

## **Dr. Tímár József Professzor Úr bírálatában szereplő kérdésekre adott válaszok**

***(Klekner Álmos: „Asztrocitómák invazivitásának szerepe a személyre szabott onkoterápiában” című MTA doktori munka vonatkozásában)***

Szeretném megköszönni Dr. Tímár József Professzor Úr opponensi véleményét, konstruktív bírálatát és jogos kritikai észrevételeit. Megjegyzéseire és kérdéseire azoknak megfelelő sorrendben válaszaim a következők:

*Bíráló: „A leggyakoribb agydaganatok a gliális tumorok. Ha szó szerint vesszük, a disszertáció címe a tartalmat nem fedi, mert az asztrocitómák csak egy részét képezik a daganatok spektrumának, amit a jelölt elemzett.”*

Válasz: Kutatásaink fő célkitűzése az asztrocitómák igen szerény kezelési eredményei mögött álló jellegzetesen kiterjedt peritumorális infiltráció közelebbi megismerése volt. Ehhez az asztrocitómák invazív tulajdonságait más daganatokéhoz képest vizsgálva próbáltunk közelebb jutni. Ezért szerepel többféle daganat a kutatásainkban, de a cél és a lényeg az asztrocitómák egyéb daganatoktól jelentősen eltérő invazivitásának a feltérképezése volt.

*Bíráló: „Másrésről, a gliális daganatok invazivitása kiterjedten vizsgált, de molekuláris szinten egyáltalán nem lezárt kérdés, aminek megértése alapvető jelentőségű. Ha ezen összefüggések tisztázódnának, akkor lehet majd biomarkerekké vagy prognosztikus markerekké konvertálni ezeket, amit majd fel lehet(ne) használni az ilyen betegek személyre szabott terápiájának kidolgozására.”*

Válasz: Ezzel a megjegyzéssel alapvetően, elméleti síkon egyetérték, hiszen minden releváns molekuláris összefüggés tisztázása lenne az ideális feltétele a klinikai szintre való továbblépésnek. Meglátásom szerint azonban egy olyan komplex kutatási területen, mint a peritumorális invázió, a teljes molekuláris háttér minden részletre kiterjedő megismerése nagyon elodázná a részeredményekben rejlő potenciális lehetőségek hasznosítását. A nemzetközi gyakorlatban a gliómák inváziójának már nem csak a vizsgálatát, hanem a célterápiás kezelését is megkezdték, a paninhibitor integrin-gátló cilengitide humán tanulmányokban való (klinikai kipróbálás fázisában történő) tesztelésével. Ez számunkra egyértelműen inspiratív volt, hiszen olyan irányban, olyan úton indultunk el, amin már mások is nem csak, hogy jártak, de már a gyakorlati megoldást keresik. Más kérdés, hogy az eddigi inváziógátló szerek mennyire bizonyultak effektívnek, de az számunkra világos volt, hogy ez a kutatási terület és célkitűzés számos más kutatót is aktívan foglalkoztat, így nem vagyunk egyedül a témában (1-3).

*Bíráló: „A 4.célkitűzés az EGFR és integrin (melyik) expresszió prediktív szerepének elemzése GBM-ben (vagy ahogy máshol jelzi asztrocitómában) érdekes kutatási kérdés,*

*amit nem lehet megválaszolni az EGFR gént érintő genetikai eltérések feltérképezése nélkül.”*

Válasz: A 4. célkitűzésben az integrin beta-1 expresszióját és ERB1-el történő heteroasszociációját vizsgáltuk. Egyetérttek a bírálónak azzal a megjegyzésével, hogy az EGFR gén eltéréseinek teljes genetikai feltérképezése a kutatásunkat jól kiegészítette volna, de a mi vizsgálatainkban nem magát az Erb receptorokat (azok génjeinek amplifikációját, mutációját, stb.), hanem a már sejtfelszínen expresszáldott ErbB1 és egy másik transzmembrán receptor (az integrin beta-1) kolonizációját vizsgáltuk. Mivel az integrin receptorokról ismert, hogy a peritumorális invázióban nélkülözhetetlen szerepet játszanak, így annak felismerése, hogy az EGFR rajtuk keresztül játszik szerepet az invázióban, sőt, prognosztikai szerepkör társítható e két receptor heteroasszociációjához, új eredménynek számít. Elfogadva azt a nézetet, miszerint a fehérjeszintű változások közvetlenebbül tükrözik egy szövet biológiai tulajdonságait, mint az esetleg nem manifestálódó genetikai eltérések, úgy vélem, hogy ebben az esetben az ErbB1 vizsgálatának eredményei a genetikai háttér ismerete nélkül is értelmezhetők.

*Bíráló: „...az 1p/19q ko-deléciós molekuláris markerek prognosztikus és prediktív szerepének elemzése hazai oligoasztrocitómás és oligodendrogliómás beteganyagban, egy, a napi rutin diagnosztikában standardként használt eljárás tankönyvi adatait igazolta vissza.”*

Válasz: Az 1p19q kodelécio szerepének nemzetközi leírása már valóban korábban megtörtént, de hazai megerősítéséről még hasonló vizsgálat nem született. Klinikai betegadat-feldolgozásainkban ezért is fogalmaztunk úgy, hogy megerősítettük hazai beteganyagon is a nemzetközi tapasztalatokat, és ezekhez kiegészítő összefüggéseket is feltártunk, melyeket - ezzel megegyező fejezetcím alatt, és nem az új eredmények között - így foglaltam össze:

- Grade III oligoasztrocitómákban és oligodendrogliómákban a kor előrehaladtával csökken az 1p19q kodeléciós esetek aránya, valamint
- ebben a betegpopulációban 1p19q kodelécio esetében a teljes tumoreltávolítás a recidivamentes túlélést egyértelműen meghosszabbította. Ez azt jelenti, hogy egy infiltratív intracerebrális tumorból történt esetleges biopsziával igazolt anaplasztikus oligodendroglióma esetében kimutatott 1p19q kodelécio pozitivitás a műtéti tumoreltávolítás forszírozása mellett szól.

*Bíráló: „Az EGFR génhibáinak elemzése GBM-ben kollaborációs munka volt, amelyben a jelölt társszerző volt a publikációkban. Az igazi újdonság ezen vizsgálatokban a negatív eredmény volt, vagyis hogy az EGFR TK szakaszát érintő mutációk nem fordulnak elő GBM-ben. Az asztrocitómák EGFR-b1 integrin expressziójának és heteroasszociációjának prognosztikus szerepére vonatkozó vizsgálatok is nagy sokszerzős kollaborációkban történtek, ahol a jelölt meghatározó szerepe nem volt egyértelmű, bár ez a munkája lett a disszertáció legjobb publikációja (D1). A megfigyelés, hogy az EGFR és b1 integrin*

*együttes expressziója és heteroasszociációja a növekvő malignizálódással fokozódik, igen érdekes megfigyelés.”*

Válasz: Az EGFR amplifikáció a GBM jellemzője, olyannyira, hogy több szerző szerint is ez differenciáldiagnosztikai jelentőségű eltérés más grádusú asztrocitómákkal szemben (4-6). Az EGFR migrációra gyakorolt stimuláló hatását is már korábban leírták, ill. az EGFR-integrin kapcsolata is ismert megfigyelés (7). Jelen kutatásunk során az EGFR-integrin heteroasszociáció vizsgálata a korábbi kutatási eredményeinkre épült, és az invazivitás molekuláris szereplőinek továbbkutatásáról és az EGFR-rel való kapcsolatának vizsgálatáról szól. Az EGFR, mint transzmembrán receptor kutatása a Debreceni Egyetemem Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetének egyik fő profiljába tartozik, és a cikkben senior kutatóként szereplő Vereb György Professzor Úr ezen a területen komoly szaktekintélynek számít. Glioblasztómás betegek vizsgálatát már a szóban forgó cikket megelőzően legalább 6-8 évvel elkezdtük, és közös munkánk eredményeképpen egy PhD dolgozat is született. Ennek a munkának egyik legfontosabb publikációja volt az ERBB1-integrin B1 kapcsolatát vizsgáló közlemény, amelyet az idegsebészeti előzetes kutatások alapján kezdeményeztünk, idegsebészeti mintákon történtek és a betegek teljes kezelési kórtörténetének és túlélési paramétereinek feldolgozásával zajlott. Mivel a költségigényes vizsgálómódszerek a Biofizikai Intézetben zajlottak, ami nekünk anyagi kiadásba egyáltalán nem került, illetve az eredmények igen munkaigényes kiértékelése is ott zajlott, az ottani laborvezető lett az utolsó szerző, és mivel a PhD hallgatónak a védéshez szüksége volt az első szerzős közleményre, ő lett a befektetett munkája után az első szerző. Számomra az, hogy az Idegsebészeti Klinikán folyó invazivitás kutatásába be tudtam vonni egy világszínvonalú labort, számunkra teljesen költségmentesen elvégezték a vizsgálatokat, nem kevés időt szántak a kiértékelésre, bőven megérte azt az árat, hogy a megszületett publikációban csak társszerzőként szerepelek. Az eredmény szerencsére új megfigyeléseket hozott, és rávilágított arra az eddig nem tisztázott jelenségre, miszerint az EGFR-nek az integrinokkal való kapcsolata prognosztikai jelentőségű összefüggést jelent.

*Bíráló: „Felmerül a kérdés (az-EGFR-integrin kutatással kapcsolatban), hogy a fokozott protein expresszió mögött nem-GBM asztrocitómákban az EGFR génnek valamilyen hibája (CNV vagy ECD-deléció) kimutatható-e a GBM-hez hasonlóan?”*

Válasz: A szóban forgó kutatás során magát az EGFR gént nem vizsgáltuk, mutáció-analízis nem történt, így ebből a szempontból a különböző grádusú asztrocitóma-csoportokat nem elemeztük.

*Bíráló: „GBM-TMZ kezelésének farmakovigilanciájára vonatkozó vizsgálat igazi originális kutatás, amely egy kémiai természetű munkából és egy valódi in vivo kezelése során GBM betegek szérum és tumor elemzésén alapul. A jelölt új kapilláris elektroforézis-alapú eljárást dolgozott ki a TMZ és metabolitjainak az MTIC- és AIC-nek érzékeny kvantitatív kimutatására. A módszerrel a TMZ féléletideje vízben és szérumban nagyon*

*hasonló szobahőn (appr. 30 perc). Miután a TMZ DNS-t károsító aktív metabolitja a metilhidrazin, felmerül a kérdés, hogy az új módszer alkalmas-e ennek a kimutatására is?”*  
Válasz: A temozolomide aktív metabolitja a metil-triazén-imidazol-karboxamid (MTIC), ami tovább bomlik amino-imidazol-karboxamiddra (AIC). Mivel a DNS-t károsító aktív metabolit a kialakulásával egyidőben tovább is bomlik, ezért a koncentrációja igen alacsony szinten marad (gyakorlatilag a TMZ maximális koncentrációjának kevesebb, mint 1/40-ed része), így ennek kimutatása igen nagy kihívás az analitikai kémia számára. Ennek ellenére sikerült az MTIC szérumbeli koncentrációját a kapilláris elektroforézis módszerével detektálni, viszont a tumorszövetben elért MTIC szint meghatározására még nem tettünk kísérletet, így erről beszámolni nem tudok, de tekintettel arra, hogy az intraparenchymális TMZ koncentráció csak töredéke a szérumbeli koncentrációnak (0,12 µg/g vs. 14,2 µg/ml), ennek kivitelezése erősen bizonytalannak tekinthető.

*Bíráló: „A módszert 2 GBM-es TMZ kezelt beteg esetében is alkalmazta a TMZ szérum-koncentrációjának meghatározására, ami az irodalmi adatokat mutatta. Egy GBM-es beteg esetében normál agyszövetből és különböző tumorterületekről vett mintában is meghatározta a TMZ koncentrációt. A bíráló számára meglepő módon több tumor-részletben is ugyanolyan szintű volt a TMZ, mint a normál agyszövetben. Több helyen is olvasható, hogy a tumorban detektálták a TMZ-t. Lehet azt tudni, hogy a minták tartalmaztak-e necrosist, bevérzést, illetve a tumorstroma milyen mértékű lehetett ezekben? (kisebb vagy nagyobb a TMZ az ilyen területeken). Hasonlóképpen kérdés az, hogy a normál glia/fehérjeállomány és a tumor között van-e különbség a TMZ koncentrációban? Szemben a várakozással, a kémiai munkában utolsó szerző a jelölt és a klinikai anyagon történt vizsgálatban csak társszerző.”*

Válasz: A TMZ koncentráció a tumormintákban 0,06 – 0,09 – 0,12 µg/g, míg a nem-tumoros agyszövetben 0,05 µg/g (55. o. 9. táblázat), ami azt jelenti, hogy az intratumorális TMZ koncentráció 2-2,5-ször nagyobb, mint a peritumorális fehérállományban detektált gyógyszer szint. Ez az eredmény arra utal, hogy a TMZ átjut a vér-agy-gáton, sőt a tumorban magasabb koncentrációt ér el, mint a nem-tumoros agyállományban. A tumormintákból természetesen metszet is készült, ami a nekrozist és bevérzést kizárta.

A TMZ-ről szóló publikációkban a szerzőséget szintén a ráfordított anyagi forrás, műszerhasználat, mérőmódszer-kalibráció és a PhD-szabályzatból származó szükségszerűség és nem egy laborba bekéredzkedő költségvállalás nélküli kollaborációt kérő klinikus egyéni igénye szabta meg. Meglátásom szerint egyébként az első cikkben nincs új analitikai módszer-kidolgozás, viszont van klinikai relevancia (a konkuráló kemoirradiációs kezelési fázisban a TMZ orális adagolásának időzítésére tett javaslat révén), míg a tumorszövetben történő gyógyszer szint-meghatározás új analitikai módszer kifejlesztését is jelentette. A szerzőségek meghatározásánál tehát számomra az is szempont volt, hogy neuro-onkológiai gyakorlati, klinikai szempontból melyik cikk jelentősebb, a kémikus kollaborátorok számára pedig természetesen az analitikai problémamegoldás és újdonság volt hangsúlyosabb. Tudományos együttműködések esetén véleményem szerint

ez egy jól működő és méltányos szerzői sorrend-elosztás, és örülni fogok, ha hasonlóan jó kapcsolatot fogok tudni más kutatólaborokkal is a jövőben kiépíteni és fenntartani.

*Bíráló: „A disszertáció döntő része, amely a jelölt saját kutatásait tartalmazza, az asztrocitómák invazivitását meghatározó ECM molekulákra vonatkozó vizsgálatok. Mint minden prekonceptió, annak minősége meghatározza, hogy milyen eredmények keletkezhetnek ezek elemzéséből. Az ún. ECM panel matrix fehérjék (laminin, fibronectin, tenascin), proteoglikánokat (pelekán, syndecan, versican, neurocan, neuroglycan, brevican), néhány MMP formát (-2, -8, -9) és kondroitinázokat és bizonyos hialuronsav szintázokat, valamint a HMMR/CD168 adhéziós molekulát tartalmazott. Fájdalmasan hiányoznak a kezdeti panelből a kondroitin szulfát és heparán szulfát bioszintézis kulcsenzimeit és a CD44 splice variánsai. Későbbi panelekbe a CD44 közös domén belekerült, de pl. egyéb szerint proteáz pl. (uPA) kimaradt. Ami még fájdalmasabb, hogy a daganatok áttétképzésében oly sokat elemzett heparanáz enzim is hiányzik, pedig az idegszöveti proteoglikánok között a HSPG-k mind ott vannak. Másrészt mára már ismert, hogy a proteáz aktivitás nem feltétlenül, sőt, sokkal gyakrabban a proteáz inhibitorok fokozott expressziója miatt növekszik, így a TIMP vagy a PAI jelenlétének ismerete nélkül nehéz értelmezni az expressziós eltéréseket. Ugyanakkor szerepel a panelben a Ki-67 sejtciklus marker és a GFAP gliális intermedier filamentum marker, egyik sem ECM komponens.”*

Válasz: Az invazivitásban résztvevő molekulák száma igen magas. Mivel az összeset nem tudjuk vizsgálni, kénytelenek vagyunk szűkíteni a célmolekulák körét. A végső panelt érintő kritikákat el kell fogadnom, az jellegéből adódóan sosem lesz tökéletes. Minden kutató, minden kollaborációs partnerünk más és más molekulákat hiányolt a listáról, és valószínűleg jogosan. Heparanase (HPSE), urokinase-type plasminogen (uPA) activator, PAI - Plasminogen activator inhibitor, TIMP – tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-nak valóban van szerepe GBM-ben is, ezek a célmolekulák a kutatásunk kezdetén, kb. 12 évvel ezelőtt számunkra még nem kerültek fókuszba. Az idevágó kritikát elfogadom, tanácsnak tekintem, és a jövőre nézve megfogadom. Az általunk kialakított panel egyébként úgy jött létre, hogy összegyűjtöttük az idevágó javaslatokat, és messze 100 feletti közleményből összeírtuk a releváns molekulák központi idegrendszeri tumorok invazivitásával kapcsolatos irodalmi adatait. A kutatómunkának ebben a kezdeti, és nem legkönnyebb fázisában nagy segítségemre volt, hogy akkor már évek óta dolgoztam együtt Módis László Professzor Úr szövettani laborjával (DE, Anatómiai Intézet), ahol az ECM kutatásából más témában (agyi aneurysmák érfalstruktúrája) első szerzős cikkem is született (8). Igazság szerint innen indult affinitásom az ECM iránt, és az akkori tapasztalataim, és az Anatómián a szövettani laborban tanultak, ill. Módis Professzor Úrral való számtalan konzultáció után alakult ki a gliómák vonatkozásában vizsgálandó molekulák köre. Mivel ez kb. 15 éve történt, ezért azóta újabb molekulák is a látótérbe kerülhettek, így az idevágó kritikát elfogadom, tanulok belőle és a panelünk kiegészítésére utaló javaslatokat elfogadom. Mindezek mellett szem előtt kellett tartanunk azt a célkitűzésünket, hogy a

kutatásaink eredményét úgy van esélyünk a klinikai alkalmazhatóság szintjére emelni, ha rutinszerű beteganyag-vizsgálatra aránylag egyszerű és olcsó vizsgálatot fogunk javasolni. Ez mindenképpen csökkenti a panelen szereplő molekulák számát. Jelenleg kb. 20 molekulánál tartunk, melyek mRNS expresszióját betegenként kb. 20.000 Ft-ból tudjuk meghatározni. Ez az összeg még talán elfogadható teher a jelenlegi diagnosztikus kiadások között.

Végül még egy megjegyzés arra vonatkozóan, hogy a KI-67 és a GFAP annak ellenére szerepel a panelben, hogy egyik sem ECM komponens. Igen, ez így van, ezeknek a molekuláknak a szerepeltetését azért találtuk célravezetőnek, mert általuk igazolható egyrészt a tumor gliális eredete, másrészt az aktív, proliferáló tumorsejtek jelenléte, azaz a Ki-67 markáns elkülönülése a normál agyszövet és a tumor között, illetve magas expressziója a tumorban igazolja a tumorszövetet és pl. kizárja a nekrozist is, így egyfajta minőségi kontrollként is szolgál.

*Bíráló: „Ezen panel felhasználásával elsőként GBM és tüdő adenocarcinoma-áttét expressziós mintázatát hasonlította egymáshoz, illetve a környező agyszövethez. Nem érthető a koncepció, amely azt feltételezi, hogy a lokális invázió (GBM esetén) hasonló ECM komponensek részvételével történik, mint az ún. metasztatikus bölcső kialakulása (tüdőrákban). A GBM-ben változó ECM fehérjék közül RNS szinten a panel fele szignifikánsan eltérő expressziót mutat, azonban ezek egy része az 50% alá csökkenés vagy 2x növekedési határérték közelében változott csak. A matrix proteinek közül a FN, perlekán és syndecan-1/2 fokozódása igen jelentős, hasonlóan az MMP2/9-hez. Nehezen értelmezhető ugyanakkor a Tenascin-C és -R, illetve a HAS 1-2-3 egymással homlokegyenest ellentétes változásai. A magam részéről a GBM-ADCmet összehasonlítást szakmailag erősen vitathatónak tartom. A metasztázis ECM expressziós profilja meglepő módon nagyban hasonlít a GBM-hez, ha a normál agyhoz viszonyított (FN, perlekán, syndecan-1, CD168, MMP2/9 fokozódás) és itt is megfigyelhető a tenascin C/R és a HAS 1-3 ellentétes mozgása. Ezen jelenségre értelmes magyarázat az lehet, hogy mindkét daganatban az agy gliaszövege adja a stromát döntően.... Mindezek értelmezése csak a fehérje expressziók elemzésével lehetséges, amihez már csak egy igen limitált panelt használt fagyasztott metszeteken IFC-vel. Ez lehetőséget adott volna azonban arra, hogy a GBM lokális invazivitását vagy a metasztázis lokális invazivitását is elemezték volna, amire utaló adatot nem láttam az elemzésben. A morfológiai elemzés megmondhatná az is, hogy daganatsejt vagy stroma eredetű markerrel állunk szemben. A 11. és 12. ábra hasonló elemzést tartalmaz, bár az ECM fehérjék nem átfedőek nagyon és a 11. ábra a GBM/met összehasonlítás, amire már fentebb utaltam.”*

Válasz: Az asztrocitómák és az intracerebrális áttéti daganatok ECM profiljának invázió szempontjából való összehasonlítása feltételezésünk szerint segít megérteni a két, anaplasztikus daganat jelentősen eltérő invazivitásának okát. Nem feltételezzük, hogy a két különböző daganat esetében a lokális invázió hasonló ECM-komponensek részvételével történik. Sőt, azt gondoljuk, hogy a két különböző tumor ECM struktúrája és összetétele

jelentősen különbözni fog, és ezt a különbséget igyekeztünk meghatározni. Ehhez a vizsgálatához négy külön vizsgálat során 23-96 molekulából álló panel RNS-expresszióját határoztuk meg. Azt, hogy számos, fentebb részletezett molekula expresziója nagyfokú hasonlóságot mutatott a GBM és MET vonatkozásában, mi úgy értékeltük, hogy ez a hasonlóság a tumorra jellemző általános tulajdonságot tükrözi (méretbeni növekedés, sejtproliferáció, expanszió, stb.). A markáns különbséget mutató molekulák pedig a daganat szövettani különbözőségével függenek össze (9/23 molekula, 60. o., 11. táblázat, ill. 11/30 molekula, 62. o., 12. táblázat).

Az RNS-szinten detektált eredmények fehérjeszintű verifikálása a gyakorlatban nem egyszerű laborfeladat. Nincs PCR-hoz hasonló amplifikáló módszer, a kis mennyiségű protein kimutatása már önmagában siker, mennyiségi analízise pedig nem is mindig megvalósítható. Proteinek specifikus kimutatására az IHC alkalmas ugyan, de csak szemikvantitatív meghatározást nyerünk vele (a digitális optikai denzitometria sem elég objektív, saját tapasztalat). Western-blottal lehet ugyan kvantitatív elemzést végezni, de egy mintából csak egy fehérje biztonságos meghatározása végezhető el. Ez azt jelenti, hogy minden egyes protein kvantitatív meghatározásához feláldozunk egy kis darab tumormintát. Ezt egy panel vizsgálata során nem tudjuk megvalósítani, 20-30 tumormintát nem tudunk feláldozni kizárólag protein-meghatározás céljából. Hasonló a helyzet az IHC-val is. 20-30 antitestet megrendelni, lemetszeni, megfesteni, kiértékelni nem csak roppant költség- és időigényes, de amint fentebb említettem, max. szemikvantitatív eredményt hoz. Ez a magyarázata annak, hogy redukált molekulaszámon végeztük el a fehérje-elemzést az RNS-expressziók meghatározásánál alkalmazott panelen szereplő molekulák számához képest. El kell azt is mondanom, hogy nagyon komoly erőfeszítéseket tettünk Western-blot vizsgálatokra, de sajnos a fagyasztott tumormintákból nem sikerül megfelelő minőségű eredményekre jutni, így ezzel fel is hagytunk. Emellett szeretném kiemelni, hogy a fő célkitűzés a rutinszerűen, alacsony költséggel elvégezhető vizsgálat, mely minél kisebb emberi erőforrást igényel és ezáltal a szubjektivitástól is mentes. Ezért nem erőltettük a morfológiai elemzést, viszont a célnak a PCR és a proteomika tökéletesen megfelelt.

*Bíráló: „A 12. ábrán gyakorlatilag az látszik, hogy az óriási (nagyságrendi) RNS expressziós eltérésekből fehérje szinten alig marad valami, a GBM ebben a tekintetben nagyon hasonlít az agyszövethez, míg a tüdőáttét agrin és MMP9 szempontjából fokozott expressziós mintázatú. Itt érhető tetten az, hogy mennyire elválik az mRNS és fehérje expresszió egymástól, ami minimálisan magyarázatra szorul: hogy ez technikai probléma vagy biológiai természetű?”*

Válasz: Az RNS-szintű és proteinszintű eltérések lehetséges magyarázatainak nagy irodalma van (9-12). Ez olyan sokrétű kérdés, amelynek pontos meghatározására klinikusként nem is vállalkozom. Természetesen a leginkább kérdéses molekulák esetében az RNS-protein disszonancia molekuláris okainak tisztázása elméleti-kísérletes kutatások révén mindenképpen célszerű lenne, de erre eddig még nem tudtunk vállalkozni.

*Bíráló: A GBM kombinált kezelése során bekövetkező változások inváziós panel elemzése nehezen hasonlítható az előbbiekhöz: számos elem hiányzik, újabbak szerepelnek, mint a HER2, az integrinek, CDHN2 (indokukat nem találtam).*

Válasz: A GBM-MET összehasonlításból származó eredményeket nem vetettük össze az onkoterápia előtti és utáni GBM minták összehasonlításából származó eredményekkel, így az eltérő összetételű inváziós panel vizsgálata nem jelentett számunkra szakmai, statisztikai, elvi összeegyeztethetlenséget. Az új elemként vizsgált HER2, a kadherin és az integrinek régóta ismert, hogy szerepelnek az inváziós folyamatokban, ezért kerültek fel a vizsgált molekulák listájára. Kutatásaink során történtek az inváziós panel fejlesztésére vonatkozó erőfeszítések (melyre az igény, mint fentebb elismertem, fennáll), ez is ennek egyik kísérlete volt.

*Bíráló: „Patológiai sok daganatban kell rutinszerűen elemezni a terápiák hatását neoadjuváns kezelések utáni műtéti anyagban, amire patológiai kiértékelési módszereket dolgoztak ki, mivel a mintákban négyféle lehetőség szerint CR, PR, SD, PD állapotokat lehet találni és kell értékelni. Az inváziós panelre vonatkozó elemzések így a morfológia ismerete nélkül gyakorlatilag értékelhetetlenek.”*

Válasz: Jóllehet egy tumorminta morfológiai elemzése mindenképpen hozzájárul a tumorprogresszió, vagy terápiás válasz megítéléséhez, véleményem szerint az inváziós molekulák expressziója mennyiségi meghatározásának ez nem nélkülözhetetlen feltétele. Ugyanakkor a kemo- és sugárterápiának az invázióra gyakorolt hatására az invázióban szerepet játszó molekulák expressziójának meghatározásával következtetni lehet. Jelen esetben, amikor kezeletlen glioblasztómás esetek inváziós spektrumát hasonlítottuk kombinált kezelés utáni tumorok inváziós spektrumához, minden esetben kezelés ellenére progrediáló tumormintákat vizsgáltunk (PD, progressive disease), hiszen recidiva miatt újabb műtetet gyakorlatilag csak méretbeni progresszió esetén végzünk. Ebből a szempontból tehát a csoportok homogénnek tekinthetők, és az antiproliferatív terápiák invázióra gyakorolt hatására az inváziós spektrum kezelést követően kialakult változásaiból tudunk következtetéseket levonni.

*Bíráló: A fenti heroikus elemzések értelme az lehet, ha ezekből prognosztikus vagy a címben jelzett terápiás/prediktív konzekvencia lenne levonható. A későbbi gyakorlati felhasználhatóság számára biztos a protein szintű expresszió előnye, mert a daganatokból paraffinos blokkok mindig elérhetők, míg friss minta, amelyből megfelelő minőségű RNS izolálható, alig.”*

Válasz: Jelen disszertációban szereplő vizsgálatok folytatásaként az esetszám bővítésének igénye miatt FFPE mintákból is végeztünk RNS izolálást és RNS-expressziós (TLDA) vizsgálatokat teljesen elfogadható eredménnyel, ami azt jelenti, hogy a PCR alapú gyors és gazdaságos vizsgálatok a paraffinos mintákból is kivitelezhetők voltak.



*Bíráló: A GBM-es betegcsoport inváziós expressziós mintázatának elemzése, talán nem meglepő módon, az eltérő túléléssel rendelkező betegcsoportokban nem mutatott eltérést és az SD értékek sem sejtettek nagy csoporton belüli szórásokat. Hasonló mondható el a protein szintű elemzés eredményéről is. Mindkét esetben egy J48 pruned tree statisztikai osztályozó módszerrel és a Weka3.6 elemző programmal csoportelemzést végzett. Megjegyzendő, hogy ezen kulcsszerepet betöltő statisztikai elemző programról alig lehet tudni valamit, és az elemzés biológiai részletei is homályban maradnak, csak a végeredményt láthatjuk. A két betegcsoportot a mintázat RNS expresszió esetében ez az elemzés a jó prognózisú csoportot 100, míg a rossz prognózisú csoportot 75%-os találati aránnyal azonosította. Az alacsony mintaszám azonban ezen értékelések erős korlátja. Láthatóan az inváziós mintázat elsősorban a kedvező prognózis megítélésében látszik hasznosabbnak, míg a kedvezőtlen prognózis megítélésére nem alkalmas.*

Válasz: A Weka statisztikai adatkezelő programot már 2004-ben is használták bioinformatikai adatelemzésre, és a biostatistikusok igen jó véleménnyel vannak róla (13). Ezen belül több statisztikai teszt megtalálható, melyek közül az általunk is használt J48 (más néven C 4.5) a bioinformatikai szakirodalom szerint benne van az első tíz ajánlott adatelemző teszt között (14). Több orvosi kutatócsoport publikációjában is dolgoztak ezzel az elemző programmal, így nem számít idegen módszernek (két példa: 15, 16), és előnye abban áll, hogy olyan csoportok összehasonlításánál használható, ahol a csoportok tagjainak több vizsgált paramétere között egyenként nem igazolható szignifikáns különbség, de a paraméterek együttes változásai alapján a tagok mégis nagy specifitással 2 vagy több csoportba besorolhatók (osztályozhatók). A mi esetünkben pontosan erre volt szükség, hiszen teljesen tumorspecifikus vagy szövettanspecifikus marker hiányában ilyen csoportanalízis segíthet a biztos elkülönítésben. A szóban forgó tesztet képzett biostatistikus javasolta, és közreműködésével véleményem szerint emelni tudtuk a tudományos munkánk színvonalát, hiszen a komplex kutatási feladatok közül az egyik legfontosabbat, az adatelemzést olyan szakember segítségével tudtuk megvalósítani, aki nálunk ehhez jobban értett (Steiner László, DE Genomika).

A statisztikai vizsgálómódszerek tekintetében véleményem szerint ennek az új megközelítésnek a szükségességét érdemes felvetni. Ismert tapasztalat, hogy a prognosztikai faktorokat egyenként vizsgálva, azok specifitása és szenzitivitása nem haladja meg a 70-80%-ot. Ezért mi azt az elvet fogalmazzuk meg, hogy több marker együttes változásának az elemzése hozhat egy olyan spektrum-változást, ami nagyon szorosan korrelálhat a prognózissal. Bio-informatikus bevonásával sokáig fejlesztettük az elemzéseket, egészen a görbe-analízistől a cluster-analízisen át a jelenleg leginkább megfelelőnek tűnő „J48 pruned tree” döntési fa elnevezésű statisztikai osztályozót használva. Ezzel sikerült nagy reprodukálhatósági aránnyal egyes csoportok esetében a 90-100 %-os szenzitivitást és pozitív prediktív értéket elérni. Az általunk használt spektrumanalízisnek további előnye, hogy az invázióban közvetlenül szereplő molekulák mellett (pl. kadherin, neurokin, tenascin, szindekin, verzikin, stb.) az invázióhoz kapcsolódó egyéb targetek is beválasztásra kerültek (pl. EGFR, CD168, integrinek, stb.), így a tumor

többszörös funkciója egyszerre tükröződik az inváziós spektrumban. Meggyőződésem, hogy a spektrumot alkotó egyes molekulák, ha egyenként nem is mutatnak nagyfokú eltérést a különböző prognosztikai csoportok között, az együttes változásuk specifikus lesz és nem csak diagnosztikus, hanem terápiát befolyásoló prediktív jelleget is ölthet.

A mi esetünkben azt vizsgáltuk, hogy az inváziós spektrum alapján milyen valószínűséggel lehet meghatározni, hogy egy glioblasztómás beteg a jó (azaz a várható túlélés nagyobb, mint 23 hónap) vagy a rossz (a várható túlélés kisebb, mint 23 hónap) prognózisú csoportba sorolható-e? A statisztikai osztályozó szerint kapott értékekből a szenzitivitást említi a bíráló, mely szerint ez a jó prognózisú csoportra protein szinten 100%, a rossz prognózisú csoportra RNS szinten pedig csak 75% (74. o. 15. táblázat és 75. o. 16. táblázat). Azonban a táblázat nem csak ezeket a szerény adatokat tartalmazza, hanem a klinikai alkalmazhatóságot leginkább tükröző értéket, a pozitív prediktív értéket (PPÉ) is, ami a statisztikai teszt végső üzenetét hordozza magában. A PPÉ jelentése ugyanis: valódi pozitív esetek száma / összes pozitív eset, (azaz valódi poz. / valódi poz. + álpoz. eset). Az "A" csoportra ez így néz ki: helyesen azonosított "A" / (helyesen azonosított "A" + tévesen "A"-nak azonosított "B" minta). Egyszerűen fogalmazva ez egy pozitív teszteredmény megbízhatóságát, tehát annak a valószínűségét mutatja meg, hogy pozitív eredmény esetében a betegség valóban fennáll-e? Esetünkben az "A" csoport PPÉ-e megmondja, hogy mennyire megbízható a teszteredmény az "A" csoportra, azaz ha a teszt azt mondja, hogy egy eset az "A" csoportba tartozik, akkor az tényleg, valóban oda tartozott-e? Tehát ha a PPÉ=1, akkor az azt jelenti, hogy minden besorolt eset valóban oda is tartozott – esetleg néhány eset kimaradt, de a tévedés csak „negatív” irányba fordulhat elő. A mi esetünkben az RNS expressziós értékek alapján a rossz prognózisú A csoport PPÉ-je 0.9, míg ugyanennek a csoportnak a protein-expressziós értékek alapján a PPÉ-je 1.0. Tehát pont a rossz prognózisú csoportot tudjuk az inváziós spektrum alapján egész biztonsággal azonosítani, és elvileg nem fordulhat elő, hogy véletlenül jó prognózisú betegnek feleslegesen javasolnánk kiegészítő kemoterápiát.

*Bíráló: Az egyes molekulák súlyát tekintve a bíráló számára értelmezhetetlen a kiválasztott jelentős fehérjék listája: brevikan, CDH12, integrin- $\alpha$ 3, valamint a laminin- $\alpha$ 4 és b1, mivel ezt a disszertációban lévő kísérleti adatok nem támasztják alá...*

Válasz: A szóban forgó molekulák vagy korábbi méréseink során hívták fel magukra a figyelmet (a brevikan szignifikáns eltérést mutatott számos korábbi elemzésünkben (GBM-MET, NORM-MET, NORM-GBM, kezelés előtt és utáni GBM minták összehasonlításánál, egyértelmű eltérés a peritumorális agyállomány vizsgálatánál, a laminin b1 szintén (NORM-MET, NORM-GBM) és proteinexpresszióval konkordáns változás kezelés előtt és utáni GBM minták összehasonlításánál, laminin  $\alpha$ 4, integrin  $\alpha$ 3 határozott eltérést mutatott a peritumorális agyállomány összehasonlításánál), vagy az irodalmi adatok alapján tartottuk fontosnak szerepeltetni őket.

*Bíráló: Az egész elemzés jelentősége és értelme az, hogy amennyiben ezen mintázat vagy egyes elemeinek prognosztikus értéke meghaladja a jelenlegi klasszikus patológiai paramétereket vagy azoktól függetlenül prognosztikus tényező. Ilyen összehasonlítás az anyagban nem történt, pedig a szövettani altípusnak, a beteg életkorának (gyerek/felnőtt), a PCNA jelölődés mértékének, az apoptotikus index értékének, a necrosis és calcificatio jelenlétének alapvető szerepük van, nem beszélve a genetikai profilról (p53 és MGMT mutációk, CIMP státusz). Továbbmenve, a megfigyelések jelentőségének értékeléséhez független beteg-, illetve tumoros anyagon történő validálás szükséges. Másrészt szükséges volna az is, hogy a TCGA nyitott adatbázisban legyenek ezek a megfigyelések validálva (mRNS expresszió profilok) illetve leellenőrizve, ahol közel 500 ilyen daganat génexpressziós profilja és klinikai adatai elérhetőek.*

Válasz: A TCGA-ból kigyűjtött adatok elemzésével már korábban is sikerült heparán-szulfát-PG (HSPG) és kondroitin-szulfát-PG (CSPG) molekulák és enzimeik expresszióját tumor vs. normál viszonylatban elemezni, de az ezzel foglalkozó review cikk is megállapítja, hogy az ekképpen meghatározható összefüggések egyrészt még nem elegendőek, másrészt direkt humán minták vizsgálatával még kiegészítésre és megerősítésre szorulnak (17). PCNA - Proliferating cell nuclear antigen, egy DNS replikációban, repairben érintett géntermék, a DNS polimeráz kofaktora. Ismert, hogy grádussal növekszik a PCNA labeling index, de hogy a magasabb grádusban ennek milyen szerepe van, van-e egyáltalán, még kérdéses (18). Egy másik kutatócsoport azt találta, hogy a kezelésre adott válasz nem függ a PCNA-tól (19). Megfigyelték azt is, hogy a PCNA a Ki67-tel szorosan összefügg, így a proliferáció markere (20), ezért felmerült a grade II és III elkülönítésében a szerepe. Az elmúlt 5 évben 6 db cikket indexel a PubMed PCNA és glioblastoma keresőszavakkal. Én úgy látom a cikkekből, hogy nem ad többet a PCNA a Ki67-nél, és a mi szempontunkból az invázióban szereplő molekulákból álló panelbe nem tudjuk beilleszteni. A CIMP státusz (CpG island methylator phenotype) – epigenetikus szabályozáshoz köthető fogalom, nagyon sokféle daganatban, köztük gliómákban is kutatták/kutatják tk. a DNS repair gének és tumorszupresszorok promoter régióiban található CpG szigetek kiterjedt hipermetiláltságát nevezzük CIMP-nek (21). A gliómákban a jelentőséget az adja, hogy az IDH mutációk okozzák a CIMP kialakulását (22). Szerepük a GBM-ben nem vitatott, de a mi az inváziót célzó kutatásunk keretei között nem tudunk ebben az irányban vizsgálatokat végezni. Összességében, a hiányolt genetikai profil meghatározása inváziókutatás szempontjából nem került az érdeklődésünk középpontjába. Ettől függetlenül a TCGA adatbázisának és saját eredményeink egybevetésének igényét elfogadom, és arra ezentúl külön gondot fogunk fordítani, a javaslatot tisztelettel megköszönöm.

*Bíráló: Mindezek alapján a bíráló a disszertáció új, a jelölt kutatásaihoz szorosan köthető tudományos eredményeinek az alábbiakat fogadja el:*

- 1. Új TMZ kimutatási módszert dolgozott ki, amelyet klinikai körülmények között is tesztelt néhány esetben.*

2. *GBM-ben egy ECM alapú inváziós panelt elemzett, amelyből a FN, perlekán és szindekán1/2 HSPG-k, valamint az MMP2/9 fokozott expresszióját írta le, ami nagyban hasonlít tüdő adenocarcinoma agyi áttétéhez.*
3. *Kemoirradiációval kezelt GBM-ben a fenti inváziós panelből az MMP9 mRNS és a brevican fehérje szintű csökkent expresszióját találta.*
4. *A GBM körüli agyszövetben az inváziós panelből a CD168/HRMM fokozott expresszióját észlelte.*

#### Válasz, kiegészítés, összefoglalás:

Az igen sokrétű, molekuláris patológiai kérdésekre reflektálva szeretném röviden kifejteni, hogy véleményem szerint hogyan lehet klinikusként, manuális szakmában említésre méltó kutatómunkát folytatni. Egy olyan intézetben, melynek nincs saját laboratóriuma, sem biofizikus, biokémikus, labororvos, molekuláris biológus személyzete, stb., és a munkaidő fizikai lekötöttsége is jelentősen megnehezíti a labormunkát, nehezen várható el elméleti alap kutatásban való kiemelkedés. Ezzel szemben pont annak az előnyét lehet kihasználni, hogy az egyetemeken egy olyan laborháló működik, melynek kapacitását a saját laborral és műszerekkel nem rendelkező kutatók is – meghatározott keretek között – igénybe vehetik. Így a jó kérdésfelvetés, a megalapozott célkitűzés, a jól megválasztott vizsgálómódszerek és a fogyóeszközökre fordítható pályázati pénzek együttesen képesek meggyőzni a társintézetek laborjait, hogy kollaborációban megvalósítsák a szóban forgó kutatómunkát. Őszinte öröm és részben büszkeség is számomra, hogy elmondhatom, hogy a Debreceni Egyetemen tárt karokkal fogadtak, szinte bárhova fordultam laborigényt jelentő kéréseimmel. Az a tapasztalatom, hogy az elméleti alap kutatást végző intézetek szinte ki vannak éhezve a jól megfogalmazott, és klinikai relevancia esélyével kecsegtető tudományos kérdésfelvetésekre, és ha ehhez a vizsgálómódszerekben való jártasság is társul (én magam 1 évig dolgoztam laborban), akkor egy nyelvet beszélünk, és a kutatás szárnyakat kap. Különösen, ha egy-egy TDK vagy PhD hallgató is a kérdés büvkörébe vonható és még az anyagi terhek egy részét is fedezni tudjuk – a vizsgálat fő tárgyát képező minőségi humán tumormintáról nem is beszélve. Így aztán a jelen disszertációban szereplő mérések közül egyetlen egy sem az Idegsebészeti Klinikán történt. Hanem az Anatómián, Patológián, Biokémián, Biofizikán Genomikán, Proteomikán, Neurológián, stb. A legnagyobb tisztelettel fogadom el Tímár professzor Úr minden, a vizsgálatok mélységét és kiterjedtségét és tudományos alaposságát illető kritikáját, mely elméleti kutatási szempontból valóban jogosnak mondható. Én magam a rendelkezésre álló eszközök és körülmények mellett a publikált eredményeknek a mellékelt szintjéig jutottam, de meglátásom szerint jelen dolgozat egyik érdeme éppen az, hogy bemutatja, hogy hogyan lehet egy egyetemi infrastruktúrát megfelelő szellemi tőkével párosítva oly módon hasznosítani, hogy kutatólaborral és személyzettel nem rendelkező klinikai kutatócsoport is nemzetközi publikációkra felbátorító eredményeket érjen el.

Emellett minden kutatási tanácsot, javaslatot, szellemi segítséget nagyon nagy örömmel és nagy tisztelettel veszek, hiszen ezek megfogadásával, ötvöztetésével és kivitelezésével alakult ki jelen disszertáció anyaga is. Éppen ezért nagyon köszönöm Tímár József Professzor Úr bírálatát és a jövőben is bármilyen építő jellegű kritikai észrevételt készséggel fogadok, a kutatásba beépítem, és alkalomadtán akár kollaboráció szintjén is a hasonló témával foglalkozó kutatókkal nem csak nagy lelkesedéssel, hanem kifejezett szakmai alázattal és hálával együttműködni is kész vagyok.

Debrecen, 2017.06.12.

Dr. Klekner Álmos

#### Hivatkozások

1. Nabors LB, Fink KL, Mikkelsen T, Grujicic D, Tarnawski R, Nam DH, Mazurkiewicz M, Salacz M, Ashby L, Zagonel V, Depenni R, Perry JR, Hicking C, Picard M, Hegi ME, Lhermitte B, Reardon DA.: Two cilengitide regimens in combination with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma and unmethylated MGMT gene promoter: results of the open-label, controlled, randomized phase II CORE study. *Neuro Oncol.* 2015 May;17(5):708-17.
2. Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, Erridge SC, Perry J, Hong YK, Aldape KD, Lhermitte B, Pietsch T, Grujicic D, Steinbach JP, Wick W, Tarnawski R, Nam DH, Hau P, Weyerbrock A, Taphoorn MJ, Shen CC, Rao N, Thurzo L, Herrlinger U, Gupta T, Kortmann RD, Adamska K, McBain C, Brandes AA, Tonn JC, Schnell O, Wiegel T, Kim CY, Nabors LB, Reardon DA, van den Bent MJ, Hicking C, Markivskyy A, Picard M, Weller M; Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC); Canadian Brain Tumor Consortium; CENTRIC study team. *Lancet Oncol.* 2014 Sep;15(10):1100-8.
3. Scaringi C, Minniti G, Caporello P, Enrici RM.: Integrin inhibitor cilengitide for the treatment of glioblastoma: a brief overview of current clinical results. *Anticancer Res.* 2012 Oct;32(10):4213-23. Review.
4. Cecile L. Maire and Keith L. Ligon: Molecular pathologic diagnosis of epidermal growth factor receptor. *Neuro Oncol.* 2014 Oct; 16(Suppl 8): viii1–viii6.
5. Lucas Tadeu Bidinotto, Raul Torrieri, Alan Mackay, Gisele Caravina Almeida, Marta Viana-Pereira, Adriana Cruvinel-Carlioni, Maria Luisa Spina, Nathalia Cristina Campanella, Weder Pereira de Menezes, Carlos Afonso Clara, Aline Paixão Becker,

- Chris Jones, and Rui Manuel Reis: Copy Number Profiling of Brazilian Astrocytomas. G3 (Bethesda). 2016 Jul; 6(7): 1867–1878.
6. Justin S. Smith, Issei Tachibana, Sandra M. Passe, Brenda K. Huntley, Thomas J. Borell, Nancy Iturria, Judith R. O’Fallon, Paul L. Schaefer, Bernd W. Scheithauer, C. David James, Jan C. Buckner, Robert B. Jenkins: PTEN Mutation, EGFR Amplification, and Outcome in Patients With Anaplastic Astrocytoma and Glioblastoma Multiforme. *J Natl Cancer Inst* (2001) 93 (16): 1246-1256.
  7. Tysnes BB, Haugland HK, Bjerkvig R.: Epidermal growth factor and laminin receptors contribute to migratory and invasive properties of gliomas. *Invasion Metastasis*. 1997;17(5):270-80.
  8. Klekner A., Felszeghy Sz., Tammi R., Tammi M., Csécssei G., Módis L.: Quantitative determination of hyaluronan content in cerebral aneurysms by digital densitometry. *Zentralbl Neurochir*. 2005 Nov; 66(4): 207-12.
  9. Antonis Koussounadis, Simon P. Langdon, In Hwa Um, David J. Harrison, and V. Anne Smith: Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Sci Rep*. 2015; 5: 10775.
  10. Chen G, Gharib TG, Huang CC, Taylor JM, Misek DE, Kardia SL, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics*. 2002 Apr;1(4):304-13.
  11. Christine Vogel and Edward M. Marcotte: Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet*. 2012 Mar 13; 13(4): 227–232.
  12. Maier T, Güell M, Serrano L: Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett*. 2009 Dec 17;583(24):3966-73.
  13. Frank E, Hall M, Trigg L, Holmes G, Witten IH.: Data mining in bioinformatics using Weka. *Bioinformatics*. 2004 Oct 12;20(15):2479-81.
  14. Xindong WuEmail authorVipin KumarJ. Ross QuinlanJoydeep GhoshQiang YangHiroshi MotodaGeoffrey J. McLachlanAngus NgBing LiuPhilip S. YuZhi-Hua ZhouMichael SteinbachDavid J. HandDan Steinberg: Top 10 algorithms in data mining. *Knowledge and Information Systems*. January 2008, Volume 14, Issue 1, pp 1–37
  15. Pamela K. Douglas, Edward Lau, Ariana Anderson, Austin Head, Wesley Kerr, Margalit Wollner, Daniel Moyer, Wei Li, Mike Durnhofer, Jennifer Bramen, and Mark S. Cohen: Single trial decoding of belief decision making from EEG and fMRI data using independent components features. *Front Hum Neurosci*. 2013; 7: 392.
  16. Muskan Kukreja, Stephen Albert Johnston, and Phillip Stafford: Comparative study of classification algorithms for immunosignaturing data. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13: 139.
  17. Anna Wade, Aaron E. Robinson, Jane R. Engler, Claudia Petritsch, C. David James, and Joanna J. Phillips: Proteoglycans and their roles in brain cancer. *FEBS J*. 2013 May; 280(10): 2399–2417.

18. Revesz T, Alsanjari N, Darling JL, Scaravilli F, Lane DP, Thomas DG.: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): expression in samples of human astrocytic gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1993 Apr;19(2):152-8.
19. Grunnet ML1, O'Neill A, Gilbert M, Hellman R.: Correlation of tumor p53 and PCNA with response and survival of glioblastoma in patients treated with an ECOG protocol of pre-irradiation chemotherapy. *Clin Neuropathol.* 2000 Sep-Oct;19(5):230-4.
20. Mohammed Kassim Chaloob, Hussam Hasson Ali, Ban Jumaa Qasim, and Ahmed Salahaldeen Mohammed: Immunohistochemical Expression of Ki-67, PCNA and CD34 in Astrocytomas: A Clinicopathological Study. *Oman Med J.* 2012 Sep; 27(5): 368–374.
21. Bady P, Sciuscio D, Diserens AC, Bloch J, van den Bent MJ, Marosi C, Dietrich PY, Weller M, Mariani L, Heppner FL, Mcdonald DR, Lacombe D, Stupp R, Delorenzi M, Hegi ME.: MGMT methylation analysis of glioblastoma on the Infinium methylation BeadChip identifies two distinct CpG regions associated with gene silencing and outcome, yielding a prediction model for comparisons across datasets, tumor grades, and CIMP-status. *Acta Neuropathol.* 2012 Oct;124(4):547-60.
22. Mur P, Rodríguez de Lope Á, Díaz-Crespo FJ, Hernández-Iglesias T, Ribalta T, Fiaño C, García JF, Rey JA, Mollejo M, Meléndez B.: Impact on prognosis of the regional distribution of MGMT methylation with respect to the CpG island methylator phenotype and age in glioma patients. *J Neurooncol.* 2015 May;122(3):441-50.