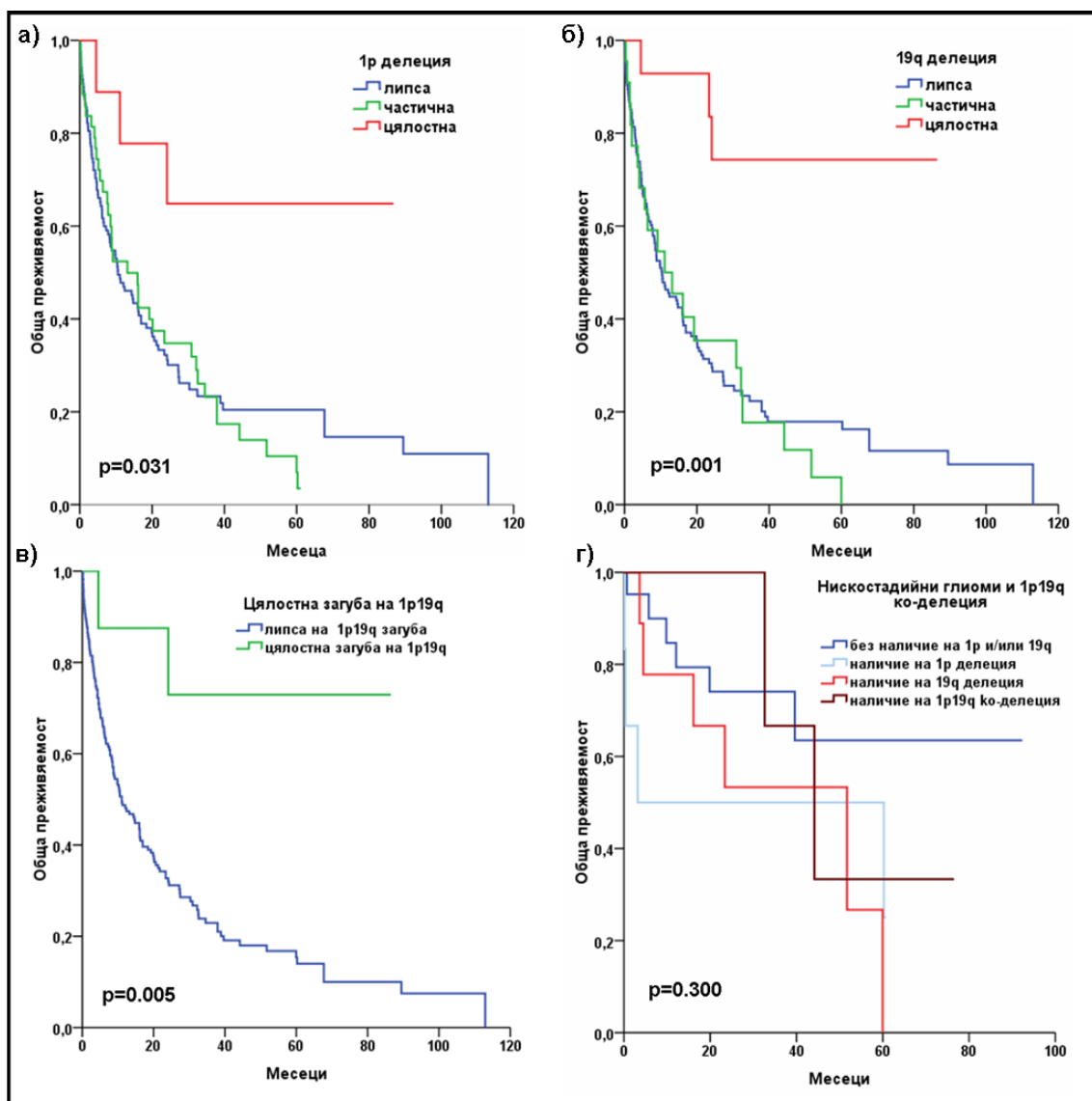
По литературни данни едновременното наличие на делеции в хромозоми 1p и 19q показва връзка с по-добър отговор към лечение и благоприятен изход, не само при олигодендроглиоми, а и при астроцитомии (5). От изследваните 212 тумора при 3 пациента амплификация на фрагментите за прицелните райони не беше осъществена поради естеството на изходния материал, а именно ДНК, изолирана от парафиново блокче. При шест от пробите, анализа не беше извършен поради липсата на достатъчно количество ДНК матрица. В изследваната група от 203 тумора (191 пациента) с глиоми съществува група от 11 пациента, при които има повече от един изследван материал. При трима от тях, туморите са отделени в резултат на провеждането на две различни хирургични резекции, а при един – от три. За останалите осем пациента разликата в туморния материал се дължи на различната форма на съхранение на тъканта, т.е. свеж и съхранен под формата на парафиново блокче материал. Туморите на пациентите претърпели повече от една операция бяха анализирани като самостоятелни проби. При пациента с три операции бяха анализирани материали само от две от тях поради изчерпване на ДНК матрицата от първата операция. Само един от пациентите показва разлика в делеционните събития на туморите от различните операции. Тумор №108 е от първата операция и в него се наблюдава частична делеция на 1p, включваща гените *PARK7*, *MFN2*, *PTAFR*, *FAF1*. Материал №211 е тумор от същия пациент, но от четвърта операция. В този тумор вече се наблюдава делеция на цялото 1p хромозомно рамо, като се открива и ново събитие – делеция на гените *ZNF342* (или *ZNF296*), *PPP1R15A*, *BAX* и *CHMP2A* в късото рамо на 19<sup>-та</sup> хромозома.



Фигура 4.10. Графично представяне на резултати от MLPA анализ: А. пациент №173 с наличие на 1p делеция; Б. пациент №177 без наличие на делеции в хромозоми 1 и 19.

В изследваната група от пациенти бяха открити делеционни събития в част и/или целите изследвани райони на хромозомните рамена 1p, 1q, 19p и 19q при общо 80 тумора от 78 пациента (39.4%). Делеции, обхващащи цялото късо (p) рамо на хромозома 1 бяха открити в 13 пациента от 67<sup>-те</sup> пациента с поне един делетирал ген в 1p (19.1%). На Фиг.4.10 Б графично са показани пациенти, в единия от които не е открита делеция в изследваните райони, а другият е със загуба на целия изследван 1p регион.

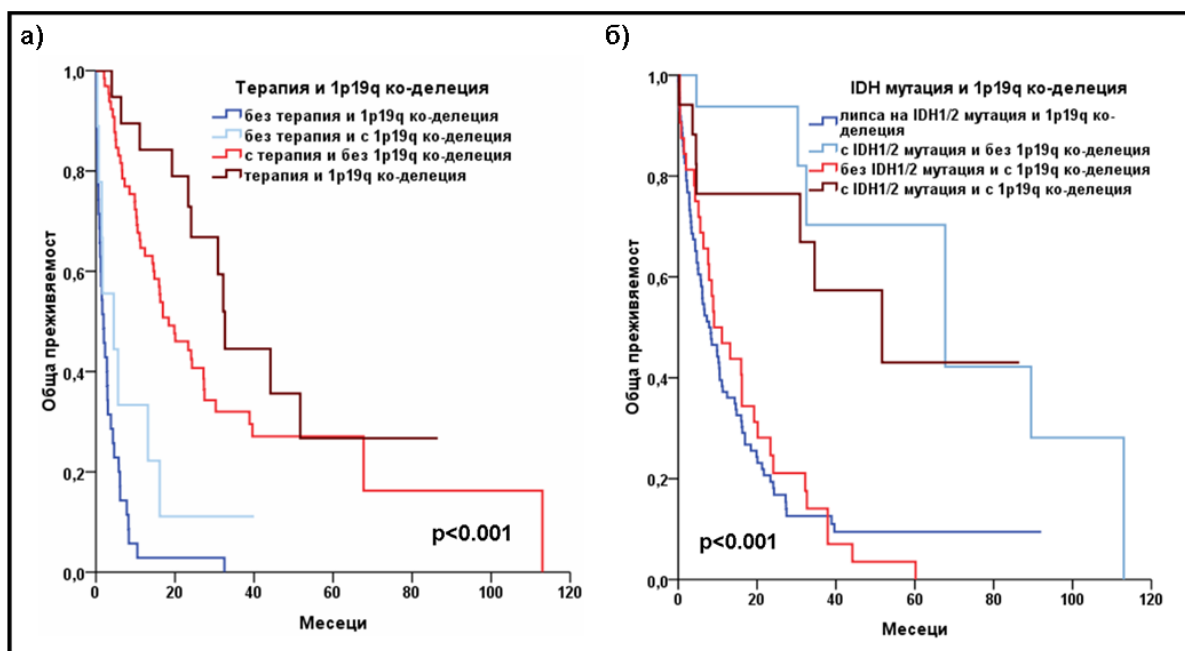
Следващите по-честота в групата се откриват делеции засягащи гените *PARK7-PTAFR*, *FAF1*, *NRAS* и *NOTCH2*, съответно при 7, 5, 5 и 6 пациента. Дванадесет от пациентите притежават 2 делеции в 1p хромозомния район, а при един се наблюдават 1 по-обширна и 3 делеции засягащи само един от гените. В изследваната група 24 пациента показаха наличие на делеционни събития в хромозомно рамо 1q. Десет от пациентите (41.6%) имаха делеция на всичките 3 амплифицирани района в 1q, кодиращи гените *LMNA*, *CRB1*, *TNNT2*, и в 6 (25%), делеции засягащи *CRB1* и *TNNT2* гените. Единична делеция в гените *LMNA*, *CRB1* или *TNNT2* беше наблюдавана съответно в 2 (8.3%), 2 (8.3%) и 4 (16.6%) от пациентите. При пациентите с ОД над 80% (5 от 6-те пациента с ОДII и 7 от 9-те с ОДIII) показват наличие на 1p делеция, докато при останалите групи процентът, които заемат пациентите с този тип делеция са съответно 11%, 47% и 27% за пациентите с астроцитом II, III стадий и ГБМ. При пациентите с диагноза олигоастроцитома беше отбелязано наличие на 1p делеционни събития с честота 66%, най-вероятно поради малкия брой на изследвани пациенти с тази диагноза (3 броя II стадий и 4 - III). Аналогично е положението с наличието на 1p/19q коделеция, което се наблюдава в най-голям процент при пациентите с хистологична диагноза олигодендроглиома (78%), докато при АAI е 30% и ГБМ е едва 15%.



**Фигура 4.11.** Преживяемост на пациентите с глиални тумори в зависимост от наличието на делеционния им статус в: а) 1p делеция ; б) 19q делеция; в) 1p19q делеция; г) НСГ и 1p19q делеция

С помощта на Kaplan-Meier анализ на преживяемостта беше установено, че наличието на делецията на цялото дълго рамо на хромозома 1 ( $p=0.031$ ; **Фиг.4.11 а**) и късо рамо на хромозома 19 ( $p=0.001$ , **Фиг.4.11 б**) показва по –добра прогностична стойност, за разлика от наличието на частична загуба или липсата на такава. Анализа на двете събития заедно,

независимо дали е частична или цялостна загубата не доведе до очаквания резултат. При анализа на данните за едновременно наличието пълна 1p и 19q загуба показва значима връзка с преживяемостта в цялата изследвана група ( $p=0.005$ ; **Фиг.4.11 в**), но не и в групата на ниско-стадийните глиоми ( $p=0.300$ ; **Фиг.4.11 з**). Пациентите, при които се наблюдава прилагане на терапия, независимо дали е лъче-, химиотерапия или комбинация от двете, и наличието на 1p19q едновременна загуба, показват значително по-висока преживяемост в сравнение с тези, при които няма коделеционното събитие ( $p<0.001$ ). За разлика от кооперативния ефект между терапевтичния подход и 1p19q коделецията, при сравняването на *IDH1/IDH2* мутациите с хромозомните загуби не се наблюдава акумулативния ефект на два положителни прогностични фактора. Пациентите с наличие на *IDH1/IDH2* мутации показват по-висока преживяемост, независимо от присъствието на коделецията ( $p<0.001$ ). След извършване на мултивариационния регресионен анализ, с независима прогностична стойност се откриха възрастта ( $p<0.001$ , HR 1.047), диагнозата ( $p=0.011$ , HR 0.204), терапията ( $p<0.001$ , HR 0.187), и наличието на *IDH1/IDH2* мутации ( $p=0.001$ , HR 0.291).



**Фигура 4.12.** Преживяемост на пациентите с глиални тумори в зависимост от наличието на 1p/19q делеционния им статус и: **а)** наличието на терапия; **б)** *IDH1/2* мутационния статус.

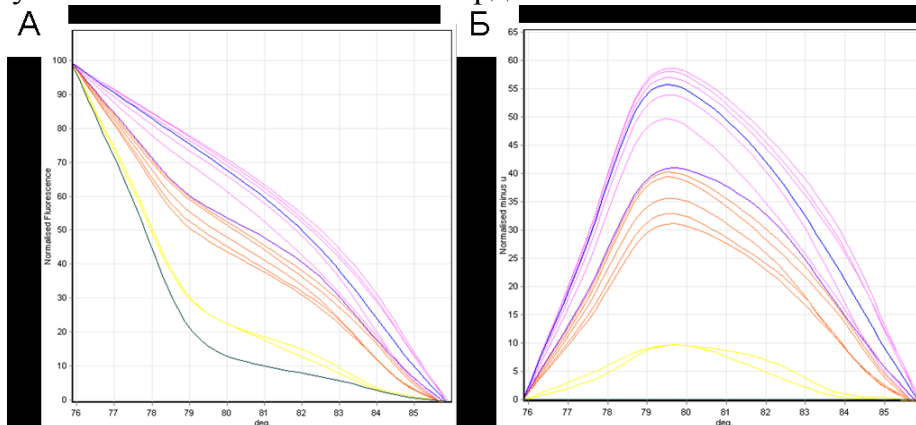
**Таблица 4.4.** Унивариационен и мултивариационен Cox регресионен анализ за корелация между характеристиките на пациентите и общата преживяемост

	Унивариационен Cox регресионен анализ			Мултивариационен Cox регресионен анализ		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
<b>Възраст (за година)</b>	1.065	1.049 - 1.081	<0.001	<b>1.047</b>	1.030 - 1.065	<b>&lt;0.001</b>
<b>Диагноза (ОД vs другите)</b>	0.225	0.072 - 0.709	0.011	<b>0.204</b>	0.060 - 0.691	<b>0.011</b>
<b>Вид операция (тотална vs. др)</b>	0.826	0.584 - 1.116	0.277	*	*	*
<b>KPS (за 10 единици)</b>	0.422	0.295 - 0.603	<0.001	1.006	0.993-1.019	0.362
<b>Терапия (наличие vs липса)</b>	0.168	0.114 - 0.248	<0.001	<b>0.187</b>	0.115 - 0.302	<b>&lt;0.001</b>
<b>1p делеция (цялостна vs другите)</b>	0.246	0.078 - 0.774	0.017	0.588	0.097 - 3.569	0.564
<b>19q делеция (цялостна vs другите)</b>	0.157	0.050 - 0.495	0.002	4.390	0.724 - 26.623	0.108
<b>1p19q делеция (цялостна vs другите)</b>	0.173	0.043 - 0.701	0.014	0.924	0.404 - 2.111	0.851
<b><i>IDH1/IDH2</i> (мутирал vs. нормален)</b>	0.227	0.134 - 0.387	<0.001	<b>0.291</b>	0.140 - 0.608	<b>&lt;0.001</b>
<b><i>SMARCA4_LDLR</i>(делетирал vs не)</b>	0.350	0.143 - 0.857	0.022	0.442	0.140 - 1.459	0.184
<b><i>CCNE1_CHMP2A</i>(делетирал vs не)</b>	0.445	0.225 - 0.877	0.19	1.053	0.422 - 2.422	0.912

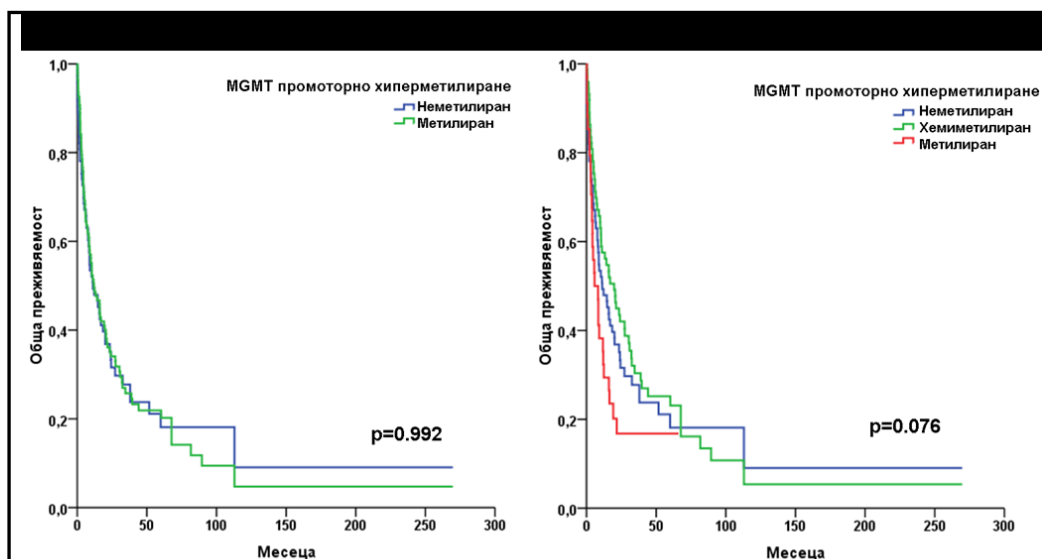
\* Показателят не е включен в мултивариационния анализ; HR – hazard ratio; CI – интервал на достоверност; p – p-стойност

#### 4.4. АНАЛИЗ НА MGMT ПРОМОТОРНО ХИПЕРМЕТИЛИРАНЕ

ДНК-и, изолирани от 212 глиални тумори, бяха използвани за анализ на промоторното хиперметиране в *MGMT* чрез метода MS-HRM. Извършена беше оптимизация на условията на амплификация и стъпката на топене на получения продукт, като успоредно бяха ползвани и контролни ДНК на фирмата Qiagen -неметирана, 50% метилирана (смес от равни количества неметирана и метилирана ДНК) и 100% метилирана ДНК (**Фиг.4.13**). Промоторно хиперметиране на *MGMT* беше наблюдавано при 116 от общо 212 изследвани тумора (53.5%), като 100% метилиране бе наблюдавано при 35 (30% от всички метилирани тумори). Поради високия процент на метилиране установено в *MGMT* гена, беше проведено бисулфитно секвениране с цел потвърждаване на резултатите от MS-HRM. Получените резултатите от секвенирането доказаха, че е имало специфично свързване на праймерите с метилираната ДНК, следователно резултатите от анализа бяха потвърдени.



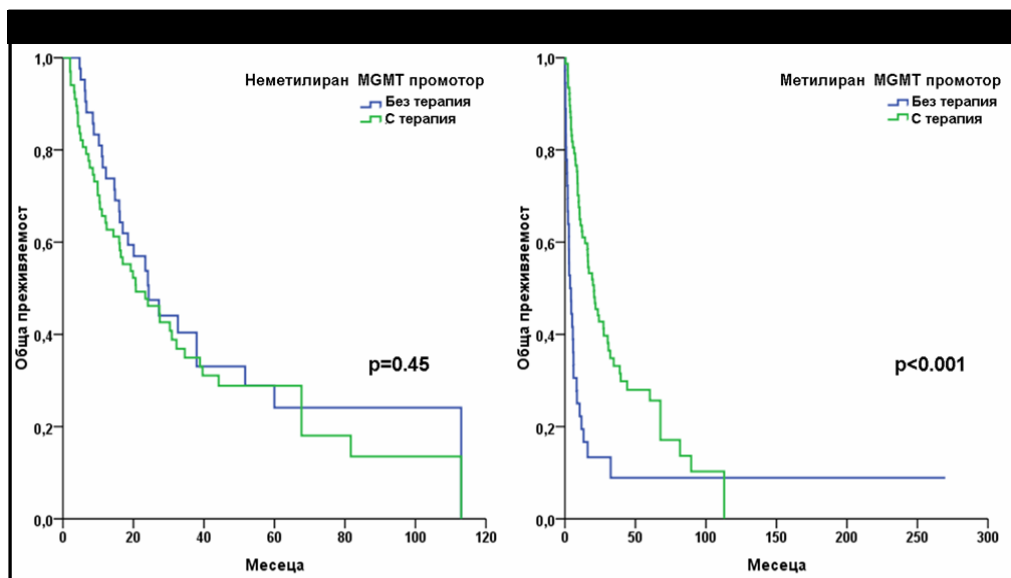
**Фигура 4.13.** Нормализирани HRM данни. Три групи са видими във всеки панел. Жълтите криви представляват неметираните пробите, в оранжево са частично метилираните проби и в светло лилаво - напълно метилираните проби. Зелените, лилавите и сините криви представляват съответно неметираните, частично метилирани и напълно метилирани контролни ДНКи.



**Фигура 4.14.** Преживяемост на пациентите с глиални тумори в зависимост от промоторно хиперметиране в *MGMT* гена. На абсцисата е показана преживяемостта в месеци, а на ординатата – общата преживяемост. А. наличие на метилиране (зелена крива) или липса (синя крива) Б. наличие на пълно метилиране (червена крива), хемиметилиране (зелена крива) или липса на метилиране (синя крива)

Промоторното хиперметиране на *MGMT* гена в изследваната група тумори не показва статистически значима корелация с преживяемостта ( $p=0.992$ ) – **Фиг.4.14 А**, въпреки че при разделянето в три групи беше установена тенденция за по-лоша преживяемост при пациентите с напълно метилиран промотор ( $p=0.076$ ) – **Фиг.4.14 Б**.

Тъй като при изследването на промоторно хиперметиране на *MGMT* проведено при първите 30 пациента беше установена асоциация с преживяемостта при пациенти, третирани с химио- и лъчетерапия, беше проведен и анализ, при които пациентите с неметиран и метиран *MGMT* бяха изследвани за връзка с проведена или не терапия. При пациентите с неметиран промотор не беше достигната статистическа значимост ( $p=0.45$ ) – **Фиг.4.15 А**, докато при туморите с метиран промотор на гена се наблюдава значително по-добра преживяемост при прилагане на терапия, без значение дали е лъче- или химиотерапия ( $p<0.001$ )- **Фиг.4.15 Б**. Въпреки, че по литературни данни при туморите с хиперметиран *MGMT* се срещат по-често мутации в гена *IDH1* <sup>(6)</sup> в нашето проучване само 24 тумора с метиран *MGMT* носят мутация в *IDH1* от общо 116 тумора (20%) срещу 17 от 94 тумора (18.08%) без метиране в *MGMT*. Не беше установена статистически значима корелация между наличието на *IDH1* мутация и метирането на *MGMT*.



**Фигура 4.15.** Преживяемост на пациентите с глиални тумори, подложени на лечение с лъче- и/или химиотерапия, в зависимост от липсата (А панел) или наличието (Б панел) на промоторно хиперметиране в *MGMT* гена. На абсцисата е показана преживяемостта в месеци, а на ординатата – общата преживяемост.

#### 4.5. АНАЛИЗ НА МИКРОСАТЕЛИТНА НЕСТАБИЛНОСТ

За провеждането на този анализ беше подбрана група от 17 пациента, на които е изяснен метилационния статуса на промотора на *MGMT*, има данни за провеждането на терапия и има изолирана ДНК от туморна и нормална тъкан. В групата са включени двама пациенти с диагноза астроцитом II стадий, четирима с астроцитом III стадий, един с олигоастроцитом II стадий, един с олигодендроглиома III стадий и девет с глиобластом. Седем от избраните тумори са показали *MGMT* промоторно хиперметиране (41%). За изследване на микросателитната нестабилност бяха подбрани следните 5 маркера - BAT26, D5S346, D18S35, D2S123 и FGA. Получените резултати са представени в **Табл.4.5**.

Наличието на микросателитната нестабилност в изследваната група тумори не показва статистически значима корелация с преживяемостта ( $p=0.452$ ). При 7 от изследваните пациенти се наблюдава промоторно хиперметиране на *MGMT*, при три от тях се наблюдава и МСН. Изследвана беше връзката между наличието на промоторно хиперметиране на *MGMT* гена, МСН и преживяемостта, но отново не беше достигната статистическа значима разлика между групите ( $p=0.782$ ). Тъй като наличието на МСН има връзка с резистентността към химиотерапевтиците, по-конкретно към темозоломид, корелационен анализ бе извършен за наличието на химиотерапия, МСН и преживяемост, но отново не беше достигната статистическа значимост ( $p=0.7$ ).

Таблица 4.5. Резултати, получени от анализа на 5 микросателита при глиоми

Пациент №	D2S123	D5S436	D18S35	Bat26	FGA	MSI/MSS
39	MSS	MSS	MSS	MSS	LOH/MSI	MSI-L/LOH
43	MSS	LOH/MSI	MSS	MSS	MSS	MSI-L/LOH
96	MSS	MSS	MSI	MSS	MSS	MSI-L
112	MSS	LOH/MSI	MSS	MSS	MSS	MSI-L/LOH
135	MSS	MSI	MSS	MSS	MSS	MSI-L
136	MSS	MSS	LOH	MSS	MSS	LOH
146	MSI	MSS	MSS	MSS	MSI	MSI-L
148	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS
149	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS
159	MSS	MSS	LOH	MSS	MSI	MSI-L
161	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS
169	MSI	MSS	MSS	MSS	MSS	MSI-L
172	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS
178	MSS	MSS	LOH	MSS	MSS	LOH
207	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS
209	MSI	MSI	MSS	MSS	LOH/MSI	MSI-H/LOH
212	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS

#### 4.6. АНАЛИЗ НА ЕКСПРЕСИОННИ МАРКЕРИ С ПРОГНОСТИЧНА СТОЙНОСТ

Проведе се генно-експресионен анализ на 14 гена (*CAIX*, *EGFR*, *FLT-1*, *HIF1A*, *HIF2A*, *HIF3A*, *KDR*, *MMP9*, *SOX2*, *SOX6*, *SOX8*, *SOX9*, *TGF-β2* и *VEGFA*) при група от туморни тъкани (59 мозъчни тумора) в сравнение с контролна група от периферна нетуморна мозъчна тъкан (14 тъканни проби от пациенти с мозъчен тумор).

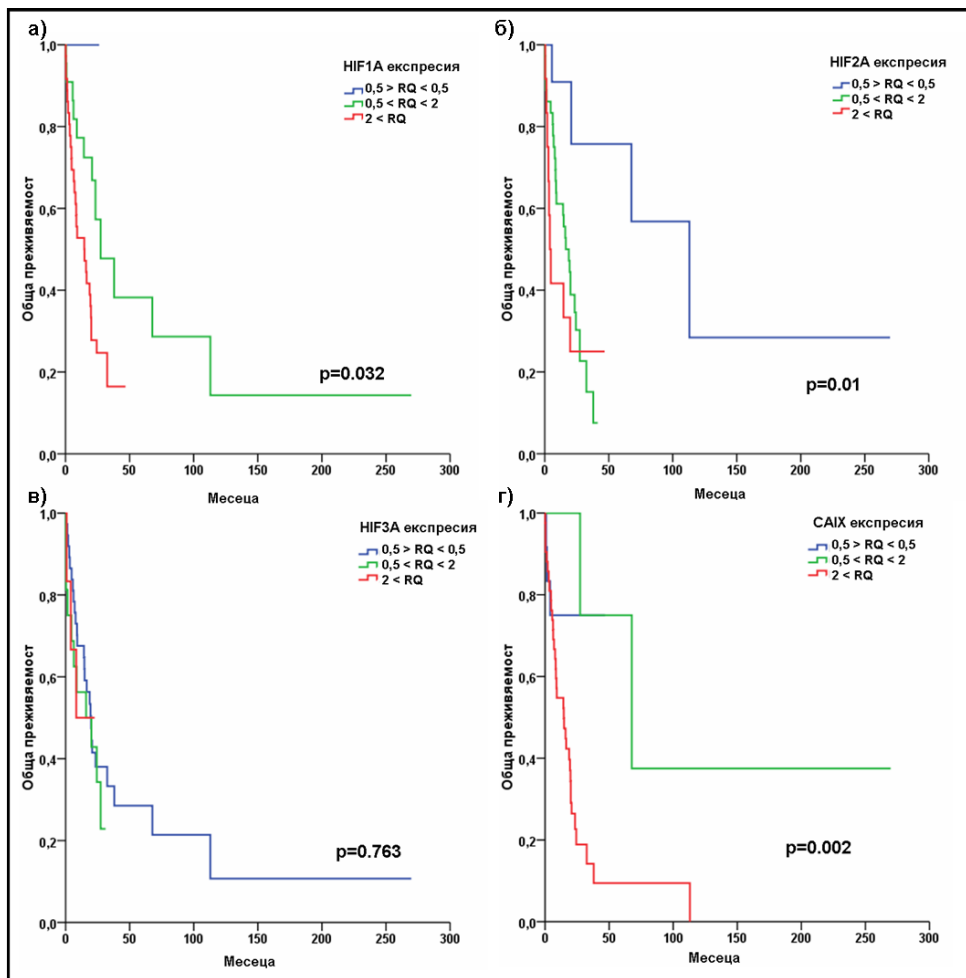
При анализа на резултатите бяха получени следните данни:

**HIF1a** - Намалена експресия беше наблюдавана само при един (1.7%) тумор и то с диагноза анапластичен астроцитом III. Тридесет и шест (61%) от пациентите показаха повишена експресия на изследвания ген, а при 22 (37.3%) тумора тя беше нормална. Групата на глиобластомите включва 45 тумора, при които се наблюдава както нормална, така и увеличена експресия на изследвания ген. В множеството от изследваните проби (27 бр, 60%) се наблюдава повишена, при 18 нормална експресия.

**HIF2a** - Намалена експресия на *HIF2a* беше наблюдавана при 11 пациента (18.6%) двама, от които със смесен тип астроцитом и двама с диагноза анапластичен астроцитом III. Тридесет и шест (61%) от пациентите показаха нормална експресия на изследвания ген, а при 12 (20.4%) тумора тя беше повишена. Групата на глиобластомите включва 45 тумора, при които в множеството от изследваните проби (30 бр, 66.7%) се наблюдава нормална експресия. При 8 тумора се наблюдава увеличена, а при 7 намалена експресия.

**HIF3a** - Намалена експресия беше наблюдавана при повечето от пациентите - 37 (62.7%). При 16 (27.1%) от пациентите беше установена нормална експресия на изследвания ген, а при 6 (10.2%) тумора – повишена. От 45 глиобластоми, в 29 (64%) се наблюдава нормална експресия. При 12 наблюдаваме понижена, а при пет повишена експресия. Интересно е, че 83% от случаите с увеличена *HIF3a* експресия са с поставена клинична диагноза глиобластом. Статистически значими разлики в преживяемостта на трите групи - с понижена, с повишена и нормална експресия, не беше наблюдавана ( $p=0.763$ ) - **Фиг.4.16 в**.

**CAIX** - В изследваната група тумори с нормална експресия са 5 (2.3%) тумора, с понижена – 12 (8.5%) тумора и с повишена – 42 (71.2%) тумора. При около 35% от туморите с повишена експресия в изследвания ген се наблюдава увеличаване над 50 пъти на експресионните нива, а при две проби нивата надвишават 200 пъти. Групата на глиобластомите включва 45 тумора, при които се наблюдава както намалена, така и увеличена експресия на изследвания ген. В повечето от изследваните проби (39 бр, 86.7%) се наблюдава повишена експресия, при 2 нормална експресия и при 4 намалена експресия.



**Фигура 4.16.** Преживяемост на пациентите с глиални тумори в зависимост от експресията на гените: а) *HIF1a*; б) *HIF2a*; в) *HIF3a*; г) *CAIX*

Всички фактори показали прогностична стойност бяха индивидуално анализирани с помощта на унивариационния Cox регресионен анализ. Резултатите от проведените статистически анализи са представени в **Табл.4.6**.

**Таблица 4.6.** Моновариационен и мултивариационен Cox регресионен анализ на корелациите между характеристиките на пациентите и общата преживяемост

	Унивариационен Cox регресионен анализ			Мултивариационен Cox регресионен анализ		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
<b>Възраст</b> (за година)	1.058	1.030-1.087	<0.001	<b>1.043</b>	1.011-1.076	<b>0.008</b>
<b>KPS</b> (за 10 единици)	0.973	0.951-0.996	0.022	0.987	0.954-1.020	0.425
<b>Диагноза</b> (ГБМ vs др.)	5.666	1.738-18.473	0.004	4.579	0.804-26.086	0.087
<b><i>HIF1a</i></b> (увеличена vs. др)	2.512	1.212-5.207	0.013	2.149	0.921-5.016	0.077
<b><i>HIF2a</i></b> (увеличена vs. др)	0.154	0.037-0.644	0.010	0.276	0.050-1.531	0.141
<b><i>HIF3a</i></b> (увеличена vs. др)	0.952	0.290-3.121	0.935	*	*	*
<b><i>CAIX</i></b> (увеличена vs. др)	4.749	1.841-12.249	0.001	1.741	0.426-7.117	0.440

\*Показателят не е включен в мултивариационния анализ; HR–hazard ratio; CI–интервал на достоверност; p–p-стойност(2-tailed)

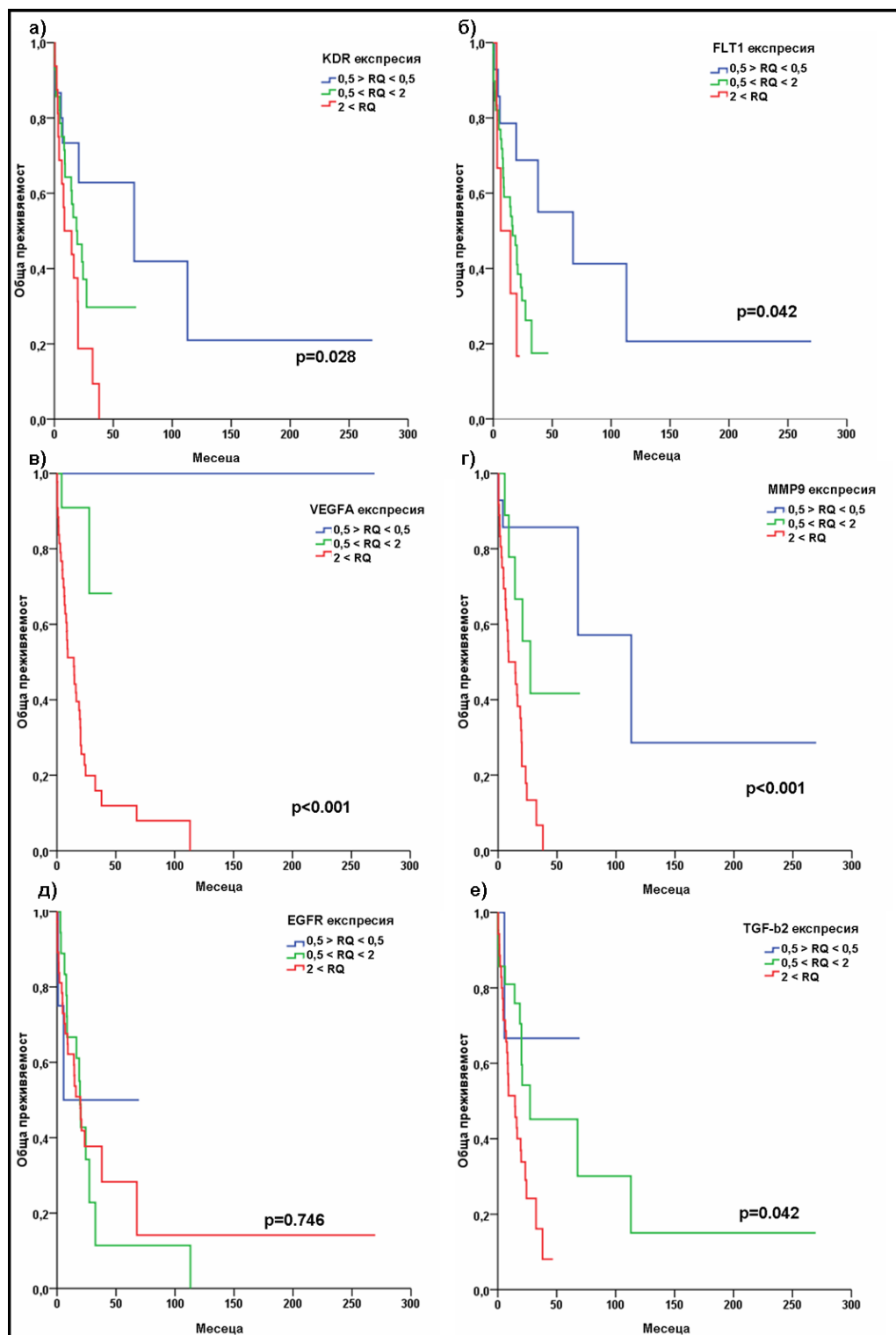
*VEGF-A* - С намалена експресия бяха наблюдавани 5 (8.5%) тумора и при това само един с диагноза глиобластом. Четиридесет и трима (72.8%) от пациентите показаха повишена експресия на изследвания ген, а при 11 (18.6%) тумора тя беше нормална. Групата на глиобластомите включва 45 тумора, при които беше наблюдавана предимно увеличена експресия на изследвания ген (40 тумора, 89%). При 5 тумора беше установена нормална експресия и само при един - намалена. Средната преживяемост на групата с увеличена експресия е значително по-ниска от тази с нормална експресия (14.33 мес. за групата с увеличена експресия към 25.43 мес.). Средната обща преживяемост на групата с нормални нива на гена е 20.92 мес. )- **Фиг.4.17 в**

KDR - Намалена експресия на гена беше наблюдавана при 15 пациента (25.4%) двама, от които с диагноза астроцитом II. Двадесет и осем (46.5%) от пациентите показаха нормална експресия на изследвания ген, а при 16 (27.1%) тумора - повишена. При повечето глиобластоми (21 тумора, 47%) беше наблюдавана нормална експресия. При 9 тумора експресията беше намалена, а при 15 - повишена. Статистически значими разлики в преживяемостта бяха наблюдавани при трите групи - с понижена, с повишена и нормална експресия ( $p=0.028$ )- **Фиг.4.17 а**). Статистически значими разлики в преживяемостта бяха наблюдавани при трите групи - с понижена, с повишена и нормална експресия ( $p=0.028$ ). Групата с повишена експресия показва по-малка средна обща преживяемост (11.55 мес.) в сравнение с групата с понижени нива на изследвания ген – 19.22 мес. Подобно на групата с понижени нива на експресия, групата с нормална експресия показва сравнително сходна обща преживяемост (19.13 мес.).

FLT-1 - С намалена експресия бяха наблюдавани 14 от пациентите (23.7%). При 39 (66.1%) от пациентите експресията на изследвания ген беше нормална, а при 6 (10.2%) тумора - повишена. Групата на глиобластомите от 45 тумора включваше 31 тумора (69%) с нормална експресия. При 6 тумора беше наблюдавана увеличена, а при 10 - намалена експресия. Статистически значими разлики бяха наблюдавани в преживяемостта на трите групи - с понижена, с повишена и нормална експресия ( $p=0.042$ ) - **Фиг.4.17 б**). Групата с повишена експресия показва по-ниска обща преживяемост (10.48 мес.) в сравнение с групата с понижени експресионни нива на изследвания ген – 19.83 мес. Подобно на групата с увеличена нива на експресия, тази с нормална експресия показва сравнително ниска обща преживяемост (16.43 мес.).

MMP9 - При анализа на генната експресия на *MMP9* бяха установени следните групи - с нормална експресия са 9 (15.2%) тумора, с понижена – 14 (23.7%) тумора и с повишена – 36 (61%) тумора. При около 13 (29%) от туморите с повишена експресия в изследвания ген се наблюдава увеличаване над 50 пъти на експресионните нива, а при четири проби нивата надвишават 200 пъти. При глиобластомите беше наблюдавана както намалена, така и увеличена експресия на изследвания ген. В множеството от изследваните проби (33 бр, 73%) беше наблюдавана повишена експресия, при 5 - нормална експресия и при седем - намалена експресия. Получените данни за нивата на експресия на *MMP9* гена при изследваните тумори бяха анализирани за връзка с данните за обща преживяемост. Беше установена връзка между наличието на свръхекспресия на гена *MMP9* и лошата прогноза. Групата с повишена експресия показва значително по-малка обща преживяемост (12 мес.) в сравнение с другите две групи – 48.7 мес. за групата с понижена и 22.9 мес. за групата с нормална експресия (**Фиг.4.17 г**);  $p<0.001$ ).

EGFR - В нашата група с понижена експресия са 4 (6.8%) тумора, с нормална – 18 (30.5%) тумора и с повишена – 37 (62.7%) тумора. При около 10% от туморите с повишена експресия в изследвания ген се наблюдава увеличаване над 50 пъти на експресионните нива, а при две проби нивата надвишават 100 пъти. Групата на глиобластомите от 45 тумора включва 27 проби (60%) с повишена експресия, 16 с нормална и трима – с намалена експресия. Значими разлики в преживяемостта не бяха установени ( $p=0.746$ ; **Фиг.4.17 д**). Групата с повишена експресия показва сходна обща преживяемост (23 мес.) с групата с нормална експресия - 22 мес. Въпреки това беше наблюдавана значима разлика в общата преживяемост при сравнение на пациентите с повишени нива на *EGFR*, разделени според началото на развитие на заболяването на ранно - под 56 години и късно – над 56 години (както следва 21 спрямо 7 месеца,  $p=0.005$ ). При групата с нормални нива на експресия такава значима връзка не беше открита ( $p=0.09$ ).



**Фигура 4.17.** Преживяемост на пациентите с глиални тумори в зависимост от експресията на гените: а) KDR; б) FLT-1; в) VEGF-A; г) MMP 9; д) EGFR; е) TGF- $\beta$ 2

TGF- $\beta$ 2 - При изследването на TGF- $\beta$ 2 понижена експресия беше установена при 3 (5%) тумора, нормална – при 21 (35.6%) тумора и повишена – при 35 (59.3 %) тумора. Групата на глиобластомите включва 45 тумора, при които се наблюдава както намалена, така и увеличена експресия на изследвания ген. При тридесет и две от изследваните проби (71%) се наблюдава повишена експресия, при 9 нормална и при 2 - намалена експресия. Статистически значими разлики в преживяемостта на трите групи - с понижена, с повишена и нормална експресия, беше наблюдавана ( $p=0.042$ ) - **Фиг.4.17 е)**. Групата с нормална експресия показва най-дълга обща преживяемост (86 мес.) в сравнение с тези с повишена (17 мес.) и с понижена експресия (20 мес.). Всички фактори показали прогностична стойност бяха индивидуално анализирани с помощта на унивариационния Cox регресионен анализ. Резултатите от проведените статистически анализи са представени в **Табл.4.7**.

**Таблица 4.7. Моновариационен и мултивариационен Sox регресионен анализ на корелациите между характеристиките на пациентите и общата преживяемост**

	Унивариационен Sox регресионен анализ			Мултивариационен Sox регресионен анализ		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
<b>Възраст</b> (за година)	1.058	1.030-1.087	<0.001	<b>1.039</b>	1.003-1.066	<b>0.032</b>
<b>KPS</b> (за 10 единици)	0.973	0.951-0.996	0.022	0.981	0.952-1.011	0.215
<b>Диагноза</b> (ГБМ vs др)	5.666	1.738-18.473	0.004	1.361	0.289-6.403	0.697
<b>VEGFA</b> (увеличена vs. др)	11.544	2.77-48.000	0.001	<b>7.934</b>	1.210-52.044	<b>0.031</b>
<b>KDR</b> (увеличена vs. др)	0.428	0.176-1.038	0.060	*	*	*
<b>FLT-1</b> (увеличена vs. др)	0.343	0.131-0.898	0.029	0.469	0.143-1.541	0.212
<b>MMP9</b> (увеличена vs. др)	5.473	2.354-12.727	<0.001	1.230	0.420-3.596	0.706
<b>EGFR</b> (увеличена vs. др)	1.021	0.542-1.926	0.948	*	*	*
<b>TGF-β2</b> (увеличена vs. др)	2.387	1.174-4.852	0.016	0.653	0.254-1.678	0.376

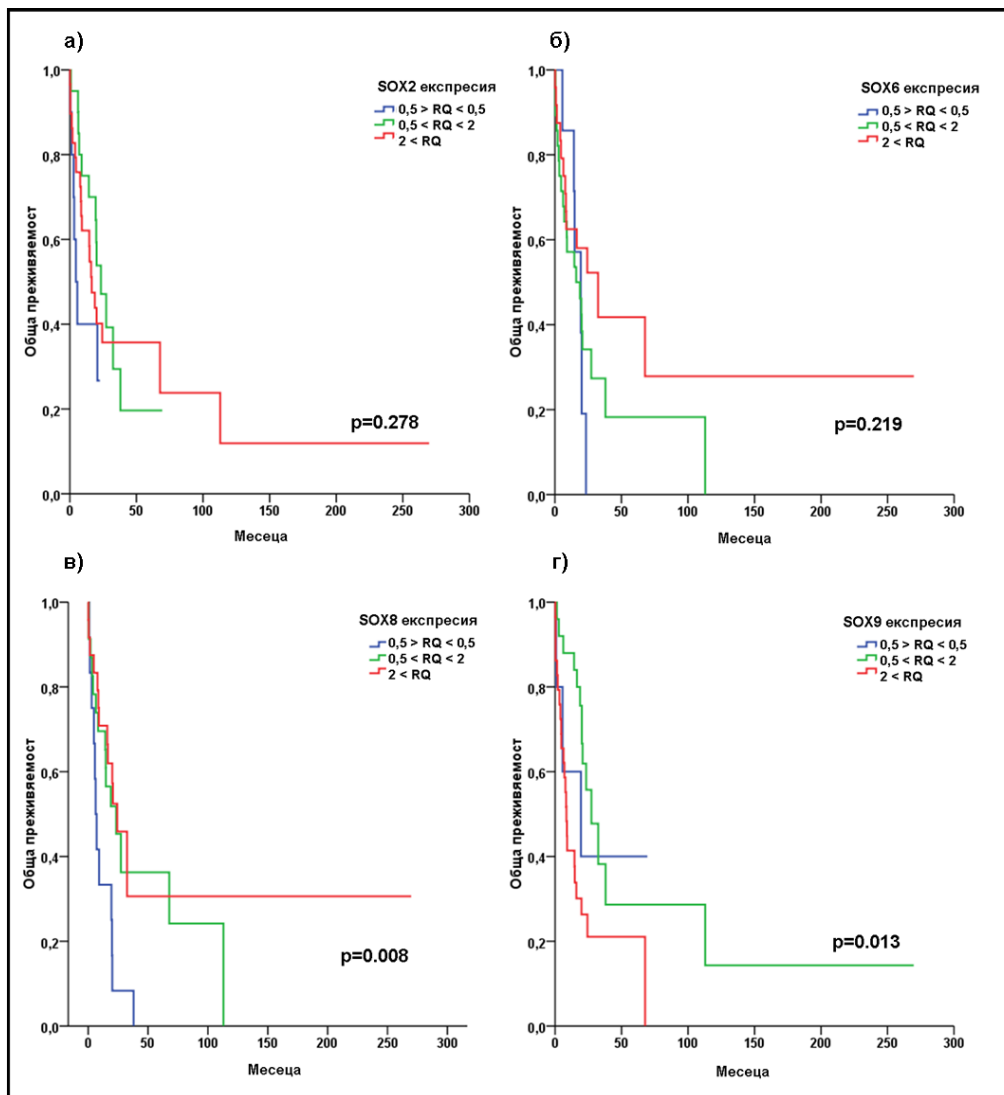
\*Показателят не е включен в мултивариационния анализ; HR-hazard ratio; CI-интервал на достоверност; p-стойност(2-tailed)

**SOX2** - Анализът на SOX2 експресията показва намалена експресия при 10 от пациентите – 16.9%. При 20 (33.9%) от пациентите беше наблюдавана нормална експресия на гена, а при 29 (49.5%) тумора - повишена. Групата на глиобластомите включва 45 тумора, при които беше наблюдавана както намалена, така и увеличена експресия на изследвания ген. В групата от изследваните проби при 21 пациенти беше установено повишение в генната експресия, при 15 наблюдавахме нормална, а при 9 - понижена експресия. Статистически значими разлики в преживяемостта на трите групи - с понижена, с повишена и нормална експресия, не беше наблюдавана (p=0.278)- **Фиг.4.18 а).**

**SOX6** - С намалена експресия бяха наблюдавани 7 (11.9%) от пациентите. Двадесет и осем (47.5%) тумора показаха нормална експресия на изследвания ген, а 24 (40.7%) тумора - повишена. При 23 глиобластоми не беше наблюдавана промяна в генната експресия, при 7 наблюдавахме понижена, а при 15 - увеличена експресия. Статистически значими разлики в преживяемостта на трите групи - с понижена, с повишена и нормална експресия, не беше наблюдавана (p=0.219)- **Фиг.4.18 б).**

**SOX8** - Намалена експресия на Sox8 беше наблюдавана при 11 пациента (18.6%) двама, от които със смесен тип астроцитом и двама с диагноза анапластичен астроцитом III. Тридесет и шест (61%) от пациентите показаха нормална експресия на изследвания ген, а при 12 (20.4%) тумора тя беше повишена. В групата на глиобластомите беше наблюдавана както намалена, така и увеличена експресия на изследвания ген. В 18 проби не беше установена промяна в генната експресия, при 11 наблюдавахме понижена, а при 16 - увеличена експресия. По литературни данни повишените експресионни нива корелират с по-лошата преживяемост при глиома. Статистически значими разлики в преживяемостта на трите групи според експресията, беше наблюдавана и в нашето проучване (p=0.008)- **Фиг.4.18 в).** Средната преживяемост на групата с увеличена експресия е по-дълга от тази с нормална експресия (28.4 мес. за групата с увеличена експресия към 11.2 мес.)

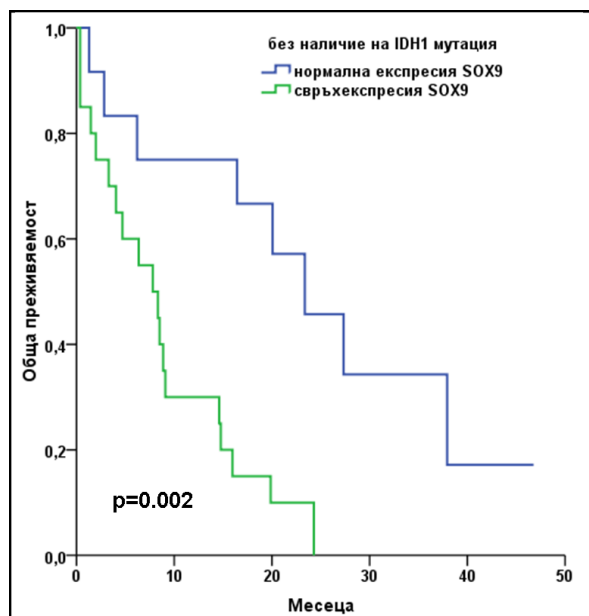
**SOX9** - С намалена експресия на Sox9 бяха наблюдавани 5 пациента (8.5 %) един, от които с диагноза анапластичен астроцитом III. Двадесет и пет (42.4%) от пациентите показаха нормална експресия на изследвания ген, а при 29 (49.1%) тумора беше повишена. При 20 от 45-те глиобластоми беше наблюдавана нормална експресия. При 21 тумора експресията беше увеличена, а при 4 - намалена. Статистическият анализ на резултатите показва значими разлики в преживяемостта на трите групи - с понижена, с повишена и нормална експресия (p=0.013)- **Фиг.4.18 г).** Средната преживяемост на групата с увеличена експресия е по-ниска от тази с нормална експресия (13.4 мес. за групата с увеличена експресия към 35 мес. с нормална). Интересно е, че групата с понижена експресия показва също по-добра преживяемост от групата с повишена експресия (24 мес.).



**Фигура 4.18.** Преживяемост на пациентите с глиални тумори в зависимост от експресията на гените: **а) SOX2; б) SOX6; в) SOX8; г) SOX9;**

Извършен беше корелационен анализ за изследване на взаимовръзките между *SOX* гените и клинично-патологичните характеристики. Всички *SOX* гени показаха силна връзка помежду си, а *SOX6* и *SOX8* силна положителна корелация с наличието на *IDH1* мутация (съответно  $\rho=0.504$  и  $0.443$ ;  $p<0.001$  за двете). Негативна корелация с диагнозата ГБМ показва *SOX6* ( $\rho=-0.261$ ;  $p=0.046$ ), докато експресионните нива на *SOX9* показаха положителна връзка с извършването на тотална резекция и възрастта (както следва  $\rho=0.296$ ,  $p=0.023$  и  $\rho=0.261$ ;  $p=0.045$ ). Освен това данните бяха анализирани според *IDH1* мутационния статус в комбинация с промените в експресионните нивата на *SOX* гените. Резултатите показват, че намалената експресия на *SOX2* не корелира значимо със статуса на *IDH1* ( $p=0.985$ ). В групата на пациентите, които притежават мутации в *IDH1* се наблюдава леко увеличаване на преживяемостта, в сравнение с тези с нормален *IDH1*.

Пациентите с понижена *SOX2* експресия в двете групи - с и без *IDH1* мутации, бяха много малко на брой и недостатъчни за провеждане на анализ за преживяемост. По същия начин, не бяха открити значителни корелации с ОП, когато *IDH1* статус и *SOX6/SOX8* експресията бяха изследвани заедно. Въпреки, че не беше установена корелация между наличието на *IDH1* мутация и *SOX9* експресията, бяха наблюдавани интересни резултати, когато пациентите са разделени в зависимост от техния *IDH1* статус. Пациенти с мутирал ген показаха сходна ОП и в двете групи - със свръхекспресиран и нормално експресиран *SOX9* ген. Въпреки това, пациентите с див тип *IDH1* и нормални нива на *SOX9* показваха значително по-продължителна преживяемост (20.97 месеца) (**Фиг.4.19.**).



**Фигура 4.19.** Преживяемост на пациентите с глиални тумори, при които не е открита мутация в *IDH1* гена в зависимост от експресията на *SOX9* гените

С помощта на Cox регресионен анализ беше установено, че наличието на понижена *SOX8* експресия ( $p=0.005$ ) показва по-добра прогностична стойност, докато наличието на увеличена експресия в гена *SOX9* ( $p=0.009$ ) показва значимост като негативен прогностичен фактор. За разлика от тях наличието на увеличена експресия в гена *SOX2* ( $p=0.911$ ) и *SOX6* ( $p=0.199$ ) не показаха статистическа значима връзка с прогнозата. За извършването на по-прецизен и информативен мултирегресионен анализ, и поради наличието на силни корелационни връзки между *SOX8* и *IDH1* мутационния статус беше извършено изграждането на 3 независими модела (**Табл.4.8** -А, Б и В модели).

**Таблица 4.8.** Мултивариационен Cox регресионен анализ (А, Б и В модели) за между характеристиките на пациентите и общата преживяемост

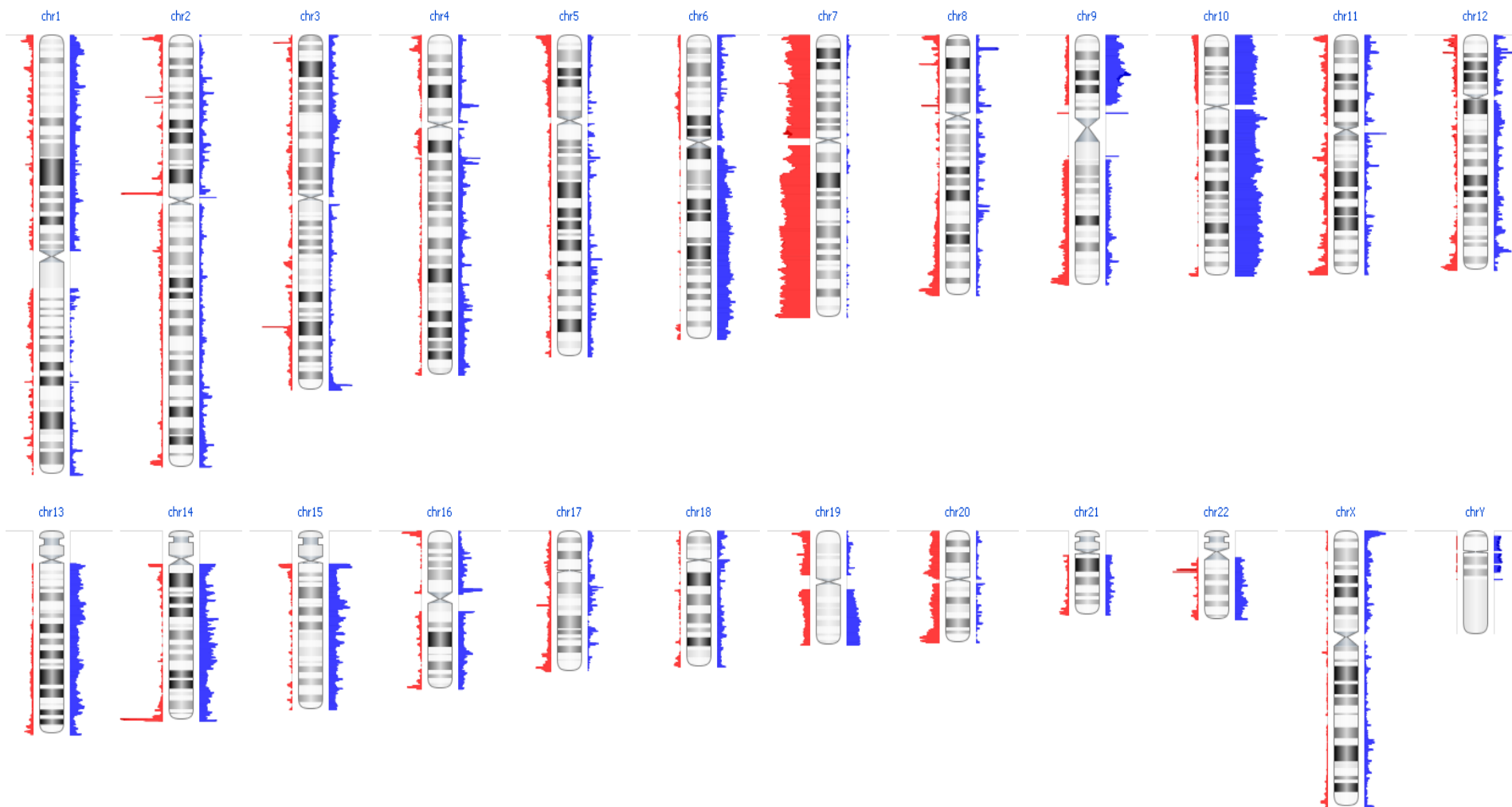
Модел	Характеристика	HR	95% CI	P
А	Възраст (за година)	<b>1.035</b>	1.004 - 1.067	<b>.029</b>
	Диагноза (ГБМ vs др.)	2.413	0.312 - 5.568	.707
	KPS (за 10 единици)	0.983	0.955 - 1.013	.110
	<i>IDH1</i> (мутантен vs. нормален)	<b>0.161</b>	0.038 - 0.681	<b>.013</b>
	<i>SOX9</i> (свръхекспресирани vs др.)	<b>3.058</b>	1.339 - 6.984	<b>.008</b>
Б	Възраст (за година)	<b>1.038</b>	1.003 - 1.074	<b>.034</b>
	Диагноза (ГБМ vs др.)	0.990	0.238 - 4.124	.989
	KPS (за 10 единици)	0.970	0.939 - 1.0-1	.061
	<i>IDH1</i> (мутантен vs. нормален)	<b>0.226</b>	0.054 - 0.953	<b>.040</b>
	<i>SOX8</i> (понижена експресия vs др.)	1.754	0.770 - 3.994	.181
В	Възраст (за година)	1.026	0.997-1.071	.072
	Диагноза (ГБМ vs др.)	1.718	0.390 - 7.561	.474
	KPS (за 10 единици)	<b>0.966</b>	0.935 - 0.977	<b>.034</b>
	<i>SOX9</i> (свръхекспресирани vs др.)	<b>4.686</b>	1.729-10.544	<b>.002</b>
	<i>IDH1</i> (мутантен vs. нормален)	0.267	0.058 - 1.231	.090
	<i>SOX8</i> (понижена експресия vs др.)	<b>3.042</b>	1.194 - 7.754	<b>.020</b>

HR – hazard ratio; CI – интервал на достоверност; p – p-стойност (2-tailed);

#### 4.7. ГЕНОМЕН АНАЛИЗ НА ГЛИАЛНИТЕ ТУМОРИ

При изследването на 58 пациента бяха установени характерните за глиоми геномни изменения, а именно – увеличен брой копия на хромозома 7 и загуба на хромозома 10 –

**Фиг.4.20.**



**Фигура 4.20.** Графично изображение на честотата на откритите при всички пациенти аберациите във всички хромозоми - с червен цвят отляво на хромозомата са отбелязани районите с амплификация, а със син цвят от дясно - районите с делеции.

## 4.7.1. АГРЕГАЦИОНЕН АНАЛИЗ

### 4.7.1.1. STAC

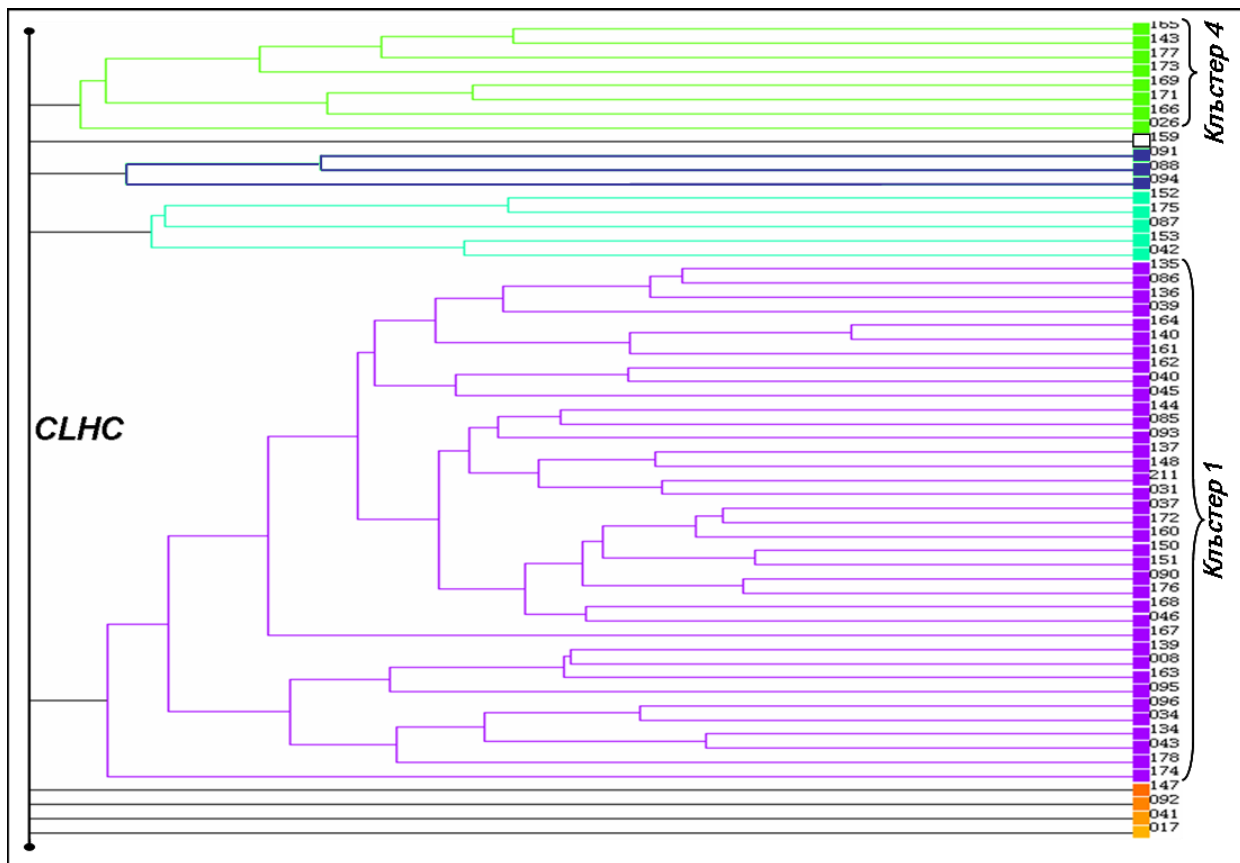
В резултат на извършения STAC анализ в изследваната група пациенти с глиома най-значимите участъци от генома бяха открити из целия геном, но районите с увеличен брой копия (в хромозоми 2, 7, 8, 9, 11 и 20) се различават от тези характеризиращи се със загуба на копийните варианти, засягащи хромозоми 1, 4, 6, 9, 10, 12, 13, 14, 15 и 16. Промени от двата вида се наблюдават единствено в хромозома 9. От гените, разположени в райони показали значими изменения от типа „увеличен брой копия – дубликации” за потенциално отговорни за процеса на канцерогенеза в мозъка бяха селектирани *PXDN*, *ADAP1*, *SKAP2*, *EGFR*, *PLXNA4*, *ARHGEF10* и *CST3* гени. По-голям брой гени бяха наблюдавани в райони показали значими изменения от типа „генетични загуби – делеции”. Засегнатите гени, които ние свързахме с провокиране и възникване на заболяването, бяха следните 20 - *TAF12*, *UBE2K*, *DDX43*, *SENP6*, *SGK1*, *PEX7*, *LATS1*, *TIAM2*, *MTAP*, *CAMK1D*, *GCH1*, *ESR2*, *MTHFD1*, *FUT8*, *NUMB*, *SPG11*, *CSNK1G1* и *SHCBP1*.

### 4.7.1.2. GISTIC

Районите със загуба на копийните варианти (в хромозоми 2, 7, 8, 9, 11 и 20) се различават от тези характеризиращи се с увеличен брой копия, засягащи хромозоми 1, 4, 6, 9, 10, 12, 13, 14, 15 и 16. Промени от двата вида се наблюдават единствено в хромозома 9. От гените, разположени в райони показали значими изменения от типа „увеличен брой копия – дубликации” за потенциално отговорни за процеса на канцерогенеза в мозъка бяха селектирани следните гени: *EGFR*, *MET*, *AGAP2*, *TSPAN31*, *CDK4*, *MARCH9*, *CYP2A*, *CYP27B1*, *METTL1*, *METTL21B*, *TSFM*.

## 4.7.2. ЙЕРАРХИЧНО ГРУПИРАНЕ

При използването на този алгоритъм за анализа на данните получихме следната дендрограма (*Фиг.4.21*). Клъстерният анализ доведе до образуването на общо 9 групи - 4 по-големи и 5 всяка от които съдържаща по един пациент в група. Клъстерна група 1 е с най-голям брой участници – 37 тумора. Преобладаващата група от пациенти (29 на брой) се характеризират с диагноза ГБМ, като само три от тях са прогресирали от по-ниско стадийна глиома. При 5 пациента е налице диагноза АА III, при 2 ААII и само при един е ОДIII. Тази група се характеризира със средна възраст на заболяемост 60 години и ниска средна обща преживяемост (8.42 мес.). Наличие на мутация в *IDH1* гена се наблюдава едва при 21% (8 пациента), три от които са с диагноза ГБМ, а само един е вторичен. Сформираната група 2 е изградена вследствие сходствата в генетичните промени измежду 5 тумора. Двама от членовете ѝ са с диагноза вторичен ГБМ, двама – с АА III стадий и един е със смесен тип глиома – олигоастроцитом. В 80% от групата възрастта на заболяемост е под 50 годишна, KPS статуса е над 70, а средната обща преживяемост е сравнително висока (19.87 мес.). Клъстерна група 3 е представена от 3 пациента с малигнен глиом, два от който ААIII, а един с диагноза вторичен ГБМ. Всички имат възраст на заболяемост над 50 години, но и високи стойности на KPS ( $\geq 80$ ). Групата се характеризира с по-висока средната обща преживяемост (23.07 мес.), което вероятно има връзка с наличието на мутация в *IDH1* гена при пациентите с ААIII. Клъстерна група 4 се състои от 8 тумора, 3 от които с диагноза АII, двама с първична ГБМ и ААIII и един с ОДIII. Тази група се характеризира със средна възраст на заболяемост 42 години, като само 2 от пациентите имат възраст на заболяемост над 45 години. Въпреки, че средната обща преживяемост в групата не показва значително увеличение (15.92 мес.), сто процента от групата има високи стойности на KPS ( $\geq 80$ ) и наличие на мутация в *IDH1* гена. Причината за това се дължи на краткия период от поставянето на диагнозата до момента на събиране данните за преживяемост на тези пациенти, но се очаква групата да покаже значително по-висока преживяемост в сравнение с останалите групи поради за липсата на летално събитие за периода на проследяването им.



**Фигура 4.21.** Дендрограма получена при анализ на данните от микрочиповия анализ чрез Йерархично групиране базирано на пълно сходство (CLHC) (с лилаво - клъстер 4, със светло синьо - клъстер 2, с тъмно синьо - клъстер 3, със зелено - клъстер 4, бяло, тъмно и светло оранжево, тъмно и светло жълто – единични представители в група)

### 4.7.3. СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА ПАЦИЕНТИТЕ ПО ГРУПИ

#### 4.7.3.1. РАЗДЕЛЯНЕ НА ПАЦИЕНТИТЕ СПОРЕД ГРУПИТЕ ПОЛУЧЕНИ ПРИ CLHC

При сравняване на групите, получени при CLHC анализа беше установена статистически значима разлика в преживяемостта на клъстерна група 1 спрямо група 4. Значимите изменения наблюдавани като съществени разлики между двете клъстерни групи, бяха открити в хромозоми 1, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14 и 19 – **Фиг.4.22** оградено в оранжево. Най-висок процент от събитията са локализиращи в хромозома 7, 8 и 10 - в клъстерната група 1 се наблюдават главно намален брой копия в хромозома 8 и 10, за разлика от група 4, при която в хромозома 8 преобладават увеличени брой копия, а в 10-та хромозома се наблюдават сравнително малък брой аберации. Наблюдаваните значими аберации в двете групи от пациенти бяха сравнени и бяха отдиференцирани само тези, при които разликата между групите е статистически значима и процента на припокриване с известни и описани вариации в броя копия е под 55%. В групата от пациенти, оформящи клъстер 1, наблюдаваните аберации довели до намаляване в броя на копията при над 70% от пациентите, засягат 9 гена и един псевдоген, като тези изменения не се наблюдават в нито един от членовете на групата, формираща клъстер 4. Гените, в райони показали значими изменения и с молекулни функции, засягащи развитието, функционирането и регулацията на нервната система, както и свързани с канцерогенезата, бяха отдиференцирани - *UPF2*, *DHTKD1* и *SAMK1D*. И трите гена се намират в хромозома 10, локализиращи в р.14-р.13, като засегнатия регион обхваща 589 587 б.дв. В групата от пациенти оформящи клъстер 4 наблюдаваните аберации от типа „увеличен брой копия – дубликации” довели до увеличаване на броя копия при около 37% от пациентите, липсващи или в единични случаи в групата формираща клъстер 1 са следните гени: *NECAB1*, *ENY2*, *EBAG9*, *SYBU*, *MPZL2*, *HYOU1*, *HMBS*, *PBGD*, *H2AFX*, *HINFP*, *CBL*, *VWA5A*, *ST14*, *MGMT*, *ARHGAP32*, *BARX2*, *APLP2*, *NFRKB* и *PRDM10*. Отдиференцирани бяха и гени, показали връзка с канцерогенезата или заболявания на нервната система при над 70% от

пациентите в клъстер 1 и при под 50% от пациентите в клъстер 4. Те са следните: *ADAP1*, *CYP2W1*, *GPER*, *INHBA*, *EGFR*, *MAGI2*, *GNAI1*, *SEMA3C*, *FEZF1*, *CADPS2*, *PLXNA4*, *PTN*.

#### **4.7.3.2. РАЗДЕЛЯНЕ НА ПАЦИЕНТИТЕ СПОРЕД IDH1 МУТАЦИОННИЯ СТАТУС**

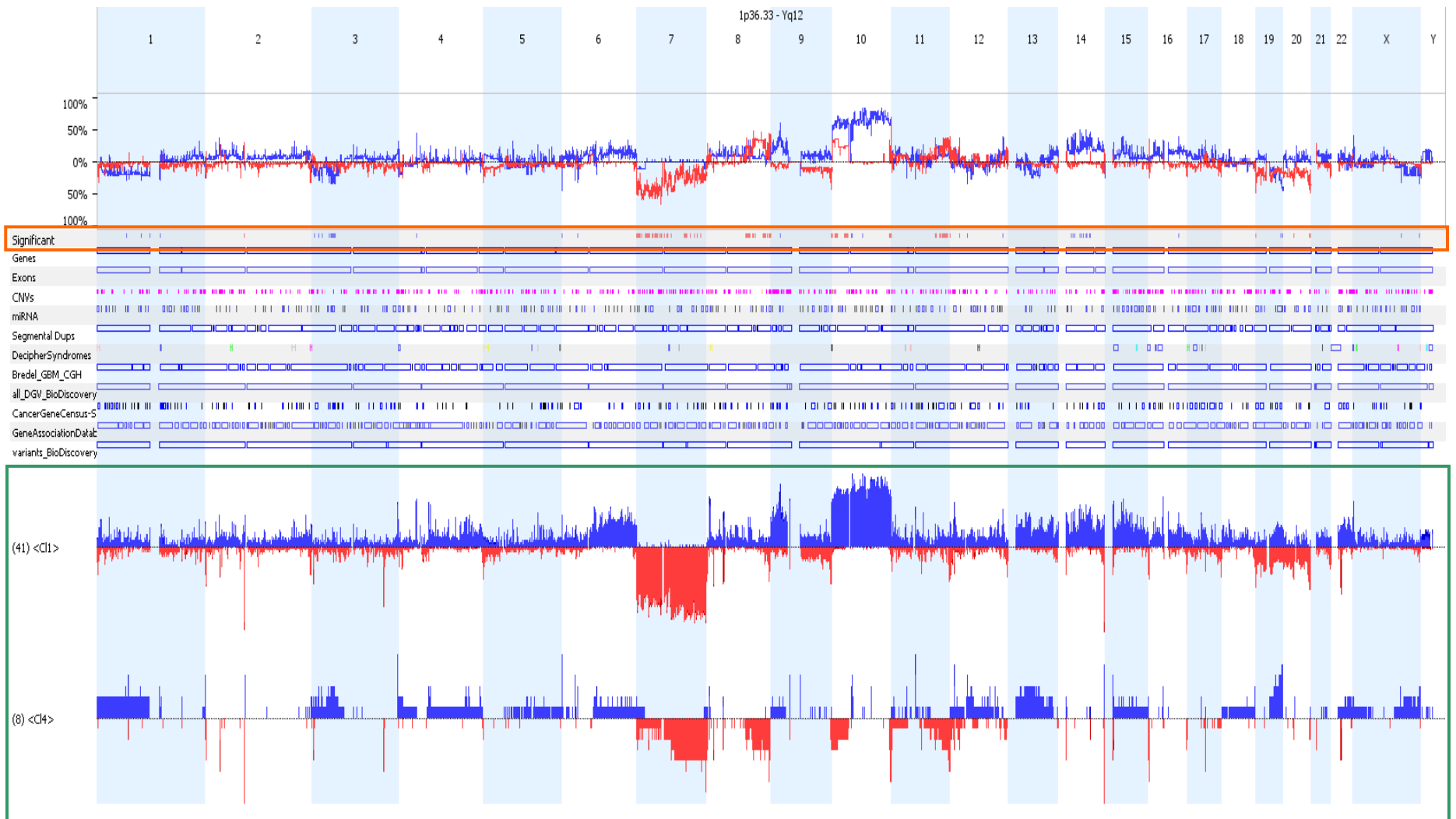
В изследваната група от 58 пациента, наличието на мутация в *IDH1* гена показва статистическа значима връзка с преживяемостта ( $p=4.18E^{-5}$ ). В резултат на това пациентите бяха разделени на четири групи, като фактори на групирането бяха наличието или липсата на *IDH1* мутация и ниска/ висока преживяемост. Пациентите с преживяемост по-голяма от 13 месеца са причислени към групата на дълго преживяващите, докато тези с по-малко от 13 месеца живот с ниска преживяемост.

##### **1. ПАЦИЕНТИ БЕЗ МУТАЦИЯ В IDH1 С НИСКА И ВИСОКА ПРЕЖИВЯЕМОСТ**

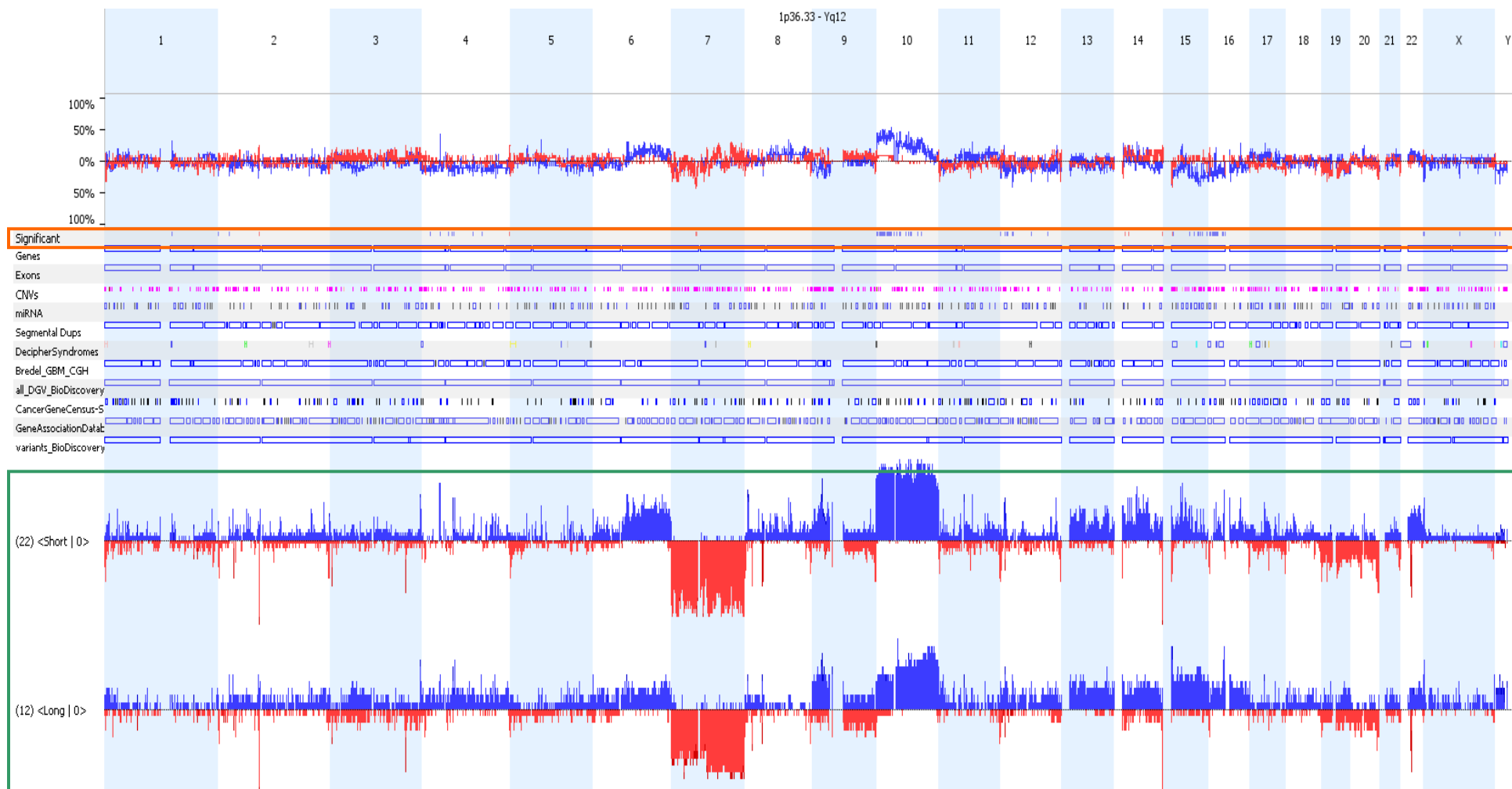
Сравнени бяха данните получени от микрочиповия анализ на 34 пациента, при които не беше открита мутация в *IDH1*, като 12 от тях бяха в групата на дълго преживяващите в сравнение с 22 пациента в групата с ниска преживяемост. Софтуерната програма пресмята разликата в амплитудата и честотата на аберациите между двете групи и отбелязва значимите такива. Значими аберации между изследваните групи се наблюдават в хромозоми 1, 2, 4, 7, 10, 12, 14, 15, 16, 22, X и Y (сините черти в секция „Significant”, **Фиг.4.23**). В групата с повишена обща преживяемост наблюдаваните аберации довели до намаление в броя на копията при 25% от пациентите, засягат следните 8 гени - *ITSN2*, *POLR2B*, *ELOVL6*, *GUCY2C*, *ATF7IP*, *GABARAPL1*, *KLRD1* и *СИТА*, като тези изменения не се наблюдават при нито един от пациентите с понижена обща преживяемост.

##### **2. ПАЦИЕНТИ С МУТАЦИЯ В IDH1 С НИСКА И ВИСОКА ПРЕЖИВЯЕМОСТ**

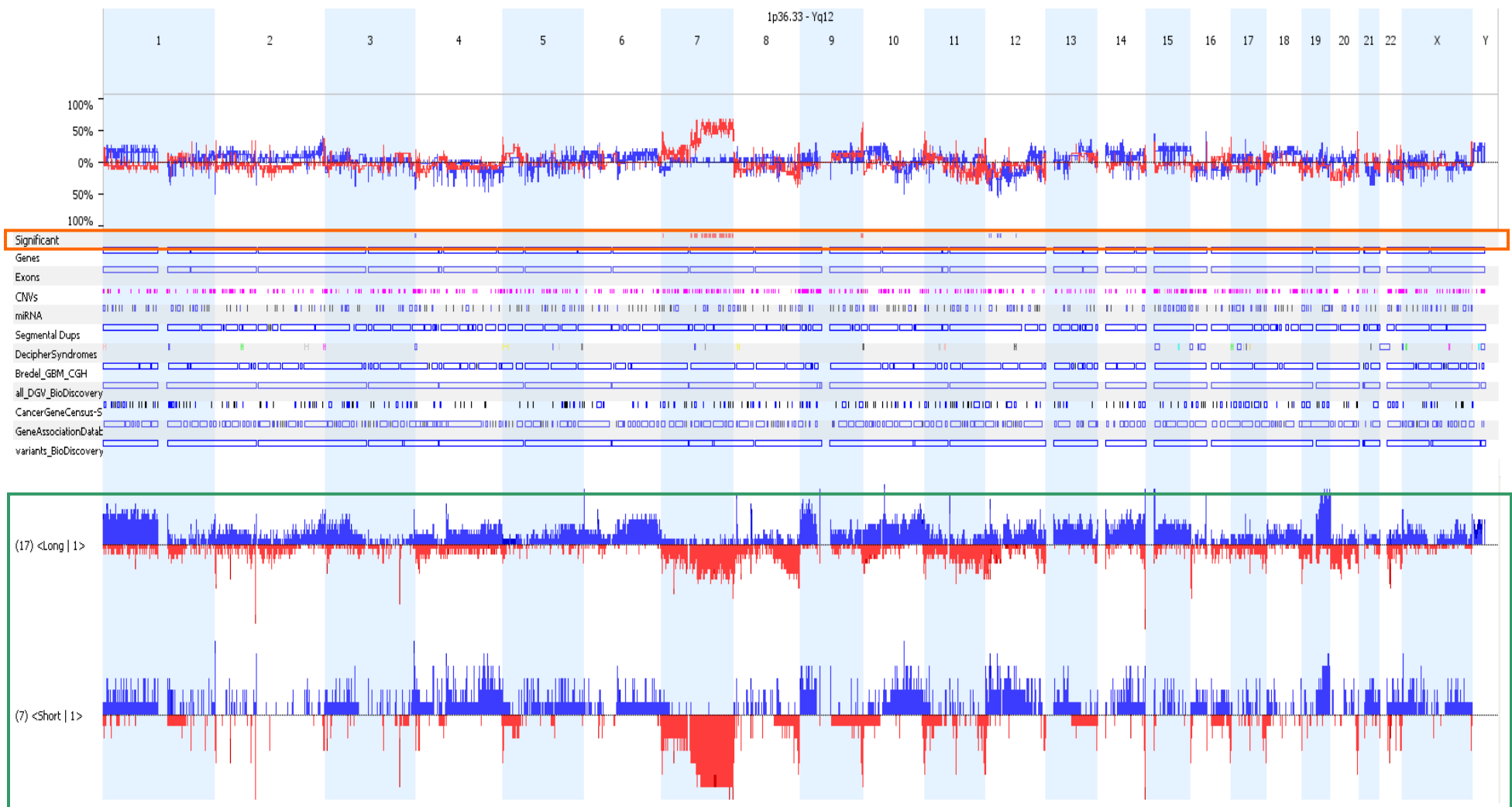
Сравнени бяха данните получени от микрочиповия анализ на 24 пациента, при които беше открита мутация в *IDH1*, като 17 от тях бяха в групата на дълго преживяващите в сравнение с 7 пациента в групата с кратка преживяемост. Значими аберации между изследваните групи се наблюдават в хромозоми 4, 7, 9 и 12 (сините и червените черти в секция „Significant”, **Фиг.4.24**). След провеждане на анализ наблюдаваните значими аберации в двете групи от пациенти бяха сравнени и отдиференцирани само тези, при които разликата между групите е статистическа значима и процента на припокриване с известни и описани вариации в броя копия е под 55%. В групата с по-ниска обща преживяемост наблюдаваните аберации водещи до загуба на част от генома при 57% от групата с лоша преживяемост и при нито един или при един пациент от другата група са открити съответно гените *REP15*, *PPFIBP1* и *DNM1L*. От друга страна при над 75% от пациентите в групата с наличие на *IDH1/2* мутации и по-лоша обща преживяемост, значимите аберации водещи до увеличаване броя на копията следователно до дупликация в следните гени - *LMTK2*, *BHLHA15*, *BAIAP2L1*, *MTPN*, *LUZP6*, *EXOC4*, *NRCAM*, *PNPLA8*, *THAP5*, *DNAJB9*, *MAGI2*, *FOXP2*, *MDFIC*, *ATXN7L1*, *NOM1*, *MNX1*, *UBE3C*, *DNAJB6*, *CNTNAP2*, *CUL1*, *EZH2*, *PDIA4*, *FGL2*, *PTPN12*, *TES*, *CAV1*, *CAV2*, *ING3*, *CPED1*, *WNT16*, *FAM3C*, *CDK14*, *ORC5*, *FSCN3*, *PAX4*, *SND1*, *CTTNBP2*, *KCND2*, *EN2*, *CPA1*, *CPA4*, *CASD1*, *SGCE*, *PEG10*, *PON3*, *PPP1R9A*, *PON1*, *PON2*, *ADAM22*, *SRI* и *STEAP4*, като тези изменения се наблюдават при 17 до 30% от пациентите с повишена обща преживяемост. Тези от гореизброените делетирани гени с най-висока честота в групата с по-лоша преживяемост (85.7%) и едновременно с това и най-ниска такава в групата с по-добра (17.6%) бяха предложени като най-вероятни участници в по-бърза прогресия на заболяването и летален изход (подчертаните гени).



**Фигура 4.22.** Графично изображение на честотата на откритите аберациите във всички хромозоми при пациентите разделени в двете групи (група 1 и група 4) според клъстерния анализ (в оранжев правоъгълник – значими региони; в зеления правоъгълник - с червен цвят отбелязани районите с амплификация, а със син цвят - районите с делеции)



**Фигура 4.23.** Графично изображение на честотата на откритите аберациите във всички хромозоми при пациенти без мутация в *IDH1* характеризиращи се съответно с ниска (група «Short») и висока (група «Long») преживяемост (в оранжев правоъгълник – значими региони; в зеления правоъгълник - с червен цвят отбелязани районите с амплификация, а със син цвят - районите с делеции)



**Фигура 4.24.** Графично изображение на честотата на откритите аберациите във всички хромозоми при пациенти с мутация в IDH1 характеризиращи се съответно с висока (група «Long») и ниска (група «Short») преживяемост (в оранжев правоъгълник – значими региони; в зеления правоъгълник - с червен цвят отбелязани районите с амплификация, а със син цвят - районите с делеции)

## 5. ОБСЪЖДАНЕ

### 5.1. ПРОГНОСТИЧНА СТОЙНОСТ НА КЛИНИЧНИТЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Редица изследвания показват, че хистологичната диагноза на глиомите продължава да бъде статистически най-значимия прогностичен фактор показващ положителна корелация между високите стадии на тумора (въз основа на целуларността, ядрения атипизъм, митотичната активност, псевдопалисадните некрози и/или микросъдовата пролиферация) и неблагоприятната прогноза, като с увеличаване на степента съответно се понижава преживяемостта <sup>(7)</sup>. В проведеното от нас проучване беше установено наличието на връзка между преживяемостта и туморния стадий, като туморите с четвърти стадий на развитие, показват по-лоша преживяемост от туморите с втори и трети ( $p < 0.001$ ). Получените данни в нашето проучване потвърждават литературните данни, че диагнозата има значима връзка с преживяемостта ( $p < 0.001$ ). Пациентите диагностицирани с глиобластом показват значимо по-лоша прогноза, в сравнение с пациентите с астроцитомите III стадий, които пък показват по-добра преживяемост от тези с астроцитом II стадий. При пациентите диагностицирани с олигодендроглиоми не се наблюдава значителна разлика между преживяемостта на II и III стадий най-вероятно поради малкия брой пациенти с такава диагноза включени в изследването (съответно 4 и 10 пациента).

Аналогичен анализ беше извършен и за други клинични характеристики като възникване на тумора, KPS статус, вид оперативна резекция и възраст на заболяемост. Установена беше асоциация на вторичните тумори с по-добрата преживяемост ( $p = 0.001$ ). Според публикуваните данни възрастта е един от неизменните прогностични фактори за ОП, както при НСГ <sup>(8)</sup>, така и при ГБМ <sup>(9)</sup>. По литературни данни ранното възникване на заболяването се асоциира с по-добра преживяемост <sup>(9, 10)</sup>, което беше наблюдавано и при пациентите в изследваната от нас група ( $p < 0.001$ ). Подобно на редица други изследвания, беше наблюдавана линейна функционална връзка между възраст и прогнозиране. Глиомите като цяло възникват предимно в по-зряла възраст. Според Packer и сътр средната възраст за възникване на първичните мозъчни тумори (злокачествени или не) е 57 година <sup>(11)</sup>. Тъй като средната възраст на всички пациенти в изследваната от нас група беше 56 години разделихме пациентите на две групи – с възникване на болестта преди и след 56 годишна възраст. Пациентите с болест възникнала преди 56 год. възраст показват по-добра преживяемост. Освен това възрастта на заболяемост се очертава като силен независим прогностичен параметър, който повлиява избора на хирургичен метод, а следователно и времето на преживяемост. С напредването на възрастта, се увеличава и риска от смърт. Освен това е установено, че прилагането на по-агресивна терапия при пациенти с напреднала възраст има по-слаба ефективност, докато при пациентите с по-ранна възраст на развитие удължава значително преживяемостта <sup>(10)</sup>.

В литературата съществуват различни инструменти позволявайки коректното оценяване на качеството на живот, като Karnosky Performance Status (KPS), инструмента на ECOG и др. <sup>(12, 13)</sup>. KPS е най-често използваният инструмент, като редица автори са потвърдили неговата надеждност и прогностичната му стойност. Високи стойности на KPS статуса ( $KPS > 70$ ) се асоциират по-често с добра прогноза <sup>(12, 14)</sup>. Основният недостатък на KPS е ниската му чувствителност при пациенти, които са в относително добро състояние ( $KPS > 80$ ) <sup>(15)</sup>. В нашето изследване наличието на KPS статус над 70 ( $p = 0.01$ ) и на тотална резекция са добри показатели на преживяемостта ( $p = 0.021$ ). Освен това се наблюдава, че биопсията или частичната резекция имат по-лоша прогностична стойност от субтоталната и тоталната оперативна интервенция. През последните няколко години, въпросът за връзката между степента на туморна резекция и влиянието ѝ върху преживяемостта е доста оспорван. Докато редица проучвания показват, че степента на резекция не оказва влияние върху общата преживяемост на пациентите, <sup>(16-18)</sup>, други показват значима положителна корелация между обема на туморна резекция и клиничния курс <sup>(19-21)</sup>. Интересно е да се отбележи, че почти всички от проучванията, при които не е установена значима корелация на ОП със степента на резекция се характеризират с малък брой изследвани пациенти. Друг недостатък на тези проучвания се базира на ограниченията от субективната оценка на степента на резекция. Такава оценка може лесно да бъде подвеждаща,

тъй като макроскопичната диференциация между патологичната и нормалната тъкан е трудна, дори и за опитни неврохирурзи. В нашето изследване резекцията на преобладаващата част от пациентите е извършена след флуоресцентно белязване на туморната маса с помощта на вещество 5-АЛА. Chaichana и сътр (22) установяват, че 70% е минималната степен резекция, която се асоциира с удължаване на преживяемостта при пациенти с новодиагностициран глиобластом, както и че този фактор е от ключово значение за цялостното прогнозиране. При нарастване с 5% размера на резекция над 70%, коефициентът на риск се редуцира с 5.2% (22, 23). От друга страна има данни че туморите засягащи както двете хемисфери, така и функционални сензомоторни области в мозъка са фактори действащи в противоположна посока на позитивния ефект в резултат на тоталното резекционно премахване на туморната маса, поради възникването на сериозен неврологичен дефицит. Следоперативният неврологичен дефицит се свързва с влошаване на KPS статуса, а от там и с по-ниска преживяемост. По този начин агресивният подход на тотална резекция при масивни тумори, засягащи функционално сензомоторни райони, носи висок риск от влошаване на клиничните показатели и силно понижена преживяемост (24).

## 5.2. IDH1, IDH2 И TP53 В МАЛИГНЕНИТЕ ГЛИОМИ

В настоящото изследване се насочихме към изследване на генетични прогностични маркери при пациенти с глиални тумори, част от тях включващи изясняване мутационния ДНК статус на гените *IDH1*, *IDH2* и *TP53*. Мутации в гена *IDH1* засягащи кодон, кодиращ R132, бяха наблюдавани само при 18.4% от пациентите. При вторичните ГБМ по-често бяха наблюдавани мутации и *IDH1/IDH2* гените (30.7%). Тази честота е значително по-ниска в сравнение с вече публикуваната от редица други проучвания (3, 25-30), което най-вероятно се дължи на по-ниския брой ниско-стадийни глиоми (21), по-висок брой първични ГБМ (153) и по-малкия брой вторични ГБМ (13), включени в изследването.

Основните причини за *TP53* инактивацията са еднонуклеотидни замени и загуба на алелите, с инактивиране на вирусни или клетъчни протеини, които играят важна роля при различните видове тумори (31). Известно е, че генетични полиморфизми биха могли да играят роля в предразположението към развитие на рак и тяхната роля в развитието на глиома все още се оценява. *TP53* е високо полиморфен както в кодиращите си, така и в некодиращите си райони и някои от полиморфизмите открити в него се асоциират с увеличено предразположението към развитие на различни неоплазии, както и с промяна във фенотипната изява на притежаващия *TP53* мутации (32). В изследваната група от 212 тумора бяха намерени аберации при 159 тумора (от 151 пациента) в гена *TP53* (75%). Общият брой на детектираните мутации във всички екзони на гена е 45, като най-голям е броят им в ДНК кодиращата последователност, включваща екзони 5 (20%), 6, 7 и 8 (24.4%). Над 80 *TP53* полиморфизма са идентифицирани и валидирани в човешката популация ([www.p53.iarc.fr](http://www.p53.iarc.fr)). Преобладаваща част от тях (90%) са разположени в интроните, около местата за сплайсинг, или в некодиращите екзони. Малка част от тях са изследвани във функционални анализи или са проучвани за връзката им с риска от развитие на ракови заболявания. Така например Ara и сътр (33) съобщават за наличието на полиморфизъм в гена p53 водещ до замяната на аминокиселината Arg (аргинин) с Pro (пролин) в кодон 72 (P72R). Dumont и сътр (34) установяват, че алела Arg72 води до 15-кратно увеличаване на апоптотичната способност в сравнение с алела Pro72 в изследвания с клетъчни линии с индуцирани хомозиготи за изследвания p53 вариант. В изследваната от нас група този вариант, намиращ се в екзон 4, се среща с най-висока честота. Открито беше при 136 тумора от всички изследвани тумора (64%). При анализ на данните спрямо възраст на заболяемост пациентите притежаващи SNP в хомозиготно състояние Pro/Pro показват връзка с по-ранното начало на заболяването (51.5 годишна възраст, p=0.04) в сравнение с генотипа Arg/Pro (54 годишна възраст) спрямо тези с генотип Arg/Arg – 59 годишна възраст. El Hallani и сътр (35) сред 254 пациенти с ГБМ, открива връзка между наличието на алела Pro72 и по-ранна възраст на заболяемост. В 20% от пациентите генотипа Pro/Pro е асоцииран с начало на заболяването преди 45 години в сравнение с 6.5% от тези с

начало след 45 годишна възраст ( $p=0.002$ ) и 5.9% при 238 контроли ( $p=0.001$ ) <sup>(35)</sup>. Освен това е открита асоциация между алела Pro и по-висок процент на соматични *TP53* мутации <sup>(35)</sup>. Изследваният вариант не показва наличие на никаква зависимост с общата преживяемост на пациентите. Получените от нас резултати са в съответствие с други публикации, в които повече от 50% от първични човешки тумори носят мутации в гена *TP53* <sup>(36)</sup>. Функцията на *TP53* е от решаващо значение за ефективността на лечението на раковите заболявания, тъй като лъче- и химиотерапия водят до активиране на програмираната клетъчна смърт, в отговор на увреждане на ДНК. Следователно, туморите носещи мутации в този ген често са трудни за лечение и тяхната прогноза е лоша. В настоящето изследване мутациите в *TP53* гена не показаха статистически значима корелация с нито един от клиничните показатели, нито с преживяемостта ( $p=0.21$ ). Появата на *TP53* мутации в глиома обикновено се свързва с възрастта. Докато промените в *TP53* са рядкост сред педиатрични тумори и с ниска честотата сред групата от глиоми в напреднала възраст, то при младите пациенти честотата им е висока <sup>(37)</sup>. Така нашите резултати потвърждават връзката между *TP53* мутации и възрастта на пациента, както е показано по-рано от други. Открити са мутации на *TP53* както в НСГ (стадий II), така и във ВСГ (стадий III и IV), с честоти съответстващи на вече публикуваните - между 25 и 35% <sup>(38)</sup>. Още повече, че не беше наблюдавана благоприятна прогноза за пациентите притежаващи аберации засягащи кодони 248 и 273 от *TP53* гена, наблюдавана в други изследвания <sup>(38, 39)</sup>. Анализът на данните за преживяемост в групите с и без *TP53* мутации не доведе до значими разлики в отграничаването им (средна преживяемост 10.8 vs. 8.5 месеца).

Публикуваните до сега данни свързани с генетичните аберации в *IDH1* при малигнени глиоми показваха наличие на мутации в хетерозиготно състояние. Нормално цитоплазмения *IDH1* и митохондриалния *IDH2* представляват хомодимери в рамките на съответните им клетъчни компартменти <sup>(40)</sup>. Анализ на ефекта на хетерозиготни *IDH1* мутации в клетки получени от глиоми показва, че мутантния *IDH1* повлиява функционалната способност на ензима да редуцира  $\alpha$ -KG до 2-HG <sup>(41)</sup>. Поради това беше предположено, че мутантния *IDH1* доминира негативно нормалната функция на дивия тип *IDH1* <sup>(42)</sup>. Туморите притежаващи *IDH1* мутантни белтъци, продуцирайки 2-HG, могат да предотвратят деметилирането на хистоновите белтъци, което е необходимо за диференцирането на прогениторни клетки специфични за дадена клетъчна линия клетки. При пациенти с глиома, наличието на *IDH1* мутации се свързва и с наличието на специфичен генно-експресионен профил, характеризиращ се с изявата на гени, широко експресирани в невроналните стволови клетки, корелиращи от своя страна с повишено метилиране на хистоновите белтъци <sup>(43)</sup>. Наскоро беше показано, че ГБМ характеризиращи се с *CIMP* фенотип се асоциират с проневроналната (PN) подгрупа тумори и *IDH1* мутациите са инициращи тяхното развитие <sup>(44, 45)</sup>. В настоящия дисертационен труд открихме наличие на хомозиготна мутация в кодон 132 (R132H) в един пациент с малигнена глиома. При този пациент беше предположено наличието на делеция на нормалния алел, поради хомозиготното състояние и на мутацията и на полиморфизма rs11554137 в *IDH1* гена. Наскоро *IDH1* хомозиготни аберации бяха публикувани за първи път при пациенти с глиома - при двама пациента с вторичен ГБМ <sup>(46)</sup> и един пациент с астроцитома <sup>(2)</sup>. В предходни изследвания *IDH1* мутации са наблюдавани при пациенти с левкемия <sup>(1)</sup> и рак на тироидната жлеза <sup>(47)</sup>. Jin и сътр <sup>(46)</sup> установяват наличие на по-ниски нива на 2-HG в клетки загубили дивия тип *IDH1* алел в сравнение с тези в хетерозиготно състояние, които могат да затруднят прилагането на 2-HG модулатори като потенциална терапевтична стратегия в туморите имащи *IDH1* мутации <sup>(46)</sup>. В съответствие със скорошните открития, че производството на 2-HG, а не доминантно негативния ефект върху функцията на ензима е от решаващо значение, и изследвания базирани на NADP<sup>+</sup>-зависими *IDH1* мутации открити при глиоми <sup>(46)</sup>, съчетано с ролята им да блокират хистоновото деметилиране и асоциацията му с *CIMP* <sup>(43)</sup>, може да се предположи, че хомозиготния носител на мутацията R132H ще има по-високи нива на метилиране в сравнение с хетерозиготния носител.

Ролята на *IDH2* мутациите, като самостоятелно събитие, все още не е изяснена поради ниската им честота при глиални тумори - около 1-2% <sup>(48)</sup>. Откриват се по-често при остра

миелоидна левкемия (AML) - около 15%, където „горещите точки“ на мутации засягат кодоните 140 и 172 (42). В изследваната група от 212 тумора не беше открита мутация засягаща публикуваните вече и споменатите по-горе кодони, но беше открита нова непубликувана досега аберация в кодон 129 - с.386A>G, K129R. Независимо, че и двете аминокиселини - аргинин и лизин са базични, наблюдаваната промяна засяга част от консервативния домен в *IDH2*, а като допълнение беше установено, че вторият алел липсва. Въпреки това, проведените анализи за патогенност на новия вариант с програмите SIFT, PolyPhen и SNPs & GO показаха по-голяма вероятност промяната да не е патогенна.

Няколко предходни изследвания демонстрират значимата роля на *IDH1* и *IDH2* мутациите за определянето на прогнозата на пациенти в изследвани групи от астроцитомии и ГБМ (28, 29, 49-51). Поради малкия брой на проби от различен туморен стадий - астроцитом II и III стадий, ОД II и III стадий, изследвахме значимостта на *IDH1* and *IDH2* мутациите в цялата група от 212 глиоми. Открита беше силна асоциация между наличието на *IDH1/IDH2* мутации и благоприятната ОП, потвърждавайки публикуваните вече сходни данни. Освен това, както очаквахме *IDH1/IDH2* мутациите бяха открити преобладаващо при по-млади пациенти с хистологично поставена диагноза различна от ГБМ. Изследваната от нас група пациенти имаше ниска средна (медиална) ОП – 8.68 месеца, която беше по-ниска от тази при повечето изследвания (52, 53). Това несъответствие може да се дължи на преобладаващото наличие на първични ГБМ в изследваната от нас кохорта. Ohgaki и сътр публикуват също ниска средна (медиална) преживяемост при първичните ГБМ (4.7 месеца) в сравнение при вторичните (7.8 месеца) (38), което е в съответствие със стойностите наблюдавани от нас - средна (медиална) ОП от 6.2 и 25.8 месеца съответно за първичните и вторични ГБМ (38).

Друга причина обясняваща по-ниската обща преживяемост в изследваната от нас група, в сравнение с преобладаващата част от глиалните проучвания, може да се дължи и на промяната в стандартите за провеждане на лъче- и химиотерапия, извършена не еднократно през периода 2005-2014 година в страната ни. Потвърждение на тази хипотеза се открива в изследването на Vleeker и сътр (54), които публикуват данни за тумори, които са били подложени на терапия преди 2006 година имащи сходни с нашите стойности на средна (медиална) преживяемост – 8.7 месеца (54). В допълнение в страната ни проучване, определящо честотата на мутации в гените *IDH1/IDH2* при български пациенти не е провеждано до сега и поради това няма данни, с които бихме могли да сравним получените от нашето проучване резултати.

Определянето произхода на тумора, по-специално засягащ ГБМ, е широко обсъждан поставящ въпроси относно критериите за класифицирането му като първично или вторично заболяване само въз основа на хистологичните доказателства (7) или необходимостта от включването на по-субективни критерий като данни за давност на оплакванията на пациентите над 6 месеца (55). По пример на Kleihues и Ohgaki (7) класифицирането на туморите като първични ГБМ беше извършено въз основа на данните за липса на предходно туморно заболяване в мозъка и поради тази причина има вероятност някои от вторичните тумори да са погрешно класифицирани като първични. Независимо от това в изследваната група от български пациенти беше установена положителната връзка между наличието на *IDH1/2* мутации и по-добрата ОП в сравнение с туморите без *IDH1/2* мутации. Тъй като генетичните изменения в *IDH1* се асоциират по-често с вторичните глиоми (60-90%) отколкото с първичните (4), и съответно по литературни данни при вторичните тумори с наличие на *IDH1* или *IDH2* мутации се наблюдава връзка с прогнозата ние направихме статистически анализ, като разделихме пациентите според мутационния им статус и според възникването на тумора. Наблюдавано беше, че пациентите с вторични тумори и наличие на *IDH1/2* мутация са с по-добра прогноза от пациентите, при които липсва мутация ( $p < 0.001$ ). Въпреки, че първичните тумори са с по-лоша преживяемост от вторичните, при тези с *IDH1/2* мутации се наблюдава по-добра прогноза от тези без мутация.

Kaplan-Meier кривите на преживяемост показваха значимостта на полиморфизма в *IDH1* (*IDH1* 105GGT; rs11554137:C>T) върху прогнозата на пациентите. Еднонуклеотидният вариант rs11554137 е локализиран в 5'-района на екзон 4 в близост до кодон 132. Изследван е при

пациенти с АМЛ и тироиден карцином. Въпреки, че rs11554137 не показва статистическа значима връзка с прогнозата на пациентите с тироиден карцином (56), при пациентите с левкемия се асоциира с наличието на по-лоша прогноза и по-висока иРНК експресия на *IDH1* (57). Смята се, че тази генетична промяна нарушава активността на *IDH1* ензима чрез промяна засягаща иРНК стабилност, сплайсинга и правилното нагъване на белтъчната му структура (57). Независимо, че SNP rs11554137 се намира в близкото обкръжение на кодон 132 не беше открита връзка между наличието му и наличието на *IDH1* мутации. Не беше открита и асоциация между еднонуклеотидната замяна и наличието на други генетични събития, като амплификацията на *EGFR*, за която има непотвърдени данни (58). Независимо от това Cox регресионния анализ показва, че полиморфизма rs11554137 не показва корелации с други фактори и връзка с ОП при глиалните тумори. Ролята на този SNP като предиктор за преживяемостта при пациенти с глиални тумори трябва да бъде проучено по-обстойно, не само на иРНК, но и на белтъчно ниво.

Освен това, *IDH1/IDH2* мутациите бяха детектирани преобладаващо при по-млади пациенти. В съответствие с вече публикуваните данни, ние открихме в 64% от пациентите характеризиращи се с *IDH1/IDH2* мутация, наличие и на мутации засягащи нуклеотидната последователност, кодираща ДНК-свързващия домен на гена *TP53* (27, 59, 60). Анализът на данните за преживяемост в групите с и без *TP53* мутации не доведе до значими разлики в отграничаването им (средна преживяемост 10.8 vs. 8.5 месеца). При разделянето на туморите според мутационния статус на *IDH1* и *TP53* гените отново беше намерена значима разлика между трите групи по възраст като най-висока тя е в групата на туморите с мутации и в двата гена.

Мултивариационният регресионен анализ определи възрастта и *IDH1/IDH2* мутационния статус като независими прогностични фактори. Интересно е да се отбележи, че пациентите с диагноза ГБМ и мутирал *IDH1* имат почти същата ОП, както и пациентите с диагноза различна от ГБМ, независимо от това дали *IDH1* е мутирал или не. Според Hartmann и сътр *IDH1* мутации са по-добър предиктор на преживяемостта, в сравнение с хистопатология. Нашите данни са подобни на тези, публикувани от Hartmann и сътр (61), като пациентите с АА III и без наличие на мутации в *IDH1* имат по-лоша преживяемост в сравнение с пациентите с ГБМ и аберации в *IDH1*. При анализ на резултатите само за пациентите с ГБМ, нашите данни показват, че *IDH1/IDH2* мутации са по-мощни прогностични фактори, отколкото класифицирането на ГБМ като първичен или вторичен - ние наблюдавахме по-добра ОП при първичните ГБМ с мутирал *IDH1/IDH2* в сравнение с вторичните ГБМ и без мутация. В допълнение, ние наблюдавахме по-добра ОП при първичните и вторични ГБМ с мутирал *IDH1* в сравнение със съответните, но с *IDH1* див тип. Така наличието на *IDH1* мутациите се оказват благоприятен фактор за прогнозата на ГБМ, независимо от техния произход. От друга страна, оценката едновременно и на двата фактора - възрастта и *IDH1/IDH2* мутационния статус, разкрива прогностична стойност на *IDH1/IDH2* само в групата на пациенти под 56 години. Това може да бъде в резултат от по-малкия брой мутации при по-възрастните пациенти.

### 5.3. НАЛИЧИЕ НА ГОЛЕМИ ДЕЛЕЦИИ В ХРОМОЗОМИ 1p И 19q

През 1998 г. за пръв път се появяват данни показващи асоциацията на загубата на 1p/19q с добрия терапевтичен отговор и продължителна обща преживяемост при анапластичните олигодендроглиомите (62). 1p/19q коделециите често засягат хромозомните рамена в тяхната цялост. Загуба на хетерозиготност (LOH) на 1p и 19q е медирана от небалансирана транслокация t(1; 19)(q10; p10), а полученият 1p19q хромозомен фрагмент се губи (63). Прогностичната значимост на 1p/19q ко-делециите при анапластичните олигодендроглиомите и олигоастроцитомите е била потвърдена в редица клинични проучвания (64, 65). Олигодендроглиомите, които имат класически хистологични характеристики като униформени кръгли ядра с перинуклеарен ореол и характерен васкуларен модел, показват силна корелация с 1p/19q коделецията (66, 67). Делециите в хромозомни рамене 1p и 19q са характерни за олигодендроглиалните тумори (62, 68, 69). Коделециите в 1p и 19q се откриват в 44-80% от

олигодендроглиомите и в 20-30% от олигоастроцитомите (70, 71). В литературата комбинираната загуба на 1p и 19q показва силна статистическа значимост като предиктор на общата преживяемост при АОД тумори (62). Нашите резултати допълват и разширяват тези констатации. Освен, че коделецията на 1p и 19q е статистически значим предиктор за обща преживяемост при пациенти с олигодендроглиомите в сравнение с ГБМ ( $p=0.035$ ), се наблюдава наличие на значимост и при пациентите с ААШ ( $p=0.002$ ) в сравнение с групата с ГБМ. Въпреки това, демонстрирането на тази асоциация при НСГ е по-трудно ( $p=0.300$ ), поради цялостната по-висока преживяемост на тези пациенти, както и с оглед на сравнително малкия брой анализирани случаи и значително по-ниската смъртност сред тези пациенти. При пациентите с ОД над 80% (5 от 6-те пациента с ОДII и 7 от 9-те с ОДIII) показват наличие на 1p делеция, докато при останалите групи процентът, който заемат пациентите с този тип делеция са съответно 11%, 47% и 27% за пациентите с астроцитом II, III стадий и ГБМ. При пациентите с диагноза ОА беше отбелязано наличие на 1p делеционно събитие с честота 66%, най-вероятно поради малкия брой на изследвани пациенти с тази диагноза (3 броя II стадий и 4 - III). Аналогично е положението с наличието на 1p/19q коделеция, което се наблюдава в най-голям процент при пациентите с хистологична диагноза олигодендроглиома (78%), докато при ААШ е 30% и ГБМ е едва 15%.

За разлика от тези, с комбинирана загуба, пациентите както с олигодендроглиома, така и с астроцитомата, характеризиращи се със загуба на 1p или 19q, поотделно една от друга, показват статистическа значимост като предиктори на общата преживяемост. Установено беше, че наличието на делецията на цялото дълго рамо на хромозома 1 ( $p=0.031$ ) и съответно късото рамо на хромозома 19 ( $p=0.001$ ) показват по-добра прогностична стойност, за разлика от наличието на частична загуба или липсата на такава в цялата изследвана група, включваща както олигодендроглиома така и астроцитомите. Предишни изследвания относно олигодендроглиома предполагат, че загубата на 1p без съпътстваща загуба на 19q е необичайно събитие (72, 73). Всъщност, настоящото изследване идентифицира само 2 олигодендроглиомите и 24 астроцитомите със загуба на 1p, но липса на промяна в 19q (11%), докато в литературата тази честота е малко по-ниска (4%) при олигодендроглиомите (70). Въпреки, че изследването на Smith и сътр (70) открива при олигодендроглиомите загуба на 19q без наличието на такава промяна в 1p с по-висока честота от наличието само на 1p (19%), предполагайки, че загубата на 19q предхожда загуба на 1p в развитието на олигодендроглиома, в нашата група от пациенти такава разлика не беше наблюдавана. От друга страна наблюдавано беше наличието на силна връзка между наличието на цялостна загуба на 1p хромозомното рамо и такава при 19q – 100 % от ОД характеризиращи се с цялостна загуба на 1p притежават такава и в 19q, докато при ОД пациентите с наличие на цялостна загуба на 19q по равно се наблюдават пациенти с частична и цялостна загуба на 1p. При астроцитомите положението е сходно, макар и да се наблюдава по-ниска честота на туморите с едновременна загуба на целите рамене на 1p19q – при 85%. Може би, загуба на 19q предразполага тези новообразувания на по-нататъшни загуби на 1p, което, от своя страна, се придава на тумора по-слабо агресивни биологично поведение.

В съответствие с предишни доклади, честотата на комбинирана 1p и 19q загуба в този набор от астроцитни тумори е значително по-ниска - при ААШ е 30% и при ГБМ е едва 15%, въпреки че наблюдаваните от нас стойности за по-високи от публикуваните в литературата (8%) (70). Това може да се дължи на съдържанието в ГБМ тумори на олигодендроглиомна компонента, която от скоро се класифицира и започна да се прилага като допълнителен маркер, обясняващ групата от ГБМ тумори, характеризиращи се с по-добра обща преживяемост в сравнение със средната наблюдавана (74). Деветнадесет от изследваните от нас първични ГБМ с коделеционно събитие, показват тенденция към по-ниска преживяемост. Това може да е вследствие на рядко срещано нарушение, свързано с по-лоша прогноза или по-вероятно може просто да отразява цялостната геномна нестабилност при ВСГ. Освен това, по-високата честота на 1p19q коделеция се асоциира, както споменахме с диагнозата олигодендроглиома,

докато е сравнително рядко събитие при астроцитомите IV стадий, което предполага, че тези промени не са толкова тясно свързани с астроцитните тумори, колкото с ОД.

Високата честота на 1p и 19q делециите в ниско-стадийните глиоми и по специално ОД категорично показва, че тези хромозомни райони съдържат туморсупресорни гени важни за туморогенезата на мозъчните тумори. За по-нататъшното разбиране значението на тези промени и за ефективното им прилагане в клиничната практика е необходимо извършването на важни стъпки като детайлното изследване на тези райони, последвано от клониране на заподозрените туморсупресорни гени в 1p или 19q глиомите. Редица кандидат гени в областта на 1p и 19q хромозомните рамена са изследвани в търсенето на потенциални прицелни гени на това ко-делеционно събитие, включително *NOTCH2*, *CDKN2C*, *RAD54*, *CITED4*, *SAMTA1*, *TP73*, *EMP3* *PEG3* и др, но доскоро търсенето на такъв оставаше неуспешно (75-79). Наличието на 1p загубата и хипотетично намиращия се там туморсупресорен ген в глиом, показва силната връзка с увеличената химиочувствителност на АОД (62). Освен това, почти всички човешки малигнени заболявания, от солидни тумори до левкемии и миелопролиферативни заболявания показват участието на промените в хромозома 1, особено в теломерния край на 1p (80-82). Един от гените разположен в 1p кодира белтъка TP73, в последно време е спряган като хомолог на TP53, и е най-често наблюдавания делетиран район при глиомите (83). Въпреки това мутационен анализ проведен при тумори притежаващи тази 1p делеция доведе до отхвърлянето му като потенциален туморсупресорен ген (84). От особен интерес представляват и промените в 19q хромозомното рамо при пациентите с глиома, тъй като те са единствените известни общи и за трите основни подвида глиоми изменения (69). Още повече, че при малигнените заболявания, с изключение на мозъчните, рядко се наблюдават делеции в 19q (85), което предполага наличието в този хромозомен район на туморсупресорен ген специфичен за глиалните тумори. Полагат се значителни усилия за идентифицирането на такъв ген, но доскоро без успех (86, 87).

Дългогодишните предположения за наличието на туморсупресорни гени в късото рамо на хромозома 1 (1p) наскоро доведоха до откриване на мутации засягащи два кандидат гена, *CIC* (capicua генен хомолог при *Drosophila*) локализиран на 19q13.2 и *FUBP1* (far-upstream element /FUSE/ binding protein) намиращ се на 1p31.1 (88). Наличието им се свързва с олигодендроглиоми притежаващи 1p19q коделеционни събития. Наблюдаваните честоти на откритите мутации в гените *CIC* и *FUBP1* е съответно 50-70% и 15% в изследваните олигодендроглиоми с 1p19q коделеции. Мутационните събития в тези важни туморсупресорни гени се асоциира със самото олигодендроглиално формирането и развитието. *CIC* белтъка се свързва към регулаторни райони, като води до транскрипционно инактивиране на гени. Освен това *CIC* е негативен транскрипционен регулатор на MAPK (mitogen activated protein kinase) сигналния път, включително EGFR, Ras, Raf, и MAP киназите (88). От друга страна мутациите в *FUBP1* повлияват активирането на MYC (myelocytomatosis viral oncogene homolog) (88), широко познат онкоген. В контраст на вече публикуваните данни от Sahm и сътр (89), които откриват мутации в *FUBP1* при изследваните 18 ОД и 42 ОА пациента, притежаващи мутации в *CIC* гена, Jiao и сътр (90) не откриват такава корелация между събитията при изследване на по-голяма група от пациенти със същите хистологични диагнози. Освен това е наблюдаван и пациент, при които се наблюдава мутация в *CIC* гена, но не се характеризира с 1p19q делеционни събития (89). Въпреки теоретичното функционално съответствие на тези гени и логичността на хипотезата те да са замесени в патогенезата на глиомите, особено на олигодендроглиомите, до момента конкретен механизъм не е идентифициран (91). Поради това е необходимо извършване на по-обширно изследване за потвърждаване на тяхната потенциална роля и значение в раковите заболявания и особено при ОД (88). В изследванията от нас панел от гени намиращи се в районите на 1p и 19q тези два гена не бяха включени.

Въпреки, че локализираните в 1p и 19q гени остават неидентифицирани, има данни за множество корелации асоциирани с наличието на 1p/19q загубите. Например, тумори с коделеция засягаща 1p и 19q често се характеризират с класическа глиална хистология и често имат *IDH1* и *IDH2* мутации (92). Анапластични олигодендроглиоми с 1p/19q се отличават с

проневронален генно-експресионен профил. Този профил, който отчасти се характеризира с експресията на специфични за неврони гени, е преобладаващ сред НСГ и спомага предскаването на терапевтичен отговор в глиобластом (93). 1p/19q коделецията е мощен прогностичен и предиктивен маркер за олигодендроглиални тумори. Делециите на 1p/19q са предиктор на отговора към химиотерапия и едновременно с това се свързват с по-добрата обща преживяемост при ниско-стадийните глиоми (94). Въпреки това, ефектът на 1p/19q коделеционните събития върху преживяемостта на пациентите може да бъде по-малък при ниско-стадийните глиоми и ролята им при определяне лечението на тази група пациенти е тема на широка дискусия (39, 79). Загуба на 1p/19q изглежда да има прогностично значение само при пациенти, лекувани с лъчетерапия или комбинирано лечение с лъчетерапия и химиотерапия. 1p/19q коделецията не е прогностичен маркер за преживяемост без прогресия при пациенти, претърпели хирургична резекция, а за такава по-скоро при пациенти с олигодендроглиални тумори, които не са претърпели терапия (95). Пациентите, при които се наблюдава прилагане на терапия, независимо дали е лъче-, химиотерапия или комбинация от двете, и наличието на 1p/19q едновременна загуба, показват значително по-висока преживяемост в сравнение с тези, при които няма коделеционното събитие ( $p < 0.001$ ). За разлика от кооперативния ефект между терапевтичния подход и 1p/19q коделецията, при сравняването на *IDH1/IDH2* мутациите с хромозомните загуби не се наблюдава акумулативния ефект на двата положителни прогностични фактора. Пациентите с наличие на *IDH1/IDH2* мутации показват по-висока преживяемост, независимо от присъствието на коделецията ( $p < 0.001$ ). След извършване на мултивариационния регресионен анализ, с независима прогностична стойност се откриха възрастта ( $p < 0.001$ , HR 1.047), диагнозата ( $p = 0.011$ , HR 0.204), терапията ( $p < 0.001$ , HR 0.187), и наличието на *IDH1/IDH2* мутации ( $p = 0.001$ , HR 0.291).

#### 5.4. MGMT ПРОМОТОРНО ХИПЕРМЕТИЛИРАНЕ И МИКРОСАТЕЛИТНАТА НЕСТАБИЛНОСТ

Алкилиращите химиотерапевтични лекарства отдавна се използват за лечение на пациенти със злокачествени глиоми. В момента, почти всички пациенти с ГБМ се третират перорално с алкилиращия лекарствен препарат – TMZ (96). Този медикамент води до закачане на метилови групи на Об позиция в молекулата на нуклеотида гуанин, което в последствие води до клетъчна смърт (97). Нормално функциониращите клетки имат унаследен механизъм, чрез който възстановяват увредената ДНК и които от своя страна имат противоположен на ефекта на TMZ действие. *MGMT* е туморсупресорен ген, имащ отношение към развитието и прогресията на рака на мозъка. *MGMT* е ензим, поправящ ДНК повредите, резултат например от алкилиращи химиотерапевтични препарати, използвани при лечението на глиоми (98). Това означава, че нормално функциониращият *MGMT* ензим води до резистентност към алкилиращи лекарства, а следователно и към TMZ. Конститутивно експресиращият се и участващ в ДНК репарацията ензим *MGMT* необратимо осъществява прехвърляне на метилова група от позицията Об на вече модифицирания гуанин върху свой цистеинов остатък, редуцирайки цитотоксичните ефекти на химиотерапията. Въпреки това, при около половината от пациентите с ГБМ се наблюдават понижени концентрации на *MGMT*, което може да направи тези тумори по-податливи на ефектите на TMZ. В настоящото проучване беше изследвано промоторно хиперметиране на *MGMT* гена при пациенти с глиални тумори. Отклонението от нормалния тип ДНК метилиране се разглежда като важно епигенетично събитие, което има връзка с развитието на човешките тумори. Метилирането на туморсупресорните гени в CpG островите, намиращи се в промоторната област, има връзка с транскрипционната му инактивация и загубата на експресия на тези гени в туморните клетки на някои човешки ракови заболявания, включително и при глиомите (98). Загубата на експресия на *MGMT* в резултат на мутация, делеция или реаранжиране на ДНК е доста рядко събитие (99). Основният механизъм, чрез който се потиска транскрипцията на този ген, е метилирането на CpG - островите в промоторния регион на гена. В изследваната от нас група глиоми промоторно хиперметиране на *MGMT* беше наблюдавано при 116 от общо 212 изследвани

тумора (53.5%), като 100% метилиране бе наблюдавано при 35 (30% от всички метилирани тумори). Тази честота е в съответствие с публикуваните данни в литературата - 35-93% за глиомите (30) и 41-45% при глиобластоми (96, 98).

Въвеждането през 2005г. на TMZ като стандарт за лечението на пациенти с ГБМ, и наличието на отговор към TMZ, свързано със статута на *MGMT* промоторния район, генерира огромен интерес към анализа на този ген. По литературни данни повечето изследвания установяват наличието на по-дълга преживяемост при пациентите с метилиран *MGMT* (100). В нашето проучване не беше открита такава, но съществува макар и малък брой публикации, в които такава връзка също не се открива (101-103). Вероятно една от причините за липса на такава асоциация в изследваната група е ниският процент на пациентите със 100% хиперметилиран *MGMT*. *MGMT* промоторното хиперметилиране е свързано с отговор на лечението TMZ в глиобластомни пациенти (96). Това доведе до предположението, че нивото на *MGMT* експресия и статуса на промоторното му хиперметилиране имат предиктивно значение при ГБМ пациентите лекувани с TMZ (97-101). Няколко проучвания потвърждават предположенията за наличие на такава взаимовръзка при пациентите с ГБМ (104) и НСГ (105). В литературата има данни, показващи метилационния статус на *MGMT* промоторната област като независим от приложението на TMZ валиден прогностичен маркер при по-възрастни пациенти с ГБМ (106), което наблюдение не беше потвърдено от нас. От множеството проучвания, се отличава изследването на Negi и сътр (96), които са изследвали състоянието на промотор на *MGMT* при голям брой тумори от пациентите, изучавайки ефекта от прилагането едновременно на TMZ и лъчетерапия, в сравнение с прилагането само на лъчетерапия. Тези автори в резултат на последващи изследвания предполагат, че анализи определящи метилационния *MGMT* статус, в допълнение към прогностична стойност, която показва допринасят и с предиктивната си значимост, като допълнителни инструменти, спомагащи отдиференцирането на ГБМ пациентите, които биха се повлияли от лечението с TMZ (107). Въпреки това, в групата с неметилиран *MGMT* също се наблюдава по-добра преживяемост при прилагането на терапия с TMZ, макар и значително по-слаба в сравнение с пациентите с метилиран *MGMT* ( $p=0.06$ ) (96). Обяснение за тази тенденция все още не е дадено и вероятно наред с други причини може да се дължи и на използвания метод за определяне на метилирането, както и на интерпретирането на резултатите при отграничаване на метилирани от неметилирани тумори (100, 108). В изследваната от нас група, при пациентите с неметилиран промотор не беше достигната статистическа значимост ( $p=0.45$ ), докато при туморите с метилиран промотор на гена се наблюдава значително по-добра преживяемост при прилагане на терапия, без значение дали е лъче- или химиотерапия ( $p<0.001$ ). Въпреки това, наличието на благоприятния отговор към TMZ в *MGMT*-неметилираните тумори, както и настоящата липса на терапевтична алтернатива, не позволява лишаването от лечение с TMZ на тази група пациенти, само въз основа на този тест, особено като се има предвид възможността за пероралното му приложение и добрата обща поносимост към лекарството. Някои автори показват *MGMT* промоторното хиперметилиране като благоприятен маркер за ОП дори при пациенти с ГБМ, които са получили само лъчетерапия, но не и химиотерапия (109). По този начин, *MGMT* метилирането не може да бъде само положителен предсказващ маркер за химиотерапия, но показва като цяло положително прогностичен фенотип в глиобластом (79). *MGMT* метилиране корелира с 1p/19q коделецията, както и с прогнозата при анапластични олигодендроглиоми (110). Въпреки, че по литературни данни при туморите с хиперметилиран *MGMT* се срещат по-често мутации в гена *IDH1* (6), в нашето проучване само 24 тумора с метилиран *MGMT* носят мутация в *IDH1* от общо 116 тумора (20%) срещу 17 от 94 тумора (18.08%) без метилиране в *MGMT*. Не беше установена статистически значима корелация между наличието на *IDH1* мутация и метилирането на *MGMT*.

Статусът на *MGMT* метилиране може да се променя във времето между първоначалното диагностициране и повторната поява на заболяването, и се променя по-често при тумори, които първоначално са охарактеризирани с метилиран *MGMT* (111). Данните в литературата свидетелстват за по-подходящото прилагане на прогностичната роля на *MGMT* метилирането

при първични тумори, но не и при рецидиви (100, 111). В допълнение, отскоро метилационният статус на *MGMT* при АА (т.е. степен на СЗО III) беше подложен на анализ от невроонкологичната група към на Германското Раково Общество и Европейската организация за изследвания и лечение на рак (EORTC) (110). И в двете проучвания, метилираният *MGMT* има прогностична стойност, но не предсказва специално отговор на лечение с алкилиращи лекарства. Наскоро промоторното хиперметиране на *MGMT* в кохорта от ГБМ пациенти, лекувани само с лъчетерапия (109) показва връзката и с предикцията към отговор на лъчева терапия (109). Това ни навежда на мисълта, че при анапластичните глиоми и вероятно при ГБМ, прогностичната полза свързана с положителния резултат за *MGMT* метилиране може да не е само въз основа на терапевтичното повлияване с алкилиращи лекарства в резултата на *MGMT* промоторното хиперметиране, а вместо това може да свидетелства за наличието на прогностично благоприятен молекулен фенотип (100, 109).

В допълнение, при ГБМ пациенти с метилиран *MGMT* промотор беше наблюдавана по-голяма склонност от развитие на рентгенографска псевдо-прогресия при лечение с TMZ, в сравнение с пациентите с неметиран генен промотор (100, 112). По време на псевдопрогресия, невровизуалният профил изглежда влошен след прилагането на TMZ, но в течение на лечението се подобрява. По този начин анализът на промоторно *MGMT* хиперметиране показва своята приложимост в друга област, а именно като маркер показващ оценка на вероятността от появата на псевдопрогресия (112).

## 5.5. ЕКСПРЕСИОННИ МАРКЕРИ С ПРОГНОСТИЧНА СТОЙНОСТ VEGFA И РЕЦЕПТОРИТЕ VEGFR1, VEGFR2

Всяка промяна във функцията или дейността на HIF, може значително да промени процеса на адаптация към хипоксията и да доведе до малигнизация. В условия на хипоксия, ангиогенезата се регулира предимно от HIF-зависимата транскрипция на VEGF, (VEGF, чиято експресията играе основоположна роля за ангиогенезата при малигнените глиоми). Освен това хипоксията транслационно регулира VEGF чрез увеличаване стабилността на иРНК с помощта на NuR свързващия белтък (113). В хипоксичната област на тъканта се наблюдава създаване на VEGF сигнален градиент, който привлича съседните ендотелни клетки и моноцити чрез рецептор-лиганд взаимодействия. VEGF се характеризира с множество изоформи и с пет различни рецептора - VEGFR-1 (FLT-1), VEGFR-2 (FLK-1/KDR), VEGFR-3 (FLT-4), NRP-1 (neuropilin-1), и NRP-2 (neuropilin-2), всеки от които има специфични характеристики за свързване на определен членове от VEGF белтъчното семейство. Например, VEGFA, взаимодейства с два тирозин-киназни рецептора, VEGFR 1 и 2, докато VEGFC и VEGFD взаимодействат с VEGFR-3. VEGFR-1 и VEGFR-2 са главните експресиращи се от ендотелните клетки рецептори, от които VEGFR-2 се е смята за главния рецептор свързан с VEGF митогенната сигнализация, осъществяващ почти всички функции медиранни от VEGF. За VEGFR-1 има противоречиви данни относно неговата конкретна функция, но се е счита че действа като регулира функцията на VEGFR-2 и подпомага разделянето на свързаните VEGF молекули с VEGFR-2. Скорошни изследвания показаха важното значение на VEGFR1 за миграцията и диференциацията на ендотелните клетки, процеси с основоположно значение при ангиогенезата (114). Изключителните функции и значението на двата рецептора е потвърдено в миши модели, при които е иницирана загубата и на двата, водеща до летална фенотипна изява по време на ембрионалното развитие (114, 115). Освен това има и данни, че VEGFR-1 през ембриогенезата играе роля на ангиогенен негативен регулатор, потискайки проангиогенните сигнали (116). Интересен експеримент е направен с мишки показващ, че лиганд-свързващия домен, заедно с трансмембрания на VEGFR-1 са достатъчно условие за появата на супресорен ефект на ангиогенезата в ранната ембриогенеза. Установено е, че докато функцията на VEGFR-1 (FLT-1) се регулира директно от HIF-1 сигнализация и HRE елементи разположени в енхансерната му област, то VEGFR-2 (KDR) се повлиява от не пряка стимулация в резултат на хипоксията, и наличието на положителна обратна връзка чрез свързването му с VEGF в ендотелните клетки (117). Освен това VEGFR-1 и -2 по време на

туморната васкуларизация активират Ras/MAPK и PI3/Akt сигналните пътища, които са замесени в ГБМ туморогенезата (118).

ГБМ е силно кръвоснабден тумор като резултата от това - повишената експресия на VEGF по време на прогресия се сравнява с други мозъчни тумори (119, 120). Повишените нива на VEGF в ГБМ увеличават съдова пролиферация и влошават заболяването. Въз основа на сегашните ни данни, ние предполагаме, че VEGF може да има двойни цели - не само туморните съдове, но и тумор стволите клетки. Множество методи на лечение са насочени към VEGF и VEGFR-ите поради значимата им роля в регулирането на процесите на ангиогенеза и ГБМ стволови клетки (ГБСК) пролиферация. В пациенти с глиоми, анти-VEGF и VEGFR2 инхибитори обикновено се използват за насочване на сигналната каскада на VEGF-VEGFR2. Все пак, въпреки някои преходни позитивни терапевтични ефекти, ефикасността на тези две стратегии са разочаровани (121-125). Анти-ангиогенната терапия води до деваскуларизация, която ограничава растежа на тумора, но предимствата на инхибитори на ангиогенезата обикновено са преходни и често се развива резистентност (121). В допълнение, някои анти-ангиогенни агенти повлияват развитието и растежа на тумора и метастазите (123). Множество механизми могат да бъдат включени чрез индукция на хипоксия, като насърчаването пролиферацията на ГБСК може да бъде един от тези механизми (123, 126). Има данни показващи, че хипоксията може да стимулира ГБСК пролиферация, но която не може да бъде потисната от VEGFR инхибитори. Следователно не само VEGF, но също и някои други сигнални растежни фактори допринасят за повишена ГБСК пролиферацията под хипоксично състояние. При продължително лечение анти-ангиогенни препарати, туморите развиват прогресивно хипоксия, която вероятно е и основния фактор за насърчаване на тумор резистентност към терапията и в крайна сметка туморната прогресия.

В настоящото проучване, свръхекспресия на *VEGFA*, *FLT-1* и *KDR* беше открита, както следва при 72.8%, 10.8% и 27.1%, от изследваните тумори, като 100% от тях са малигнени глиоми, а в НСГ и такива от смесен тип не се наблюдавани при нито един. Статистически значими разлики бяха наблюдавани в преживяемостта на трите групи - с понижена, с повишена и нормална експресия за двата изследвани рецептора (както следва за *FLT-1*,  $p=0.042$  и *KDR*,  $p=0.028$ ), но при провеждането на мултирегресионен анализ, промяната в експресията на нито един от тях не показва значима независима връзка с прогнозата. От друга страна при провеждане на корелационния анализ на промените в нивата на *VEGFA* и *KDR* бяха установени значими положително асоциирани връзки с наличието на диагноза ГБМ (съответно  $\rho=0.478$  и  $0.265$   $p<0.001$ ), както и показват такава и с напредването на възрастта на заболяемост (съответно  $\rho=0.407$ ;  $p=0.001$  и  $0.390$ ;  $p=0.003$ ).

Експресията на VEGF се увеличава в отговор на хипоксия, и това се осъществява чрез два механизма. Първо, хипоксията предизвиква активиране транскрипцията на VEGF чрез HIF-зависими механизъм, медирано от HIF-1, свързвайки се с HRE в рамките промотора на VEGF, водещ до повишаване на генната транскрипция (127). Вторият механизъм регулиращ нивата на VEGF иРНК чрез регулиране на стабилността ѝ. Този ефект се медира от 3'-нетранслираната област на VEGF иРНК (128). Хипоксичната активация на VEGF се счита за основната движеща сила за развитието на нови кръвоносните съдове, както по време на ембрионалното генезис и в развитието на тумора. *In situ* хибридизация на туморната тъкан разкри VEGF иРНК локализирана в псевдопалисадните клетки около хипоксично/некротичните зони при ГБМ, което вероятно се дължи на хипоксична индукция. В действителност, инхибирането на VEGF сигнален път води до инхибиране на туморния растеж и ангиогенеза.

VEGF е широко изследван и е ключов регулатор на ангиогенезата. VEGF и неговия основен рецептор VEGFR-2, са експресирани в злокачествен глиом, водещо до паракринна активация на клетъчна пролиферация, оцеляване, активиране, инвазия, миграция и пропускливост. Експресионните нива на VEGF са положително свързани със злокачествена прогресия и съдова плътност. VEGF сигнализацията също стимулира въвличането на стволови клетки от костния мозък, които секретират проангиогенен фактори за местата на

продължаващата туморна ангиогенеза. Установено е десетократно повишение в нивата му при ВСГ, в сравнение с НСГ (118).

*VEGF* експресия е изследвана при мозъчни тумори, т.е. астроцитни глиоми (СЗО класове II, III) и глиобластом, като е наблюдавано значително повишение на *VEGF* експресия при ВСГ в сравнение с НСГ (129). ИХХ изследвания откриват увеличено количество *VEGF* около областта на некроза и особено в псевдопалисадните клетки на ГБМ, което логически води до предположението, че хипоксията е отговорна за стимулиране на *VEGF* експресията и ангиогенезата с цел насърчаване на туморния растеж (130). Поради изобилната неоваскуларизация при ВСГ и практически отсъствието им в клас II астроцитни тумори, за експресията на *VEGF* се смята, че има прогностична стойност в астроцитни глиоми. Поради тази причина в настоящото изследване връзката между експресия на *VEGF* и общата преживяемост на пациентите с глиома е изследван, като са включени тумори с различни стадий за оценка на прогностична стойност на този ангиогенен фактор. Клиничните данни и резултатите са сравними с тези на други анализирани ретроспективно изследвания (131). Това беше потвърдено и в нашето проучване – наблюдавахме статистически значими разлики в преживяемостта на трите групи (с понижена, с повишена и нормална експресия;  $p < 0.001$ ), като средната преживяемост на групата с увеличена експресия е значително по-ниска от тази с нормална експресия (14.33 мес за групата с увеличена експресия към 25.43 мес.). В изследваната група беше анализирана и неговата независима прогностична стойност, като анализа включва наличието на клинични и демографски показатели като възраст, туморен стадий и наличието на други експресионни маркера, като показва независимата си негативна значимост наред с възрастта (съответно за *VEGF* HR=1.039, CI 95% 1.003-1.066,  $p=0.032$  и за възрастта HR=7.934, CI 95% 1.210-52.044,  $p=0.031$ ). Изследването на възможните корелации между конкретните клетъчни и/или молекулярни събития и клиничните характеристики в човешките тумори е ценно поради възможността за субгруппирането на тумори въз основа на техния биологичен "облик", което може да предостави полезна информация по отношение на адекватна терапия, т.е. по-агресивно лечение може да се приложи при тумори с установена лоша прогноза въз основа на генетичните прогностични маркера. Освен това силната прогностична значимост на дадено клетъчно или молекулярно събитие могат да насочат вниманието към биологичното му значимост в многостъпалния процес на туморогенеза.

## **SOX (SRY-TYPE HMG BOX) СУПЕРСЕМЕЙСТВО**

Значимата ролята на *SOX* генното семейство в канцерогенезата е била заподозряна поради участието им в регулацията на клетъчната диференциация, пролиферация и оцеляването на клетките. Нарушената регулация на *SOX* гените се наблюдава при различни видове ракови заболявания (132-148). Анализът показва, че три от изследваните гени бяха свръхекспресирани при глиоми в сравнение с нормалните мозъчни тъкани на възрастни индивиди - *SOX2* (49.15%), *SOX8* (40.68%) и *SOX9* (49.15%) гени, докато *SOX6* гена често имаше иРНК нива еквивалентни на тези в нормалния мозък (47.46%). Тези резултати са в съответствие с вече публикувани данни, въпреки че *SOX6* свръхекспресия се наблюдава само в 40% от пациентите, докато Ueda и сътр (149) съобщават за значително по-висока *SOX6* гена експресия във всички анализирани глиомни проби, предполагайки, че съществува установена ясна връзка между имуногенността на *SOX6* и степен на злокачественост в глиомите. Тази различна честота в нашето изследване може да се дължи на използването на две ендеогенни контроли, по-подходящи за изследване на експресионни нива в ЦНС (*GAPDH* и *TBP* (150)) в сравнение с  $\beta$ -актин, използвана в проучването на Ueda и сътр (149). Нашите резултати показват, че всички НСГ имат свръхекспресиран *SOX6* в сравнение с 33.3% от ГБМ. Друго проучване докладва, по-високи нива на иРНК на *SOX6* в ОД в сравнение с астроцитите (151), които не бихме могли да проверим поради малкия брой пациенти в групата на НСГ (2-ОДIII, 3-АII и 1-ОАIII проби). Повече от половината от пациентите с ГБМ и АА имат експресионни нива сравними с тези в нормалната мозъчна тъкан на възрастен индивид, докато другите групи показваха леко завишение на експресионните нива. Интересно е откритието, че една трета от

пациентите с глиома и високи нива на *SOX6* развиват IgG антитела срещу тях, което досега не е наблюдавано при пациенти с други мозъчни заболявания или здрави хора (149, 152). Освен това, ние открихме, че иРНК нивата на *SOX6* значително корелират с тези на *SOX8* ( $\rho=0.510$ ), което е наблюдавано и в TCGA проекта както в ГБМ, така и в НСГ (153).

Нашите резултати показват силно увеличена регулация на *SOX2* ген в нашата група пациенти, но без това да го прави независим маркер с клинично или прогностично значение. *SOX2* генната експресия е широко изследвана в поредица от проучвания сочещи, че промяна в експресията на *SOX2* може да бъде важна за туморогенезата при някои видове малигнени образувания, като рак на стомаха - понижена експресия се свързва с неблагоприятната ОП (133, 154). От друга страна изследвания, изследващи ГБМ и медулобластоми разкриват свръхекспресията на *SOX2*, като индуцираща инвазия и миграцията на глиомните клетки, което предполага, че де-регулацията на *SOX2* допринася за туморното развитие (155) и е свързана с лоша прогноза (147). От друга страна, *SOX2* показва, че има отношение в разграничаването и молекулярния отпечатък на проневроналната субгрупа ГБМ (156), въпреки че в данните на TCGA проекта се асоциира и с характерния генен профил на класическата група (153). Различни механизми като генна амплификация, промоторно хипометилиране, транслационна регулация, и активиране на сигналните пътища, участват в регулацията на *SOX2* при ГБМ пациенти и агресивността на заболяване (155, 157). Други проучвания нямат еднозначен резултат в опита си да съпоставят повишената експресия с прогноза на заболяването (158-163). Тези резултати не намаляват значимостта на *SOX2* експресията в глиалните туморите, а предполагат, че нивата на *SOX2* са съпроводени от други промени, засягащи например генната експресия подпомагайки действието на *SOX2* в иницирането растежа на туморните клетки (147).

Нашето изследване е едно от малкото, които анализират данни за преживяемост при пациенти с глиома във връзка със *SOX2*, *SOX6*, *SOX8* и *SOX9* експресия в комбиниран със състоянието на мутация *IDH1*. Въпреки че повечето от публикациите докладват наличие на маркери на стволови клетки като *SOX2* по-често при глиобластом, съвсем наскоро увеличена експресия на *SOX2* е открита при голям брой пациенти с анапластична глиома с див тип *IDH1* ( $p=0.020$ ), но статистическа значима връзка с прогноза не се наблюдава (164). Нашите резултати показаха по-висока експресия на *SOX2* при ГБМ и ААIII в сравнение с нормалната мозъчна тъкан, но не е установена връзка с *IDH1* мутации. Вместо това, нивата на експресията на иРНК за *SOX6* и *SOX8* значително корелират с наличието на *IDH1* мутации. Схемата за класификация на Verhaak и сътр разграничава ВСГ в четири субгрупи (проневронална или PN, невронална, мезенхимална и класическа), но не позволява да се предсказва общата преживяемост на пациентите в тези субгрупи (165). Sun и сътр (166) разширяват предишните проучвания върху глиомната класификация, базирайки се на гени паралелно ко-експесиращи се с EGFR (EGFR модул-EM) или с PDGFRA (PDGFRA модул-PM) в глиоми, като тази схема на класифициране е силен инструмент за разграничаване при възрастните ниско- и високо-стадийните дифузни глиоми на три основни подтипа (EM, PM и EM<sup>ниско</sup>PM<sup>ниско</sup>) в зависимост от преживяемостта на пациентите, както и според транскриптомните и геномни характеристики (166). В EM са наблюдавани глиоми специфични за невроналните стволови клетки маркери като NES и EGFR, както и важни транскрипционни фактори - POU3F2, NFIA и *SOX9*, регулиращи астроцитния произход /астрогенезиса/. Докато в PM глиоми се наблюдава значителна експресия на гени, участващи в регулацията на олигодендрогенезиса (*PDGFRA*, *OLIG1*, *OLIG2*, *SOX6*, *SOX8* и други), проневроналната подгрупа се характеризира с висока PDGFRA амплификация и *IDH1* мутации. Последните от изброените беше установено, че се срещат във висок процент и при PM глиоми (166), което потвърди, наблюдаваната от нашето изследване положителна корелация между нивата на иРНК на гените *SOX6* или *SOX8* и *IDH1* мутации. Освен това е налице информация, че промените в *SOX8* и *IDH1* има тенденция да бъдат събития с едновременно присъствие както при ГБМ, така и в ниско-стадийните глиоми (НСГ), докато тези засягащи *SOX6* и *IDH1* има тенденция на съвместното присъствие само при НСГ, а при ГБМ се характеризират като взаимноизключващи се (153). Независимо че в изследваната от нас група

пациенти преобладава броя на ГБМ тумори, в групата характеризираща се с *IDH1* мутации наблюдавахме тенденция за едновременно наличие и на по-висока *SOX8* експресия, най-вероятно поради наличието на НСГ в нашето проучване, които от своя страна са и пробите с по-висок процент на *IDH1* аберации. Iuchi и сътр съобщават подобна връзка между *SOX8* свръхекспресията и *IDH1* мутация (167).

*SOX8* и *SOX9* принадлежат към една и съща група протеини на SOX семейството, споделяйки сходна структура и геномна организация, а свръхекспресията на *SOX8* е наблюдавано, че допринася за трансформацията на нормалните клетки в ракови клетки по аналогичен начин на действието на *SOX9*. Въпреки това, в сравнение с широко изследвания *SOX9*, *SOX8* в много по-малка степен е проучван и съответно информацията за неговата роля е много оскъдна при туморите и по-специфично, в мозъчната туморогенеза. Нашето изследване показва, че *SOX8* експресията не се асоциира с никой от клиничните параметри (възраст, степента на тумора и диагноза). Друго изследване (151-237) наблюдава значително повишени иРНК *SOX8* нива в по-голямата част от изследваните ниско-стадийни дифузни астроцитомии и ОД тумори (151-237). Такава асоциация не беше открита в нашето изследване, вероятно поради малкия брой пациенти с глиоми СЗО стадий II. Въпреки това, ние изследвахме наличието му в няколко ОД СЗО III, където нивата на експресия варират в широк диапазон, както и в ГБМ, където нивата *SOX8* иРНК бяха по-ниски при около 90% от ГБМ. Ние открихме, че пациенти с ниско *SOX8* иРНК показват по-неблагоприятна ОП. *SOX8* експресията е обратнопропорционална на *SOX9* и *SOX10* експресията при олигодендроглиоми и експерименти с нокаут на *SOX8* показват засилване на функцията на другите два SOXE фактора (168). Това може да е причина за наблюдаваните ниски нива на *SOX8* при пациенти с по-напреднал стадий и по-агресивни мозъчни тумори. Iuchi и сътр съобщават за значително по-високи експресионни нива на *SOX8* в олигодендроглиални тумори ( $p < 0.0001$ ) и тумори с мутант *IDH1* белтък ( $p < 0.0001$ ) (167), докато ние открихме асоциация не само с НСГ, но също така и с цялата група от злокачествени глиоми, включително ГБМ и АА. Макар и без статистическа значимост, се наблюдава тенденция за връзка между наличието на увеличена регулация на *SOX8* и *IDH1* мутации ( $p = 0.122$ ), докато при астроцитните тумори без *IDH1* мутации се наблюдава обратната тенденция, пациентите с високи или нормални нива на *SOX8* тумори с тенденция да показват по-добре оцеляване, отколкото тези с ниска *SOX8* експресия (5.9 месеца), въпреки че и тази разлика не е статистически значима ( $p = 0.523$ ). Наблюдаваните резултати може да се дължат на преобладаващото количество от ГБМ пациенти в групата с див тип *IDH1*. Повече от половината от групата притежаващи *IDH1* мутации се състои от пациенти, които са били диагностицирани с глиоми различни от ГБМ, а от ГБМ три от случаите в тази група са се развили от по-ниско стадийни глиоми.

Въпреки че повечето от SOX гените, показват поведение на онкоген, иницирането на клетъчната пролиферация инхибира клетъчното остаряване и си колаборира с други онкогени при неопластичната трансформация (74), някои от тях може да проявяват диаметрално противоположен функционална роля в други видове туморни заболявания и могат да играят роля като туморсупресорни гени, блокирайки растежа на туморите (169). Пример за такъв ген е *SOX9*, които е от критично значение за ембрионалното развитие и тъканна хомеостаза в няколко органи. Неговата свръхекспресия често се наблюдава при хепатоцелуларен карцином, рак на кожата, простатата, белия дроб и мозъка, действащи като онкоген, силно асоцииран с прогресията на тумора и лошата прогноза (154, 170-172). От друга страна, в някои случаи на меланом и колоректален карцином, се проявява като туморсупресор, намалявайки туморогеността (138, 173). Kaplan-Meier анализът на преживяемостта показва значително по-ниска обща преживяемост (13.4 месеца) на пациенти с глиома и с повишени иРНК *SOX9* нива в сравнение с тези на пациенти с понижени *SOX9* иРНК (24.7 месеца,  $p = 0.013$ ). Тези данни подкрепят хипотезата за проонкогенното поведение на *SOX9* при пациентите с глиома. Нещо повече, съобщава се, че по-високите експресионни нива играят важна роля в глиомното развитие и прогресия (174). От клинична гледна точка, повишената експресия на *SOX9* в глиома пациенти значително корелира с възрастта и вида на резекция, но нито с туморния СЗО стадий

( $p=0.927$ ), нито с KPS статуса ( $p=0.195$ ). В контраст с получения от нас резултат, Wang и сътр съобщават за тясна връзка между нивото на иРНК *SOX9* и клинично-патологични фактори като СЗО стадий и KPS статус, което предполага тенденцията за увеличение на *SOX9* иРНК да води до прогресия в туморния стадий и да е свързано с по-нисък KPS (174). Това несъответствие може да се дължи на малкия брой пациенти с по-нисък стадий в нашата група, която е доминирана от пациенти със стадий IV. Въпреки че не е наблюдавана значима корелация между *SOX9* експресията и *IDH1* мутационния статус на пациентите, тези без наличие на *IDH1* мутации, експресиращи нормални нива *SOX9*, имат значително удължена преживяемост в сравнение с тези с по-високи *SOX9* нива ( $p=0.002$ ). Досега няма известно публикувано проучване изследващо връзката на *SOX9* генната експресия във връзка с *IDH1* мутационния статус.

Анализ на възможните прогностични маркери, използващи многовариантни регресионни модели, определя възрастта, *IDH1* мутационен статус, KPS статус, *SOX9* и *SOX8* иРНК като независими прогностични фактори за пациенти с глиоми. Няколко мултивариантни регресионни модели, различаващи се с присъствието на *SOX8* и *SOX9* иРНК-и бяха тествани, което разкри интересни резултати. В модел А силно изразена експресия на *SOX9* ген имаше отрицателна прогностична стойност и *IDH1* мутации, както се очакваше се открие като независим прогностичен фактор. За разлика от тях, в модел В, *IDH1* мутация отново се отличи като маркер за по-добра преживяемост ( $p=0.013$ ), но *SOX8* експресията загуби своята прогностична стойност. Това може да се дължи на наблюдаваната значителна положителна корелация между мутационния статус на *IDH1* и *SOX8* експресия. Въпреки че наличието на *IDH1* мутация се съобщава в много проучвания като силен независим прогностичен фактор дори в група с ГБМ тумори (28, 175), от модела С, където всички променливи са тествани заедно, ниските нива на *SOX8* иРНК експресия и високи нива на *SOX9* експресия се проявиха като значими неблагоприятни прогностични маркери (съответно  $p=0.020$  и  $p=0.002$ ), докато *IDH1* мутациите загубиха своята прогностична стойност.

Въпреки широко разпространената експресия на *SOX8* и неговата роля в невrogenезата, миши модели, дефицитни на *SOX8*, генерират нормални олигодендроцити (176), вероятно поради биохимичното сходство на членовете в SOXE групата. Това е причината, поради която се предполага, че липсата на *SOX8* може да се компенсира от *SOX9* и *SOX10*, както *SOX8* може да компенсира липсата на *SOX9* (168). От друга страна, *SOX* гените участват в регулацията на редица процеси на развитие (154, 177, 178), като потенциални туморни супресори или инициатори в различни малигнени образувания. Последните проучвания в туморогенезата установяват, че *SOX* семейството транскрипционни фактори се очертава като важен регулатор на Wnt сигнално-трансдукционния път, който регулира клетъчната пролиферация и миграция, както и съдбата на клетките по време на ембрионалното развитие, действието на клетките като стволови и тъканната хомеостаза (179). Каноничните функции на Wnt пътя се регулират от транскрипционния коактиватор  $\beta$ -катенин (CTNNB1), който често е свръхекспресиран при ВСГ (180, 423). Високата му активност се наблюдава, че корелира значително с по-лошата прогноза при пациенти с рак на гърдата, стомаха и дебелото черво, както и да служи като полезен прогностичен маркер при астроцитомии и ГБМ (181). Повишеният цитозолен  $\beta$ -катенин повлиява взаимодействието му с промотори на различни целеви гени, като например с-Мус кодиращ транскрипционен фактор, с нарушена регулация в човешки ракови заболявания (182). Има доказателства в литературата, че МУС може да стимулира експресията на двата основни глутамат транспортери, с цел увеличаване приема на глутамат и получаване на допълнителни количества алфа-кетоглутарат ( $\alpha$ -KG) в резултат на дву-стъпален процес на глутаминолиза (183). В тумори с *IDH1* мутация има намалено производство на  $\alpha$ -KG за сметка на увеличаване синтеза на 2-Хидроксиглутарат (2-HG), който представлява реалния онкометаболит.  $\alpha$ -KG е важен кофактор за няколко  $\alpha$ -KG-зависими диоксигенази, които променят 5-метилцитозин в 5-хидроксиметилцитозин, водещи до деметилиране и следователно до активно действаща епигенетична регулация (184, 509, 185, 510). За *SOX9* и *SOX8* в литературата има данни, че са свързани с WNT/ $\beta$ -катенин пътя и канцерогенност при различни видове рак (186, 187).

Въпреки, че механизмите, с които се нарушава регулацията на *SOX8* при МГ остават неизяснени, въз основа на информацията, че някои *SOX* гени, като *SOX9* например, имат диаметрално противоположна функционална роля – като онкоген и туморсупресор (154, 170-172) при различните видове рак може да се предположи, че това се отнася и за *SOX8*. Има данни, че свръхекспресия на *SOX8* инициира туморогенезата при хепатоцелуларния карцином (187). Предстои да бъде изяснен механизма на взаимодействие между ефекта на *IDH1* мутации и *SOX8*, *SOX9* експресия при раковите заболявания в детайли. В заключение, нашите данни предполагат, че свръхекспресия на *SOX9* иРНК и намалена експресия на *SOX8* иРНК са тясно свързани с неблагоприятните клинични резултати на пациенти с глиоми. Тези наблюдения са направени независимо от прогностичното значение на маркери като възраст, диагноза, KPS статус и мутации в *IDH1* ген, в подкрепа на хипотезата, че от избраните 4 *SOX* гени, както *SOX8*, така и *SOX9* са обещаващи прогностични биомаркери за пациенти с глиоми.

## 5.6. СРАВНИТЕЛНА ГЕНОМНА ХИБРИДИЗАЦИЯ (aCGH)

### 5.6.1. АГРЕГАЦИОНЕН АНАЛИЗ

В настоящия дисертационен труд с помощта на различни агрегационни анализи (STAC и GISTIC) в изследваната група от глиоми (НСГ и ВСГ) идентифицирахме най-често засегнатите и характерни за глиомите геномни изменения, а именно – загуба в хромозомни участъци 1p, 6q, 9p, 10p, 10q, 13q, 14q, 15q, 19q, 22q, и увеличен брой копия на хромозома 7, 14q, 19p, 19q, 20p, 20q и 22q. Събитието наречено амплификация (увеличен брой копия) отразява последиците от фокалното увеличение на ДНК съдържанието, което от своя страна обичайно се асоциира със специфично нарастване експресионните нивата на генните разположени в засегнатите ампликони. Освен това амплификациите могат да водят до нарастване на броя копия както в част от хромозомния участък, така и да обхваща цели хромозоми (188). В литературата при глиомите са наблюдавани най-често амплификация на локусите 7p и 4q (189, 190), като събитието с най-висока амплификационна честота, особено при ГБМ, е това в локус 7p12, където се намира и гена *EGFR*. Това е и най-често наблюдаваната промяна засягаща онкогени, която води до свръхекспресия на *EGFR*. *EGFR* се свръхекспресира в различни видове рак, което предполага ключовата му роля в патогенезата на тези заболявания. Амплификацията на *EGFR* е открита в 30-50% от всички ГБМ, като се появява по-често в първични ГБМ и ускорява процесите на растеж и инвазивност, като определя и резистентност на туморните клетки към лъче- и/или химиотерапия (191, 192). В диагностичната практика все повече невропатолози изследват *EGFR* статуса на пациентите с цел по-точното идентифициране и поставяне на хистологична диагноза при неопластичните астроцитомии. Наличието на *EGFR* амплификация се счита за силно доказателство, че туморът е ГБМ, или поне, че би трябвало да бъде третиран като ГБМ, дори когато характерните за ГБМ хистологичните критерии (некроза и микроваскуларна пролиферация) не се наблюдават (191).

Освен това амплификация и на други гени кодиращи рецепторните тирозин-кинази (RTK) имат ключова роля в туморогенезата на глиомите и е основен фактор за растежа на тумора чрез активиране на MAPK сигналния път. До 50% от ГБМ имат амплификация на RTK, включващи освен *EGFR*, и *KIT*, *VEGFR2*, *PDGFRA* и *MET*. Високо ниво на амплификация на RTK гените изглежда сравнително по-късно събитие в туморогенеза на ГБМ, и обикновено високо амплификационно ниво показва само един от RTK (193). По-голямата част от първични ГБМ притежават амплификация и/или мутация засягащи RTK, както следва: рецептора на епидермалния растежен фактор или (*EGFR* 40-50%), тромбоцитен растежен фактор рецептор  $\alpha$  (*PDGFRA*;  $\approx$  15%), или рецептор на хепатоцитен растежен фактор (*MET*,  $\approx$  5%) (153). Такъв белтък, кодиран от гена разположен в засегнатия район в 7-ма хромозома е *MET* (Mesenchymal epithelial transition factor). Известен е като протоонкогенен тирозин-киназен рецептор на хепатоцитен растежен фактор. При възрастните, експресията му е ограничена до наличие в стволовите и прогениторни клетки и е необходим за зарастване на рани и регенерация на хепатоцитите. В ембриона тези рецептори се експресират върху клетките от епителен произход, като са от съществено значение за инвазията при растежа и спомага епително-мезенхимния

преход (EMT). Активиране на този път при възрастните индивиди води до развитие на повече от 155 болести, множество от различни видове инвазивни тумори, (194, 195). Мутации открити в *MET* гена се свързват с по-лоша прогноза, тъй като водят до неконтролируемото клетъчно делене, ангиогенеза и метастазиране (196).

Плексин А4 (**PLXNA4**), който служи като рецептор за клас 3 семафорини, притежава пряко участие в аксоналното насочване по време на развитието на централната и периферната нервна система. Например доказано е, че *PLXNA4* ограничава неправилното разпространение на мъхести нервни влакна в СА3 региона на мишия хипокампус, насочва дървовидните разклонения на базалните дендрити във V слоя на кортикални неврони и симпатикови аксони, както и участва в образуването на слоевете и синапсите във външния край на ретината при мишки (197). В литературата има данни, че *PLXNA4* е замесен при редица невродегенеративните заболявания. С помощта на GWAS проучване, изследващо вариантите с ниска честота при пациенти с късно начало на болестта на Алцхаймер е било установено, че гена *PLXNA4* показва най-силна асоциация (198). Досега *PLXNA4* не е свързван с възникването и развитието на мозъчни тумори, но има данни за връзката между увеличаване брой копия и наличието на меланома (199). Редица изследвания показват връзката на семафорините и неуропилините при туморите, като предполагаеми туморсупресорни гени или като медиатори на туморната инвазия и метастазиране (200-202). Допълнителна асоциация между плексините и туморите се потвърждава от тяхната възможност да свързват и функционално да активират тирозинкиназни рецептори като *MET*, *RON*, *HER2*, и *KDR* (203-205). Тези данни водят до предположението, че плексините могат да участват в туморната инвазия и метастатичният потенциал на раковите клетки. Единични случаи анализират експресионните нива на индивидуални плексини в малигнените образувания (206-208)

Всички гени, разположени в не само в районите на хромозома 7, но и извън, показва значими изменения от типа „увеличен брой копия – дубликации” и с молекулни функции, засягащи развитието, функционирането и регулацията на нервната система, както и участващи в процеси водещи до развитието на малигнените заболявания. Освен вече разгледаните *EGFR*, *MET*, *PLXNA4*, които са по-широко застъпени в литературата, интерес представляват и *PXDN*, *ADAP1*, *SKAP2*, *ARHGEF10*, *MARCH9*, *TSPAN31*, *TFSM*, *METT21B*, *AGAP2*, *METTL1*, *CYP2A*, *CYP27B1*, *CDK4*, *MDM4* и *CST3*. При рецидивиращи тумори са установени амплифицирани райони засягащи хромозома 12, с големина от 44Мб до 1,479Мб и в него са включени различни участъци предимно засягащи 12q съдържащ до 41 различни гени. На ред с другите гени като значими промени в изследваната от нас група отдиференцирахме *CYP27B1*, *METTL1*, и *TFSM* при 4 пациента от всички гени в локус 12q14.1 при 16/58 пациента (27%), и *CDK4* и *AGAP2* гени при 6 ГБМ (10%). В допълнение, амплификацията на хромозомен район 12q15 (при 12 пациента) обхваща гена *MDM2* ген заедно със *SLC35E3* и *CPM* гени при 5 случая (8%). Амплификация на хромозомен район 12q13–15 беше наблюдавана при значителна част от ГБМ, което е в пълно съответствие с публикуваните досега данни (209). Противоположно на наблюдаваното в локус 7p11.2, в 12q13-15 често събитие е участието на множество гени, чиято експресия засяга увеличено количество иРНК, така и броя ДНК копия. От всички гени разположени в този локус само *METTL1*, *CYP27B1* и *TFSM* бяха наблюдавани систематично да са засегнати при туморите показващи промени в 12q. В литературата има данни за висока честота при ГБМ на ко-амплификация на гените *CDK4* и *MDM2*, намиращи се в района 12q13-15 (210). В изследваната от нас група беше наблюдавана предимно амплификацията на *CDK4*, без да се наблюдава връзка с тази на *MDM2*. За разлика от тези гени, относително малко се знае за ролята на други ко-амплифицирани и свръхекспресирани гени локализирани в 12q13-15, въпреки че са наблюдавани и при други видове тумори [Wikman, 2005 #5276]. От тези гени по-специално внимание обърнахме на *CYP27B1*. (P450 цитохром 25-хидроксивитамин D3 1, а хидроксилаза), който катализира превръщането на калцидиола в калцитриол, който представлява най-активния метаболит на витамин D, и участва в клетъчната пролиферация проявявайки, както антипролиферативния, така и ефекта си в клетъчната диференциация (211). Обратно, ролята на *METLL1* - ядрен белтък, който катализира образуването на N (7)-

метилгуанин в позиция 46 (m7G46) на тРНК, инактивиран в отговор на агонисти на PI3-киназия път или на класическата MAP киназна каскада, и *TSM* (ген, който кодира EFTs хондрични превод коефициент на удължение) при ГБМ, заслужават допълнително изследване, както е докладвано и в предходни проучвания (212).

От друга страна хомозиготните мутации са чест индикатор за локализацията в тези геномни позиции на туморсупресорни гени, а идентифицирането на такива събития в туморните клетки са изключително важни събития, които с помощта на високо-резолютивната способност на aCGH е значително улеснено. Докато най-честото хомозиготно делеционно събитие включва *CDKN2A* (p16) (188, 189), LOH на хромозома 10 е най-честата генетична промяна в ГБМ, и се среща при 60-80% от случаите (213). Загуба на цялата хромозома е често наблюдавано, но частични делеции в три общи региони са описани, което предполага, че няколко туморсупресорни гени могат да съществуват в хромозома 10 (214). LOH 10q се наблюдава със сходна честота при първичните и вторичните ГБМ (213), докато LOH 10p е по-характерно за първичните ГБМ (215). В резултат на LOH в 10q е установен един от туморсупресорните гени - *PTEN* локализиран в 10q23.3 (216). *PTEN* е фосфатаза, което инхибира PI3 сигнализиране, и по този начин потиска активността на АКТ и mTOR, като инхибира клетъчната пролиферация. Мутации в него се наблюдават при 15-40% от ГБМ (217), но най-често при първичните ГБМ (213, 215). Въпреки, че някои изследвания показват липса на връзка между преживяемостта и наличието на мутации в *PTEN* гена при глиомите (225), повишената АКТ активност се асоциира с по-лоша прогноза за пациентите (226), както и редица други проучвания откриват пряка връзка между аберациите в *PTEN* (мутации, делеции или метилиране) и по-лошата преживяемост (226, 227). В изследваната от нас група пациенти гените, в райони показали значими изменения от типа „генетични загуби – делеции” и с молекулни функции, засягащи развитието, функционирането и регулацията на нервната система, както и свързани с канцерогенезата, са следните 20 - *TAF12*, *UBE2K*, *DDX43*, *SENP6*, *SGK1*, *PEX7*, *LATS1*, *TIAM2*, *MTAP*, *SAMK1D*, *GCH1*, *ESR2*, *MTHFD1*, *FUT8*, *NUMB*, *SPG11*, *CSNK1G1* и *SHCBP1*.

## 5.6.2. ЙЕРАРХИЧНО ГРУПИРАНЕ

Йерархично групиране вследствие групира базирано на пълно сходство (CLHC) довел до разграничаването на 4 групи, 2 от които показаха значими различия в преживяемостта. Значимите изменения наблюдавани като съществени разлики между двете клъстерни групи, бяха открити в хромозоми 1, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14 и 19. Най-голям процент от събитията са локализирани в хромозома 7, 8 и 10 - в клъстерната група 1 се наблюдават главно делеционни събития в хромозома 8 и 10, за разлика от група 4, при която в хромозома 8 преобладава увеличени брой копия, а в 10-та хромозома се наблюдават сравнително малък брой аберации. В групата от пациенти оформящи клъстер 1 наблюдаваните аберации довели до редуция в броя на копията при над 70% от пациентите, засягат 9 гена и един псевдоген, като тези изменения не се наблюдават в нито един от членовете на групата формираща клъстер 4. Гените, в райони показали значими изменения и с молекулни функции, засягащи развитието, функционирането и регулацията на нервната система, както и свързани с канцерогенезата и са отдиференцирани *UPF2*, *DHTKD1* и *SAMK1D*. И трите гена се намират в хромозома 10, локализирани в p.14-p.13, като засегнатия регион обхваща 589 587 б.дв. Високата честота на LOH в хромозома 10, и по-конкретно 10p14-15, е наблюдавано при редица туморни заболявания, като глиоми (218), медулобластоми (219), белодробни карциноиди и ендометриални (220), хепатоцелуларни (221), простатни (222) и други карциноми. Тези открития предполагат наличието на туморсупресорен ген в този локус (223), а до момента *KLF6* е идентифициран като един от туморсупресорните гени (224), което предполага възможността за наличието и на други с важно значение за туморогенезата.

Гените, в райони показали значими изменения от типа „увеличен брой копия – дубликации” и с молекулни функции, засягащи развитието, функционирането и регулацията на нервната система, както и свързани с канцерогенезата, са разположени в 7<sup>ма</sup> хромозома

единствено. Отдиференцирахме следните кандидат гени: *ADAP1*, *CYP2W1*, *GPER*, *INHBA*, *EGFR*, *MAGI2*, *GNAI1*, *SEMA3C*, *FEZF1*, *CADPS2*, *PLXNA4*, *PTN*. *ADAP1*, *EGFR* и *PLXNA4* са гени, посочени като замесени в патогенезата на това раково заболяване. Гените имащи отношение към развитието и функционирането на нервната система са *SEMA3C*, *CADPS2*, *FEZF1* и *MAGI2*. В групата от пациенти оформящи клъстер 4 наблюдаваните аберации от типа „увеличен брой копия – дубликации” при около 37% от пациентите, липсващи в групата формираща клъстер 1 са следните гени: *NECAB1*, *ENY2*, *EBAG9*, *SYBU*, *MPZL2*, *HYOU1*, *HMBS*, *PBGD*, *H2AFX*, *HINFP*, *CBL*, *VWA5A*, *ST14*, *MGMT*, *ARHGAP32*, *BARX2*, *APLP2*, *NFRKB* и *PRDM10*. От тях гените *EBAG9*, *MPZL2*, *HMBS*, *PBGD*, *HINFP*, *ST14* и *BARX2* се асоциират с възникването на различни ракови заболявания (*EBAG9* – рак на гърдата, простатата, черния дроб, дебелото черво, белодробен, езофагеален и др; *MPZL2* – рак на белите дробове, левкемия; *HMBS* – рак на гърдата, простатата, дебелото черво, но и болест на Алцхаймер, неврити и др. болести засягащи нервната система; *PBGD* – рак на гърдата и яйчниците; *HINFP* – рак на простатата; *ST14* - рак на гърдата, простатата, стомаха, фибросарком и др, *BARX2* - левкемия и ендометриален карцином). Гените *NECAB1*, *ARHGAP32*, *APLP2* и *PRDM10* са свързани с нормалното развитие на нервната система, нейното нормално функциониране и аберациите, които ги засягат водят патогенезата на редица невронални заболявания.

### 5.6.3. РАЗДЕЛЯНЕ НА ПАЦИЕНТИТЕ СПОРЕД IDH1 МУТАЦИОННИЯ СТАТУС

#### 1. ПАЦИЕНТИ БЕЗ МУТАЦИЯ В IDH1 С НИСКА И ВИСОКА ПРЕЖИВЯЕМОСТ

Сравнени бяха данните получени от микрочиповият анализ на 34 пациента, при които не беше открита мутация в *IDH1*, като 12 от тях бяха в групата на дълго преживяващите в сравнение с 22 пациента в групата с ниска преживяемост. Значими аберации между изследваните групи от типа „генетични загуби – делеции” се наблюдават в хромозоми 1, 2, 4, 10, 12, 15, 16, 22, X и Y, докато тези с „увеличен брой копия – дубликации” засягат само две хромозоми - 7 и 14. В групата с повишена обща преживяемост наблюдаваните аберации довели до намаляване броя на копията при 25% от пациентите, засягат следните 8 гени - *ITSN2*, *POLR2B*, *ELOVL6*, *GUCY2C*, *ATF7IP*, *GABARAPL1*, *KLRD1* и *CIITA*, като тези изменения не се наблюдават при нито един от пациентите с понижена обща преживяемост. Гените *ITSN2*, *GUCY2C*, *ATF7IP*, *GABARAPL1* и *KLRD1* се асоциират с възникването на различни ракови заболявания. В групата с повишена обща преживяемост наблюдаваните аберации довели до увеличение в броя копия при 25% от пациентите, в сравнение с нито един от групата с ниска преживяемост, се наблюдава при два гена - *STXBP6*, кодиращ синтаксин свързващ белтък 6 амизин, включен в образуването на т.нар. SNARE комплекс и екзоцитозата (асоцииран с болестта на Алцхаймер и ревматоидния артрит), както и *CEP170B*, играещ роля при организацията на микротубулите.

В групата с понижена обща преживяемост наблюдаваните аберации довели до загуба в броя на копията при над 75% от пациентите, засягат следните 26 гени - *SORBS1*, *TCTN3*, *ALDH18A1*, *ENTPD1*, *PTEN*, *DNAJC12*, *SIRT1*, *PBLD*, *HERC4*, *MYPN*, *ATOX7*, *HNRNP3*, *HNRNP3*, *DNA2*, *SLC25A16*, *PRKG1*, *ARHGAP22*, *WDFY4*, *MTRNR2L7*, *ZNF248*, *CCDC7*, *WAC*, *BAMBI*, *THNSL1*, *GPR158* и *RSU1*, като тези изменения се наблюдават и в групата с повишена обща преживяемост, но с много по-ниска честота. Първите 15 гена се откриват при 95.46% от пациентите (21 човека) с НП и при около 50% (6 човека) от групата с ВП. Пет от изброените по-горе гени са описани в литературата, като имащи връзка с мозъчната туморогенеза – *PTEN*, *SIRT1*, *SLC25A16*, *BAMBI* и *RSU1*. LOH на хромозома 10 е най-честата генетична промяна в ГБМ, и се среща при 60-80% от случаите <sup>(213)</sup>. Загуба на цялата хромозома е често наблюдавано, но частични делеции в три общи региони са описани, което предполага, че няколко туморсупресорни гени могат да съществуват в хромозома 10 <sup>(214)</sup>.

#### 2. ПАЦИЕНТИ С МУТАЦИЯ В IDH1 С НИСКА И ВИСОКА ПРЕЖИВЯЕМОСТ

В резултат на получените резултати от микрочиповият анализ на 24те пациента, с мутация в *IDH1*, значими разлики бяха наблюдавани между изследваните групи в хромозоми 7,

9 и 12. В групата с по-ниска обща преживяемост наблюдаваните аберации водещи до загуба броя на копията при 57% от групата с лоша преживяемост и при нито един или при един пациент от другата група са открити съответно гените *REP15*, *PPFIBP1*, *DNM1L* и *MDM2*. Загубата на вече споменатите гени, наблюдавани в групата от пациенти с *IDH1/2* мутация и с по-ниска преживяемост, може да е причината за по-лошата преживяемост на пациентите в тази групата. Чести генетичните аберации, открити при единични глиални тумори включват амплификация в локуси 1q32.1 (*PIK3C2B*, *MDM4*), 4q11-q12 (*KIT*, *PDGFRA*), 7p12.1–11.2 (*EGFR*), 12q13.3–12q14.1 (*GLII*, *CDK4*) и 12q15 (*MDM2*), и делеции в 9p21.1–24.3 (*p16INK4a/p14ARF*), 10p15.3-q26.3 (*PTEN*, и т.н.) и 13 q12.11- q34 (*SPRY2*, *RBI*). Тези вариации имат голяма вероятност да са причината за развитието на патогенезата на ГБМ (наречени отключващи туморогенезата мутации).

В литературата е налична оскъдната информация относно връзката между инактивацията на гените *REP15* и *PPFIBP1*, и процеса на туморогенеза. *REP15* е един от белтъците, регулатори на трансферин-рецепторното рециклиране, но няма публикувани данни за връзката му с възникването на мозъчни тумори. От друга страна белтък, кодиран от гена *PPFIBP1*, е член на семейство LAR тирозин-фосфатаза взаимодействащи белтъци наречени липрини. Те взаимодействат с членовете на семейството на LAR трансмембранни тирозин-фосфатази, които имат връзка с аксонната ориентация и развитието на млечната жлеза. Предполага се, че липрините са поливалентни белтъци, които формират комплексни структури и действат като скелет за събиране и закрепване на LAR тирозин-фосфатазните белтъци. Има данни, че взаимодейства със S100A4, калций-свързващ протеин, свързан с туморната инвазивност и метастазирание <sup>(230)</sup>. S100A4/Mts1 белтъка е високо експресирани при индивиди с хипертензия и има данни, че води до промени в кръвоносната система <sup>(231, 232)</sup>. *In vitro* експеримент показва, че взаимодействието на този белтък с протеин киназа C води до инхибиране на фосфорилирането му. Повреди в него се асоциират със заболявания като хондросарком, възпалителен миофибробластен тумор и болест на Олиер (проявява се с множество хрущялни тумори).

*DNM1L* кодира един от членовете на динамин суперсемейство ГТФ-ази. Белтъкът има важни функции при деленето на митохондриите и пероксизомите по време на митозата. Той спомага разделянето на мембраната чрез олигомеризация в пръстеновидна структура, която се разполага около мястото на разделяне чрез свиване и прекъсване на митохондриалната мембрана чрез механизма на ГТФ-зависима хидролиза. Чрез функцията си в деленето на митохондриите се гарантира оцеляването на поне няколко вида постмитотични неврони, включително клетките на Пуркиние, чрез потискане на окислително увреждане. Наличието му е задължителен фактор за нормалното развитие на мозъка, включително и това на малкия мозък. Улеснява регулираната апоптоза по време развитието на невралната тръба. Освен това участва и в регулацията на апоптозата и програмираната апоптоза по време на индивидуално развитие. Изключително необходим е за освобождаване на нормални нива цитохром C и активиране на каспазите по време на апоптоза, както и за изпълнение на програмираните некротични процеси. Вероятно участват активно и във везикулният транспорт. От друга страна свръхекспресията на изоформа 1 и изоформа 4 води до обратния ефект при пероксизомите т.е. инхибира разделяне им <sup>(233)</sup>. Нарушаване на функциите на този ген се свързват с тежки невронални заболявания, включително и болест на Алцхаймер, Паркинсонова болест, атаксия, болест на Хънтингтън, невропатия на Шарко-Мари-Тут, и други, но също и много ракови заболявания – колоректален карцином, рак на простатата и на белия дроб. Мутации в този ген се асоциират с летално автозомно-доминантно заболяване, енцефалопатия, поради дефекти засягащи митохондриалния и пероксизални разделяне. Наличието на допълнително копие на вече споменатите гени *REP15*, *PPFIBP1* и *DNM1L*, наблюдавани в групата от пациенти с *IDH1/2* мутация и с по-ниска преживяемост, може да е причината за по-лошата преживяемост на пациентите в тази групата. От друга страна при над 75% от пациентите в групата с наличие на *IDH1/2* мутации и по-лоша обща преживяемост, значимите аберации водещи до наличие на допълнително копие на част от генома и следователно до дупликация на следните гени - *LMTK2*, *BHLHA15*, *BAIAP2L1*, *MTPN*, *LUZP6*, *EXOC4*, *NRCAM*, *PNPLA8*, *THAP5*, *DNAJB9*,

*MAGI2, FOXP2, MDFIC, ATXN7L1, NOM1, MNX1, UBE3C, DNAJB6, CNTNAP2, CUL1, EZH2, PDIA4, FGL2, PTPN12, TES, CAV1, CAV2, ING3, CPED1, WNT16, FAM3C, CDK14, ORC5, FSCN3, PAX4, SND1, CTTNBP2, KCND2, EN2, CPA1, CPA4, CASD1, SGCE, PEG10, PON3, PPP1R9A, PON1, PON2, ADAM22, SRI* и *STEAP4*, като най-вероятни участници в по-бърза прогресия на заболяването и летален изход (подчертаните гени).

*MNX1* е ген кодиращ ядрен протеин, представляващ транскрипционен фактор. Мутациите в този ген водят до заболявания като синдром на Курарино (автозомно-доминантна вродена малформация) <sup>(234)</sup>. Освен това е наблюдаван в CD34+ клетки, В клетки и В лимфоидни тъкани <sup>(235)</sup>. Освен с това заболяване, изменения в гена се наблюдават и при Ходжкинов лимфом, остра миелоидна левкемия, тератом, менингоцеле, церебрален паралич, Болест на Hirschsprung и др. *MNX1* функционира в имунните клетки и досега няма данни да участва в ГБМ биология, но скорошни изследвания го идентифицират като транскрипционен фактор участващ в развитието както на солидни тумори, така и на хематологични малигнени заболявания <sup>(236)</sup>.

*CDK14* е една от серин/треонин протеин киназите, участващи в регулацията на еукариотния клетъчния цикъл, чиято дейност се контролира от свързващите се с нея циклини. Съществуват предположения, че *CDK14* има важна, независима роля за растежа на КРК тумори извън гастроинтестиналния тракт и метастазирането им. Въпреки че данните от сравнителните изследвания отчитат ролята на *CDK14* в раковите заболявания са много малко, има доклади за действието му като регулатор на клетъчния цикъл на Wnt-сигналния път по време на прехода между G2/M фазата чрез фосфорилиране на белтъка LRP6. Наблюдава се връзка между свръхекспресията на *CDK14* и активирането на му <sup>(237)</sup>, което предопределя химиотерапевтичната резистентност <sup>(238)</sup>, и увеличава възможността за метастазиране при хепатоцелуларния карцином <sup>(239)</sup>. Действа като регулатор на клетъчния цикъл и пролиферация чрез взаимодействието му с *CCDN3*. В *in vitro* изследвания води до фосфорилиране на RB1, но този резултат не е бил потвърден в *in vivo* системи. Предполага се, че играе и важна роля по време на мейозата, диференциацията на невроните и като индиректен отрицателен регулатор на инсулин-чувствителния глюкозен транспорт. Свързва се с развитието на плоскоклетъчен тип карциноми, злокачествени образувания в черния дроб, аутизъм и др.

*FSCN3* действа като белтък водещ до групирането на актина. Освен това фасцина има ключова роля в туморната инвазия и метастазиране <sup>(240)</sup>, което предполага, че развитието на фасцин-блокиращи агенти вероятно ще доведе до предотвратяване на туморното разпространение при малигнените тумори <sup>(241)</sup>. Поради високата честота на смъртност на раково болни вследствие на метастазирането, има спешна нужда от развитие на медикаменти намаляващи процеса метастазиране <sup>(242)</sup>. Някои карциноми с различен произход, засягащи различни органи, високите експресионни нива на фасцин се асоциират с увеличена инвазивност и ранна смърт <sup>(240)</sup>. Фасцинът освен това показва връзка и с тъканната инфилтрация с помощта на циркулиращите туморни клетки <sup>(243)</sup>. Подобна асоциация е открита и при малигнен ГБМ <sup>(244, 245)</sup>, който е склонен да се разпространява обширно из ЦНС. Ролята му е потвърдена чрез изследвания, в които потискане на неговата експресия намалява туморната инвазивност и/или метастатичния потенциал при КРК <sup>(246)</sup>, ГБМ <sup>(247)</sup>, стомашен карцином <sup>(243)</sup> и рак на гърдата <sup>(248)</sup>. Освен това вещества от семейството на миграстатин, които са потенциални инхибитори на туморната инвазия и метастазиран <sup>(249)</sup>, е в лабораторни условия се свързват към фасцина и потискат неговата активност при участието му в комплекс с актина <sup>(250)</sup>. Въпреки, че функцията им не е напълно изяснена, има данни за участието му в дендритно-клетъчната саркома, синдром на Денди-Уокър, аденокарциноми на панкреаса и ретината.

*PAX4* играе важна роля в диференциацията и развитието на бета клетките изграждащи панкреасните островчета. Този ген е член на семейството транскрипционни фактори, които играят критична роля по време на развитието на плода и развитието на рака. Той е транскрипционен репресор, свързващ се със сходен елемент намиращ се в глюкагоновия, инсулиновия и соматостатиновия промотори, и се конкурира с *PAX6* белтъка за една и също място на свързване в промоторната област. *PAX4* функционира, като потенциален туморен супресор при меланомните човешките клетки. А именно експресионните нива на *PAX4* са

понижени при меланомните клетки в сравнение с тези в невуаните клетки. Още повече, че иницирираната *PAX4* експресия потискат растежа на меланомни клетки, главно поради намаляване на синтезата на ДНК чрез спиране на клетъчния цикъл в G1 фазата <sup>(251)</sup>. Заболявания, които се свързват с този ген са меланомата, миелоидната левкемия и др. <sup>(251)</sup>

SND1 (staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1) един мултифункционален белтък, чиято увеличена експресия се наблюдава при карцином на гърдата, простатата, колоректален, хепатоцелуларен, саркома на Капоши и малигнен глиом. Молекулярните изследвания разкриха връзката между разнородните дейности на SND1, участващ в регулацията, както на транскрипционно, така и на пост-транскрипционно ниво.

Първоначалните изследвания определят SND1, като транскрипционен активатор, но SND1 е и компонент от RISC комплекса (RNA-induced silencing complex), който медира функционирането на РНК-ите, регулира РНК сплайсинга, поправката и стабилността, и играе важна роля в поддържането на клетъчната жизнеспособност. Тези разнообразни функции му позволяват да модифицира/ модулира сложен комплекс от молекулни мрежи, като по този начин иницирира канцерогенеза. Освен това неговата ключова роля за раковото развитие и прогресия го определят като потенциална терапевтична мишена <sup>(252)</sup>.

## 6. ИЗВОДИ

В резултат на изследването на генетичните и геномни промени в българската популация, представена от изследваните 199 пациента с малигнени глиоми могат да се направят следните изводи:

√ Пациентите с ранно начало на заболяването показват значимо по-дълга преживяемост в сравнение с групата с по-късно начало ( $p < 0,001$ ).

√ Наличието на KPS статус над 70 ( $p = 0,01$ ) и на тотална резекция са добри показатели за преживяемостта ( $p = 0,021$ ).

√ Установена беше значима асоциация на вторичните тумори с по-добрата преживяемост ( $p = 0,001$ ).

√ Честотата на мутациите в *IDH1* гена при пациенти с глиални тумори е 18,7%, която е по-ниска в сравнение с литературните данни поради обогатената с първични тумори извадка от пациенти.

√ За първи път беше открита хомозиготна мутация R132H в *IDH1*, определена като асоциирана с функционалната промяна на гена и непубликувана досега. В хомозиготно състояние беше открита нова мутация и в *IDH2* гена, засягаща кодон 129 – с.386A>G, която води до замяна на Lys с Arg.

√ Пациентите с *IDH1/2* мутации се характеризират с по-добра преживяемост дори и в групата с по-напреднала възраст на заболяемост ( $p < 0,001$ ).

√ Мутациите в *IDH1/2* бяха по-често наблюдавани при вторичните глиоми (26,7%), което определя и по-дългата им преживяемост.

√ В изследваната група пациенти бяха открити 9 неописвани досега в базите данни мутации в *TP53*.

√ Наличието на делецията на цялото дълго рамо на хромозома 1 ( $p = 0,03$ ) и късо рамо на хромозома 19 ( $p = 0,001$ ) бяха установени като добър прогностичен фактор в цялата група, за разлика от наличието на частичните загуби или липсата на такива.

√ Наличието едновременно на цялостни делеционни събития в 1p и 19q показва значима връзка с преживяемостта в цялата изследвана група ( $p = 0,005$ ).

√ Едновременното наличие на 1p19q коделеции е добър прогностичен и предиктивен фактор при пациенти с проведена терапия (лъче- и/или химиотерапия с TMZ) ( $p < 0,001$ ).

√ След стратифициране на групата според наличието или не на прилагана терапия (химио- и/или лъчетерапия) се наблюдава значително по-добра преживяемост ( $p < 0,001$ ) при туморите с метилиран промотор на *MGMT* и проведена терапия.

√ Увеличената експресия на *VEGF-A* и *SOX9*, и намалена *SOX8* експресия са независими прогностични фактори. Повишените нива на *VEGF-A* (HR=7.7934) и *SOX9* (HR=3.421) са лоши прогностични фактори, докато наличието на понижената експресия на *SOX8* (HR=0.590) е фактор асоцииращ се с по-дългата преживяемост.

√ Идентифицирани бяха най-честите райони показали значими изменения (намален или увеличен брой копия) в изследваната група от глиални тумори.

√ Отдиференцирани бяха специфичните хромозомни аберации показали асоциация с по-високата преживяемост при пациенти с нормален *IDH1/IDH2* гени.

√ Открити бяха специфичните хромозомни аберации показали асоциация с по-ниската преживяемост при пациенти с мутация в *IDH1/IDH2* гени.

√ Подбрани бяха кандидат гени в тези райони, според молекулните им функции, засягащи развитието, функционирането и регулацията на нервната система, както и свързани с канцерогенезата, за бъдещо проучване на потенциални биомаркери с прогностична стойност.

## 7. ПРИНОСИ

В резултат на изследването на генетичните и геномни промени в българската популация и направените изводи могат да се формулират следните приноси:

### 7.1. Научно-теоретични приноси

- ✓ В гена *IDH1* за първи път беше открита мутация в хомозиготно състояние при пациенти с глиални тумори;
- ✓ В гена *IDH2* беше открита нова мутация в хомозиготно състояние, непубликувана в литературата досега;
- ✓ Чрез сравнителна геномна хибридизация бяха установени най-честите хромозомни аберации при глиални тумори в български пациенти
- ✓ Идентифицирани бяха специфични геномни аберации при подгрупи пациенти с висока и ниска преживяемост в групите пациенти с и без *IDH1/IDH2* мутации;

### 7.2. Научно-приложни приноси

- ✓ За първи път в България беше определена честотата на мутации в гените TP53, IDH1 и IDH2 при български пациенти с глиални тумор и потвърдена ролята на мутации в IDH1/IDH2 като добър прогностичен фактор, независимо от възрастта. Поправи ме ако не ти харесва така
- ✓ Чрез анализ на експресионните нива на гените VEGFA и SOX9 беше установена ролята на увеличената им експресия като независим негативен прогностичен фактор;
- ✓ Бяха изследвани експресионните нива на SOX8 и беше установена ролята на намалената му експресия като добър прогностичен фактор;

### 7.3. Приноси с потвърдителен характер

- ✓ За първи път в България беше проведен анализ за 1p19q коделеционни събития и беше потвърдена ролята им като независим предиктивен фактор при пациенти с глиоми и проведена терапия (лъче- и/или химиотерапия с TMZ);
- ✓ Беше изследван приноса на MGMT промоторното хиперметиране при български пациенти и беше потвърдена ролята му като независим предиктивен фактор при пациенти с проведена терапия (лъче- и/или химиотерапия с TMZ);

### 7.4. Методични приноси

- ✓ За първи път в България беше въведен метода на сравнителна геномна хибридизация за изследване на ДНК от глиални туморни тъкани;
- ✓ Въведен беше метода на лазерна микродисекция за разделяне на туморни от нормални клетки в свежи туморни тъкани;

## БИБЛИОГРАФИЯ

1. Zhang Y, Wei H, Wang M, Huai L, Mi Y, Lin D, et al. Some novel features of IDH1-mutated acute myeloid leukemia revealed in Chinese patients. *Leuk Res.* 2011 Oct;35(10):1301-6.
2. Gupta R, Flanagan S, Li CC, Lee M, Shivalingham B, Maleki S, et al. Expanding the spectrum of IDH1 mutations in gliomas. *Mod Pathol.* 2013 May;26(5):619-25.
3. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009 Feb 19;360(8):765-73.
4. Prensner JR, Chinnaiyan AM. Metabolism unhinged: IDH mutations in cancer. *Nat Med.* Mar;17(3):291-3.
5. McLendon RE, Herndon JE, 2nd, West B, Reardon D, Wiltshire R, Rasheed BK, et al. Survival analysis of presumptive prognostic markers among oligodendrogliomas. *Cancer.* 2005 Oct 15;104(8):1693-9.
6. Christensen BC, Smith AA, Zheng S, Koestler DC, Houseman EA, Marsit CJ, et al. DNA methylation, isocitrate dehydrogenase mutation, and survival in glioma. *J Natl Cancer Inst.* 2011 Jan 19;103(2):143-53.
7. Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol.* 1999 Jan;1(1):44-51.
8. Pignatti F, van den Bent M, Curran D, Debruyne C, Sylvester R, Therasse P, et al. Prognostic factors for survival in adult patients with cerebral low-grade glioma. *J Clin Oncol.* 2002 Apr 15;20(8):2076-84.
9. Lamborn KR, Chang SM, Prados MD. Prognostic factors for survival of patients with glioblastoma: recursive partitioning analysis. *Neuro Oncol.* 2004 Jul;6(3):227-35.
10. Helseth R, Helseth E, Johannesen TB, Langberg CW, Lote K, Ronning P, et al. Overall survival, prognostic factors, and repeated surgery in a consecutive series of 516 patients with glioblastoma multiforme. *Acta Neurol Scand.* 2010 Sep;122(3):159-67.
11. Packer RJ, Schiff D, editors. *Neuro-oncology: John Wiley & Sons Ltd; 2012.*
12. Stark AM, Stepper W, Mehdorn HM. Outcome evaluation in glioblastoma patients using different ranking scores: KPS, GOS, mRS and MRC. *Eur J Cancer Care (Engl).* 2010 Jan 1;19(1):39-44.
13. Buccheri G, Ferrigno D, Giordano MC. Weekly chemotherapy with cisplatin and paclitaxel in advanced NSCLC: a phase II study. *Monaldi Arch Chest Dis.* 2006 Jun;65(2):75-81.
14. Krex D, Klink B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, et al. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain.* 2007 Oct;130(Pt 10):2596-606.
15. Mackworth N, Fobair P, Prados MD. Quality of life self-reports from 200 brain tumor patients: comparisons with Karnofsky performance scores. *J Neurooncol.* 1992 Nov;14(3):243-53.
16. Nimsy C, Ganslandt O, Buchfelder M, Fahlbusch R. Intraoperative visualization for resection of gliomas: the role of functional neuronavigation and intraoperative 1.5 T MRI. *Neurol Res.* 2006 Jul;28(5):482-7.
17. Muragaki Y, Iseki H, Maruyama T, Kawamata T, Yamane F, Nakamura R, et al. Usefulness of intraoperative magnetic resonance imaging for glioma surgery. *Acta Neurochir Suppl.* 2006;98:67-75.
18. Mehdorn HM, Schwartz F, Dawirs S, Hedderich J, Dorner L, Nabavi A. High-field iMRI in glioblastoma surgery: improvement of resection radicality and survival for the patient? *Acta Neurochir Suppl.* 2011;109:103-6.
19. Oszwald A, Guresir E, Setzer M, Vatter H, Senft C, Seifert V, et al. Glioblastoma therapy in the elderly and the importance of the extent of resection regardless of age. *J Neurosurg.* 2012 Feb;116(2):357-64.
20. Stummer W, Reulen HJ, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn JC, et al. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery.* 2008 Mar;62(3):564-76; discussion -76.
21. Kuhnt D, Becker A, Ganslandt O, Bauer M, Buchfelder M, Nimsy C. Correlation of the extent of tumor volume resection and patient survival in surgery of glioblastoma multiforme with high-field intraoperative MRI guidance. *Neuro Oncol.* 2011 Dec;13(12):1339-48.
22. Chaichana KL, Jusue-Torres I, Navarro-Ramirez R, Raza SM, Pascual-Gallego M, Ibrahim A, et al. Establishing percent resection and residual volume thresholds affecting survival and recurrence for patients with newly diagnosed intracranial glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2014 Jan;16(1):113-22.
23. Sanai N, Polley MY, McDermott MW, Parsa AT, Berger MS. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. *J Neurosurg.* 2011 Jul;115(1):3-8.
24. Eyupoglu IY, Buchfelder M, Savaskan NE. Surgical resection of malignant gliomas-role in optimizing patient outcome. *Nat Rev Neurol.* 2013 Mar;9(3):141-51.
25. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol.* 2008 Dec;116(6):597-602.
26. Dang L, Jin S, Su SM. IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. *Trends Mol Med.* [Review]. 2010 Sep;16(9):387-97.
27. Ichimura K, Pearson DM, Kocialkowski S, Backlund LM, Chan R, Jones DT, et al. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Aug;11(4):341-7.
28. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idhah A, Laffaire J, Ducray F, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Sep 1;27(25):4150-4.
29. van den Bent MJ, Dubbink HJ, Marie Y, Brandes AA, Taphoorn MJ, Wesseling P, et al. IDH1 and IDH2 mutations are prognostic but not predictive for outcome in anaplastic oligodendroglial tumors: a report of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group. *Clin Cancer Res.* Mar 1;16(5):1597-604.
30. von Deimling A, Korshunov A, Hartmann C. The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusions and IDH1 mutations. *Brain Pathol.* 2011 Jan;21(1):74-87.

31. Tommasino M, Accardi R, Caldeira S, Dong W, Malanchi I, Smet A, et al. The role of TP53 in Cervical carcinogenesis. *Hum Mutat*. 2003 Mar;21(3):307-12.
32. Whibley C, Pharoah PD, Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer*. 2009 Feb;9(2):95-107.
33. Ara S, Lee PS, Hansen MF, Saya H. Codon 72 polymorphism of the TP53 gene. *Nucleic Acids Res*. 1990 Aug 25;18(16):4961.
34. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC, 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet*. 2003 Mar;33(3):357-65.
35. El Hallani S, Ducray F, Idbaih A, Marie Y, Boisselier B, Colin C, et al. TP53 codon 72 polymorphism is associated with age at onset of glioblastoma. *Neurology*. 2009 Jan 27;72(4):332-6.
36. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000 Nov 16;408(6810):307-10.
37. Rasheed BK, McLendon RE, Herndon JE, Friedman HS, Friedman AH, Bigner DD, et al. Alterations of the TP53 gene in human gliomas. *Cancer Res*. 1994 Mar 1;54(5):1324-30.
38. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*. 2007 May;170(5):1445-53.
39. Tabatabai G, Stupp R, van den Bent MJ, Hegi ME, Tonn JC, Wick W, et al. Molecular diagnostics of gliomas: the clinical perspective. *Acta neuropathologica*. [Review]. 2010 Nov;120(5):585-92.
40. Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, et al. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. *Science*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Apr 10;324(5924):261-5.
41. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2009 Dec 10;462(7274):739-44.
42. Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell*. [Research Support, N.I.H., Extramural]. 2010 Mar 16;17(3):225-34.
43. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O, et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*. 2012 Mar 22;483(7390):474-8.
44. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell*. 2010 May 18;17(5):510-22.
45. Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, et al. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature*. 2012 Mar 22;483(7390):479-83.
46. Jin G, Reitman ZJ, Spasojevic I, Batinic-Haberle I, Yang J, Schmidt-Kittler O, et al. 2-hydroxyglutarate production, but not dominant negative function, is conferred by glioma-derived NADP-dependent isocitrate dehydrogenase mutations. *PLoS One*. 2011;6(2):e16812.
47. Murugan AK, Bojdani E, Xing M. Identification and functional characterization of isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutations in thyroid cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Mar 12;393(3):555-9.
48. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta neuropathologica*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Oct;118(4):469-74.
49. Dubbink HJ, Taal W, van Marion R, Kros JM, van Heuvel I, Bromberg JE, et al. IDH1 mutations in low-grade astrocytomas predict survival but not response to temozolomide. *Neurology*. [Clinical Trial Multicenter Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Nov 24;73(21):1792-5.
50. Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J, et al. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Dec 1;27(34):5743-50.
51. Yan H, Bigner DD, Velculescu V, Parsons DW. Mutant metabolic enzymes are at the origin of gliomas. *Cancer Res*. 2009 Dec 15;69(24):9157-9.
52. Sonoda Y, Kumabe T, Nakamura T, Saito R, Kanamori M, Yamashita Y, et al. Analysis of IDH1 and IDH2 mutations in Japanese glioma patients. *Cancer Sci*. 2009 Oct;100(10):1996-8.
53. Takano S, Kato Y, Yamamoto T, Kaneko MK, Ishikawa E, Tsujimoto Y, et al. Immunohistochemical detection of IDH1 mutation, p53, and internexin as prognostic factors of glial tumors. *J Neurooncol*. 2012 Jul;108(3):361-73.
54. Bleeker FE, Atai NA, Lamba S, Jonker A, Rijkeboer D, Bosch KS, et al. The prognostic IDH1( R132 ) mutation is associated with reduced NADP+-dependent IDH activity in glioblastoma. *Acta neuropathologica*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Apr;119(4):487-94.
55. Tysnes BB, Mahesparan R. Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets. *J Neurooncol*. 2001 Jun;53(2):129-47.
56. Hemerly JP, Bastos AU, Cerutti JM. Identification of several novel non-p.R132 IDH1 variants in thyroid carcinomas. *Eur J Endocrinol*. 2010 Nov;163(5):747-55.
57. Wagner K, Damm F, Gohring G, Gorlich K, Heuser M, Schafer I, et al. Impact of IDH1 R132 mutations and an IDH1 single nucleotide polymorphism in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: SNP rs11554137 is an adverse prognostic factor. *J Clin Oncol*. 2010 May 10;28(14):2356-64.
58. Wang XW, Boisselier B, Rossetto M, Marie Y, Idbaih A, Mokhtari K, et al. Prognostic impact of the isocitrate dehydrogenase 1 single-nucleotide polymorphism rs11554137 in malignant gliomas. *Cancer*. 2013 Feb 15;119(4):806-13.
59. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer science*. [Review]. 2009 Dec;100(12):2235-41.
60. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008 Sep 26;321(5897):1807-12.

61. Hartmann C, Hentschel B, Wick W, Capper D, Felsberg J, Simon M, et al. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol*. 2010 Dec;120(6):707-18.
62. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Oct 7;90(19):1473-9.
63. Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res*. 2006 Oct 15;66(20):9852-61.
64. Cairncross G, Berkey B, Shaw E, Jenkins R, Scheithauer B, Brachman D, et al. Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J Clin Oncol*. 2006 Jun 20;24(18):2707-14.
65. van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, Sanson M, Taphoorn MJ, Bernsen HJ, et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *J Clin Oncol*. 2006 Jun 20;24(18):2715-22.
66. Giannini C, Burger PC, Berkey BA, Cairncross JG, Jenkins RB, Mehta M, et al. Anaplastic oligodendroglial tumors: refining the correlation among histopathology, 1p 19q deletion and clinical outcome in Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *Brain Pathol*. 2008 Jul;18(3):360-9.
67. Scheie D, Cvancarova M, Mork S, Skullerud K, Andresen PA, Benestad I, et al. Can morphology predict 1p/19q loss in oligodendroglial tumours? *Histopathology*. 2008 Nov;53(5):578-87.
68. Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins VP. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol*. 1994 Nov;145(5):1175-90.
69. von Deimling A, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Wiestler OD, Seizinger BR. Evidence for a tumor suppressor gene on chromosome 19q associated with human astrocytomas, oligodendrogliomas, and mixed gliomas. *Cancer Res*. 1992 Aug 1;52(15):4277-9.
70. Smith JS, Perry A, Borell TJ, Lee HK, O'Fallon J, Hosek SM, et al. Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *J Clin Oncol*. 2000 Feb;18(3):636-45.
71. Jeuken JW, Wesseling P. MAPK pathway activation through BRAF gene fusion in pilocytic astrocytomas; a novel oncogenic fusion gene with diagnostic, prognostic, and therapeutic potential. *J Pathol*. 2010 Dec;222(4):324-8.
72. Kraus JA, Koopmann J, Kaskel P, Maintz D, Brandner S, Schramm J, et al. Shared allelic losses on chromosomes 1p and 19q suggest a common origin of oligodendroglioma and oligoastrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1995 Jan;54(1):91-5.
73. Louis DN, Gusella JF. A tiger behind many doors: multiple genetic pathways to malignant glioma. *Trends Genet*. 1995 Oct;11(10):412-5.
74. Wang Y, Li S, Chen L, You G, Bao Z, Yan W, et al. Glioblastoma with an oligodendroglioma component: distinct clinical behavior, genetic alterations, and outcome. *Neuro Oncol*. 2012 Apr;14(4):518-25.
75. Marko NF, Weil RJ. The molecular biology of WHO grade II gliomas. *Neurosurg Focus*. 2013 Feb;34(2):E1.
76. Bello MJ, de Campos JM, Vaquero J, Ruiz-Barnes P, Kusak ME, Sarasa JL, et al. hRAD54 gene and 1p high-resolution deletion-mapping analyses in oligodendrogliomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000 Jan 15;116(2):142-7.
77. Alonso ME, Bello MJ, Gonzalez-Gomez P, Lomas J, Arjona D, de Campos JM, et al. Mutation analysis of the p73 gene in nonastrocytic brain tumours. *Br J Cancer*. 2001 Jul 20;85(2):204-8.
78. Alonso ME, Bello MJ, Arjona D, Gonzalez-Gomez P, Aminosos C, Lopez-Marin I, et al. Mutational study of the 1p located genes p18ink4c, Patched-2, RIZ1 and KIF1B in oligodendrogliomas. *Oncol Rep*. 2005 Mar;13(3):539-42.
79. Jansen M, Yip S, Louis DN. Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers. *Lancet Neurol*. 2010 Jul;9(7):717-26.
80. Ragnarsson G, Eiriksdottir G, Johannsdottir JT, Jonasson JG, Egilsson V, Ingvarsson S. Loss of heterozygosity at chromosome 1p in different solid human tumours: association with survival. *Br J Cancer*. 1999 Mar;79(9-10):1468-74.
81. Utada Y, Emi M, Yoshimoto M, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G, et al. Allelic loss at 1p34-36 predicts poor prognosis in node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2000 Aug;6(8):3193-8.
82. Kambara T, Sharp GB, Nagasaka T, Takeda M, Sasamoto H, Nakagawa H, et al. Allelic loss of a common microsatellite marker MYCL1: a useful prognostic factor of poor outcomes in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2004 Mar 1;10(5):1758-63.
83. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*. 1997 Aug 22;90(4):809-19.
84. Mai M, Huang H, Reed C, Qian C, Smith JS, Alderete B, et al. Genomic organization and mutation analysis of p73 in oligodendrogliomas with chromosome 1 p-arm deletions. *Genomics*. 1998 Aug 1;51(3):359-63.
85. Seizinger BR, Klinger HP, Junien C, Nakamura Y, Le Beau M, Cavenee W, et al. Report of the committee on chromosome and gene loss in human neoplasia. *Cytogenet Cell Genet* 1991;58:17.
86. Tews B, Felsberg J, Hartmann C, Kunitz A, Hahn M, Toedt G, et al. Identification of novel oligodendroglioma-associated candidate tumor suppressor genes in 1p36 and 19q13 using microarray-based expression profiling. *Int J Cancer*. 2006 Aug 15;119(4):792-800.
87. Peters N, Smith JS, Tachibana I, Lee HK, Pohl U, Portier BP, et al. The human glia maturation factor-gamma gene: genomic structure and mutation analysis in gliomas with chromosome 19q loss. *Neurogenetics*. 1999 Sep;2(3):163-6.
88. Bettgowda C, Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, Wood LD, Hruban RH, et al. Mutations in CIC and FUBP1 contribute to human oligodendroglioma. *Science*. 2011 Sep 9;333(6048):1453-5.
89. Sahm F, Koelsche C, Meyer J, Pusch S, Lindenberg K, Mueller W, et al. CIC and FUBP1 mutations in oligodendrogliomas, oligoastrocytomas and astrocytomas. *Acta Neuropathol*. 2012 Jun;123(6):853-60.
90. Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, Rasheed AB, Heaphy CM, de Wilde RF, et al. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget*. 2012 Jul;3(7):709-22.

91. Olar A, Aldape KD. Biomarkers classification and therapeutic decision-making for malignant gliomas. *Curr Treat Options Oncol.* 2012 Dec;13(4):417-36.
92. Riemenschneider MJ, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta neuropathologica.* [Review]. 2010 Nov;120(5):567-84.
93. Ducray F, Idbaih A, de Reynies A, Bieche I, Thillet J, Mokhtari K, et al. Anaplastic oligodendrogliomas with 1p19q codeletion have a proneural gene expression profile. *Mol Cancer.* 2008;7:41.
94. Kaloshi G, Benouaich-Amiel A, Diakite F, Taillibert S, Lejeune J, Laigle-Donadey F, et al. Temozolomide for low-grade gliomas: predictive impact of 1p/19q loss on response and outcome. *Neurology.* 2007 May 22;68(21):1831-6.
95. Weller M, Berger H, Hartmann C, Schramm J, Westphal M, Simon M, et al. Combined 1p/19q loss in oligodendroglial tumors: predictive or prognostic biomarker? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Dec 1;13(23):6933-7.
96. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):997-1003.
97. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med.* 2000 Nov 9;343(19):1350-4.
98. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res.* 1999 Feb 15;59(4):793-7.
99. Esteller M, Herman JG. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene.* 2004 Jan 8;23(1):1-8.
100. Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, van den Bent MJ, Wick W, et al. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol.* 2010 Jan;6(1):39-51.
101. Wick W, Platten M, Weller M. New (alternative) temozolomide regimens for the treatment of glioma. *Neuro Oncol.* 2009 Feb;11(1):69-79.
102. Zawlik I, Vaccarella S, Kita D, Mittelbronn M, Franceschi S, Ohgaki H. Promoter methylation and polymorphisms of the MGMT gene in glioblastomas: a population-based study. *Neuroepidemiology.* 2009;32(1):21-9.
103. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, Benevento F, Scopece L, Mazzocchi V, et al. Temozolomide concomitant and adjuvant to radiotherapy in elderly patients with glioblastoma: correlation with MGMT promoter methylation status. *Cancer.* 2009 Aug 1;115(15):3512-8.
104. Martinez R, Schackert G, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, Herman JG, Esteller M. Frequent hypermethylation of the DNA repair gene MGMT in long-term survivors of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 2007 May;83(1):91-3.
105. Everhard S, Kaloshi G, Criniere E, Benouaich-Amiel A, Lejeune J, Marie Y, et al. MGMT methylation: a marker of response to temozolomide in low-grade gliomas. *Ann Neurol.* 2006 Dec;60(6):740-3.
106. Gerstner ER, Yip S, Wang DL, Louis DN, Iafrate AJ, Batchelor TT. Mgmt methylation is a prognostic biomarker in elderly patients with newly diagnosed glioblastoma. *Neurology.* 2009 Nov 3;73(18):1509-10.
107. Hau P, Stupp R, Hegi ME. MGMT methylation status: the advent of stratified therapy in glioblastoma? *Dis Markers.* 2007;23(1-2):97-104.
108. Iafrate AJ, Louis DN. "MGMT for pt mgmt": is methylguanine-DNA methyltransferase testing ready for patient management? *J Mol Diagn.* 2008 Jul;10(4):308-10.
109. Rivera AL, Pelloski CE, Gilbert MR, Colman H, De La Cruz C, Sulman EP, et al. MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2010 Feb;12(2):116-21.
110. van den Bent MJ, Dubbink HJ, Sanson M, van der Lee-Haarloo CR, Hegi M, Jeuken JW, et al. MGMT promoter methylation is prognostic but not predictive for outcome to adjuvant PCV chemotherapy in anaplastic oligodendroglial tumors: a report from EORTC Brain Tumor Group Study 26951. *J Clin Oncol.* 2009 Dec 10;27(35):5881-6.
111. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, Bartolini S, Bacci A, Agati R, et al. O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase methylation status can change between first surgery for newly diagnosed glioblastoma and second surgery for recurrence: clinical implications. *Neuro Oncol.* 2010 Mar;12(3):283-8.
112. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, Blatt V, Pession A, Tallini G, et al. MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients. *J Clin Oncol.* 2008 May 1;26(13):2192-7.
113. Levy AP. Hypoxic regulation of VEGF mRNA stability by RNA-binding proteins. *Trends Cardiovasc Med.* 1998 Aug;8(6):246-50.
114. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2004 May;3(5):391-400.
115. Bruns AF, Bao L, Walker JH, Ponnambalam S. VEGF-A-stimulated signalling in endothelial cells via a dual receptor tyrosine kinase system is dependent on co-ordinated trafficking and proteolysis. *Biochem Soc Trans.* 2009 Dec;37(Pt 6):1193-7.
116. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 2006 Sep 30;39(5):469-78.
117. Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem.* 1997 Sep 19;272(38):23659-67.
118. Jo J, Schiff D, Purow B. Angiogenic inhibition in high-grade gliomas: past, present and future. *Expert Rev Neurother.* 2012 Jun;12(6):733-47.
119. Linkous AG, Yazlovitskaya EM. Angiogenesis in glioblastoma multiforme: navigating the maze. *Anticancer Agents Med Chem.* 2011 Oct;11(8):712-8.
120. Robles Irizarry L, Hambardzumyan D, Nakano I, Gladson CL, Ahluwalia MS. Therapeutic targeting of VEGF in the treatment of glioblastoma. *Expert Opin Ther Targets.* 2012 Oct;16(10):973-84.

121. Hu YL, DeLay M, Jahangiri A, Molinaro AM, Rose SD, Carbonell WS, et al. Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma. *Cancer Res.* 2012 Apr 1;72(7):1773-83.
122. Bikfalvi A, Moenner M, Javerzat S, North S, Hagedorn M. Inhibition of angiogenesis and the angiogenesis/invasion shift. *Biochem Soc Trans.* 2011 Dec;39(6):1560-4.
123. Keunen O, Johansson M, Oudin A, Sanzey M, Rahim SA, Fack F, et al. Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 1;108(9):3749-54.
124. Norden AD, Drappatz J, Wen PY. Antiangiogenic therapies for high-grade glioma. *Nat Rev Neurol.* 2009 Nov;5(11):610-20.
125. Chamberlain MC. Antiangiogenic blockage: a new treatment for glioblastoma. *Expert Opin Biol Ther.* 2008 Oct;8(10):1449-53.
126. Heddleston JM, Wu Q, Rivera M, Minhas S, Lathia JD, Sloan AE, et al. Hypoxia-induced mixed-lineage leukemia 1 regulates glioma stem cell tumorigenic potential. *Cell Death Differ.* 2012 Mar;19(3):428-39.
127. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* 1996 Sep;16(9):4604-13.
128. Onesto C, Berra E, Grepin R, Pages G. Poly(A)-binding protein-interacting protein 2, a strong regulator of vascular endothelial growth factor mRNA. *J Biol Chem.* 2004 Aug 13;279(33):34217-26.
129. Oehring RD, Miletic M, Valter MM, Pietsch T, Neumann J, Fimmers R, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytic gliomas--a prognostic factor? *J Neurooncol.* 1999;45(2):117-25.
130. Brat DJ, Van Meir EG. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab Invest.* 2004 Apr;84(4):397-405.
131. Yoo H, Sohn S, Nam BH, Min HS, Jung E, Shin SH, et al. The expressions of carbonic anhydrase 9 and vascular endothelial growth factor in astrocytic tumors predict a poor prognosis. *Int J Mol Med.* 2010 Jul;26(1):3-9.
132. Dong C, Wilhelm D, Koopman P. Sox genes and cancer. *Cytogenet Genome Res.* 2004;105(2-4):442-7.
133. Otsubo T, Akiyama Y, Yanagihara K, Yuasa Y. SOX2 is frequently downregulated in gastric cancers and inhibits cell growth through cell-cycle arrest and apoptosis. *Br J Cancer.* 2008 Feb 26;98(4):824-31.
134. Sun M, Uozaki H, Hino R, Kunita A, Shinozaki A, Ushiku T, et al. SOX9 expression and its methylation status in gastric cancer. *Virchows Arch.* 2012 Mar;460(3):271-9.
135. Burgos-Ojeda D, Rueda BR, Buckanovich RJ. Ovarian cancer stem cell markers: prognostic and therapeutic implications. *Cancer Lett.* 2012 Sep 1;322(1):1-7.
136. Chen Y, Shi L, Zhang L, Li R, Liang J, Yu W, et al. The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *J Biol Chem.* 2008 Jun 27;283(26):17969-78.
137. Acloque H, Ocana OH, Matheu A, Rizzoti K, Wise C, Lovell-Badge R, et al. Reciprocal repression between Sox3 and snail transcription factors defines embryonic territories at gastrulation. *Dev Cell.* 2011 Sep 13;21(3):546-58.
138. Passeron T, Valencia JC, Namiki T, Vieira WD, Passeron H, Miyamura Y, et al. Upregulation of SOX9 inhibits the growth of human and mouse melanomas and restores their sensitivity to retinoic acid. *J Clin Invest.* 2009 Apr;119(4):954-63.
139. Zhong WD, Qin GQ, Dai QS, Han ZD, Chen SM, Ling XH, et al. SOXs in human prostate cancer: implication as progression and prognosis factors. *BMC Cancer.* 2012;12:248.
140. Sinner D, Kordich JJ, Spence JR, Opoka R, Rankin S, Lin SC, et al. Sox17 and Sox4 differentially regulate beta-catenin/T-cell factor activity and proliferation of colon carcinoma cells. *Mol Cell Biol.* 2007 Nov;27(22):7802-15.
141. Chen QL, Zheng WL, Yao WJ, Nie LW, Cheng SH, Ma WL. Analysis of SOX4 gene mutation in non-small cell lung cancer tissues. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2007 Oct;24(5):505-9.
142. Yin D, Jia Y, Yu Y, Brock MV, Herman JG, Han C, et al. SOX17 methylation inhibits its antagonism of Wnt signaling pathway in lung cancer. *Discov Med.* 2012 Jul;14(74):33-40.
143. Chen JS, Su IJ, Leu YW, Young KC, Sun HS. Expression of T-cell lymphoma invasion and metastasis 2 (TIAM2) promotes proliferation and invasion of liver cancer. *Int J Cancer.* 2012 Mar 15;130(6):1302-13.
144. Li X, Wang J, Xu Z, Ahmad A, Li E, Wang Y, et al. Expression of sox2 and oct4 and their clinical significance in human non-small-cell lung cancer. *Int J Mol Sci.* 2012;13(6):7663-75.
145. Rudin CM, Durinck S, Stawiski EW, Poirier JT, Modrusan Z, Shames DS, et al. Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer. *Nat Genet.* 2012 Oct;44(10):1111-6.
146. Xiang R, Liao D, Cheng T, Zhou H, Shi Q, Chuang TS, et al. Downregulation of transcription factor SOX2 in cancer stem cells suppresses growth and metastasis of lung cancer. *Br J Cancer.* 2011 Apr 26;104(9):1410-7.
147. Cox JL, Wilder PJ, Desler M, Rizzino A. Elevating SOX2 levels deleteriously affects the growth of medulloblastoma and glioblastoma cells. *PLoS One.* 2012;7(8):e44087.
148. Swartling FJ, Savov V, Persson AI, Chen J, Hackett CS, Northcott PA, et al. Distinct neural stem cell populations give rise to disparate brain tumors in response to N-MYC. *Cancer Cell.* 2012 May 15;21(5):601-13.
149. Ueda R, Iizuka Y, Yoshida K, Kawase T, Kawakami Y, Toda M. Identification of a human glioma antigen, SOX6, recognized by patients' sera. *Oncogene.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2004 Feb 19;23(7):1420-7.
150. Kreth S, Heyn J, Grau S, Kretschmar HA, Egensperger R, Kreth FW. Identification of valid endogenous control genes for determining gene expression in human glioma. *Neuro Oncol.* 2010 Jun;12(6):570-9.
151. Schlierf B, Friedrich RP, Roerig P, Felsberg J, Reifenberger G, Wegner M. Expression of SoxE and SoxD genes in human gliomas. *Neuropathology and applied neurobiology.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Dec;33(6):621-30.
152. Ferletta M. The Role of Sox Transcription Factors in Brain Tumorigenesis. In: Garami MR, editor. *Molecular Targets of CNS Tumors: InTech*; 2011. p. 99-124.
153. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008 Oct 23;455(7216):1061-8.
154. Zhu Y, Li Y, Jun Wei JW, Liu X. The role of sox genes in lung morphogenesis and cancer. *Int J Mol Sci.* 2012;13(12):15767-83.

155. Alonso MM, Diez-Valle R, Manterola L, Rubio A, Liu D, Cortes-Santiago N, et al. Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. *PLoS one*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011;6(11):e26740.
156. Stoltz K, Sinyuk M, Hale JS, Wu Q, Otvos B, Walker K, et al. Development of a Sox2 reporter system modeling cellular heterogeneity in glioma. *Neuro Oncol*. 2014 Nov 21.
157. Berezovsky AD, Poisson LM, Cherba D, Webb CP, Transou AD, Lemke NW, et al. Sox2 promotes malignancy in glioblastoma by regulating plasticity and astrocytic differentiation. *Neoplasia*. 2014 Mar;16(3):193-206, e19-25.
158. Ma YH, Mentlein R, Knerlich F, Kruse ML, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades. *J Neurooncol*. 2008 Jan;86(1):31-45.
159. Phi JH, Park SH, Kim SK, Paek SH, Kim JH, Lee YJ, et al. Sox2 expression in brain tumors: a reflection of the neuroglial differentiation pathway. *Am J Surg Pathol*. 2008 Jan;32(1):103-12.
160. Wan F, Herold-Mende C, Campos B, Centner FS, Dictus C, Becker N, et al. Association of stem cell-related markers and survival in astrocytic gliomas. *Biomarkers*. 2011 Mar;16(2):136-43.
161. Xavier-Magalhaes A, Nandhabalan M, Jones C, Costa BM. Molecular prognostic factors in glioblastoma: state of the art and future challenges. *CNS Oncol*. 2013 Nov;2(6):495-510.
162. Annovazzi L, Mellai M, Caldera V, Valente G, Schiffer D. SOX2 expression and amplification in gliomas and glioma cell lines. *Cancer Genomics Proteomics*. 2011 May-Jun;8(3):139-47.
163. Galatro TF, Uno M, Oba-Shinjo SM, Almeida AN, Teixeira MJ, Rosemberg S, et al. Differential expression of ID4 and its association with TP53 mutation, SOX2, SOX4 and OCT-4 expression levels. *PLoS One*. 2013;8(4):e61605.
164. Shibahara I, Sonoda Y, Shoji T, Kanamori M, Saito R, Inoue T, et al. Malignant clinical features of anaplastic gliomas without IDH mutation. *Neuro Oncol*. 2015 Jan;17(1):136-44.
165. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):98-110.
166. Sun Y, Overvad K, Olsen J. Cancer risks in children with congenital malformations in the nervous and circulatory system-A population based cohort study. *Cancer Epidemiol*. 2014 Aug;38(4):393-400.
167. Iuchi T, Yokoi S, Ohira M, Kageyama H, Itami M, Hasegawa Y, et al., editors. Sox8 as a molecular marker of oligodendroglial tumors. *AACR 103rd Annual Meeting 2012; 2012 April 15, 2012; Chicago, IL: Cancer Res*.
168. Kordes U, Hagel C. Expression of SOX9 and SOX10 in central neuroepithelial tumor. *J Neurooncol*. 2006 Nov;80(2):151-5.
169. Aleman A, Adrien L, Lopez-Serra L, Cordon-Cardo C, Esteller M, Belbin TJ, et al. Identification of DNA hypermethylation of SOX9 in association with bladder cancer progression using CpG microarrays. *Br J Cancer*. 2008 Jan 29;98(2):466-73.
170. Jiang SS, Fang WT, Hou YH, Huang SF, Yen BL, Chang JL, et al. Upregulation of SOX9 in lung adenocarcinoma and its involvement in the regulation of cell growth and tumorigenicity. *Clin Cancer Res*. 2010 Sep 1;16(17):4363-73.
171. Guo X, Xiong L, Sun T, Peng R, Zou L, Zhu H, et al. Expression features of SOX9 associate with tumor progression and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Diagn Pathol*. 2012;7:44.
172. Matheu A, Collado M, Wise C, Manterola L, Cekaite L, Tye AJ, et al. Oncogenicity of the developmental transcription factor Sox9. *Cancer research*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Mar 1;72(5):1301-15.
173. Lu B, Fang Y, Xu J, Wang L, Xu F, Xu E, et al. Analysis of SOX9 expression in colorectal cancer. *Am J Clin Pathol*. 2008 Dec;130(6):897-904.
174. Wang L, He S, Yuan J, Mao X, Cao Y, Zong J, et al. Oncogenic role of SOX9 expression in human malignant glioma. *Med Oncol*. 2012 Dec;29(5):3484-90.
175. Stancheva G, Goranova T, Laleva M, Kamenova M, Mitkova A, Velinov N, et al. IDH1/IDH2 but not TP53 mutations predict prognosis in Bulgarian glioblastoma patients. *Biomed Res Int*. 2014;2014:654727.
176. Stolt CC, Schlierf A, Lommes P, Hillgartner S, Werner T, Kosian T, et al. SoxD proteins influence multiple stages of oligodendrocyte development and modulate SoxE protein function. *Developmental cell*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006 Nov;11(5):697-709.
177. Sarkar A, Hochedlinger K. The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell stem cell*. 2013 Jan 3;12(1):15-30.
178. de la Rocha AM, Sampron N, Alonso MM, Matheu A. Role of SOX family of transcription factors in central nervous system tumors. *Am J Cancer Res*. 2014;4(4):312-24.
179. Kormish JD, Sinner D, Zorn AM. Interactions between SOX factors and Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Dev Dyn*. 2010 Jan;239(1):56-68.
180. Liu X, Wang L, Zhao S, Ji X, Luo Y, Ling F. beta-Catenin overexpression in malignant glioma and its role in proliferation and apoptosis in glioblastoma cells. *Med Oncol*. 2011 Jun;28(2):608-14.
181. Mishra S. CSNK1A1 and Gli2 as Novel Targets Identified Through an Integrative Analysis of Gene Expression Data, Protein-Protein Interaction and Pathways Networks in Glioblastoma Tumors: Can These Two Be Antagonistic Proteins? *Cancer Inform*. 2014;13:93-108.
182. Wan Z, Shi W, Shao B, Shi J, Shen A, Ma Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist pioglitazone inhibits beta-catenin-mediated glioma cell growth and invasion. *Mol Cell Biochem*. 2011 Mar;349(1-2):1-10.
183. Gerhäuser C. Cancer cell metabolism, epigenetics and the potential influence of dietary components – A perspective *Biomedical Research*. 2012 01/2012; Volume 23(Issue 1 (Cancer Metabolism)):SI 69-89.
184. Yang H, Ye D, Guan KL, Xiong Y. IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: mechanistic insights and clinical perspectives. *Clin Cancer Res*. 2012 Oct 15;18(20):5562-71.
185. Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*. 2013 Oct 24;502(7472):472-9.

186. Zhao X, Zhang W, Wang L, Zhao WL. Genetic methylation and lymphoid malignancies: biomarkers of tumor progression and targeted therapy. *Biomark Res.* 2013;1(1):24.
187. Zhang S, Zhu C, Zhu L, Liu H, Liu S, Zhao N, et al. Oncogenicity of the transcription factor SOX8 in hepatocellular carcinoma. *Med Oncol.* 2014 Apr;31(4):918.
188. Cowell JK, Lo KC, Luce J, Hawthorn L. Interpreting aCGH-defined karyotypic changes in gliomas using copy number status, loss of heterozygosity and allelic ratios. *Exp Mol Pathol.* 2010 Feb;88(1):82-9.
189. Lo KC, Bailey D, Burkhardt T, Gardina P, Turpaz Y, Cowell JK. Comprehensive analysis of loss of heterozygosity events in glioblastoma using the 100K SNP mapping arrays and comparison with copy number abnormalities defined by BAC array comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer.* 2008 Mar;47(3):221-37.
190. Rossi MR, La Duca J, Matsui S, Nowak NJ, Hawthorn L, Cowell JK. Novel amplicons on the short arm of chromosome 7 identified using high resolution array CGH contain over expressed genes in addition to EGFR in glioblastoma multiforme. *Genes Chromosomes Cancer.* 2005 Dec;44(4):392-404.
191. Hatanpaa KJ, Burma S, Zhao D, Habib AA. Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia.* 2010 Sep;12(9):675-84.
192. Nagane M, Levitzki A, Gazit A, Cavenee WK, Huang HJ. Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 May 12;95(10):5724-9.
193. Snuderl M, Fazlollahi L, Le LP, Nitta M, Zhelyazkova BH, Davidson CJ, et al. Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer Cell.* 2011 Dec 13;20(6):810-7.
194. Voutsina A, Tzardi M, Kalikaki A, Zafeiriou Z, Papadimitraki E, Papadakis M, et al. Combined analysis of KRAS and PIK3CA mutations, MET and PTEN expression in primary tumors and corresponding metastases in colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2013 Feb;26(2):302-13.
195. Danilkovitch-Miagkova A, Zbar B. Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors. *J Clin Invest.* 2002 Apr;109(7):863-7.
196. Sierra JR, Tsao MS. c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2011 Nov;3(1 Suppl):S21-35.
197. Schulte EC, Stahl I, Czamara D, Ellwanger DC, Eck S, Graf E, et al. Rare variants in PLXNA4 and Parkinson's disease. *PLoS One.* 2013;8(11):e79145.
198. Jun G, Asai H, Zeldich E, Drapeau E, Chen C, Chung J, et al. PLXNA4 is associated with Alzheimer disease and modulates tau phosphorylation. *Ann Neurol.* 2014 Sep;76(3):379-92.
199. Balakrishnan A, Penachioni JY, Lamba S, Bleeker FE, Zanon C, Rodolfo M, et al. Molecular profiling of the "plexinome" in melanoma and pancreatic cancer. *Hum Mutat.* 2009 Aug;30(8):1167-74.
200. Christensen C, Ambartsumian N, Gilestro G, Thomsen B, Comoglio P, Tamagnone L, et al. Proteolytic processing converts the repelling signal Sema3E into an inducer of invasive growth and lung metastasis. *Cancer Res.* 2005 Jul 15;65(14):6167-77.
201. Basile JR, Castilho RM, Williams VP, Gutkind JS. Semaphorin 4D provides a link between axon guidance processes and tumor-induced angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jun 13;103(24):9017-22.
202. Catalano A, Caprari P, Moretti S, Faronato M, Tamagnone L, Procopio A. Semaphorin-3A is expressed by tumor cells and alters T-cell signal transduction and function. *Blood.* 2006 Apr 15;107(8):3321-9.
203. Giordano S, Corso S, Conrotto P, Artigiani S, Gilestro G, Barberis D, et al. The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met. *Nat Cell Biol.* 2002 Sep;4(9):720-4.
204. Toyofuku T, Zhang H, Kumanogoh A, Takegahara N, Suto F, Kamei J, et al. Dual roles of Sema6D in cardiac morphogenesis through region-specific association of its receptor, Plexin-A1, with off-track and vascular endothelial growth factor receptor type 2. *Genes Dev.* 2004 Feb 15;18(4):435-47.
205. Swiercz JM, Worzfeld T, Offermanns S. ErbB-2 and met reciprocally regulate cellular signaling via plexin-B1. *J Biol Chem.* 2008 Jan 25;283(4):1893-901.
206. Rieger J, Wick W, Weller M. Human malignant glioma cells express semaphorins and their receptors, neuropilins and plexins. *Glia.* 2003 Jun;42(4):379-89.
207. Rody A, Holtrich U, Gaetje R, Gehrman M, Engels K, von Minckwitz G, et al. Poor outcome in estrogen receptor-positive breast cancers predicted by loss of plexin B1. *Clin Cancer Res.* 2007 Feb 15;13(4):1115-22.
208. Wong OG, Nitkunan T, Oinuma I, Zhou C, Blanc V, Brown RS, et al. Plexin-B1 mutations in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Nov 27;104(48):19040-5.
209. Fischer U, Keller A, Leidinger P, Deutscher S, Heisel S, Urbschat S, et al. A different view on DNA amplifications indicates frequent, highly complex, and stable amplicons on 12q13-21 in glioma. *Mol Cancer Res.* 2008 Apr;6(4):576-84.
210. Fischer U, Leidinger P, Keller A, Folarin A, Ketter R, Graf N, et al. Amplicons on chromosome 12q13-21 in glioblastoma recurrences. *Int J Cancer.* 2010 Jun 1;126(11):2594-602.
211. Diesel B, Radermacher J, Bureik M, Bernhardt R, Seifert M, Reichrath J, et al. Vitamin D(3) metabolism in human glioblastoma multiforme: functionality of CYP27B1 splice variants, metabolism of calcidiol, and effect of calcitriol. *Clin Cancer Res.* 2005 Aug 1;11(15):5370-80.
212. Crespo I, Tao H, Nieto AB, Rebelo O, Domingues P, Vital AL, et al. Amplified and homozygously deleted genes in glioblastoma: impact on gene expression levels. *PLoS One.* 2012;7(9):e46088.
213. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 2004 Oct 1;64(19):6892-9.
214. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007 Aug;114(2):97-109.
215. Karajannis MA, Zagzag D, editors. *Molecular Pathology of Nervous System Tumors: Biological Stratification and Targeted Therapies.* New York: Springer; 2015 edition (November 21, 2014); 2015.
216. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* 1997 Mar 28;275(5308):1943-7.

217. Knobbe CB, Merlo A, Reifenberger G. Pten signaling in gliomas. *Neuro Oncol.* 2002 Jul;4(3):196-211.
218. Macoska JA, Xu J, Ziemnicka D, Schwab TS, Rubin MA, Kotula L. Loss of expression of human spectrin src homology domain binding protein 1 is associated with 10p loss in human prostatic adenocarcinoma. *Neoplasia.* 2001 Mar-Apr;3(2):99-104.
219. Kagawa N, Maruno M, Suzuki T, Hashiba T, Hashimoto N, Izumoto S, et al. Detection of genetic and chromosomal aberrations in medulloblastomas and primitive neuroectodermal tumors with DNA microarrays. *Brain Tumor Pathol.* 2006 Apr;23(1):41-7.
220. Halbwdel I, Ullmann R, Kremser ML, Man YG, Isadi-Moud N, Lax S, et al. Chromosomal alterations in low-grade endometrial stromal sarcoma and undifferentiated endometrial sarcoma as detected by comparative genomic hybridization. *Gynecol Oncol.* 2005 May;97(2):582-7.
221. Yang ZM, Han XP, Wu SF, Yin YF, Wang K, Gao J, et al. [Analysis of chromosomal abnormalities in pancreatic cancer by spectral karyotyping]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2010 Nov;39(11):767-71.
222. Ransom DT, Ritland SR, Moertel CA, Dahl RJ, O'Fallon JR, Scheithauer BW, et al. Correlation of cytogenetic analysis and loss of heterozygosity studies in human diffuse astrocytomas and mixed oligo-astrocytomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 1992 Nov;5(4):357-74.
223. Kimmelman AC, Ross DA, Liang BC. Loss of heterozygosity of chromosome 10p in human gliomas. *Genomics.* 1996 Jun 1;34(2):250-4.
224. Jeng YM, Hsu HC. KLF6, a putative tumor suppressor gene, is mutated in astrocytic gliomas. *Int J Cancer.* 2003 Jul 10;105(5):625-9.
225. Rich JN, Hans C, Jones B, Iversen ES, McLendon RE, Rasheed BK, et al. Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival. *Cancer Res.* 2005 May 15;65(10):4051-8.
226. Ermoian RP, Furniss CS, Lamborn KR, Basila D, Berger MS, Gottschalk AR, et al. Dysregulation of PTEN and protein kinase B is associated with glioma histology and patient survival. *Clin Cancer Res.* 2002 May;8(5):1100-6.
227. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrester WF, Soriano RH, Wu TD, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell.* 2006 Mar;9(3):157-73.
228. Mawrin C, Kirches E, Schneider-Stock R, Boltze C, Vorwerk CK, von Mawrin A, et al. Alterations of cell cycle regulators in gliomatosis cerebri. *J Neurooncol.* 2005 Apr;72(2):115-22.
229. Jones SN, Roe AE, Donehower LA, Bradley A. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature.* 1995 Nov 9;378(6553):206-8.
230. Serra-Pagez C, Medley QG, Tang M, Hart A, Streuli M. Liprins, a family of LAR transmembrane protein-tyrosine phosphatase-interacting proteins. *J Biol Chem.* 1998 Jun 19;273(25):15611-20.
231. Krijajevska M, Fischer-Larsen M, Moertz E, Vorm O, Tulchinsky E, Grigorian M, et al. Liprin beta 1, a member of the family of LAR transmembrane tyrosine phosphatase-interacting proteins, is a new target for the metastasis-associated protein S100A4 (Mts1). *J Biol Chem.* 2002 Feb 15;277(7):5229-35.
232. Kitao A, Sato Y, Sawada-Kitamura S, Harada K, Sasaki M, Morikawa H, et al. Endothelial to mesenchymal transition via transforming growth factor-beta1/Smad activation is associated with portal venous stenosis in idiopathic portal hypertension. *Am J Pathol.* 2009 Aug;175(2):616-26.
233. Zhao J, Liu T, Jin S, Wang X, Qu M, Uhlen P, et al. Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. *EMBO J.* 2011 Jul 20;30(14):2762-78.
234. Lynch SA, Bond PM, Copp AJ, Kirwan WO, Nour S, Balling R, et al. A gene for autosomal dominant sacral agenesis maps to the holoprosencephaly region at 7q36. *Nat Genet.* 1995 Sep;11(1):93-5.
235. Harrison KA, Druey KM, Deguchi Y, Tuscano JM, Kehrl JH. A novel human homeobox gene distantly related to proboscipedia is expressed in lymphoid and pancreatic tissues. *J Biol Chem.* 1994 Aug 5;269(31):19968-75.
236. Ferguson S, Gautrey HE, Strathdee G. The dual role of HLXB9 in leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2011 Mar;56(3):349-52.
237. Davidson G, Shen J, Huang YL, Su Y, Karaulanov E, Bartscherer K, et al. Cell cycle control of wnt receptor activation. *Dev Cell.* 2009 Dec;17(6):788-99.
238. Miyagaki H, Yamasaki M, Miyata H, Takahashi T, Kurokawa Y, Nakajima K, et al. Overexpression of PFTK1 predicts resistance to chemotherapy in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2012 Feb 28;106(5):947-54.
239. Pang EY, Bai AH, To KF, Sy SM, Wong NL, Lai PB, et al. Identification of PFTAIRE protein kinase 1, a novel cell division cycle-2 related gene, in the motile phenotype of hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology.* 2007 Aug;46(2):436-45.
240. Machesky LM, Li A. Fascin: Invasive filopodia promoting metastasis. *Commun Integr Biol.* 2010 May;3(3):263-70.
241. Hashimoto Y, Kim DJ, Adams JC. The roles of fascin in health and disease. *J Pathol.* 2011 Jul;224(3):289-300.
242. Sleeman J, Steeg PS. Cancer metastasis as a therapeutic target. *Eur J Cancer.* 2010 May;46(7):1177-80.
243. Kim SJ, Choi IJ, Cheong TC, Lee SJ, Lotan R, Park SH, et al. Galectin-3 increases gastric cancer cell motility by up-regulating fascin-1 expression. *Gastroenterology.* 2010 Mar;138(3):1035-45 e1-2.
244. Roma AA, Prayson RA. Fascin expression in 90 patients with glioblastoma multiforme. *Ann Diagn Pathol.* 2005 Dec;9(6):307-11.
245. Gunal A, Onguru O, Safali M, Beyzadeoglu M. Fascin expression [corrected] in glial tumors and its prognostic significance in glioblastomas. *Neuropathology.* 2008 Aug;28(4):382-6.
246. Hashimoto Y, Parsons M, Adams JC. Dual actin-bundling and protein kinase C-binding activities of fascin regulate carcinoma cell migration downstream of Rac and contribute to metastasis. *Mol Biol Cell.* 2007 Nov;18(11):4591-602.
247. Hwang JH, Smith CA, Salhia B, Rutka JT. The role of fascin in the migration and invasiveness of malignant glioma cells. *Neoplasia.* 2008 Feb;10(2):149-59.
248. Al-Alwan M, Olabi S, Ghebeh H, Barhoush E, Tulbah A, Al-Tweigeri T, et al. Fascin is a key regulator of breast cancer invasion that acts via the modification of metastasis-associated molecules. *PLoS One.* 2011;6(11):e27339.
249. Shan D, Chen L, Njardarson JT, Gaul C, Ma X, Danishefsky SJ, et al. Synthetic analogues of migrastatin that inhibit mammary tumor metastasis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Mar 8;102(10):3772-6.

250. Kraft R, Kahn A, Medina-Franco JL, Orlowski ML, Baynes C, Lopez-Vallejo F, et al. A cell-based fascin bioassay identifies compounds with potential anti-metastasis or cognition-enhancing functions. *Dis Model Mech*. 2013 Jan;6(1):217-35.
251. Hata S, Hamada J, Maeda K, Murai T, Tada M, Furukawa H, et al. PAX4 has the potential to function as a tumor suppressor in human melanoma. *Int J Oncol*. 2008 Nov;33(5):1065-71.
252. Jariwala N, Rajasekaran D, Srivastava J, Gredler R, Akiel MA, Robertson CL, et al. Role of the staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1 in oncogenesis (review). *Int J Oncol*. 2015 Feb;46(2):465-73.

## ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### *Публикации във връзка с дисертационния труд*

1. **G. Stancheva**, T. Goranova, M. Laleva, M. Kamenova, A. Mitkova, N. Velinov, R. Kaneva, G. Poptodorov, V. Mitev, N. Gabrovsky. *IDH1/IDH2*, but not *TP53* mutations predict prognosis in Bulgarian glioblastoma patients. *Research Article. Biomed Res Int.* 2014;2014:654727, doi: 10.1155/2014/654727, Epub 2014 Apr 24,

**IF 2013 (2.706), цитирания – 6**

2. **Г. Станчева**, Т. Горанова, А. Миткова, Р. Кънева, В. Митев. Биомаркери с прогностична и предиктивна стойност при малигнени глиални тумори. *Обзорна статия. Studia Oncologica*, брой 2, година VI, 2014.

3. **G. Stancheva**, T. Goranova, M. Laleva, M. Kamenova, A. Mitkova, N. Velinov, G. Poptodorov, V. Mitev, N. Gabrovsky, R. Kaneva. Expression of *SOX* genes as potential prognostic biomarkers in glial tumours. *Research Article. GENE*. Under review

**IF 2013 (2.082).**

### *Научни прояви във връзка с дисертационния труд:*

#### *Участия в български и международни научни конгреси и конференции*

1. **G. Stancheva**, T. Goranova, M. Laleva, M. Kamenova, A. Mitkova, N. Velinov, R. Kaneva, G. Poptodorov, V. Mitev, N. Gabrovsky. Gene expression of *SOX2*, *SOX6*, *SOX8* and *SOX9* and its prognostic role in patients with gliomas. Poster presentation. *The 23rd Meeting of European Association for Cancer Research, 5-8 July 2014*, Munich, Germany /*EJC Suppl.5, Vol 50 (2014): 698, S168/*

2. **G. Stancheva**, T. Goranova, M. Laleva, M. Kamenova, A. Mitkova, N. Velinov, R. Kaneva, G. Poptodorov, V. Mitev, N. Gabrovsky. Gene expression of *MMP9* and its prognostic role in patients with gliomas. Poster presentation. *The European Human Genetics Conference, 08-11 June 2014*, Milano, Italy France /*Eur J Hum Genet, 2014, Vol 22 (suppl 1): 479, J12,119/*

3. **Г. Станчева**, Т. Горанова, М. Лалева, М. Каменова, А. Миткова, Н. Велинов, Р. Кънева, Г. Поптодоров, В. Митев, Н. Габровски. Прогностично значение на соматични мутации в гените *IDH1* и *IDH2* при Български пациенти с мултиформен глиобластом. *XXII национална конференция по неврохирургия, 24-26 Октомври 2013*, Велинград, България

4. **G. Stancheva**, T. Goranova, M. Laleva, M. Kamenova, A. Mitkova, N. Velinov, R. Kaneva, G. Poptodorov, V. Mitev, N. Gabrovsky. Prognostic Significance of Somatic Mutations in *Idh1* and *Trp53* Genes in Bulgarian Patients with Glioblastoma Multiforme Abstract. *15th World Congress of Neurosurgery & World Federation of Neurosurgical Societies, 8-13 September 2013, Seoul, Korea.* /Abstract No. FA1231/

5. **G. Stancheva**, T. Goranova, M. Laleva, M. Kamenova, A. Mitkova, N. Velinov, R. Kaneva, G. Poptodorov, V. Mitev, N. Gabrovsky. Prognostic significance of *IDH1* mutations and *1p/19q* co-deletion I patients with glial tumours. Poster presentation. *The European Human Genetics Conference, 08-11 June 2013*, Paris, France /*Eur J Hum Genet, 2012, Vol 21 (suppl 2): 281, P11,068/*

6. **G. Stancheva**, T. Goranova, M. Laleva, M. Kamenova, A. Mitkova, N. Velinov, R. Kaneva, G. Poptodorov, V. Mitev, N. Gabrovsky. Molecular biomarkers with predictive value in glioma patients Poster presentation. *The 10th Meeting of European Association of Neurooncology, 06-09 September 2012*, Marseille, France /*Neuro-Oncology September 2012, Vol.14 (suppl 3): P124/*

7. **G. Stancheva**, T. Goranova, M. Laleva, M. Kamenova, A. Mitkova, N. Velinov, R. Kaneva, G. Poptodorov, V. Mitev, N. Gabrovsky. A novel missense mutation in *IDH2* gene of a glioma patient. *The European Human Genetics Conference, 22-26 June 2012*, Nuremberg, Germany. /*Eur J Hum Genet, 2012, 20 (suppl 1): 166, P06,48/*

8. Stefano Pierini, Teodora Goranova, **Gergana Stancheva**, Maria Laleva, Margarita Kamenova, Atanaska Mitkova, Nikolay Velinov, Radka Kaneva, George Poptodorov, Vanio Mitev, Nikolay Gabrovsky. *MGMT* promoter hypermethylation is a frequent event in glioma patients but has no

- prognostic value. *The European Human Genetics Conference, 22-26 June 2012, Nuremberg, Germany.* /Eur J Hum Genet, 2012, 20 (suppl 1): 186, P06,144/
- 9.** N. Gabrovsky, **G. Stancheva**, T. Goranova, M. Laleva, M. Kamenova, A. Mitkova, N. Velinov, G. Poptodorov, V. Mitev, R. Kaneva. *IDH1 and IDH2 mutations – prevalence and prognostic significance in glial tumours.* *The 14-th European Congress of Neurosurgery, 9-14 October 2011, Rome, Italy.*/Nov 30, 1999; 9675/
- 10.** **G. Stancheva**, T. Goranova, M. Laleva, N. Velinov, R. Kaneva, G. Poptodorov, V. Mitev, St. Gabrovsky, P.Vanev, N. Gabrovsky. *Comparison of instruments for quality of life measurement in Bulgarian patients with malignant glial tumors.* *The 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress, 23-27 September 2011, Stockholm, Sweden.*/ European Journal of Cancer, Vol 47, Suppl. 3: 519, S123/
- 11.** T. Goranova, **G. Stancheva**, A. Mitkova, R. Kaneva, M. Kamenova, M. Laleva, N.Velinov, G. Poptodorov, V. Mitev, N. Gabrovsky. *MGMT promoter methylation in Bulgarian patients with glial tumors.* *The 4-th International Congress of Molecular Medicine, 27-30 June 2011, Istanbul, Turkey.* /In vivo 25: 526, 2011/
- 12.** **G. Stancheva**, T. Goranova, M. Laleva, M. Kamenova, A. Mitkova, N. Velinov, R. Kaneva, G. Poptodorov, V. Mitev, N. Gabrovsky. *IDH1, IDH2 and TP53 mutations in Bulgarian patients with glial tumours. Poster presentation.* *The European Human Genetics Conference 2011, 28-31 May 2011, Amsterdam, The Netherlands.* /Eur J Hum Genet, 2011, 19 (suppl 2): 198, P06,042/
- 13.** T. Goranova, **G. Stancheva**, A. Mitkova, R. Kaneva, G. Poptodorov, N. Velinov, V. Mitev, N. Gabrovsky. *Mutations in IDH1 and TP53 as prognostic biomarkers in Bulgarian patients with gliomas* *Poster presentation.* *The 9th Meeting of European Association of Neurooncology 16-19 September 2010, Maastricht, The Netherlands.* /NEURO ONCOL 2010 Sep; 12(Suppl 3): 33/
- 14.** T. Goranova, **G. Stancheva**, A. Mitkova, R. Kaneva, G. Poptodorov, N. Velinov, V. Mitev, N. Gabrovsky. *IDH1 and IDH2 mutations in Bulgarian patients with glial tumours* *Poster presentation.* *The 21st Meeting of European Association for Cancer Research 26-29 June 2010, Oslo, Norway.* /EJC Supplements 8, No. 5 (2010): 224-225/
- 15.** **G. Stancheva**, T. Goranova, S. Jordanov, A. Mitkova, I. Chalakov, G. Poptodorov, R. Kaneva, V. Mitev, N. Gabrovsky, K. Kunev. *Promoter hypermethylation in Bulgarian patients with glial and laryngeal cancer* *Poster presentation.* *The 21st Meeting of European Association for Cancer Research 26-29 June 2010, Oslo, Norway.* /EJC Supplements 8, No. 5 (2010) 220/

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

*Авторът на този труд би искал да благодари на своя научен ръководител Чл.кор.проф. д-р Ваньо Митев, на научните си консултанти доц. Радка Кънева и д-р Теодора Горанова, както и на всички колеги от Центъра по Молекулна Медицина, които през цялото време освен колеги бяха и истински учители.*

*Специални благодарности към д-р Теодора Горанова, д.б., без чиято експертна, колегиална и приятелска подкрепа осъществяването на настоящия дисертационен труд не би бил възможен.*

*Благодарности към екипа на проф. д-р Н. Габровски от клиниката по Неврохирургия към УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов“, които помогнаха за събирането на необходимата група пациенти, прецизното хирургично отстраняване на туморните тъкани и тяхното качествено съхраняване, както и за осигурената детайлна информация за пациентите, за да придобие това проучване цялостен вид.*

*Благодарности към доц. д-р М.Каменова и екипа ѝ от клиника по "Клинична патология, консервиране на тъкани и съдебна медицина", УМБАЛСМ „Н. И. Пирогов“, които помогнаха за събирането, поставянето на коректна хистологичната диагноза на избраната група пациенти, извърши и анализира имунохистологичните изследвания, чието качество и яснота биха привлекли вниманието на всеки професионалист в тази област по света.*

*Благодарности към моето семейството и всички близки хора за дългогодишната подкрепа и разбиране!*

## SUMMARY

Brain tumours, in particular gliomas, are characterized by high mortality rate. However, gliomas with similar features often show different behaviour. In the recent years many comprehensive studies were focused on genomic characteristics of gliomas. This led to the discovery of a variety of genes that were not associated with glial carcinogenesis before. This raises the issue about molecular markers for prognosis prediction. During the implementation of the PhD thesis unique for the country biobank of biological materials (tissue, DNA, RNA, cDNA) of patients with glial tumours has been created in the Molecular Medicine Center, Medical University of Sofia and University Hospital “Pirogov”. The importance of valuable prognostic factors associated with survival such as the histological diagnosis and the age of onset of the disorder have been evaluated. The Karnofsky scale (KRS) to measure the patient’s quality of life is easy to implement instrument that has to be an obligatory element in the continued monitoring of the disorder’s progress.

During the investigation of the mutational status of the *IDH1*, *IDH2*, *TP53* genes in patients with glial tumours and their relevance as prognostic factors, it has been found that *IDH1/IDH2* mutations, age of onset under 56, KRS status above 70 and the type of the tumour (primary/ secondary) have better prognostic values. The age and *IDH1/IDH2* mutations are independent prognostic factors. While age is a predictor of worse survival (HR=1.045), the presence of *IDH1/IDH2* mutations is associated with longer survival (HR=0.201).

Combined losses of 1p/19q are likely to be a frequent aberration in Bulgarian patients with gliomas and are found in approximately 80% of oligodendrogliomas and oligoastrocytomas. These aberrations are associated with favourable prognosis, improved overall survival (p=0.005) and therapy sensitivity (radio- and/or chemotherapy, p<0.001) in whole investigated group even though they are rarer in astrocytic tumours. The relation between the *MGMT* promotor hypermethylation, the functioning of the Mismatch-Repair System (MMR) and the therapeutic response, and survival has been also investigated. The promotor hypermethylation, analysed with methyl-specific high resolution melting curve analysis (MS-HRM), did not show correlation with survival in the investigated patients. In the tumours with methylated *MGMT* promotor, however, significantly better survival rate following chemo- and radiotherapy has been observed (p<0.001). No significant correlations between *IDH1* mutations and *MGMT* methylation, as well as between microsatellite instability (MSI) and factors such as survival, *MGMT* promotor hypermethylation and chemotherapy have been found.

Gene expression analysis of 14 genes has been performed. (*CAIX*, *EGFR*, *FLT-1*, *HIF1A*, *HIF2A*, *HIF3A*, *KDR*, *MMP9*, *SOX2*, *SOX6*, *SOX8*, *SOX9*, *TGF-b2* и *VEGFA*). The Cox regression analysis differentiated the lower *FLT-1*, *HIF2a* and *SOX8* expression as factors with good prognostic value, while the increased expression of the genes *HIF1a*, *CAIX*, *TGF-b2*, *VEGF-A*, *SOX9* and *MMP9* as negative prognostic factors. The increased *VEGF-A* (p=0.031) and *SOX9* (p=0.001), and the reduced *SOX8* (p=0.010) expression are independent prognostic factors, as the increased *VEGF-A* (HR=7.7934) and *SOX9* (HR=3.421) gene expression is associated with short, while the reduced expression of *SOX8* with longer survival (HR=2.590).

The implementation of comparative genome hybridisation in glial tumours led to the identification of multiple chromosome aberrations and genes, involved in processes related to differentiation, functioning and regulation of the nervous system, as well as in the cancerogenesis. Genes have been found that have not been related to glial cancerogenesis before and are probably associated with more aggressive behaviour and resistance to therapy of the tumours from a given histological subtype