

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

3040.

LIPPAI ZOLTÁN

Onkológia
című program

Programvezető: Dr. Bödör Csaba, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Sápi Zoltán, egyetemi tanár

Új, rekurrens *NTRK1* mutációval jellemezhető dedifferenciált liposarcomák

Doktori értekezés

Dr. Lippai Zoltán

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sápi Zoltán, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Tóth Erika, Ph.D., osztályvezető főorvos
Dr. Borka Katalin, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Kulka Janina, D.Sc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Pápai Zsuzsanna, Ph.D., címzetes egyetemi tanár
Dr. Antal Imre, Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2024

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Bevezetés.....	8
1.1. Dedifferenciált liposarcoma.....	8
1.2. Az <i>NTRK</i> géncsalád.....	8
1.3. <i>NTRK</i> géneltérések rosszindulatú daganatokban.....	9
1.4. <i>NTRK</i> géneltéréseket hordozó rosszindulatú daganatok terápiája.....	12
1.5. Az <i>NTRK</i> géneltérések jelentősége sarcomákban.....	13
2. Célkitűzések.....	14
3. Módszerek.....	15
3.1. Esetek kiválasztása.....	15
3.2. Immunhisztokémia.....	15
3.3. Polimeráz láncreakció (PCR).....	16
3.4. Sanger szekvenálás.....	17
3.5. Fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH).....	19
3.6. Újgenerációs szekvenálás (NGS).....	19
3.7. A vad típusú, illetve a mutáns <i>NTRK1</i> ORF klónozása lentivirális expressziós vektorba.....	21
3.8. Lentivirus termelés és transzdukció.....	22
3.9. Proliferációs vizsgálat és dózis-válasz görbék.....	22
3.10. H604Y/G613V in silico modellezése LOXO-101 jelenlétében.....	23
4. Eredmények.....	25
4.1. Kórszövetten és klinikai eredmények.....	25
4.2. Az <i>NTRK</i> gének expressziója gyakori dedifferenciált liposarcomában.....	39
4.3. Rekurrens <i>NTRK1</i> gén variánsok dedifferenciált liposarcomában.....	50
4.4. Az AKT útvonal aktív az <i>NTRK1</i> mutáns esetekben.....	56

4.5. Az <i>NTRK1</i> variánst expresszáló sejtek különböző módon reagálnak TRK inhibitorokra.....	60
4.6. A G613V és a H604Y variánsok rezisztencia mechanizmusának megértése molekuláris szinten	63
5. Megbeszélés	64
6. Következtetések.....	69
7. Összefoglalás.....	70
8. Irodalomjegyzék.....	71
9. Saját publikációk jegyzéke	79
9.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények	79
9.2. Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent közlemények	79
10. Köszönetnyilvánítás	80

Rövidítések jegyzéke

AKT: protein kináz B

BDNF: agyi eredetű neurotrofikus faktor

CDK4: ciklindependens kináz 4

cDNS: komplementer dezoxiribonukleinsav

DMEM: Dulbecco módosított sas tápközeg

DNS: dezoxiribonukleinsav

EGFR: epidermális növekedési faktor receptor

EML4: echinoderm mikrotubulus-asszociált protein-like 4

ERK: extracelluláris-szignál regulált kináz

ETV6: transzlokáció-Ets-leukemia vírus

FISH: fluoreszcens *in situ* hibridizáció

foszfo-AKT: foszforilált protein kináz B

foszfo-ERK: foszforilált extracelluláris-szignál regulált kináz

HEK 293T: emberi embrionális vese 293 sejtvonal

IP3: inozitol-triszfoszfát

LMNA: lamin A

LOXO-101: larotrectinib

LOXO-195: selitrectinib

MDM2: mouse double minute 2

MEK: mitogén-aktivált protein kináz kináz

mRNS: hírvivő ribonukleinsav

NGF: idegi növekedési faktor

NGS: újgenerációs szekvenálás

NT-3: neurotrofin 3

NT-4/5: neurotrofin 4/5

NTRK: neurotrofikus receptor tirozin kináz géncsalád

NTRK1: neurotrofikus receptor tirozin kináz 1

NTRK2: neurotrofikus receptor tirozin kináz 2

NTRK3: neurotrofikus receptor tirozin kináz 3

ORF: kezdő leolvasási keret

pan-TRK: pan-tropomiozin receptor kináz antitest

PCR: polimeráz láncreakció

PI3K: foszfatidil-inozitol-3-kináz

PIP2: foszfatidil-inozitol-biszfoszfát

PKC: protein kináz C

PLC: foszfolipáz C

pLV: plazmid lentivirus vektor

RAF: rapidly accelerated fibrosarcoma

RAS: rat sarcoma virus

RNS: ribonukleinsav

SMA: simaizom aktin

T449: T449 dedifferenciált liposarcoma sejtvonal

TIP3P: transferable intermolecular potential with 3 points

TMA: szöveti multiblokk

TRK: tropomiozin receptor kináz fehérje

TRKA: tropomiozin receptor kináz A

TRKB: tropomiozin receptor kináz B

TRKC: tropomiozin receptor kináz C

TUKEB: Tudományos és Kutatásetikai Bizottság

VH10: VH10 sejtvonala, emberi fitymából származó fibroblast sejtvonala

VH10-hTERT: humán telomerázzal transzfektált VH10 sejtvonala

WT: vad típus

1. Bevezetés

1.1. Dedifferenciált liposarcoma

A dedifferenciált liposarcoma a liposarcoma egyik gyakori formája, mely leggyakrabban retroperitonealis elhelyezkedésű, noha ritkábban, de előfordulhat a mediastinumban, a fej-nyak régióban, a törzsön, illetve akár a végtagokon is. A dedifferenciált liposarcoma diagnózisához a hagyományos hematoxin-eozin festett metszeten látott kórszöveti jellegzetességek (jól differenciált liposarcoma átmenete non-lipogén sarcomába, változó mértékű dedifferenciációval és grádussal), illetve az *MDM2* vagy a *CDK4* gén amplifikációjának molekuláris vizsgálatokkal történő igazolása szükséges. (1) A kezelés alappillére, ahogyan az a szolid rosszindulatú daganattal rendelkező betegek ellátásában megszokott, a sebészi eltávolítás, mindazonáltal radioterápia és hagyományos, antraciklin-alapú kemoterápia alkalmazására is sor kerülhet, bár ezen modalitások eredményessége nem kifejezetten kecsegtető. (2, 3) Reménykeltő lehet a jelenleg fázis III vizsgálatban (ClinicalTrials.gov ID: NCT04979442) lévő *MDM2* inhibitor (milademetan), mely a fázis I vizsgálat során 58%-os betegség kontroll ráta (disease control rate) eléréséhez vezetett dedifferenciált liposarcomában szenvedő betegeknél. (4) Mindezek fényében feltétlenül szükséges lenne a dedifferenciált liposarcoma tekintetében a terápiás lehetőségek spektrumának kiszélesítése és további új, célozható molekuláris elváltozások identifikálása.

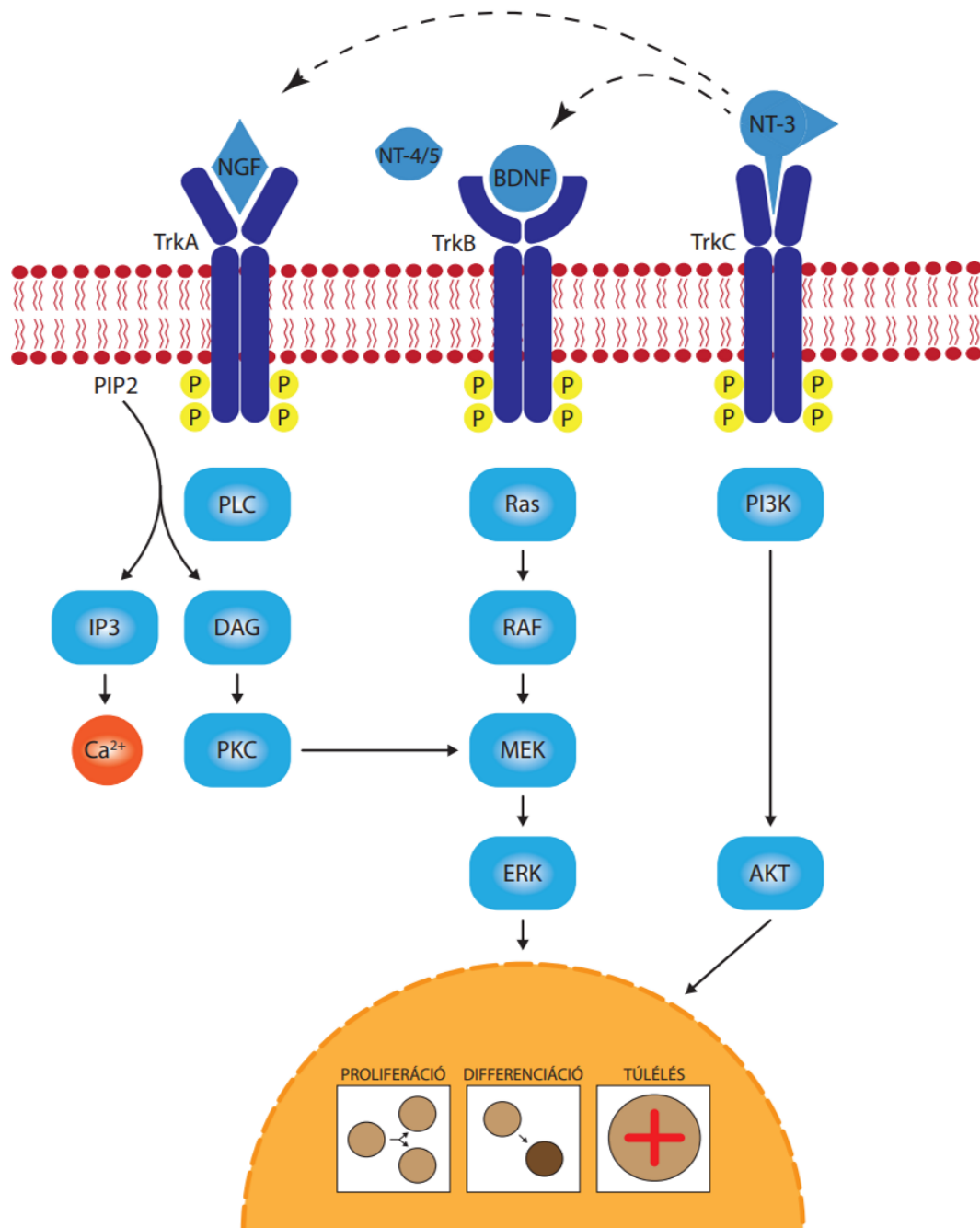
1.2. Az *NTRK* géncsalád

A neurotrofikus receptor tirozin kináz (*NTRK*) géncsalád három tagból áll: *NTRK1* (1q23), *NTRK2* (9q21), *NTRK3* (15q25), melyek az alábbi fehérjéket kódolják, rendre: TRKA, TRKB, TRKC. Ezen tirozin kináz receptorok általános felépítése más tirozin kináz receptorokéval megegyező, mivel rendelkeznek egy ligandkötő, extracelluláris doménnel, továbbá egy transzmembrán doménnel, valamint egy intracelluláris, tirozin kináz doménnel. A receptorokat aktiváló ligandok a neurotrofinok. A TRKA receptorhoz

az NGF (nerve growth factor, idegi növekedési faktor), a TRKB receptorhoz a BDNF (brain-derived neurotrophic factor, agyi eredetű növekedési faktor), a TRKC receptorhoz az NT-3 (neurotrophin-3, neurotrofin-3) kapcsolódik elsősorban, ugyanakkor a receptorokat nem csupán az elsődleges ligandjuk tudja aktiválni, valamint a különböző neurotrofinok többféle receptorhoz is kötődhetnek. A tirozin kináz receptorokhoz történő ligandkapcsolódás következtében jól ismert jelátviteli útvonalak aktiválódnak (PI3K/AKT, RAS/RAF/MEK/ERK, PLC/PKC), melyek a sejtciklus szabályozásában fontos transzkripciós faktorokra és génekre vannak hatással (1. ábra). A TRK fehérjék élettani szerepe az idegrendszer sejteinek proliferációjának, differenciációjának, apoptózisának, sejtciklusának szabályozásában van, ugyanakkor egyéb, nem neuronális sejtekben is expresszálódnak a receptorok. (5)

1.3. NTRK génelterések rosszindulatú daganatokban

Az *NTRK* géncsaládot érintő genetikai eltérések közül a transzlokációk a legismertebbek. Számos partnergént, illetve töréspontot írtak le mindezidáig, ugyanakkor közös jellemzője a transzlokációknak, hogy a tirozin kináz domén mindig érintetlen marad. Azt feltételezik, hogy a fúziók ugyanazon jelátviteli útvonalakon keresztül érvényesítik hatásukat, mivel a tirozin kináz domén nem változik meg. A transzlokáció következtében létrejövő fúziós fehérje elveszíti a ligandkötő, extracelluláris domént, így a kiméra protein ligand-független, folyamatos aktivációja jön létre, ami által a sejtciklus szabályozása zavart szenved, s ez a sejtek daganatos transzformációjához vezet. Ezen *NTRK* fúziók, mint driver mutációk vannak jelen számos rosszindulatú daganatban. Ezek karakterisztikusak lehetnek bizonyos ritka daganattípusokban, ilyen daganat például az infantilis fibrosarcoma (*ETV6::NTRK3*; *LMNA::NTRK1*; *EML4::NTRK3*), a congenitalis mesoblastos nephroma celluláris és vegyes szubtipusa (*ETV6::NTRK3*), az emlő szekretoros karcinómája (*ETV6::NTRK3*), a nyálmirigy szekretoros karcinómája (*ETV6::NTRK3*). (6-11) Ugyanakkor számos egyéb más daganatban is leírásra kerültek már az *NTRK* fúziók, mint vastagbélrák, tüdőrák, melanoma, noha igen ritka elváltozásnak számítanak ezen tumorokban, az előfordulási gyakoriságuk 0,1-3% körül van.



1. ábra. A TRK receptorokról induló jelátviteli útvonalak. Noha a receptoroknak van elsődleges ligandja, egy adott receptorhoz többféle ligand is tud kötődni, illetve egy ligand többféle receptort is tud aktiválni. Mindhárom tirozin kináz receptorról ugyanazon jelátviteli útvonalak indulnak ki. A jelátviteli útvonalak a sejtciklus szabályozásában résztvevő transzkripciós faktorokat és géneket befolyásolják. (5)

Annak ellenére, hogy az *NTRK* génelterések közül a transzlokáció következtében létrejövő fúziók a legismertebbek és legalaposabban vizsgáltak, fontos megjegyezni,

hogy egyéb génelterési módok is leírásra kerültek, ugyanakkor ezek többségének a jelentősége egyelőre nem ismert. Kópiaszám-eltérések vannak jelen számos daganattípus esetében, többek között az emlőrákok és a tüdőrákok több mint 10%-ában a cBioPortal adatai alapján. (12) Tíz agyi áttétekkel rendelkező emlőrákos nő közül négyben *NTRK1* amplifikációt írtak le, mely felveti annak lehetőségét, hogy a nem megfelelően szabályozott TRK jelátviteli útvonal szerepet játszhat akár az áttétképződésben. (13) Több daganattípusban is emelkedett TRKA mRNS szintet mértek. (14) A TRKA fehérje túltermelődése jobb, míg a TRKB fehérje túltermelődése rosszabb prognózissal járt neuroblastomában szenvedő betegeknél. (15) A TRKB mRNS magasabb szintje rosszabb prognózissal járt Wilms-tumorban szenvedő betegeknél. (16) A tüdő nagysejtes neuroendokrin karcinómáiban a tirozin kináz domént kódoló régió egy pontmutációit írtak le az *NTRK2* és az *NTRK3* génekben. (17) Sajnálatosan ezen elváltozásoknak a daganatképződésben betöltött szerepét nem vizsgálták.

Viszont akadnak olyan *NTRK* génelterések is, melyek bizonyítottan onkogén potenciállal bírnak. Az *NTRK1* gén 'in-frame' delécióját találták akut myeloid leukémiában szenvedő betegeknél. (18, 19) A deléció következtében hiányos extracelluláris doménnel rendelkező TRKA növekedési transzformációhoz vezetett fibroblast sejtekben, epithelialis sejtekben, myeloid sejtekben a ligand-független, konstitutív aktiváció révén. (19) Egy TRKA splice variáns, mely az extracelluláris domén egy részének elvesztését okozta, a PI3K/AKT jelátviteli útvonal spontán aktivációját okozta neuroblastoma sejtvonalban, de a RAS/RAF/MEK/ERK jelátviteli útvonal nem volt érintett. A TRKA splice variáns egy fibroblast sejtvonal transzformációjához és egy neuroblastoma sejtvonal fokozott növekedéséhez vezetett. (20) Azon fúziók, ahol a partnergén nem rendelkezik dimerizációs doménnel és mégis a fúziós fehérje állandó aktivációja következik be, továbbá a deletált TRKA, illetve a TRKA splice variáns esetében megfigyeltek mind arra utalnak, hogy az extracelluláris domén, a ligand-kötődés által okozott aktivációs mechanizmus közvetítésén túl egyéb, afféle autoinhibitorikus hatással is rendelkezik. Az extracelluláris domént érintő károsodás vagy változás hozzájárulhat a tumorgenezis folyamatához. Ezen feltételezést tovább erősíti egy TRKA extracelluláris domén deléziós kísérlet. Az extracelluláris domén szerkezetét érintő változások spontán dimerizációhoz és konstitutív aktivációhoz vezettek, mely alapján felmerül, hogy az intakt domén megakadályozza a ligand hiányában történő dimerizációt. (21) Mindezen

megfigyelések egyezést mutatnak azzal a feltételezéssel, miszerint az extracelluláris domén akár csak kis változása is malignus transzformációhoz vezethet. (22)

Az utóbbi évek két legfontosabb olyan közleményében, melyben az *NTRK* géncsalád nem-fúziós eltéréseit detektálták, egy pontmutációk kerültek leírásra hematológiai rosszindulatú daganatokban, az extracelluláris és transzmembrán doménben (*NTRK2*, *NTRK3*), illetve a tirozin kináz doménben (*NTRK1*). Ezen eltérések (egy pontmutációk) funkcionális vizsgálatok alapján onkogénnek bizonyultak. Azon túlmenően, hogy mindkét tanulmány szerzői bizonyították a mutációk onkogén jellegét, a vizsgálatok jelentőségét az adja, hogy sikerült azt is megállapítaniuk, hogy ezen génelterések reagálnak a célzott kezelésekre (lásd alább). (23, 24)

Összességében a nem-fúziós *NTRK* eltérések a rosszindulatú daganatok közel 14%-ában jelen vannak. (25) Mindezek alapján a nem-fúziós *NTRK* eltérések rosszindulatú daganatok kialakulásában mutatott jelentőségének felderítése szükséges, mely akár lehetőséget is adhat a célzott kezelésekre (lásd alább).

1.4. NTRK génelteréseket hordozó rosszindulatú daganatok terápiája

Noha az *NTRK* géncsalád és fúzióinak egy része már évtizedek óta ismertek, jelentőségük mondhatni csekély volt. De mára mindez teljesen megváltozott köszönhetően a rendkívül hatékony szelektív TRK gátlószereknek - larotrectinib, entrectinib. Az Amerikai Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi hivatala (US FDA) engedélyezte a TRK gátlószerek használatát mindazon rosszindulatú daganatban szenvedő betegeknél, ahol a daganatban kimutatható bármelyik *NTRK* gén fúziója. Az engedélyezésnek szükséges és elégséges feltétele az *NTRK* fúzió jelenléte, viszont teljesen független a rosszindulatú daganat szövettani típusától. (7, 26-28) A TRK gátlószerek kezelés hatására a tirozin kináz doménben létrejövő egy pontmutációk által közvetített rezisztencia (7, 29, 30) miatt további, második generációs TRK inhibitorok kerültek kifejlesztésre - repotrectinib (31), selitrectinib (32) - melyek szintúgy nagyon hatékonyak bizonyultak. Noha az első generációs TRK gátlószerek csakis kizárólag olyan rosszindulatú daganatok kezelése esetén engedélyezettek, melyben *NTRK* fúzió kerül detektálásra, feltétlenül érdemes

lenne a gátlószerek terápiás spektrumának kiszélesítése minden TRK fehérje túlexpresszió esetére, függetlenül a háttérben meghúzódó genetikai eltéréstől, mely ehhez vezet. Például a fentebb említett, hematológiai rosszindulatú daganatokban leírt, bizonyítottan onkogén extracelluláris, transzmembrán, és tirozin kináz domén egy pontmutációk TRK gátlószeres kezelésre érzékenynek bizonyultak. (23, 24)

1.5. Az NTRK géneltérések jelentősége sarcomákban

A pan-TRK antitesttel végzett immunhisztokémiai vizsgálat révén kimutatható a TRKA, a TRKB és a TRKC fehérjék expressziójának emelkedése. A pan-TRK immunhisztokémiai vizsgálat remek módszernek bizonyult azon tumorok kimutatására, melyekben nincs *NTRK* eltérés, köszönhetően a magas negatív prediktív értékének. (6, 33) Minthogy pan-TRK immunpozitivitás látható bizonyos miogén differenciációt vagy miogén fenotípust mutató sarcomákban, melyek *NTRK* fúziót nem hordoznak, a pan-TRK immunhisztokémiai módszer kiválóan alkalmazható tumoros minták előszűrésére az *NTRK* géneltérések igazolására irányuló szekvenálási eljárások használata előtt. (34-37)

2. Célkitűzések

Kutatásunk során az volt a célunk, hogy megvizsgáljuk az *NTRK* géneltérések lehetséges szerepét dedifferenciált liposarcomában. Mindehhez figyelembe vettük azt a tényt, hogy a dedifferenciált liposarcoma olyan sarcoma, mely miogén fenotípust mutathat. Azzal a feltételezéssel éltünk, hogy a TRK fehérjét túlexpresszázó esetek egy részében *NTRK* géneltéréseket azonosíthatunk. Pan-TRK immunhisztokémiai vizsgálattal előszelektált dedifferenciált liposarcoma esetekben az *NTRK* gének tirozin kináz doménjét kódoló régióinak vizsgálatát terveztük, géneltérések után kutatva. Továbbá terveztük, hogy amennyiben találunk érdemi genetikai eltérést, annak pontos jelentőségének meghatározására funkcionális vizsgálatokat végzünk majd el.

3. Módszerek

3.1. Esetek kiválasztása

Összesen százharmincegy individuális, a saját intézményi, illetve konzultációs archívumunkból származó, 2014 és 2022 között diagnosztizált, miogén differenciációt mutató dedifferenciált liposarcoma esetet vontunk be vizsgálatunkba. A diagnózis a klinikai jellemzőkön, a hematoxin-eozin festett metszeten fénymikroszkóppal azonosított morfológiai eltéréseken, illetve az *MDM2* és/vagy *CDK4* gének molekuláris vizsgálatán és/vagy az általuk kódolt fehérjék immunhisztokémiai vizsgálatán alapult. A simaizom aktin és/vagy dezmin antitesttel végzett immunhisztokémiai reakció segített a miogén differenciációt mutató esetek kiválasztásában. A vizsgálatot a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatás-Értékelési Bizottsága jóváhagyta (TUKEB 155/2012).

3.2. Immunhisztokémia

Minden beteg formalin fixált, paraffinba ágyazott blokkjának kettő tumorgazdag területéről vettünk 2 mm átmérőjű core mintát és helyeztük azokat szöveti multiblokkokba, 6x9 elosztásban a TMA Master (3DHistech, Budapest, Magyarország) gép segítségével. Minden szöveti multiblokkban normál kisagy szolgált pozitív kontrollként. Azon esetekben, ahol nem állt rendelkezésre elegendő anyag, csupán egy tumorgazdag területről vettünk mintát (a 131 betegből 12 esetben). Az AKT, és foszfo-AKT, illetve az ERK, továbbá a foszfo-ERK, valamint a simaizom aktin, és a dezmin immunhisztokémiai vizsgálatokat illetőleg teljes metszeteket alkalmaztunk. Az AKT, foszfo-AKT, ERK, illetve foszfo-ERK immunhisztokémiai reakciókat a hat darab kettős mutációt hordozó dedifferenciált liposarcománál, további hat darab, az adott kettős mutációt nem hordozó dedifferenciált liposarcománál, illetve egy infantilis fibrosarcománál végeztük el. Antitest specifikus epitóp feltárást követően a deparaffinált, rehidrált szöveti multiblokk metszeteiken, illetve az egyes blokkok teljes metszetein az

immunfestés a Bond Max (Leica Biosystems, Wetzlar, Németország) automata festőgéppel történt, az alábbi antitestek alkalmazásával: pan-TRK (pan-TRK, használatra kész, EPR17341, 790-7026, Ventana, Mannheim, Németország) simaizom aktin (smooth muscle actin, 1:200 hígítást alkalmazva, 1A4, A2547, Dako, Glostrup, Dánia), dezmin (desmin, 1:200 hígítást alkalmazva, D33, M0760, Dako), AKT (Akt, 1:100 hígítást alkalmazva, C67E7, #4691, Cell Signaling Technology, Danvers, Egyesült Államok), foszfo-AKT (phospho-Akt, Thr308, 1:100 hígítást alkalmazva, C31E5E, #2965, Cell Signaling Technology), ERK (Erk1/2, 1:100 hígítást alkalmazva, #9102, Cell Signaling Technology), foszfo-ERK (phospho-Erk1/2, Thr202/Tyr204, 1:100 hígítást alkalmazva, D13.14.4.E, #4370, Cell Signaling Technology). Az elsődleges antitest kötődésének vizualizációjához a BOND Polymer Refine Detection termékcsomagot alkalmaztuk (Leica Biosystems), melyben a kromogén diamino-benzidin (DAB). Az immunreakció intenzitásának, illetve kiterjedésének értékelését két lágyszövetpatológus (Prof. Dr. Sági Zoltán és Dr. Dezső Katalin) végezte el. A pan-TRK antitesttel kivitelezett immunhisztokémiai reakciót akkor tartottuk pozitívnak, ha a tumorsejtek legalább 1%-a mutatott festődést, bármilyen mértékű, a háttérfestődést meghaladó intenzitás esetén. (38, 39) Az AKT, foszfo-AKT, ERK, foszfo-ERK antitestekkel kivitelezett immunhisztokémiai reakciók intenzitásának értékelése az alábbiak szerint történt: nem volt festődés (-), enyhe festődés (+), közepes festődés (++), erős festődés (+++); míg a kiterjedés értékelése az alábbiak szerint történt: 0% (0), 0-10% (1), 10-60% (2), 60%-100% (3). Pozitív kontrollként infantilis fibrosarcoma szolgált, míg negatív kontrollként hat darab, az adott kettős mutációt nem hordozó dedifferenciált liposarcoma.

3.3. Polimeráz láncreakció (PCR)

A teljes DNS-t formalinnal fixált, paraffinba ágyazott blokkokból izoláltuk a QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Németország) használatával, a gyártó utasításai szerint. A DNS koncentrációt a Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Egyesült Államok) segítségével mértük a Qubit™ 3 fluorométeren. Az *NTRK1-3* gének tirozin kináz domént kódoló al régióit lefedő primereket a Primer3Plus platform felhasználásával terveztük (1. táblázat). A polimeráz láncreakciót az általunk

tervezett primerek (Integrated DNA Technologies, Coralville, Egyesült Államok) és az AmpliTaq Gold™ Master Mix 360 (Thermo Fisher Scientific) alkalmazásával hajtottuk végre, a gyártó utasításai szerint, az alábbi körülmények között: az első ciklust megelőzően 95 °C-on 10 percig, majd harmincöt ciklus 95 °C-on 30 másodpercig, 57 °C-on 30 másodpercig, 72 °C-on 1 percig, majd a harmincöt ciklus leteltével 72 °C-on 7 percig. A polimeráz láncreakció során létrejött amplifikációs termékeket agaróz gélen kivitelezett gélelektroforézissel igazoltuk.

3.4. Sanger szekvenálás

A polimeráz láncreakciót az ExoSAP-IT™ (Thermo Fisher Scientific) termék segítségével végrehajtott tisztítás követte, a gyártó utasításai szerint. A ciklusszekvenálás a BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit és a BigDye™ Terminator v1.1 és v3.1 5X Sequencing Buffer (Thermo Fisher Scientific) alkalmazásával történt, a gyártó utasításai szerint, a következő körülmények között történt: az első ciklust megelőzően 95 °C-on 2 percig, majd huszonöt ciklus 95 °C-on 30 másodpercig, 51 °C-on 15 másodpercig, 60 °C-on 4 percig. Ciklusszekvenálást hajtottunk végre minden al régióban mindkét irányban, mind 'forward', mind 'reverse' irányban. A szekvenálási reakciók során létrejött termékeket Performa® DTR Gel Filtration Cartridge (Edge Biosystems, San Jose, USA) használatával tisztítottuk meg. Ezt követően a szekvenálási reakció során létrejött elegyet deionizált formamidban - 10 µl Hi-Di™ Formamide (Thermo Fisher Scientific) - szuszpendáltuk, majd a kapilláris elektroforézist 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, Egyesült Államok) készülékkel végeztük el. Az NG_007493.1, NG_012201.2 és NG_029619.1 referencia szekvenciákat használtuk a BioEdit 7.0 szoftvert által végrehajtott szekvencia-illesztés során.

1. táblázat. Az *NTRK* gének tirozin kináz domén kódoló alrégióit közrefogó primerek.

gén	exon	jelölés	forward primer	jelölés	reverse primer
NTRK1	15	F1	CTACCGTCTGACCCTGCAA	R1	CCCCTCTGTCCTGATGTGA
	16	F2	CCCCAACTCAGTCCTGTCC	R2	TGTCTATAGGGAAGGGAAGACG
	17	F3	CTCCCAGCCTATCCCCTCT	R3	GGGTGTCTACAGTTTGGATGC
	18	F4	CCCCTGGAATTGATGCAGT	R4	GAACCTGAAGGGGCATGG
	19	F5	GCCTAGTGGGCTTTCTCCTC	R5	TAGCCCAGGACATCCAGGTA
NTRK2	15	F1	TCCACATGCTTCAATTCCAA	R1	TCATGGTTAATGAGACATTCTGG
	16	F2	AGGGCCCACTGAAGTAATCC	R2	TGAACCCTCCACTCCTGAAC
	17	F3	CCCAGCTTCATTCTCCATGT	R3	GTCCCTGGGGTCTCTGATCT
	18	F4	GTGACTGATGCCTCCCTGTT	R4	AATGGATGCCTCTGGGATCT
	19	F5	GCATTGCTTTTCCTCCTGTC	R5	GGCCCTAGCCTAGAATGTCC
NTRK3	15	F1	TCCCCATCCTACAGATGTGC	R1	CTCAAATGGAGGGAGCCTCT
	16	F2	CCCCTGCCCTGTAGTTGTTA	R2	AGGGGAAGACAATCCTTGCT
	17	F3	CTCTTCTCCCCATGCTCTTG	R3	AGCTCTGTGGCTGAGTCCTG
	18	F4	GGCCTTCCTTTTCTGAGGAT	R4	TTAAAGTGTGGGACAATGAACT
	19	F5	CTGGCCATCTGGTCACTCTG	R5	TATGAGCCCTCCCCAATCA
	20	F6	AGGACCAAGGCTGAGCTTTG	R6	ATTCATGACCACCAGCCACC

3.5. Fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH)

A fluoreszcens *in situ* hibridizációt formalin fixált, paraffinba ágyazott blokkok 3 µm-es metszetein végeztük el, interfázisban lévő tumorsejtek magjain. Az elemzéshez az *NTRK1/2/3* gének kereskedelmi forgalomba hozott ZytoLight SPEC Dual Color Break Apart próbáját, a ZytoLight® SPEC MDM2/CEN 12 Dual Color Probe próbáját és a ZytoLight® SPEC CDK4/CEN 12 Dual Color Probe (ZytoVision, Bremerhaven, Németország) próbáját használtuk a kromoszómák szerkezetbeli és számbeli eltéréseinek vizsgálatára. A hibridizációt követő mosási lépések $0,4 \times \text{SSC}/0,1\%$ NP-40 oldatban 72°C -on 5 percig és $2 \times \text{SSC}/0,1\%$ NP-40 oldatban szobahőmérsékleten 5 percig történtek, majd DAPI (Vector Laboratories, Inc., Newark, Egyesült Államok) sejtmagfestést végeztünk. A fluoreszcens *in situ* hibridizáció során a vizsgált esetekből egyenként legalább 100 sejtet értékeltünk a kérdéses tumorrégióban Nikon Eclipse E600 fluoreszcens mikroszkóp segítségével. Az *NTRK* gének átrendeződését (transzlokáció, fúzió) akkor állapítottuk meg, ha a tumorsejtek legalább 20%-a mutatott az alkalmazott *NTRK* próbákkal jelszétválást ('split signal'). Poliszómiát vagy kópiaszám növekedést akkor állapítottunk meg, ha az átlagos *NTRK1/2/3* szignál kópiaszáma ≥ 3 volt. Az *MDM2* vagy *CDK4* génamplifikáció tekintetében pozitívnak tekintettük azokat az eseteket, amikor 100 megszámlált tumorsejtből legalább 20 mutatott négyenél több zöld jelet (az *MDM2* vagy *CDK4* gén kópiáinak száma) és emellett csak két narancssárga jel (centromer régió kontroll próba) volt azonosítható. A fluoreszcens *in situ* hibridizáció során látottakat egy patológus (Prof. Dr. Sági Zoltán) és egy biológus (Dr. Papp Gergő) értékelte.

3.6. Újgenerációs szekvenálás (NGS)

A genomikus DNS-t, illetve a teljes RNS-t formalin fixált, paraffinba ágyazott blokkokból származó mintákból izoláltuk a QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) és a High Pure FFPE RNS Isolation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) termékek használatával, a gyártók utasításait követve. A minták tumorsejt százalékos

arányának becslését kórszövetteni vizsgálatokkal végeztük az izolálási folyamatokat megelőzően. A DNS- és RNS-koncentrációkat a Qubit™ dsDNA HS Assay és a Qubit™ RNA HS Assay Kits (Thermo Fisher Scientific) segítségével mértük a Qubit™ 3 fluorométeren. 120 ng DNS 52 µl térfogatban történő vágását kiviteleztük (200 ciklus, csúcsteljesítmény: 75 W, terhelési tényező: 10, kezelési idő: 510 s, 7 °C alapértéken) a Covaris E220 Focused-ultrasonicator (Covaris, Woburn, Egyesült Államok) alkalmazásával. A kettős szálú DNS-fragmentumok és az RNS-molekulák méretének ellenőrzése a TapeStation 2200 (Agilent, Cheshire, Egyesült Királyság) használatával történt. Az Illumina TruSight Oncology 500 High Throughput assay könyvtár-előkészítési munkafolyamata a gyártó protokollja szerint történt. Az újgenerációs szekvenálást az Illumina NextSeq 2000 platformon hajtottuk végre, 101 ciklus páros végű szekvenálással. A bioinformatikai elemzést az Illumina TruSight Oncology 500 Local App v2.1 alkalmazással végeztük. Röviden, nyers BCL fájlokat töltöttünk le, a FASTQ generálást a bcl-convert szoftver végezte. A hg19 referenciagenomhoz való szekvenáció-illesztést a Burrows-Wheeler Aligner (BWA-MEM) végezte a SAMtools segédprogrammal együtt. Read összeesési analízist végeztünk annak érdekében, hogy eltávolítsuk az ismétlődő read-eket, amelyeket egyedi molekuláris azonosítók (UMI) jelöltek meg. Az indel átrendezést és összeillesztést a Gemini végezte. Az alacsony frekvenciában jelen lévő variánsok azonosítását a PISCES hajtotta végre, amely kimenetet a Pepe szoftverkomponens szűrte. Az Illumina Annotation Engine a COSMIC (v84), ClinVar (2019-02-04), dbSNP (v151), 1000Genomes (Phase 3 v5a), gnomAD (2.1), RefSeq és Ensembl (VEP build 91) adatait felhasználva annotálta a kisebb variánsokat. A kópiaszám variáció (copy number variation) hívást a CRAFT végezte. Az RNS-alapú analízishez minden mintát 30 millió leolvasásra csökkentettünk, majd a STAR segítségével a hg19 referencia genomhoz és a GENCODEv19 referencia transzkriptomhoz igazítottuk. A duplikátumokat a Picard duplikátumjelölő algoritmussal jelöltük, a fúziós hívást Manta végezte. A 'splice' variánsokat, a tumor mutációs terhelést és a mikroszatellita instabilitását belső fejlesztésű algoritmusok határozták meg. A további klinikai értelmezéshez a Qiagen Clinical Insight (QCI) Interpret szoftvert használtuk, amely variánsszűrést és további annotációkat alkalmaz: patogenitási pontszámok, populáció-gyakoriság, fehérjeszerkezet előrejelzések, releváns klinikai

irányelvek és terápiás lehetőségek a variánsokhoz. A genomikai adatok vizuális megjelenítésére az Integrative Genomics Viewer (IGV) programot alkalmaztuk.

3.7. A vad típusú, illetve a mutáns *NTRK1* ORF klónozása lentivirális expressziós vektorba

A humán *NTRK1* cDNS-t (GenBank hozzáférési szám: NM_002529.3) a GenScript cégtől szereztük be (CloneID: OHu24045ORF, GenScript Biotech, Piscataway, Egyesült Államok). Ezt a plazmidot helyspecifikus mutagenézissel módosítottuk, egy- és kettő pontmutációt tartalmazó vektorok létrehozására Phusion high fidelity DNS polimeráz enzim (Thermo Fisher Scientific), és az alábbi primerek felhasználásával, (NTRK1_G613_F: CTGCTGGCTGGTGGGGAGGATG; illetve NTRK1_H604_R: CTTGGCATCAGGTCCATGGGATCGGAG; valamint NTRK1_G613V_F_mut: CTGCTGGCTGTTGGGGAGGATG; továbbá NTRK1_H604Y_R_mut: CTTGGCATCAGGTCCATAGGATCGGAG). A mutációk jelenlétét a módosított plazmidklónok inzerájének Sanger szekvenálásával igazoltuk. A vad típusú és a mutált (H604Y; G613V; H604Y és G613V) *NTRK1* inzeráket PCR amplifikáltuk az alábbi 'forward' (TTTTTCTCGAGGCGATGCTGCGAGGCGG), illetve 'reverz' primerek (TTTTTCTAGACTAGCCCAGGACATCCAGGTA) és Phusion high fidelity DNS polimeráz enzim használatával. A PCR termékeket egy pLV-CMV-Puro lentivírus vektor (PMID: 20532169) XhoI és XbaI helyére építettük be hagyományos ligálással. A rekombináns lentivírus klónokban kolónia PCR-rel és XhoI-XbaI, valamint NdeI-NotI kettős emésztéssel vizsgáltuk az inzerá jelenlétét, majd pontos szekvenciájukat Sanger szekvenálással határoztuk meg, melyhez CMV min (CGCCATCCACGCTGTTTTG), NTRK1_Seq_F777 (GCCAATGTCACCAGTGACCTCCAAC) és NTRK1_Seq_F1620 (CTGAGCAGGACAAGATGCTG) szekvenáló primereket használtunk. Humán sejtek transzfekciójához a validált rekombináns lentivírus plazmidokat *E. coli* sejtekből PureLink® HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével izoláltuk, a gyártó utasításai szerint.

3.8. Lentivirus termelés és transzdukció

Az *NTRK1* variánsok lentivirális termeléséhez HEK 293T sejtek transzfekciója történt lentivirális „csomagoló” plazmidokkal és *NTRK1* p.H604Y; *NTRK1* p.G613V; *NTRK1* p.H604Y+G613V; vad típusú *NTRK1*; vagy GFP-pLV-CMV-Puro (negatív kontroll) tartalmazó plazmidokkal. A lentivirus begyűjtésére 24 és 48 órával később került sor, DMEM médiumban. A lentivirus-mediált transzdukciós kísérletekhez VH10 fibroblast, valamint VH10-hTERT immortalizált fibroblast, illetve T449 liposarcoma sejtek kerültek megfertőzésre az *NTRK1* gént tartalmazó, harmadik generációs lentivirusok által, úgy hogy a fertőzés multiplicitása (multiplicity of infection: MOI; átlagosan hány darab vírus fertőz meg egy darab sejtet) 3 volt. A transzdukció kivitelezése 8 µg/ml koncentrációjú polibrént tartalmazó DMEM médiumban történt meg. A médium kicserélésre került az infekciót követő 24. óra után. A sejtek tenyésztése 1 µg/ml koncentrációjú puromycin-dihidroklorid (Thermo Fisher Scientific) jelenlétében történt. A transzdukciót követő harmadik naptól a sejtek mosása történt legalább négy alkalommal minden egyes passzázsor és tripszin kezelés történt kétszer (két passzázs), valamint legalább öt egymást követő passzázs során puromycin szelekció került érvényesítésre.

3.9. Proliferációs vizsgálat és dózis-válasz görbék

A különböző sejtvonalakba transzdukált különböző *NTRK1* konstrukciók növekedési sebességre gyakorolt hatásának nyomon követésére a sejteket 96 lyukú lemezre oltottuk 3000 sejt/lemez mennyiségben, és 3, majd 7 nap elteltével metabolikus vizsgálatot végeztünk PrestoBlue reagens (Thermo Fisher Scientific), valamint kristályibolya (Sigma-Aldrich, St. Louis, Egyesült Államok) festés segítségével. A dózis-válasz görbe becslésekhez a következő sejtsűrűségek kerültek fel a lemezre: VH10-hTERT: 5000, T449: 5000, duplikátumban, és legalább két független oltásból történtek a mérések. Egy nappal azután, hogy az oltóközeget feltöltöttük megfelelő tápközeggel, amely vagy 250 µM és 80 nM közötti koncentrációban LOXO-101-et (larotrectinib) vagy 200 µM és 0,2 nM közötti koncentrációban LOXO-195-öt (selitrectinib) tartalmazott. Az *NTRK1*

aktiváció hatásának vizsgálatára a természetes ligand (NGF: nerve growth factor) 3 ng/ml koncentrációban történő alkalmazására került sor. A sejteket két tápközeg körülmény között teszteltük, nevezetesen: NGF hozzáadásával vagy hozzáadása nélkül. Vanoli és mtsai munkáját alapul véve (40), az első teszteléshez alkalmazott inkubációs idő 3 nap volt, majd a 7. napon ismétlés történt, majd kristályibolya festés és PrestoBlue reagens használatával mérések történtek a viábilis sejtek mennyiségének meghatározásához. Az 0,05%-os kristályibolya oldat 50 µl mennyiségének inkubációja 20 percen keresztül történt, szoba hőmérsékleten. Csapvizes lemosást, majd szárítást követően, 100%-os metanol 100 µl mennyiségének inkubációja 5 percen keresztül történt. Az optikai denzitometriás mérések 595 nm-es hullámhosszon történtek. A PrestoBlue reagens alkalmazása a gyártó útmutatása szerint történt. A PrestoBlue reagens inkubációja 30 percen keresztül történt, 37 °C-on. A fluoreszcencia méréshez alkalmazott gerjesztő fény 535-560 nm hullámhossz tartományban volt, míg az emittált fény hullámhossz tartománya 590-615 nm volt. Az összes mérés Victor PerkinElmer 2030 Explorer (Perkin Elmer) által került kivitelezésre, az adatokat Microsoft Excelbe exportáltuk további feldolgozás és normalizálás céljából, végül a dózis-válasz számításokat a Graphpad Prism szoftvereszköz segítségével végeztük.

3.10. H604Y/G613V in silico modellezése LOXO-101 jelenlétében

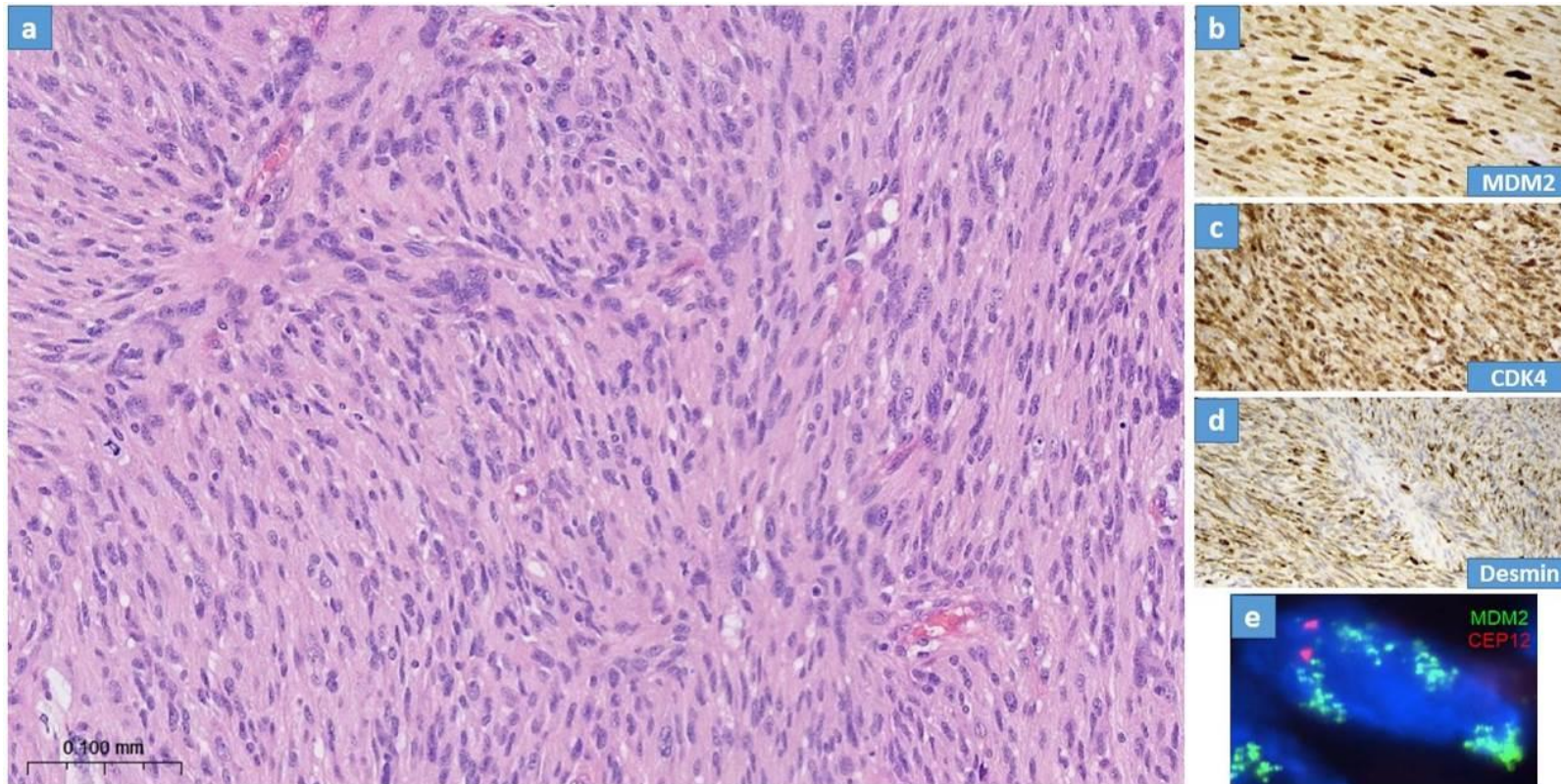
A LOXO-101 (larotrectinib) TRK inhibitor az aktív konformációjú, vad típusú TRKA fehérjeszerkezethez történő kötődésének vizsgálata történt (PDB ID: 7VKO), a Glide szoftver alkalmazásával. (41) Ezt követően a kötődési helyzet értékelése az irodalomban található kötődési helyzetekkel való összehasonlítás alapján történt. A mutált modellek (G595R; G613V; H604Y; G613V/H604Y) megalkotása a Maestro-val (2022-4 kiadás) történt a kötődési helyzetek használatával, majd ezeket energiaminimalizálásnak vetettük alá. A molekuláris dinamikai szimulációkat a Desmond szoftverben végeztük el (42), OPLS-2005 erőter alkalmazásával (43), 300 Kelvinen, konstans-hőmérséklet, konstansnyomás együttes (izotermikus, izobár ensemble; NPT) alatt. A komplexeket ortorombikus periodikus dobozba helyeztük és TIP3P vízmolekulákkal szolvatáltuk. A rendszereket ellenionok hozzáadásával semlegesítettük, és további ionokat vittünk be,

hogy elérjük a 150 mM sókoncentrációt. Mindegyik rendszerénél 50 ns-os kiegyenlítő futást végeztünk, majd molekuláris dinamikai szimulációkat végeztünk 300 ns-on keresztül, háromszor. A pályákat a Desmond Simulation Event Analysis és a pályagörbe vizualizáció segítségével elemeztük. Az ábrák PyMOL Molecular Graphics System (Schrödinger LLC, 2015, 2.0 verzió) segítségével készültek.

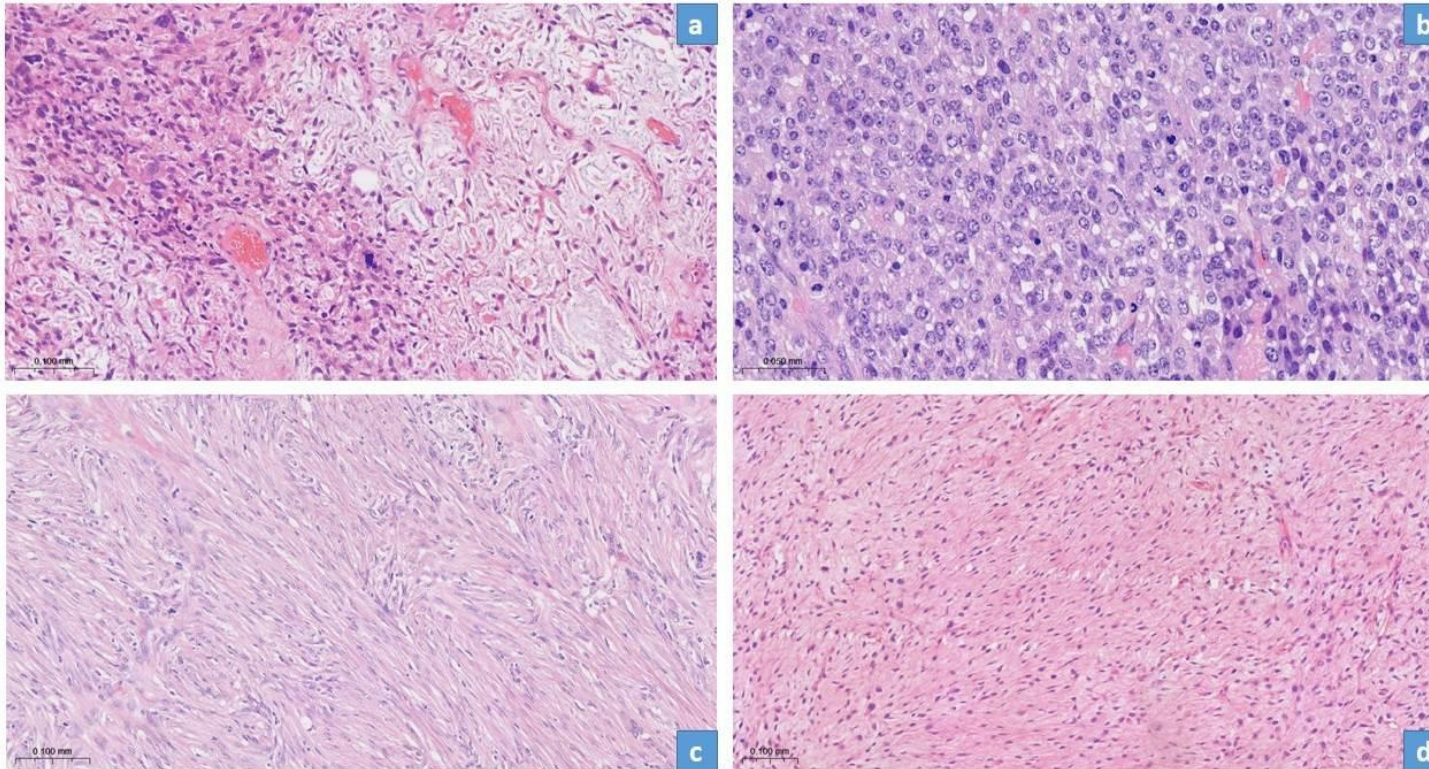
4. Eredmények

4.1. Kórszövetten és klinikai eredmények

A dedifferenciált liposarcoma diagnózisának felállítása a karakterisztikus kórszövetten eltéréseken (atípusos lipomatózus tumort tartalmazó területek dedifferenciált területekkel), továbbá az MDM2 és/vagy CDK4 immunhisztokémiai reakciók pozitívitasán alapult. Minden olyan esetben, amikor az immunhisztokémiai reakció eredménye nem volt egyértelmű, FISH vizsgálatot végeztünk MDM2 és/vagy CDK4 próbák alkalmazásával az *MDM2* és/vagy *CDK4* amplifikáció igazolására. A vizsgálatunkba bevont, dedifferenciált liposarcomával diagnosztizált betegek medián életkora 65 év (szórás: 12,1, tartomány: 30-90 év) volt, a férfi:nő arány 1,3 (74:57). A miogén differenciáció meglétét igazolandó simaizom aktin és/vagy dezmin immunhisztokémiai vizsgálatokat hajtottunk végre. A reprezentatív diagnosztikai jellemzők az 2. ábrán vannak feltüntetve. Különböző, változatos kórszövetten mintázatok is felismerésre kerültek a fénymikroszkópos vizsgálat során, például differenciálatlan pleomorph sarcoma és egyéb alacsony vagy magas grádusú (low-grade vagy high-grade) sarcoma-szerű területek (3. ábra). A diagnózis felállításához szükséges alapvető klinikai adatokat és immunhisztokémiai eredményeket az 2. táblázat tartalmazza.



2. ábra. Egy reprezentatív dedifferenciált liposarcoma eset a legfontosabb hisztopatológiai jellemzőivel. a) A HE-festett (hematoxin-eozin) metszeten atípusos, pleiomorf, orsó alakú, rövid kötegekbe rendeződő tumorsejtek láthatók. b) Az MDM2 immunfestés diffúz, erős pozitívítást mutat (200x nagyítás). c) A CDK4 immunfestés diffúz, erős pozitívítást mutat (200x nagyítás). d) A dezmin immunfestés pozitív eredménye igazolja a miogén fenotípust (100x nagyítás). e) A FISH vizsgálat igazolja az *MDM2* gén amplifikációját (MDM2 zöld szignál, CEP12 vörös szignál).



3. ábra. High-grade (a, b) és low-grade (c, d) dedifferenciált liposarcomák hisztológiai mintázatai (HE-festés). a) Nagy, bizarr, pleiomorf tumorsejtek, szklerotikus, kissé myxoid stromában, enyhe krónikus gyulladással. Az atípusos mitotikus alakok könnyedén észrevehetőek. b) Anaplasztikus jelleget mutató tumor, kereksejtes morfológiával, magas mitotikus aktivitással. c) Nem túlságosan sejtdús tumor, melyet orsó alakú sejtek kötegei alkotnak, kissé szklerotikus stromában. A tumorsejtek magja megnyúlt, a citológiai atípiát enyhe, a mitotikus aktivitás alacsony. d) Sejtszegény tumor, kollagéndús stromával. A tumorsejtek magja megnyúlt, a citológiai atípiát enyhe, a mitotikus aktivitás alacsony. Megfigyelhető néhány plexiform ér is.

2. táblázat. Az összegyűjtött 131 dedifferenciált liposarcoma legfontosabb klinikopatológiai adatainak összefoglalása. Az SMA (simaizom aktin) és/vagy a dezmin immunhisztokémiai vizsgálatok pozitív eredménye igazolja a daganat myogén differenciációját. A dedifferenciált liposarcoma diagnózisához szükséges az MDM2 és/vagy a CDK4 immunhisztokémiai reakció pozitivitása. Egyes esetekben az *MDM2* vagy a *CDK4* gének amplifikációjának kimutatása is megtörtént FISH vizsgálat segítségével. A legtöbb dedifferenciált liposarcoma magas grádusú, ún. „high grade”. (Ahogyan az a nemzetközi adatok alapján is ismert, a leggyakoribb lokalizációja a daganatnak a retroperitoneum, mely megfigyelést a mi adataink is alátámasztják.)

azonosító	kor/nem	lokalizáció	immunhisztokémia				FISH		grádus
			SMA	dezmin	MDM2	CDK4	MDM2	CDK4	
1	45/nő	jobb láb	pozitív	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
2	70/nő	retroperitoneum	pozitív	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
3	69/férfi	retroperitoneum	pozitív	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
4	47/nő	retroperitoneum	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
5	62/férfi	retroperitoneum	negatív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
6	67/férfi	retroperitoneum	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high

7	54/férfi	hát	negatív	pozitív	pozitív	negatív	nem elérhető	nem elérhető	high
8	62/nő	retroperitoneum	pozitív	negatív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
9	63/férfi	jobb láb	pozitív	nem elérhető	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
10	60/férfi	retroperitoneum	pozitív	negatív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	low
11	58/férfi	mesenterium	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
12	61/férfi	medence	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
13	66/nő	retroperitoneum	pozitív	nem elérhető	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
14	49/nő	mellkas	pozitív	negatív	pozitív	pozitív	amplifikált	nem elérhető	high
15	48/férfi	jobb láb	negatív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
16	77/férfi	jobb láb	nem elérhető	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
17	60/férfi	retroperitoneum	negatív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
18	65/férfi	bal kar	nem elérhető	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
19	31/nő	retroperitoneum	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high

20	39/nő	retroperitoneum	nem elérhető	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
21	83/nő	retroperitoneum	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
22	77/férfi	retroperitoneum	nem elérhető	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
23	84/férfi	has	negatív	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
24	75/férfi	mediastinum	pozitív	nem elérhető	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
25	74/férfi	scrotum	pozitív	nem elérhető	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
26	71/nő	bal láb	negatív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
27	58/férfi	scrotum	nem elérhető	pozitív	pozitív	negatív	nem elérhető	nem elérhető	high
28	63/nő	retroperitoneum	pozitív	negatív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
29	56/nő	retroperitoneum	pozitív	negatív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
30	81/nő	retroperitoneum	pozitív	negatív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
31	69/férfi	retroperitoneum	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
32	55/férfi	retroperitoneum	pozitív	negatív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high

33	52/nő	retroperitoneum	pozitív	negatív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
34	68/férfi	retroperitoneum	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	amplifikált	nem elérhető	high
35	67/férfi	retroperitoneum	pozitív	negatív	pozitív	nem elérhető	amplifikált	nem elérhető	high
36	75/nő	retroperitoneum	pozitív	negatív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
37	67/férfi	mesenterium	pozitív	nem elérhető	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
38	63/nő	retroperitoneum	pozitív	negatív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
39	87/férfi	has	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
40	78/nő	has	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
41	59/nő	medence	pozitív	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
42	62/nő	retroperitoneum	negatív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
43	52/férfi	jobb láb	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
44	77/nő	bal mell	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
45	63/férfi	mellkas	pozitív	negatív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high

46	69/férfi	has	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
47	74/férfi	retroperitoneum	pozitív	negatív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
48	62/nő	retroperitoneum	pozitív	nem elérhető	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
49	74/nő	gyomor	pozitív	negatív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
50	79/nő	retroperitoneum	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
51	30/nő	retroperitoneum	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
52	65/nő	jobb láb	pozitív	nem elérhető	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
53	59/nő	retroperitoneum	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
54	64/férfi	mellkas	negatív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	low
55	58/férfi	retroperitoneum	pozitív	nem elérhető	pozitív	nem elérhető	amplifikált	nem elérhető	high
56	80/férfi	retroperitoneum	pozitív	negatív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
57	76/nő	retroperitoneum	negatív	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
58	70/férfi	jobb láb	pozitív	nem elérhető	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high

59	75/férfi	mesenterium	pozitív	negatív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
60	70/férfi	retroperitoneum	pozitív	negatív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
61	58/férfi	retroperitoneum	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
62	55/férfi	jobb láb	pozitív	negatív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
63	68/nő	bal láb	negatív	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
64	83/nő	retroperitoneum	negatív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
65	70/férfi	mellkas	pozitív	negatív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
66	57/férfi	has	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
67	47/nő	medence	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
68	52/férfi	retroperitoneum	pozitív	negatív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
69	65/férfi	retroperitoneum	pozitív	negatív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
70	44/férfi	scrotum	pozitív	nem elérhető	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
71	72/férfi	mellkas	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high

72	71/férfi	retroperitoneum	negatív	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
73	70/nő	retroperitoneum	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
74	65/nő	axilla	negatív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
75	57/férfi	retroperitoneum	negatív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
76	67/férfi	scrotum	negatív	pozitív	pozitív	pozitív	amplifikált	amplifikált	high
77	65/nő	has	pozitív	nem elérhető	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
78	66/nő	retroperitoneum	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
79	73/férfi	retroperitoneum	pozitív	nem elérhető	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
80	69/férfi	has	pozitív	negatív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
81	70/férfi	retroperitoneum	pozitív	negatív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
82	62/nő	has	pozitív	negatív	pozitív	nem elérhető	amplifikált	nem elérhető	high
83	90/férfi	retroperitoneum	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
84	88/férfi	retroperitoneum	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	amplifikált	nem elérhető	high

85	42/nő	bal láb	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
86	69/nő	retroperitoneum	pozitív	negatív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
87	62/férfi	retroperitoneum	pozitív	negatív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
88	46/férfi	scrotum	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	amplifikált	nem elérhető	high
89	54/nő	jobb láb	negatív	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
90	78/nő	retroperitoneum	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
91	67/nő	jobb láb	negatív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
92	64/férfi	retroperitoneum	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
93	62/nő	has	pozitív	negatív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
94	49/férfi	scrotum	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
95	80/férfi	jobb láb	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
96	74/férfi	retroperitoneum	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
97	72/férfi	mellkas	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high

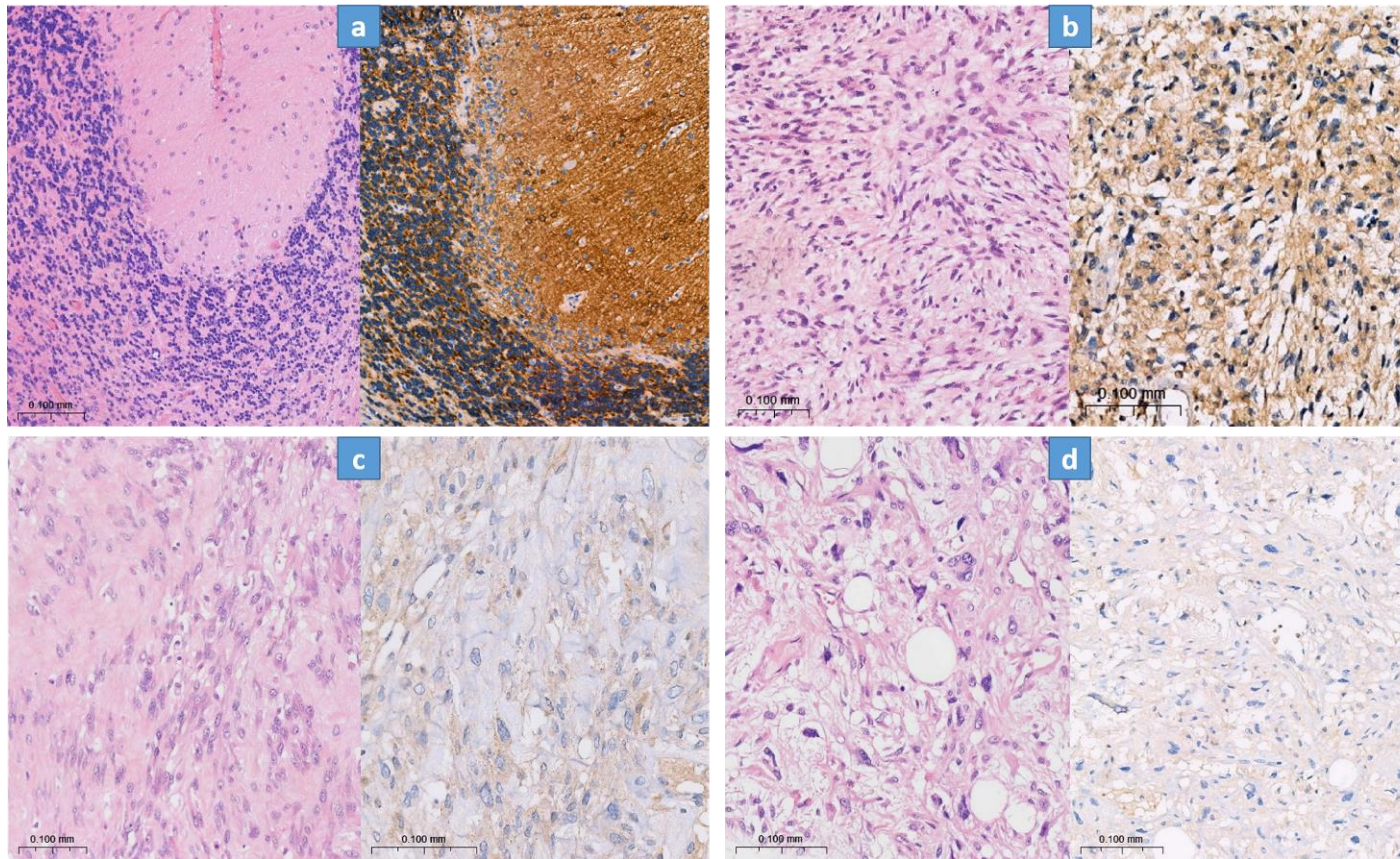
98	42/férfi	bal láb	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	low
99	80/nő	retroperitoneum	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	amplifikált	nem elérhető	high
100	57/nő	jobb láb	pozitív	nem elérhető	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
101	58/férfi	scrotum	pozitív	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
102	74/nő	mellkas	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	amplifikált	amplifikált	high
103	66/férfi	jobb láb	pozitív	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
104	76/férfi	has	pozitív	negatív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
105	83/nő	bal láb	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
106	63/nő	retroperitoneum	negatív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
107	63/férfi	jobb láb	pozitív	negatív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
108	73/nő	has	pozitív	nem elérhető	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
109	50/férfi	scrotum	pozitív	nem elérhető	pozitív	nem elérhető	amplifikált	nem elérhető	low
110	38/nő	retroperitoneum	pozitív	negatív	pozitív	pozitív	amplifikált	amplifikált	high

111	67/férfi	retroperitoneum	pozitív	nem elérhető	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	low
112	83/férfi	medence	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
113	59/férfi	has	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
114	78/nő	retroperitoneum	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
115	59/férfi	nyak	pozitív	negatív	pozitív	nem elérhető	amplifikált	nem elérhető	high
116	55/férfi	medence	pozitív	negatív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
117	64/nő	mell	pozitív	negatív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
118	46/nő	hát	pozitív	nem elérhető	pozitív	nem elérhető	amplifikált	nem elérhető	high
119	61/férfi	jobb láb	negatív	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
120	66/nő	bal láb	pozitív	pozitív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high
121	84/férfi	retroperitoneum	pozitív	negatív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
122	42/nő	jobb láb	pozitív	negatív	pozitív	pozitív	amplifikált	nem elérhető	high
123	46/férfi	bal láb	pozitív	pozitív	negatív	nem elérhető	nem amplifikált	amplifikált	high

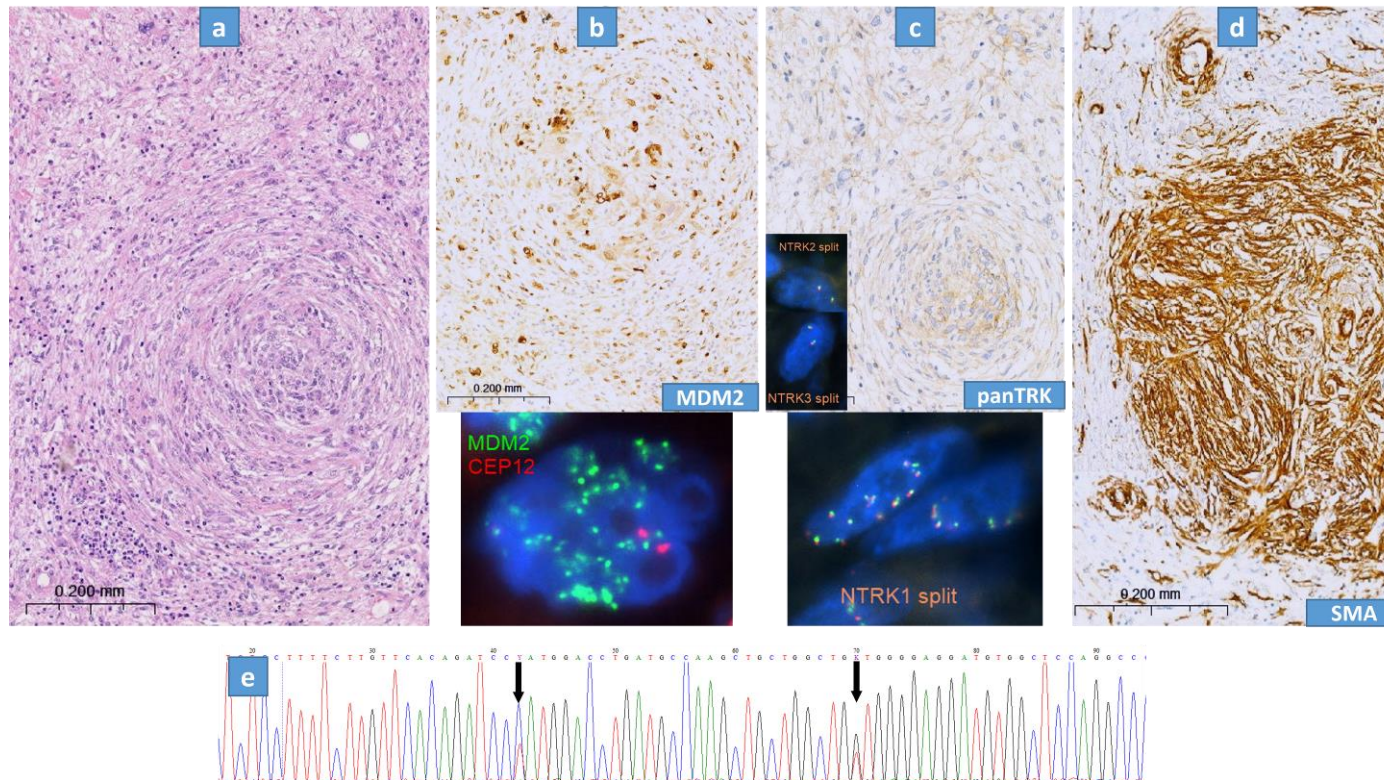
124	69/férfi	retroperitoneum	pozitív	nem elérhető	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	low
125	71/nő	retroperitoneum	pozitív	pozitív	pozitív	pozitív	amplifikált	nem elérhető	high
126	47/férfi	bal láb	nem elérhető	pozitív	pozitív	pozitív	amplifikált	nem elérhető	high
127	69/nő	jobb láb	pozitív	pozitív	pozitív	pozitív	amplifikált	nem elérhető	high
128	60/férfi	retroperitoneum	pozitív	nem elérhető	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető	high
129	82/nő	retroperitoneum	pozitív	nem elérhető	negatív	pozitív	amplifikált	amplifikált	high
130	80/férfi	fej	pozitív	negatív	pozitív	pozitív	amplifikált	amplifikált	high
131	58/nő	retroperitoneum	pozitív	negatív	pozitív	pozitív	nem elérhető	nem elérhető	high

4.2. Az NTRK gének expressziója gyakori dedifferenciált liposarcomában

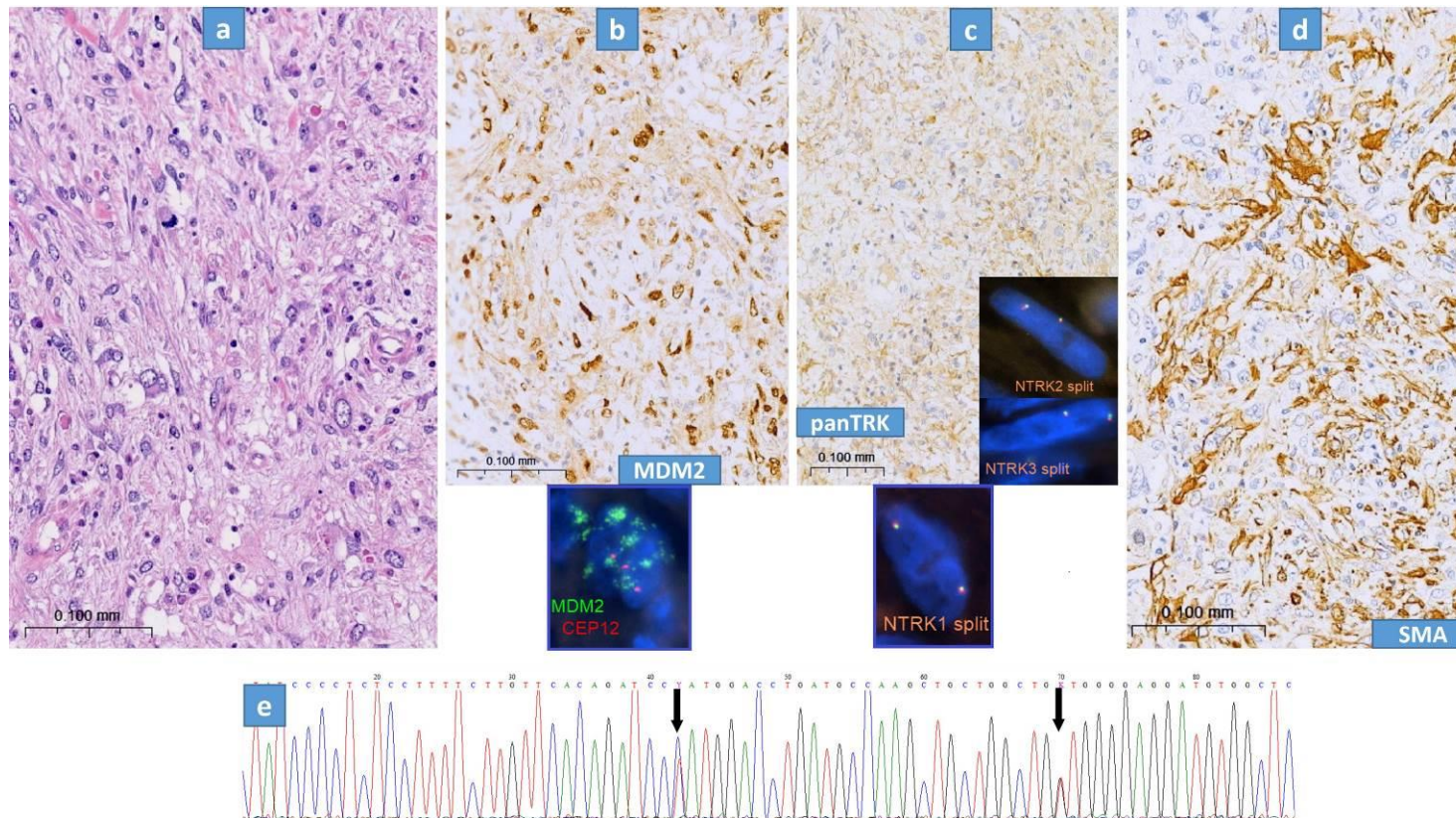
A 131 dedifferenciált liposarcomából 116 esetben sikerült a pan-TRK immunhisztokémiai reakciót elvégezni. Sajnálatosan, 15 minta értékelhetetlennek bizonyult a szöveti multiblokkokból származó metszeteken, technikai nehézségek miatt (a kifejezetten apró biopsziás minták nem voltak érdemben vizsgálhatók). A 116 sikeresen kivitelezett esetből 75 esetben volt pozitív immunreakció detektálható. Az immunreakciók erőssége és kiterjedése széles tartományban mozgott (4. ábra, 5. ábra, 6. ábra). 38 esetben mutatott a daganatsejtek legalább 50%-a a háttérfestődésnél intenzívebb, legalább minimális erősségű immunpozitivitást. 14 esetben legalább közepes erősségű (++) immunreakció volt azonosítható, mitöbb, 4 esetben közép-erős (++/+++)¹ vagy erős (+++) festődési intenzitás volt megfigyelhető (3. táblázat, 4. táblázat).



4. ábra. HE-festés és pan-TRK immunhisztokémia különböző dedifferenciált liposarcoma esetekben. a) Kisagyszövet szolgált pozitív kontrollként. b), c), d) A megvizsgált dedifferenciált liposarcomák különböző pan-TRK expressziót mutattak. b) A storiform mintázatot mutató orsósejtes tumor erős, diffúz immunfestést mutat. c) A szklerotikus stromában elhelyezkedő pleiomorf, atípusos tumorsejtek közepes erősségű reakciót mutatnak. d) Fokális, enyhe erősségű immunreakció látható ezen a pleiomorf területen.



5. ábra. Egy reprezentatív dedifferenciált liposarcoma eset (azonosító: 84). a) A HE-festett metszeten örvényes mintázatot mutató orsósejtes sarcoma látható, krónikus gyulladásos infiltrátum kíséretében. b) Az MDM2 immunfestés közepes erősségű, a FISH vizsgálat igazolta az *MDM2* gén amplifikációját. c) A tumorsejtek diffúz, enyhe citoplazmatikus pan-TRK pozitivitást mutatnak. FISH vizsgálatnál *NTRK1-2-3* fúzió nincs jelen, viszont *NTRK1* amplifikáció mutatkozik. d) Diffúz, erős citoplazmatikus SMA immunfestés látható. e) A Sanger szekvenogramon az *NTRK1* gén c.1810C>T és c.1838G>T báziscseréi láthatók, melyek mint misszensz mutációk aminosavcserékhez (p.H604Y, p.G613V) vezetnek.



6. ábra. Egy reprezentatív dedifferenciált liposarcoma eset (azonosító: 14). a) A HE-festett metszeten laza kötegekbe rendeződő pleiomorf tumorsejtek láthatók, enyhe krónikus gyulladásos infiltrátum kíséretében. Néhány mitosis is azonosítható. b) Az MDM2 immunfestés kifejezetten erős, a FISH vizsgálat igazolta az *MDM2* gén amplifikációját. c) A tumorsejtek diffúz, közepes erősségű citoplazmatikus pan-TRK pozitivitást mutatnak. FISH vizsgálatnál *NTRK1-2-3* fúzió nincs jelen. d) Diffúz, erős citoplazmatikus SMA immunfestés látható. e) A Sanger szekvenogramon ugyanaz látszik, mint az 5. ábrán, azaz az *NTRK1* gén c.1810C>T és c.1838G>T báziscseréi.

3. táblázat. Pan-TRK antitesttel végzett immunhisztokémiai reakciók eredménye. Az immunerősség megállapításához hatosztatú skálát használtunk (0, +, +/++, ++, +/+++, +++). Az immunreakció kiterjedését az érintett sejtek %-os arányában adtuk meg 0% és 100% között. Az alább felsorolt mintákban került azonosításra a kettős egy pont mutáció (*NTRK1* c.1810C>T, *NTRK1* c.1838G>T) Sanger szekvenálás alkalmazásával: 14, 84, 88, 109, 125, 127.

azonosító	első mintavételi terület		második mintavételi terület	
	kiterjedés (%)	erősség	kiterjedés (%)	erősség
1	0	-	túl kevés minta	túl kevés minta
2	sikertelen	sikertelen	sikertelen	sikertelen
3	30	+	20	+
4	sikertelen	sikertelen	sikertelen	sikertelen
5	sikertelen	sikertelen	sikertelen	sikertelen
6	sikertelen	sikertelen	sikertelen	sikertelen
7	80	+	60	+
8	80	+/++	40	+/++
9	70	+	70	++
10	0	-	sikertelen	sikertelen
11	80	++	70	+/++
12	sikertelen	sikertelen	sikertelen	sikertelen

13	30	+	0	-
14	100	++/+++	100	++/+++
15	50	+/>++	30	+
16	0	-	0	-
17	0	-	0	-
18	40	+	40	+
19	0	-	0	-
20	40	+	70	+
21	40	+	0	-
22	40	+	40	+
23	100	+	70	+
24	100	+	sikertelen	sikertelen
25	0	-	0	-
26	0	-	0	-
27	100	+	100	+
28	100	+	100	+
29	100	+++	100	+++
30	100	++	100	++
31	100	+	sikertelen	sikertelen

32	sikertelen	sikertelen	sikertelen	sikertelen
33	100	+	100	+
34	sikertelen	sikertelen	sikertelen	sikertelen
35	100	+	100	+
36	sikertelen	sikertelen	sikertelen	sikertelen
37	5	+	sikertelen	sikertelen
38	sikertelen	sikertelen	sikertelen	sikertelen
39	sikertelen	sikertelen	sikertelen	sikertelen
40	100	+	100	+
41	sikertelen	sikertelen	sikertelen	sikertelen
42	sikertelen	sikertelen	sikertelen	sikertelen
43	0	-	0	-
44	100	+	100	+
45	100	+	100	+
46	20	+	20	+
47	0	-	0	-
48	100	+	100	+
49	0	-	0	-
50	15	+	15	+

51	100	+ / ++	100	+ / ++
52	sikertelen	sikertelen	túl kevés minta	túl kevés minta
53	5	+	túl kevés minta	túl kevés minta
54	0	-	0	-
55	0	-	0	-
56	0	-	0	-
57	0	-	0	-
58	0	-	0	-
59	0	-	0	-
60	0	-	0	-
61	0	-	0	-
62	0	-	0	-
63	0	-	0	-
64	0	-	túl kevés minta	túl kevés minta
65	0	-	sikertelen	sikertelen
66	0	-	0	-
67	0	-	0	-
68	5	+	5	+
69	10	+	10	+

70	0	-	0	-
71	0	-	0	-
72	5	+	5	+
73	50	+	50	+
74	0	-	túl kevés minta	túl kevés minta
75	sikertelen	sikertelen	túl kevés minta	túl kevés minta
76	20	+	20	+
77	5	+	5	+
78	0	-	0	-
79	25	+	sikertelen	sikertelen
80	50	++	túl kevés minta	túl kevés minta
81	sikertelen	sikertelen	túl kevés minta	túl kevés minta
82	5	+	5	+
83	70	++	70	++
84	100	+	100	+
85	75	+ / ++	75	+ / ++
86	100	+	100	+
87	15	+	15	+
88	5	+++	5	+++

89	100	+	100	+
90	0	-	0	-
91	10	+	5	+
92	0	-	0	-
93	10	+	30	+
94	10	+	5	+
95	60	+/>++	60	+/>++
96	40	+	50	+
97	70	+	80	++
98	0	-	túl kevés minta	túl kevés minta
99	40	+/>++	40	+/>++
100	0	-	0	-
101	10	+	30	+
102	10	+	30	+
103	5	+	0	-
104	értékelhetetlen	+	túl kevés minta	túl kevés minta
105	10	+	50	+
106	értékelhetetlen	+	túl kevés minta	túl kevés minta
107	0	-	túl kevés minta	túl kevés minta

108	0	-	0	-
109	5	+	2	+
110	0	-	0	-
111	0	-	0	-
112	100	++	100	++
113	100	+++	100	+++
114	0	-	0	-
115	100	+	100	+
116	5	+	5	+
117	5	+	5	+
118	0	-	0	-
119	40	+	40	+
120	20	+	20	+
121	10	+	10	+
122	10	++	10	++
123	40	+ / ++	40	+ / ++
124	0	-	0	-
125	60	++	100	+
126	5	+	5	+

127	5	+	5	+
128	0	-	0	-
129	100	+	100	+
130	0	-	0	-
131	100	+	10	++

4.3. Rekurrens *NTRK1* gén variánsok dedifferenciált liposarcomában

A pan-TRK immunpozitivitást mutató esetek (75) közül 46 esetben végeztük el az *NTRK1-3* gének tirozin kináz doménjét kódoló régióinak Sanger szekvenálását. Sajnálatosan, a maradék 29 esetben vagy nem állt rendelkezésre már elegendő mennyiségű minta a Sanger szekvenálás elvégzéséhez vagy az izolált DNS minősége nem volt megfelelő vagy a Sanger szekvenálás eredménye nem volt egyértelműen értékelhető. Az *NTRK3* gén tirozin kináz domént kódoló régiójában nem azonosítottunk semmilyen eltérést sem. Az *NTRK1* és *NTRK2* gének esetében szinonim egy pontmutációk (synonymous single nucleotide variant) voltak jelen, továbbá, mindezidáig dedifferenciált liposarcomában nem leírt misszensz mutációk (missense mutation) is detektálásra kerültek az *NTRK1* génben 6 esetben is (4. táblázat, 5. táblázat). Mind a hat esetben pontosan ugyanaz a misszensz mutáció pár (*NTRK1* c.1810C>T, p.H604Y; *NTRK1* c.1838G>T, p.G613V) került azonosításra (5. ábra, 6. ábra, 4. táblázat). Ezen kettős egy pontmutációt tartalmazó 6 eset egészséges, tumormentes szövetmintáit is megvizsgáltuk Sanger szekvenálással. Négy esetben az egy pontmutáció pár nem volt jelen az egészséges, tumormentes szövetmintákban (7. ábra). Sajnálatos módon, a további kettő esetben nem állt rendelkezésünkre egészséges, tumormentes szövetminta.

4. táblázat. A hat kettős egypontmutációt hordozó eset legfontosabb jellemzőit összefoglaló táblázata. A * jelölés a táblázatban az *NTRK1* génben igazolt két egypontmutációra (c.1810C>T, c.1838G>T) vonatkozik. A két egypontmutációt az NGS is kimutatta. A pan-TRK antitesttel végzett reakciók intenzitásukat és kiterjedésüket tekintve igen változatos eredményeket mutatnak. Az NTRK1, NTRK2, NTRK3 break-apart FISH próbák negatívak, azaz nincs transzlokáció ezen géneket illetően, így a pan-TRK immunpozitivitás oka nem *NTRK* fúzió.

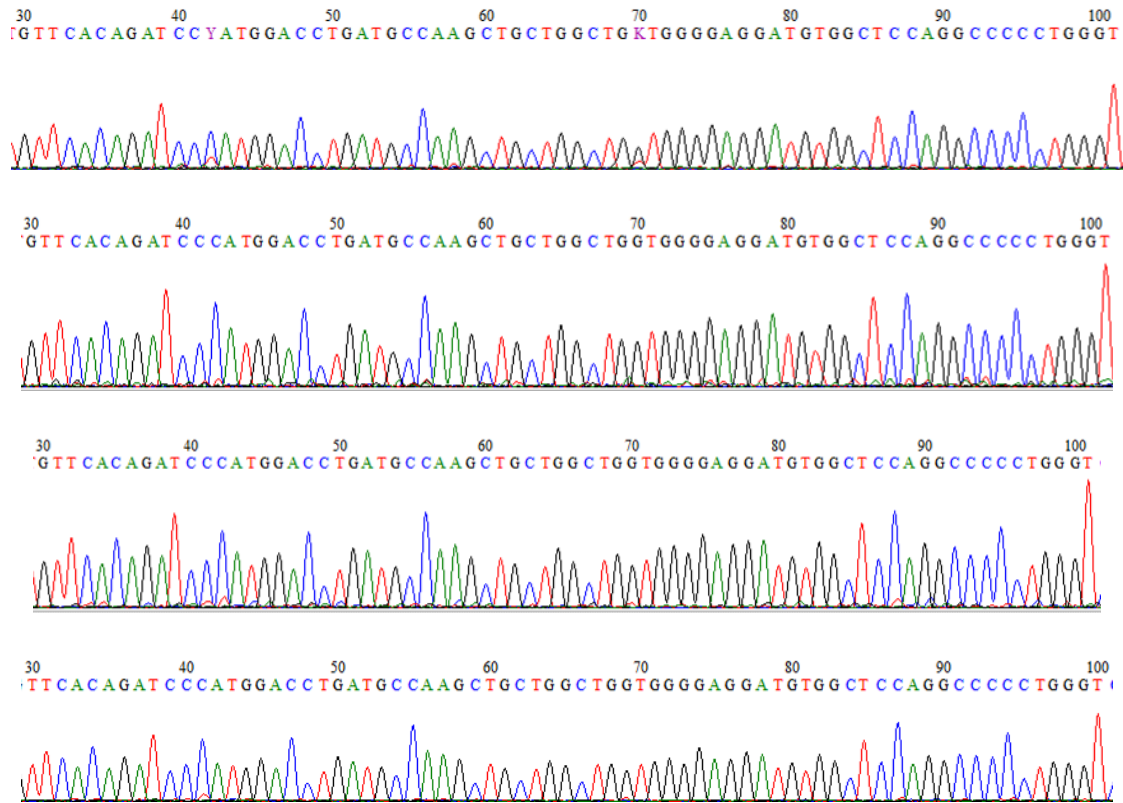
azonosító	kor/nem	grádus	immunhisztokémia			FISH				NGS		
			SMA	dezmin	pan-TRK	MDM2	NTRK1 break-apart	NTRK2 break-apart	NTRK3 break-apart	Sanger szekvenálás	kettős mutáció	MDM2 amplifikáció
14	49/nő	high	pozitív	negatív	100%, ++/+++	amplifikált	nincs jelszétválás	nincs jelszétválás	nincs jelszétválás	kettős mutáció*	azonosított	azonosított
84	88/férfi	high	pozitív	pozitív	100%, +	amplifikált	amplifikált, nincs jelszétválás	nincs jelszétválás	nincs jelszétválás	kettős mutáció*	azonosított	azonosított
88	46/férfi	high	pozitív	-	5%, +++	amplifikált	amplifikált, nincs jelszétválás	nincs jelszétválás	nincs jelszétválás	kettős mutáció*	azonosított	azonosított
109	40/férfi	low	pozitív	-	5%, +	amplifikált	nincs jelszétválás	nincs jelszétválás	nincs jelszétválás	kettős mutáció*	azonosított	azonosított
125	71/nő	high	pozitív	pozitív	60%, ++	amplifikált	amplifikált, nincs jelszétválás	nincs jelszétválás	nincs jelszétválás	kettős mutáció*	azonosított	azonosított
127	69/nő	high	pozitív	pozitív	5%, +	amplifikált	nincs jelszétválás	nincs jelszétválás	nincs jelszétválás	kettős mutáció*	azonosított	azonosított

5. táblázat. Az *NTRK1* gén tirozin kináz doménjét kódoló régióinak vizsgálata Sanger szekvenálással. Piros színnel jelölve az aminosavcserével járó egy pontmutációk. A Sanger szekvenálásra alkalmas 46 pan-TRK immunpozitív esetből 6 mintában volt jelen aminosavcserével járó génelterés. Mind a hat esetben pontosan ugyanaz a kettő egy pontmutáció van jelen. (Az *NTRK2* és *NTRK3* gének azonos régióiban nem került detektálásra említésre méltó génelterés.)

NTRK1	a primerpárok által lefedett régiók				
azonosító	F1R1	F2R2	F3R3	F4R4	F5R5
3	-	-	1887C>T	-	-
7	-	-	1887C>T	-	-
8	-	-	1887C>T	-	-
9	-	-	1887C>T	-	-
11	-	-	1887C>T	-	-
13	-	-	1887C>T	-	-
14	-	1674G>A	1810C>T 1838G>T 1887C>T	-	-
20	-	-	1887C>T	-	-
22	-	-	1887C>T	-	-
23	-	1674G>A	-	-	-
27	-	-	1887C>T	-	-
29	-	-	1887C>T	-	-
30	-	-	1887C>T	-	-
31	-	1674G>A	1887C>T	-	-

35	-	-	1887C>T	-	-
40	-	-	1887C>T	-	-
44	-	1674G>A	1887C>T	-	-
45	-	-	1887C>T	-	-
48	-	1674G>A	1887C>T	-	-
51	-	-	1887C>T	-	-
52	-	1674G>A	-	-	-
69	-	-	1887C>T	-	-
79	-	-	1887C>T 1920C>T	-	-
84	-	1674G>A	1810C>T 1838G>T 1887C>T	-	-
85	-	-	1887C>T	-	-
86	-	-	-	-	-
88	-	1674G>A	1810C>T 1838G>T 1887C>T	-	-
94	-	-	-	-	-
96	-	-	1887C>T	-	-
99	-	-	1887C>T	-	-
109	-	1674G>A	1810C>T 1838G>T 1887C>T	-	-
112	-	-	1887C>T	-	-

113	-	-	1887C>T	-	-
115	-	1674G>A	1887C>T	-	-
116	-	-	-	-	-
117	-	1674G>A	-	-	-
119	-	-	1887C>T	-	-
120	-	-	1887C>T	-	-
121	-	1674G>A	1887C>T	-	-
122	-	-	1887C>T	-	-
123	-	-	1887C>T	-	-
125	-	1674G>A	1810C>T 1838G>T 1887C>T	-	-
126	-	-	1887C>T	-	-
127	-	1674G>A	1810C>T 1838G>T 1887C>T	-	-
129	-	-	1887C>T	-	-
131	-	-	1887C>T	-	-



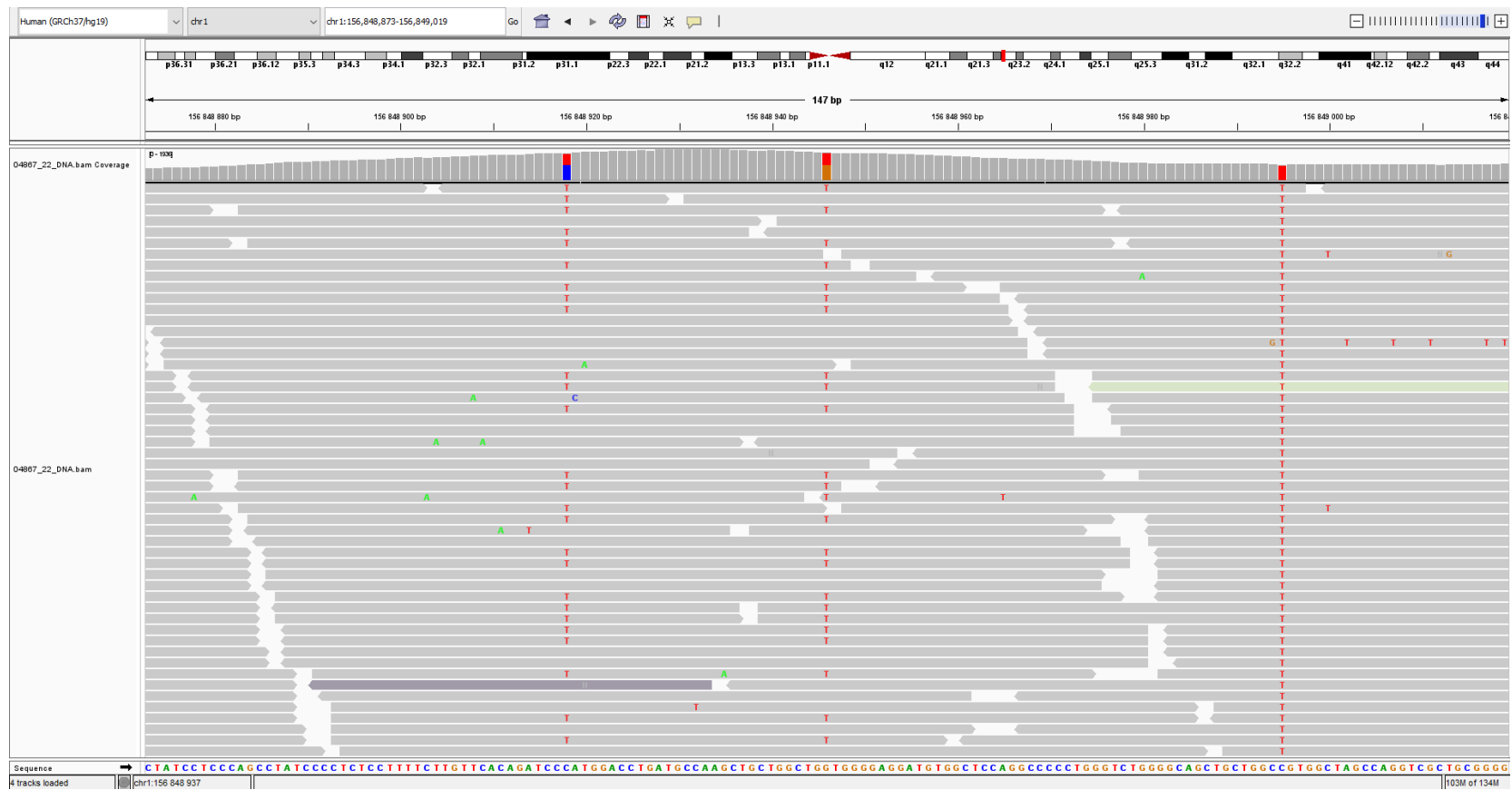
7. ábra. A kettős egy pontmutációt hordozó esetek normál, tumormentes szöveteinek Sanger szekvenogramjai az *NTRK1* gén azonos régióiról. A 6 mutált esetből csak 4 esetben volt elérhető megfelelő, tumormentes minta. A 14-es azonosítóval jelölt minta tumoros szövetrészeket is tartalmazott. (A négy különböző Sanger szekvenogramhoz tartozó azonosítók, rendre: 14, 84, 88, 109.)

A strukturális génátrendeződés lehetőségének kizárása végett *NTRK1-3* break-apart FISH vizsgálatokat végeztünk a kettős egy pontmutációt mutató 6 esetben, egyértelmű negatív eredménnyel, ugyanis jelszétválás nem volt azonosítható (5. ábra, 6. ábra, 4. táblázat). Meglepő módon, 3 esetben is erőteljes *NTRK1* amplifikáció volt megfigyelhető. Ezen esetekben a pan-TRK immunfestés, illetve az *NTRK1* amplifikáció jól korrelált egymással. (5. ábra, 4. táblázat).

Ezt követően, a mutációpárt hordozó 6 eset újgenerációs szekvenálása történt az Illumina TruSight Oncology 500 segítségével, mely mindhárom *NTRK* gént tartalmazza. Ahogyan az várható volt, az *NTRK1* egypontmutáció pár mind a hat esetben detektálásra került. Továbbá, semmilyen egyéb rekurrens mutáció nem volt azonosítható ezeken kívül. Figyelembe véve a tumorsejt arányt a vizsgált mintákban, illetve a megfigyelt allél frekvenciákat, kijelenthető, hogy 4 eset homozigóta mindkét mutációra, míg a további 2 eset heterozigóta mindkét mutációra. Mitöbb, a genomikus adatok vizualizációja alapján megállapítható, hogy a két egypontmutáció *cis* pozícióban van, tekintettel arra, hogy a két mutáció szinte mindig ugyanazon a read-eken helyezkedik el (8. ábra).

4.4. Az AKT útvonal aktív az *NTRK1* mutáns esetekben

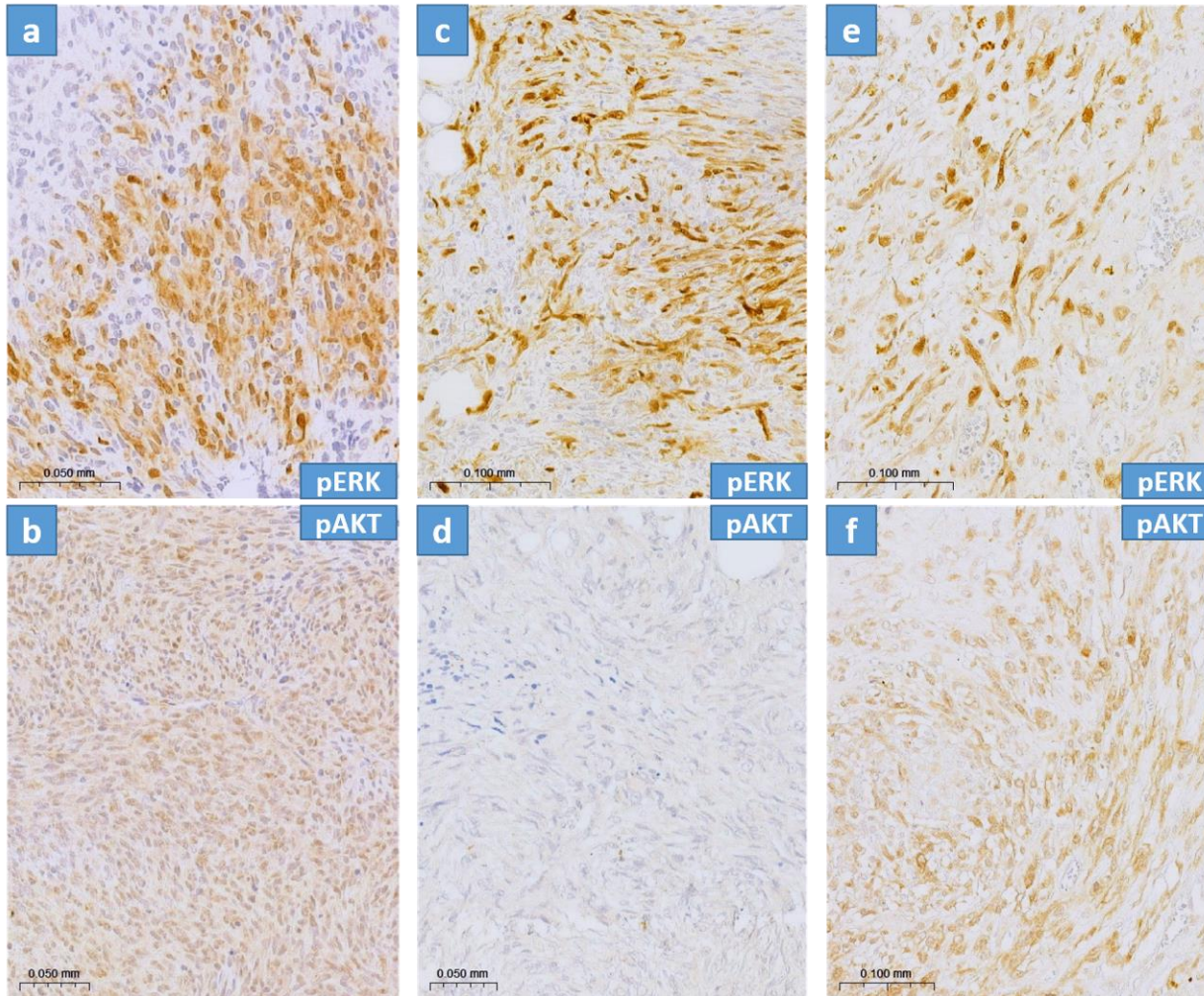
A kettős egypontmutációt hordozó esetek jelátviteli útvonalainak vizsgálata foszfo-ERK és foszfo-AKT immunhisztokémiai reakciókkal történt, összehasonlítva 6 véletlenszerűen kiválasztott, a kettős egypontmutációt nem hordozó dedifferenciált liposarcomával és egy infantilis fibrosarcomával. Hasonló foszfo-ERK immunfestődés volt azonosítható, mind a mutációkat hordozó, mind a mutációkat nem hordozó dedifferenciált liposarcomák, illetve az infantilis fibrosarcoma esetén. Mindazonáltal, szembevető különbség volt észlelhető a foszfo-AKT nukleáris pozitivitását illetőleg. A mutációkat nem hordozó dedifferenciált liposarcomák negatívnak bizonyultak, míg a kettős egypontmutációt hordozó esetek erősebb vagy gyengébb intenzitással, de egyértelmű pozitívítást mutattak. Természetesen a pozitív kontrollként szolgáló, *ETV6::NTRK3* fúziót hordozó infantilis fibrosarcoma eset is pozitív volt. Az eredményeket a 6. táblázat, illetve a 9. ábra mutatja.



8. ábra. Egy eset NGS eredményének vizualizációja (azonosító: 84). A tumorsejtek aránya a mintában 80%. A kettő egy pontmutáció - *NTRK1* c.1810C>T és *NTRK1* c.1838G>T - azonos read-eken helyezkedik el, azaz *cis* pozícióban vannak. A tumorsejtek heterozigóták a mutációkra, minthogy a read-ek megközelítőleg 40%-ában vannak jelen.

6. táblázat. A TRKA receptorról induló jelátviteli útvonalak vizsgálata az aktivált ERK és az aktivált AKT immunhisztokémiai módszerrel történő kimutatásával. A hat kettős mutációt hordozó esetet hasonlítottuk össze hat, véletlenszerűen kiválasztott, a mutációkat nem hordozó dedifferenciált liposarcomával. A mutáns (azonosító: 14, 84, 88, 109, 125, 127) és a nem mutáns (azonosító: 62, 56, 49, 66, 55, 50) esetekben is aktív az ERK útvonal, ugyanakkor csak a mutáns esetekben aktív az AKT útvonal. Az immunreakció erősségének, illetve kiterjedésének megállapítása az alábbiak szerint történt: nem volt festődés (-), enyhe festődés (+), közepes festődés (++) , erős festődés (+++); 0% (0), 0-10% (1), 10-60% (2), 60%-100% (3). (IFS: infantilis fibrosarcoma, *ETV6::NTRK3* fúzióval.)

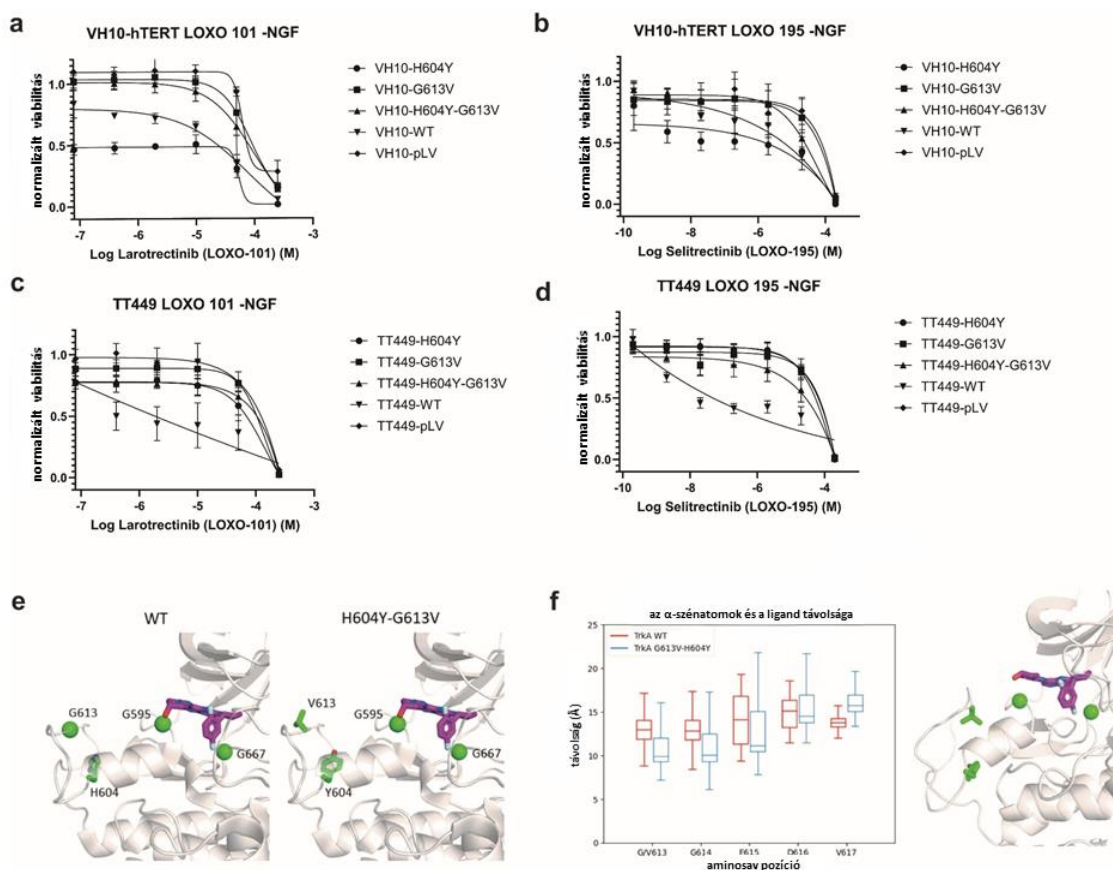
azonosító	jellemző	foszfo-ERK		foszfo-AKT	
		erősség	kiterjedés	erősség	kiterjedés
14	mutáns	+++	2	++	3
84	mutáns	++	1	+	3
88	mutáns	+++	2	+	2
109	mutáns	++	2	+	2
125	mutáns	++	2	++	3
127	mutáns	+	1	+	1
62	nem mutáns	+++	2	-	0
56	nem mutáns	++	1	-	0
49	nem mutáns	+	1	-	0
66	nem mutáns	+++	1	-	0
55	nem mutáns	+++	3	-	0
50	nem mutáns	++	2	-	0
IFS	pozitív kontroll	+++	2	++	3



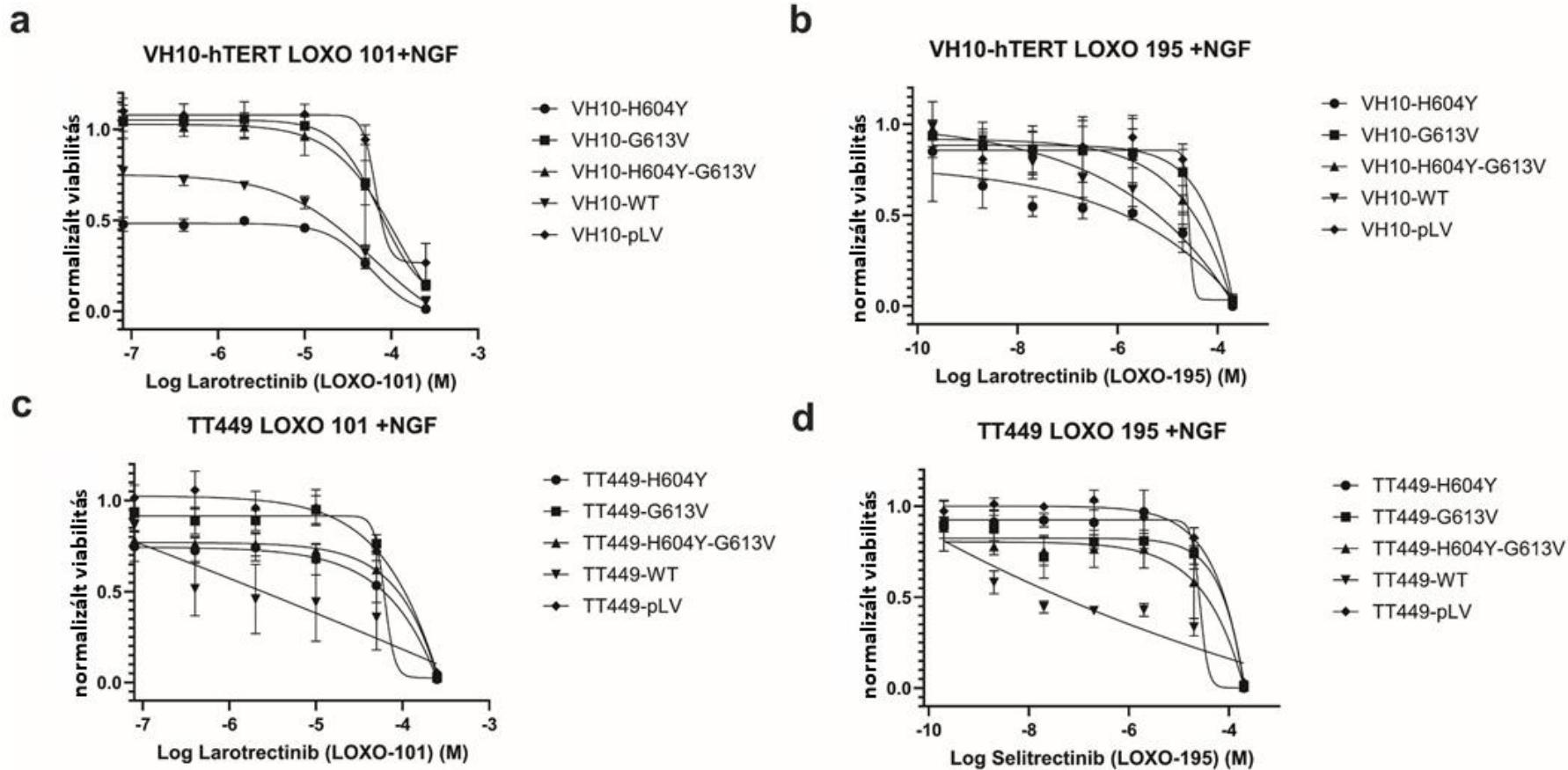
9. ábra. Infantilis fibrosarcoma, mint pozitív kontroll. a) foszfo-ERK (pERK), b) foszfo-AKT (pAKT). Dedifferenciált liposarcoma (azonosító: 55), mely nem hordozza a p.H604Y és p.G613V mutációkat. c) foszfo-ERK (pERK), d) foszfo-AKT (pAKT). Dedifferenciált liposarcoma (azonosító: 125), mely hordozza a p.H604Y és p.G613V mutációkat. e) foszfo-ERK (pERK), f) foszfo-AKT (pAKT). A foszfo-ERK immunfestés eredményében nincs különbség. A mutációt nem hordozó esetekben a foszfo-AKT immunreakció negatív volt, míg a mutáns esetekben változó erősségű magi pozitivitás volt látható.

4.5. Az NTRK1 variánst expresszáló sejtek különböző módon reagálnak TRK inhibitorokra

Három különféle sejtvonal (fibroblast (VH10), illetve hTERT immortalizált fibroblast (VH10-hTERT), valamint dedifferenciált liposarcoma (T449)) lentivirális transzdukciója történt *NTRK1* c.1810C>T (p.H604Y) vagy *NTRK1* c.1838G>T (p.G613V) vagy *cis* pozícióban lévő *NTRK1* c.1810C>T (p.H604Y), *NTRK1* c.1838G>T (p.G613V) vagy *NTRK1*-WT (vad típus) tartalmazó vagy üres pLV vektorokkal. A különböző lentivirális konstrukciók proliferációra gyakorolt hatásának vizsgálata a populáció megkettőződési idő mérésén alapult, melynek eredménye alapján nem volt különbség e tekintetben a különböző lentivirális konstrukció típusok között. A VH10 fibroblast sejtvonal további passzázs vizsgálata történt, maximum nyolc további passzázsra, amikor is már a sejteken szeneszcencia jelek voltak detektálhatók, továbbá leállt a proliferációjuk (három egymástól független kísérleti összeállításban is). Mindezek alapján a variánsok nem voltak képesek a normál fibroblastokat transzformálni. Puromycin szelekciót követő további sejtenyésztés után a transzdukált konstrukciók jelenlétének és expressziójának kimutatása történt DNS- és RNS szinten, PCR, valamint reverz transzkripció-PCR, majd Sanger szekvenálás által, ezzel mutatva a plazmid jelenlétét, illetve az expressziót RNS szinten. Dózis-válasz mérések történtek LOXO-101, illetve LOXO-195 hatóanyagokat alkalmazva 7 nap inkubációs időt követően, a természetes ligand (NGF) jelenlétében vagy annak hozzáadása nélkül egyaránt. Minden esetben a TRK inhibitor gátló hatása volt megfigyelhető az *NTRK1*-WT konstrukció esetén, valamint teljes rezisztencia üres vektor esetén, kivéve rendkívül nagy dózisok alkalmazásakor. Mindez azt mutatja, hogy az *NTRK1*-WT receptor aktiváció gátlható és ennek negatív hatása van a sejtproliferációra. Ugyanakkor, az *NTRK1* c.1838G>T (p.G613V) variáns, illetve a *cis* pozícióban lévő *NTRK1* c.1810C>T (p.H604Y), *NTRK1* c.1838G>T (p.G613V) kombináció rezisztenciát mutatott a TRK inhibitor kezeléssel szemben minden transzdukált sejtvonalban, függetlenül a természetes ligand (NGF) jelenlététől vagy hiányától (10. ábra és 11. ábra).



10. ábra. Dózis-válasz görbék a) LOXO-101 (larotrectinib) és b) LOXO-195 (selitrectinib) által kezelt VH10-hTERT immortalizált fibroblast sejtvonalban, valamint c) LOXO-101 (larotrectinib) és d) LOXO-195 (selitrectinib) által kezelt T449 dedifferenciált liposarcoma sejtvonalban az *NTRK1*-p.H604Y, *NTRK1*-p.G613V, *NTRK1*-p.H604Y+p.G613V, *NTRK1*-WT, és üres vektort tartalmazó lentivirális transzdukciót követően, a természetes ligand (NGF) hozzáadása nélkül. e) A TRKA fehérje térszerkezetének egy részlete. Látható a LOXO-101 (larotrectinib) orientációja a kötőhelyhez, illetve jelölésre kerültek a már ismert rezisztenciát okozó mutációk - G595R és G667C (zöld gömbök), továbbá láthatók az újonnan, általunk leírt rezisztencia mutációk helyzete is - H604 és G613 (zöld henger és gömb). A LOXO-101 (larotrectinib) magenta színnel van jelezve. f) bal oldali panel: a szimulációk során tapasztalt távolságok a TRK gátlószer és a vad típusú fehérje, és a mutált fehérje 613-617 fehérjerészletének alfa szénatomjai között; jobb oldali panel: a szimuláció során készült pillanatkép, mely időpontban a TRK gátlószer és a G614 közötti távolság a legkisebb.



11. ábra. Dózis-válasz görbék a) LOXO-101 (larotrectinib) és b) LOXO-195 (selitrectinib) által kezelt VH10-hTERT immortalizált fibroblast sejtvonalban, valamint c) LOXO-101 (larotrectinib) és d) LOXO-195 (selitrectinib) által kezelt T449 dedifferenciált liposarcoma sejtvonalban az *NTRK1*-p.H604Y, *NTRK1*-p.G613V, *NTRK1*-p.H604Y+p.G613V, *NTRK1*-WT, és üres vektort tartalmazó lentivirális transzdukciót követően, a természetes ligand (NGF) hozzáadásával.

4.6. A G613V és a H604Y variánsok rezisztencia mechanizmusának megértése molekuláris szinten

Molekuláris dinamikai szimulációkat végeztünk annak érdekében, hogy a G613V és H604Y aminosavcserek által a LOXO-101 (larotrectinib) hatóanyaggal szemben mutatott rezisztencia mechanizmusát megvizsgáljuk molekuláris szinten. Ennek megfelelően, szimulációkat futtattunk mind a vad típusú fehérjével, mind a kettős mutációt (G613V, H604Y) hordozó fehérjével. Továbbá, az egész szimuláció során megmértük a LOXO-101 (larotrectinib) hatóanyag és a 603-617 fehérjehurok között fennálló távolságot (10. ábra). Noha az előbb említett fehérjehurok a kettős mutált fehérjében közelebb van a TRK inhibitorhoz, mint a vad típusú fehérje esetében, de a szimuláció során tapasztalt távolságok egyike sem elég kicsi ahhoz, hogy a fent nevezett gátlószert akadályozza a kötődésében. Ezzel szemben a nemzetközi irodalomban leírt rezisztenciát okozó mutációk, mint a G595R vagy a G667C, közvetlenül gátolják a TRK inhibitor kötődését sztérikus akadályoztatás révén (10. ábra). Következésképpen, a G613V és a H604Y aminosavcserek által közvetített rezisztencia pontos mechanizmusa egyelőre ismeretlen.

5. Megbeszélés

A kutatásunk célja a lehetséges *NTRK* génelterések felderítése volt Sanger szekvenálást alkalmazva, pan-TRK immunhisztokémiai vizsgálattal előszűrt dedifferenciált liposarcomákban.

A nem-fúziós *NTRK* génelterések a rosszindulatú daganatok 14%-ában jelen vannak, ugyanakkor jelentőségük nem teljesen ismert. (25) Nemrég onkogén egy pontmutációkat írtak le egyes daganatokban, melyek jól reagáltak az amúgy fúzióknál használatos TRK gátlószerekre. (23, 24) Mindezek ismeretében vállalkoztunk arra, hogy potenciálisan onkogén génelteréseket azonosítsunk az *NTRK* gének tirozin kináz doménjeit kódoló régióiban dedifferenciált liposarcomában.

Pan-TRK immunhisztokémiai reakcióval a vizsgált 116 esetből 75 bizonyult pozitívnak (75/116, 64%). Noha első látásra a magas immunpozitivitási arány kissé meglepő összehasonlítva mások eredményeivel, (6, 35, 44, 45) fontos kiemelni, hogy az általunk alkalmazott kritériumrendszer kifejezetten megengedő volt az immunpozitivitást illetően, mivel pozitívnak ítéltük meg az immunreakciót, amennyiben az immunfestés erőssége akár csak gyenge intenzitású is volt, továbbá az érintett tumorsejtek akár csak egy százalékos arányát is pozitívnak határoztuk meg. Jelen ismereteink szerint kettő olyan kutatás van a nemzetközi irodalomban, melyben pan-TRK antitest alkalmazására került sor dedifferenciált liposarcomában. Harmincnégy dedifferenciált liposarcomából egy, míg öt dedifferenciált liposarcomából kettő bizonyult pozitívnak azonos pan-TRK antitestet és alkalmazási módot, valamint nagyon hasonló értékelési rendszert használva Brcic és mtsai, valamint Tsai és mtsai kutatásaiban. (38, 39) Az előbbi vizsgálatban *NTRK* fúzió lehetősége kizárásra került NGS révén. Sajnos, az utóbbi tanulmányban nem történtek további vizsgálatok, melyek segíthettek volna értelmezni a látott eredményt.

Figyelembe véve a pan-TRK immunhisztokémiai vizsgálat magas negatív prediktív értékét (6, 33), csak az immunpozitív esetekben végeztük el a Sanger szekvenálást. Egy rekurrens, *cis* pozícióban lévő, misszensz mutáció pár - *NTRK1* c.1810C>T (p.H604Y); *NTRK1* c.1838G>T (p.G613V) - került detektálásra a vizsgált negyvenhat esetből hat esetben is (6/46, 13%). Az *NTRK2* és *NTRK3* gének tirozin kináz domént kódoló régióiban misszensz mutáció, vagy egyéb, a fehérje szerkezetének megváltozásához

vezető génelterés nem került azonosításra. A hat kettős mutációt hordozó eset *NTRK*-break apart FISH vizsgálatai kizárták az *NTRK* gének fúzióját, mint a pan-TRK immunpozitivitás lehetséges okát.

A kettős misszensz mutáció előfordulásának *in silico* elemzését végeztük a legnagyobb, széleskörű adatbázisok (COSMIC, ClinVar, UniProtKB, OMIM, VarSome) alkalmazásával. A dbSNP és a VarSome adatai alapján mindkettő variáns egészséges emberekben megfigyelt előfordulási gyakorisága megközelítőleg 4%, ugyanakkor érdemes megjegyezni azt, hogy az együttes előfordulásuk vizsgálatára ezen adatbázisokban egyelőre még nincs lehetőség.

A nemzetközi irodalomban csupán kevés információ érhető el ezen mutációról. Megfigyelték olyan betegekben, akiknek veleszületett fájdalomérzéketlenségük van (CIPA: congenital insensitivity to pain with anhidrosis). (46) Egy kutatás szerint a *NTRK1* c.1810C>T (p.H604Y) polimorfizmus kapcsolatot mutat a skizofréniával. (47) Lehetséges, hogy ezen génelterés jelenléte az Alzheimer-kór fokozott rizikójához vezethet. (48) Az *NTRK1* c.1838G>T (p.G613V) leírásra került homozigóta formában egészséges izraeli-beduinokban. (49) A variánsokat külön (*NTRK1* c.1810C>T (p.H604Y) és *NTRK1* c.1838G>T (p.G613V)) mint potenciálisan benignus változatok írják le, habár, alig van érdemi információ a két mutációról, mint együttesen előforduló mutációpárról.

A mutációpár rosszindulatú daganatok kialakulásában betöltött szerepét alig vizsgálták mindezidáig. Harminckettő haemangioblastomából kettőben detektálták, de a mutáció pár jelentőségének vizsgálatára nem került sor. (50) Medulláris pajzsmirigyrákokban is leírásra került a két variáns, de azok ugyanúgy jelen voltak a betegekhez tartozó normál, tumormentes sejtek DNS-ében is, valamint a kontroll csoportban is, de a cikkben nem egyértelműen azonosítható, hogy mi a „normál” és a „kontroll” csoport. (51) Továbbá más cikkben azt találták, hogy a mutáció pár jelenléte nincs hatással a TRKA fehérje autofoszforilációjára neuroblastoma és fibroblast sejtvonalakban, ennél fogva a mutációkat, mint polimorfizmusokat értelmezték. (46) Ennek ellenére a kettős egy pontmutáció rövidebb túléléshez vezetett neuroblastomában szenvedő betegekben. (52)

Az eseteinkben a két mutáció azonos read-eken volt jelen az NGS vizsgálat IGV általi vizuális megjelenítése alapján, így a két mutáció egymáshoz viszonyítva *cis* elhelyezkedésű. Egy korábbi tanulmány, mely megvizsgálta a multiplex driver mutációkat azonos onkogénekben azt találta, hogy azok legnagyobb részben *cis* pozícióban vannak (78%), mely alapján feltételezhető, hogy az általunk identifikált mutációk driver mutációk lehetnek. (53)

Figyelembe véve az előbb leírtakat, az is lehetséges, hogy a két mutáció nem értelmezhető a hagyományos passenger-driver mutáció elv mentén, s inkább önmagukban szuboptimális mutációként tekintendők, melyek viszont kombinációban onkogén potenciált hordozhatnak, hasonlóan a tüdőrákokban megfigyelt EGFR szomatikus dupla mutációkhoz. (54) Továbbá érdemes azt is megjegyezni, hogy egy genetikai elváltozás onkogén potenciálja változhat a szövettípustól függően, amiben kialakul. (55) Ennél fogva lehetséges, hogy ezen mutációk hozzájárulnak a dedifferenciált liposarcoma kialakulásához, de nem okoznak jelentős változást nem lágyrésztumорок eseteiben.

Tekintettel a nemzetközi irodalomban eddig leírtakra, ez a kettős mutáció előfordulhat együtt, (51) ugyanakkor az együttes prevalenciájuk nem volt specifikusan vizsgálva, kifejezetten dedifferenciált liposarcomában való előfordulásuk pedig egyáltalán nem volt kutatva. A mi vizsgálatunk alapján 13%-os (6/46) előfordulási gyakoriság állapítható meg pan-TRK immunpozitív dedifferenciált liposarcomákban.

Négy páciens-től volt elérhető normál, tumormentes szövet Sanger szekvenálásra a hat kettős mutációt hordozó esetből. Bebizonyítottuk, hogy ezen négy esetben a misszensz mutáció pár nem volt jelen a normál, tumormentes szövetekben, vagyis kizártuk a csírvonal eredetű mutáció lehetőségét és bebizonyítottuk, hogy a mutáció pár szomatikus mutációként értelmezendő. Azon esetek Sanger szekvenogramjainak értékelése alapján, melyeknél nem volt túlságosan magas a használt mintában a tumor százalékos aránya (a tumor százalék maximum 70% volt), ennél fogva elegendően nagy arányban volt jelen normál, tumormentes szövetrészlet is (a normál szövet aránya minimum 30% volt), az ezen kritériumnak megfelelő tizenhét esetből egyetlen egyszer sem volt jelen a mutáció pár (0/18), indirekt módon utalva arra, hogy nem csírvonal eredetű a mutáció. Ha ehhez hozzávesszük az előbb leírt, a tumorban a kettős mutációt hordozó, de a normál, tumormentes szövetben azt nem hordozó négy esetet is, akkor

huszonkettő egyén normál, tumormentes szöveteinek vizsgálata alapján egyszer sem volt jelen a kettős mutáció (0/22).

A kettős aminosavcserét szenvedett TRKA (p.H604Y + p.G613V) lehetséges aktivációjának vizsgálatára a receptorról induló jelátviteli útvonalak résztvevőit vizsgáltuk az AKT, és foszfo-AKT, valamint ERK, továbbá foszfo-ERK antitestekkel végzett immunhisztokémiai reakciókkal. Az ERK és foszfo-ERK immunvizsgálatok eredményei alapján a kettős mutációt hordozó dedifferenciált liposarcomák és a véletlenszerűen kiválasztott, a kettős mutációt nem hordozó dedifferenciált liposarcomák között lényeges különbség nem adódott, nem volt erősebb immunfestés a foszfo-ERK (foszforilált-ERK, az ERK aktivált formája) által, ennél fogva megállapítható, hogy a RAS/RAF/MEK/ERK jelátviteli útvonal aktivitásában nem okoz növekedést a TRKA p.H604Y + p.G613V. Ugyanakkor az AKT és foszfo-AKT immunvizsgálatok eredménye jelentős különbséget mutatott a mutáció párt hordozó és nem hordozó dedifferenciált liposarcomák között. A mutációt nem hordozó esetek negatívnak bizonyultak, míg a mutánsok enyhe vagy erős intenzitású magfestődést mutattak a foszfo-AKT antitesttel (foszforilált-AKT, az AKT aktivált formája). Ez alapján a kettős aminosavcserét szenvedett TRKA (p.H604Y + p.G613V) a PI3K/AKT jelátviteli útvonal aktivitásának fokozódásához vezet.

Nem túlságosan meglepő az, hogy a kettős mutáció nem bizonyult transzformatívnak, hiszen ezen megfigyelés megfelel annak, hogy csíravonal variánsként is leírásra kerültek az eddigi publikációkban. (46) A mutációk jelenléte nem vezetett a növekedés gyorsulásához a vizsgált sejtvonalakban, mely alapján inkább csak enyhe modifikációs hatás valószínűsíthető. Viszont mindenképpen megemlítendő, hogy ezen adat értékelése során figyelembe kell venni az *in vitro* sejtmodell kísérletek korlátait. Ahogy arra Vanoli és mtsai tanulmánya rámutatott (40), még az ismert, biztosan driver *NTRK* fúziók sem okozták a proliferációs ráta egyértelmű emelkedését sem humán embrionális őssejtekben, sem mesenchymalis progenitorsejtekben az *in vitro* kísérletek nyomán. Ugyanakkor váratlan eredmény az, hogy a G613V variáns önmagában, illetve a H604Y variánssal kombinációban is *in vitro* kísérleti körülmények között mind az első generáció, mind a második generációs TRK inhibitorokkal szemben rezisztenciát okoz. Az aminosavcserék a várt, konzervált rezisztencia régióin kívül helyezkednek el. A vad típusú, illetve a kettős mutált TRKA fehérje a LOXO-101 (larotrectinib) és a LOXO-195 (selitrectinib)

jelenlétében végzett *in silico* modellezése nem mutatott semmilyen olyan térszerkezetbeli eltérést, mely magyarázhatná a megfigyelt rezisztenciát (10. ábra). Viszont ez nem zárja ki olyan térszerkezetbeli változások lehetőségét, melyek más fehérjékkel való interakció során jönnek létre és esetlegesen a TRK gátlószeres hatásának csökkenéséhez vezetnek. Az *in vitro* adatok alapján mindenesetre a G613V variáns önmagában vagy kombinációban a TRK gátlószeresekkel kezelt betegekben *de novo* rezisztenciát jelezhet előre, minthogy ezen variáns akár csíravonal, akár szomatikus formában is jelen lehet.

Eredményeink után felmerül a lehetősége egy olyan klinikai vizsgálatnak, melybe azokat a dedifferenciált liposarcomában szenvedő betegeket lenne érdemes bevonni, akiknek a daganatsejtjei hordozzák a kettős mutációt, mivel mind a pontmutációpár és mind a TRK gátlószeres is eltérően viselkedhetnek *in vivo* körülmények között.

Azonosítottunk egy visszatérő, szomatikus egy pontmutáció párt dedifferenciált liposarcomában, mely mutációpár *in vitro* körülmények között rezisztenciát okozott mind az első, mind a második generációs TRK gátlószeresekkel szemben. Ezen mutációk/variánsok akár biomarkerként is szolgálhatnak a TRK gátlószeresekkel szembeni *de novo* rezisztencia kimutatására.

6. Következtetések

A dedifferenciált liposarcomák 64%-ában (75/116) volt pan-TRK immunpozitivitás.

A pan-TRK immunpozitív dedifferenciált liposarcomák 13%-ában (6/46) kettő olyan misszensz mutációt (*NTRK1* c.1810C>T, p.H604Y; *NTRK1* c.1838.G>T, p.G613V) azonosítottunk az *NTRK1* gén tirozin kináz doménjét kódoló régióban, melyek mindig együtt vannak jelen (Sanger szekvenálás).

A pan-TRK pozitív dedifferenciált liposarcomákban az *NTRK2* és *NTRK3* gének tirozin kináz doménjét kódoló régióiban Sanger szekvenálással nem azonosítottunk eltérést.

A hat kettős mutációt hordozó eset *NTRK* break-apart FISH vizsgálatai kizárták *NTRK* fúziók jelenlétét, mint a pan-TRK immunpozitivitás lehetséges okát.

A hat kettős mutációt hordozó esetből négyenél állt rendelkezésre tumormentes szövetminta, melyek Sanger szekvenálásával a kettős mutáció egyik esetben sem volt jelen. Ezzel kizártuk csírvonal mutáció lehetőségét és igazoltuk azt, hogy a mutációk szomatikusak.

Fibroblast sejtvonal lentivirális transzdukciója révén az *NTRK1* variánsok transzformatív hatását vizsgáltuk, mely nem igazolódott, ugyanakkor az *in vitro* sejtmódeli vizsgálatoknak egyértelmű korlátai vannak.

Immortalizált fibroblast és dedifferenciált liposarcoma sejtvonalakat lentivirális transzdukciót követően TRK gátlószeres környezetben inkubáltuk, s így vizsgáltuk a viábilis sejtek arányát. A G613V önmagában, illetve a H604Y variánssal kombinációban is rezisztenciához vezetett.

Fehérje modellezéssel nem találtuk a variánsok által közvetített rezisztencia egyértelmű mechanizmusát, ugyanakkor ezek akár potenciális biomarkerek is lehetnek olyan klinikai vizsgálatokban, ahol TRK gátlószereket alkalmaznak.

7. Összefoglalás

Összesen százharmincegy dedifferenciált liposarcomával diagnosztizált beteg tumoros mintáját használtuk fel kutatásunkban. Pan-TRK immunhisztokémiával kiszűrtük azon eseteket, melyekben nem volt várható *NTRK* géneltérés. Az immunpozitív esetekben (hetvenöt) az *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3* gének tirozin kináz domént kódoló régióinak vizsgálatát végeztük Sanger szekvenálással (negyvenhat). Egy visszatérő, szomatikus, *cis* pozícióban lévő mutációpárt - *NTRK1* c.1810C>T (p.H604Y), *NTRK1* c.1838G>T (p.G613V) - azonosítottunk hat esetben (6/46, 13%), mely korábban még nem került leírásra dedifferenciált liposarcomában. Ezen hat eset FISH vizsgálata által kizárásra került *NTRK* fúziók jelenléte, mint a pan-TRK pozitivitás lehetséges oka. Ezen hat esetből négyenél ált rendelkezésre tumormentes szövetminta is, melyben a mutációpár nem volt jelen, ezzel igazoltuk a mutációpár szomatikus voltát. Funkcionális vizsgálatokat végeztünk az *NTRK1* variánsok jelentőségének meghatározására. Lentivirális transzdukció révén megfigyeltük az *NTRK1* variánsok hatását fibroblast, immortalizált fibroblast és dedifferenciált liposarcoma sejtvonalakban. Az *NTRK1* variánsok nem okozták a fibroblast sejtvonala transzformációját. Eredményeink alapján ugyanakkor nem teljesen egyértelmű, hogy a mutációpár mennyiben járul hozzá a tumorigenezishez ezen dedifferenciált liposarcomák esetében, tekintettel az *in vitro* kísérletek korlátaira. Viszont mind az immortalizált fibroblast sejtvonalba, mind a dedifferenciált liposarcoma sejtvonalba az első generációs, illetve a második generációs TRK gátlószerekkel szemben rezisztenciához vezetett a G613V önmagában, de a H604Y aminosavcserével kombinációban is. A vad típusú és a mutált fehérje térszerkezetének modellezése alapján nem derült ki, hogy pontosan hogyan vezetnek a mutációk következtében létrejövő aminosavcserék a rezisztencia kialakulásához. Mivel a variánsok a TRK gátlószerekkel szemben rezisztenciát okoznak, ezek akár potenciális biomarkerek is lehetnek olyan klinikai vizsgálatokban, ahol TRK gátlószereket alkalmaznak.

8. Irodalomjegyzék

1. WHO. Soft Tissue and Bone Tumours. 5th ed: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2020.
2. Italiano A, Toulmonde M, Cioffi A, Penel N, Isambert N, Bompas E, Duffaud F, Patrikidou A, Lortal B, Le Cesne A, Blay JY, Maki RG, Schwartz GK, Antonescu CR, Singer S, Coindre JM, Bui B. Advanced well-differentiated/dedifferentiated liposarcomas: role of chemotherapy and survival. *Ann Oncol.* 2012;23(6):1601-1607.
3. Jones RL, Fisher C, Al-Muderis O, Judson IR. Differential sensitivity of liposarcoma subtypes to chemotherapy. *Eur J Cancer.* 2005;41(18):2853-2860.
4. Gounder MM, Bauer TM, Schwartz GK, Weise AM, LoRusso P, Kumar P, Tao B, Hong Y, Patel P, Lu Y, Lesegretain A, Tirunagaru VG, Xu F, Doebele RC, Hong DS. A First-in-Human Phase I Study of Milademetan, an MDM2 Inhibitor, in Patients With Advanced Liposarcoma, Solid Tumors, or Lymphomas. *J Clin Oncol.* 2023;41(9):1714-1724.
5. Lippai Z, Sapi Z. [Diagnostic approach of tumors with neurotrophic tropomyosin receptor tyrosine kinase gene fusions]. *Orv Hetil.* 2020;161(41):1753-1763.
6. Gatalica Z, Xiu J, Swensen J, Vranic S. Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions. *Mod Pathol.* 2019;32(1):147-153.
7. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD, Nathenson M, Doebele RC, Farago AF, Pappo AS, Turpin B, Dowlati A, Brose MS, Mascarenhas L, Federman N, Berlin J, El-Deiry WS, Baik C, Deeken J, Boni V, Nagasubramanian R, Taylor M, Rudzinski ER, Meric-Bernstam F, Sohal DPS, Ma PC, Raez LE, Hechtman JF, Benayed R, Ladanyi M, Tuch BB, Ebata K, Cruickshank S, Ku NC, Cox MC, Hawkins DS, Hong DS, Hyman DM. Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. *N Engl J Med.* 2018;378(8):731-739.
8. Davis JL, Lockwood CM, Albert CM, Tsuchiya K, Hawkins DS, Rudzinski ER. Infantile NTRK-associated Mesenchymal Tumors. *Pediatr Dev Pathol.* 2018;21(1):68-78.
9. Pavlick D, Schrock AB, Malicki D, Stephens PJ, Kuo DJ, Ahn H, Turpin B, Allen JM, Rosenzweig M, Badizadegan K, Ross JS, Miller VA, Wong V, Ali SM. Identification of NTRK fusions in pediatric mesenchymal tumors. *Pediatr Blood Cancer.* 2017;64(8).

10. Prasad ML, Vyas M, Horne MJ, Virk RK, Morotti R, Liu Z, Tallini G, Nikiforova MN, Christison-Lagay ER, Udelsman R, Dinauer CA, Nikiforov YE. NTRK fusion oncogenes in pediatric papillary thyroid carcinoma in northeast United States. *Cancer*. 2016;122(7):1097-1107.
11. Bender J, Anderson B, Bloom DA, Rabah R, McDougall R, Vats P, Mody R. Refractory and metastatic infantile fibrosarcoma harboring LMNA-NTRK1 fusion shows complete and durable response to crizotinib. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*. 2019;5(1).
12. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*. 2013;6(269):p11.
13. Bollig-Fischer A, Michelhaugh SK, Wijesinghe P, Dyson G, Kruger A, Palanisamy N, Choi L, Alesh B, Ali-Fehmi R, Mittal S. Cytogenomic profiling of breast cancer brain metastases reveals potential for repurposing targeted therapeutics. *Oncotarget*. 2015;6(16):14614-14624.
14. Narayanan R, Yepuru M, Coss CC, Wu Z, Bauler MN, Barrett CM, Mohler ML, Wang Y, Kim J, Snyder LM, He Y, Levy N, Miller DD, Dalton JT. Discovery and preclinical characterization of novel small molecule TRK and ROS1 tyrosine kinase inhibitors for the treatment of cancer and inflammation. *PLoS One*. 2013;8(12):e83380.
15. Brodeur GM, Minturn JE, Ho R, Simpson AM, Iyer R, Varela CR, Light JE, Kolla V, Evans AE. Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clin Cancer Res*. 2009;15(10):3244-3250.
16. Eggert A, Grotzer MA, Ikegaki N, Zhao H, Cnaan A, Brodeur GM, Evans AE. Expression of the neurotrophin receptor TrkB is associated with unfavorable outcome in Wilms' tumor. *J Clin Oncol*. 2001;19(3):689-696.
17. Marchetti A, Felicioni L, Pelosi G, Del Grammastro M, Fumagalli C, Sciarrotta M, Malatesta S, Chella A, Barassi F, Mucilli F, Campese P, D'Antuono T, Sacco R, Buttitta F. Frequent mutations in the neurotrophic tyrosine receptor kinase gene family in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Hum Mutat*. 2008;29(5):609-616.
18. Tomasson MH, Xiang Z, Walgren R, Zhao Y, Kasai Y, Miner T, Ries RE, Lubman O, Fremont DH, McLellan MD, Payton JE, Westervelt P, DiPersio JF, Link DC, Walter MJ, Graubert TA, Watson M, Baty J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Bloomfield CD, Mardis ER, Wilson RK, Ley TJ. Somatic mutations and germline sequence variants

in the expressed tyrosine kinase genes of patients with de novo acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111(9):4797-4808.

19. Reuther GW, Lambert QT, Caligiuri MA, Der CJ. Identification and characterization of an activating TrkA deletion mutation in acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol*. 2000;20(23):8655-8666.

20. Tacconelli A, Farina AR, Cappabianca L, Desantis G, Tessitore A, Vetuschi A, Sferra R, Rucci N, Argenti B, Screpanti I, Gulino A, Mackay AR. TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell*. 2004;6(4):347-360.

21. Arevalo JC, Conde B, Hempstead BL, Chao MV, Martin-Zanca D, Perez P. TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol Cell Biol*. 2000;20(16):5908-5916.

22. Coulier F, Kumar R, Ernst M, Klein R, Martin-Zanca D, Barbacid M. Human trk oncogenes activated by point mutation, in-frame deletion, and duplication of the tyrosine kinase domain. *Mol Cell Biol*. 1990;10(8):4202-4210.

23. Joshi SK, Qian K, Bisson WH, Watanabe-Smith K, Huang A, Bottomly D, Traer E, Tyner JW, McWeeney SK, Davare MA, Druker BJ, Tognon CE. Discovery and characterization of targetable NTRK point mutations in hematologic neoplasms. *Blood*. 2020;135(24):2159-2170.

24. Iacobucci I, Wen J, Meggendorfer M, Choi JK, Shi L, Pounds SB, Carmichael CL, Masih KE, Morris SM, Lindsley RC, Janke LJ, Alexander TB, Song G, Qu C, Li Y, Payne-Turner D, Tomizawa D, Kiyokawa N, Valentine M, Valentine V, Basso G, Locatelli F, Enemark EJ, Kham SKY, Yeoh AEJ, Ma X, Zhou X, Sioson E, Rusch M, Ries RE, Stieglitz E, Hunger SP, Wei AH, To LB, Lewis ID, D'Andrea RJ, Kile BT, Brown AL, Scott HS, Hahn CN, Marlton P, Pei D, Cheng C, Loh ML, Ebert BL, Meshinchi S, Haferlach T, Mullighan CG. Genomic subtyping and therapeutic targeting of acute erythroleukemia. *Nat Genet*. 2019;51(4):694-704.

25. Okamura R, Boichard A, Kato S, Sicklick JK, Bazhenova L, Kurzrock R. Analysis of NTRK Alterations in Pan-Cancer Adult and Pediatric Malignancies: Implications for NTRK-Targeted Therapeutics. *JCO Precis Oncol*. 2018;2018.

26. Doebele RC, Davis LE, Vaishnavi A, Le AT, Estrada-Bernal A, Keysar S, Jimeno A, Varella-Garcia M, Aisner DL, Li Y, Stephens PJ, Morosini D, Tuch BB, Fernandes

M, Nanda N, Low JA. An Oncogenic NTRK Fusion in a Patient with Soft-Tissue Sarcoma with Response to the Tropomyosin-Related Kinase Inhibitor LOXO-101. *Cancer Discov.* 2015;5(10):1049-1057.

27. Farago AF, Le LP, Zheng Z, Muzikansky A, Drilon A, Patel M, Bauer TM, Liu SV, Ou SH, Jackman D, Costa DB, Multani PS, Li GG, Hornby Z, Chow-Maneval E, Luo D, Lim JE, Iafrate AJ, Shaw AT. Durable Clinical Response to Entrectinib in NTRK1-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2015;10(12):1670-1674.

28. Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, Siena S, Shaw AT, Farago AF, Blakely CM, Seto T, Cho BC, Tosi D, Besse B, Chawla SP, Bazhenova L, Krauss JC, Chae YK, Barve M, Garrido-Laguna I, Liu SV, Conkling P, John T, Fakih M, Sigal D, Loong HH, Buchschacher GL, Jr., Garrido P, Nieva J, Steuer C, Overbeck TR, Bowles DW, Fox E, Riehl T, Chow-Maneval E, Simmons B, Cui N, Johnson A, Eng S, Wilson TR, Demetri GD, trial i. Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials. *Lancet Oncol.* 2020;21(2):271-282.

29. Russo M, Misale S, Wei G, Siravegna G, Crisafulli G, Lazzari L, Corti G, Rospo G, Novara L, Mussolin B, Bartolini A, Cam N, Patel R, Yan S, Shoemaker R, Wild R, Di Nicolantonio F, Bianchi AS, Li G, Siena S, Bardelli A. Acquired Resistance to the TRK Inhibitor Entrectinib in Colorectal Cancer. *Cancer Discov.* 2016;6(1):36-44.

30. Drilon A, Li G, Dogan S, Gounder M, Shen R, Arcila M, Wang L, Hyman DM, Hechtman J, Wei G, Cam NR, Christiansen J, Luo D, Maneval EC, Bauer T, Patel M, Liu SV, Ou SH, Farago A, Shaw A, Shoemaker RF, Lim J, Hornby Z, Multani P, Ladanyi M, Berger M, Katabi N, Ghossein R, Ho AL. What hides behind the MASC: clinical response and acquired resistance to entrectinib after ETV6-NTRK3 identification in a mammary analogue secretory carcinoma (MASC). *Ann Oncol.* 2016;27(5):920-926.

31. Drilon A, Ou SI, Cho BC, Kim DW, Lee J, Lin JJ, Zhu VW, Ahn MJ, Camidge DR, Nguyen J, Zhai D, Deng W, Huang Z, Rogers E, Liu J, Whitten J, Lim JK, Stopatschinskaja S, Hyman DM, Doebele RC, Cui JJ, Shaw AT. Repotrectinib (TPX-0005) Is a Next-Generation ROS1/TRK/ALK Inhibitor That Potently Inhibits ROS1/TRK/ALK Solvent-Front Mutations. *Cancer Discov.* 2018;8(10):1227-1236.

32. Drilon A, Nagasubramanian R, Blake JF, Ku N, Tuch BB, Ebata K, Smith S, Lauriault V, Kolakowski GR, Brandhuber BJ, Larsen PD, Bouhana KS, Winski SL, Hamor R, Wu WI, Parker A, Morales TH, Sullivan FX, DeWolf WE, Wollenberg LA, Gordon PR, Douglas-Lindsay DN, Scaltriti M, Benayed R, Raj S, Hanusch B, Schram AM, Jonsson P, Berger MF, Hechtman JF, Taylor BS, Andrews S, Rothenberg SM, Hyman DM. A Next-Generation TRK Kinase Inhibitor Overcomes Acquired Resistance to Prior TRK Kinase Inhibition in Patients with TRK Fusion-Positive Solid Tumors. *Cancer Discov.* 2017;7(9):963-972.
33. Rudzinski ER, Lockwood CM, Stohr BA, Vargas SO, Sheridan R, Black JO, Rajaram V, Laetsch TW, Davis JL. Pan-Trk Immunohistochemistry Identifies NTRK Rearrangements in Pediatric Mesenchymal Tumors. *Am J Surg Pathol.* 2018;42(7):927-935.
34. Chiang S, Cotzia P, Hyman DM, Drilon A, Tap WD, Zhang L, Hechtman JF, Frosina D, Jungbluth AA, Murali R, Park KJ, Soslow RA, Oliva E, Iafrate AJ, Benayed R, Ladanyi M, Antonescu CR. NTRK Fusions Define a Novel Uterine Sarcoma Subtype With Features of Fibrosarcoma. *Am J Surg Pathol.* 2018;42(6):791-798.
35. Hung YP, Fletcher CDM, Hornick JL. Evaluation of pan-TRK immunohistochemistry in infantile fibrosarcoma, lipofibromatosis-like neural tumour and histological mimics. *Histopathology.* 2018;73(4):634-644.
36. Solomon JP, Linkov I, Rosado A, Mullaney K, Rosen EY, Frosina D, Jungbluth AA, Zehir A, Benayed R, Drilon A, Hyman DM, Ladanyi M, Sireci AN, Hechtman JF. NTRK fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: diagnostic implications and pitfalls. *Mod Pathol.* 2020;33(1):38-46.
37. Hechtman JF, Benayed R, Hyman DM, Drilon A, Zehir A, Frosina D, Arcila ME, Dogan S, Klimstra DS, Ladanyi M, Jungbluth AA. Pan-Trk Immunohistochemistry Is an Efficient and Reliable Screen for the Detection of NTRK Fusions. *Am J Surg Pathol.* 2017;41(11):1547-1551.
38. Brcic I, Godschachner TM, Bergovec M, Igrec J, Till H, Lackner H, Scheipl S, Kashofer K, Brodowicz T, Leithner A, Szkandera J, Liegl-Atzwanger B. Broadening the spectrum of NTRK rearranged mesenchymal tumors and usefulness of pan-TRK immunohistochemistry for identification of NTRK fusions. *Mod Pathol.* 2021;34(2):396-407.

39. Tsai JW, Lee JC, Hsieh TH, Huang SC, Lee PH, Liu TT, Kao YC, Chang CD, Weng TF, Li CF, Lin JC, Liang CW, Su YL, Chang IY, Wang YT, Chang NY, Yu SC, Wang JC, Huang HY. Adult NTRK-rearranged spindle cell neoplasms of the viscera: with an emphasis on rare locations and heterologous elements. *Mod Pathol.* 2022;35(7):911-921.
40. Vanoli F, Herviou L, Tsuda Y, Sung P, Xie Z, Fishinevich E, Min SS, Mallen W, de Wardin HT, Zhang Y, Jasin M, Antonescu CR. Generating in vitro models of NTRK-fusion mesenchymal neoplasia as tools for investigating kinase oncogenic activation and response to targeted therapy. *Oncogenesis.* 2023;12(1):8.
41. Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT, Repasky MP, Knoll EH, Shelley M, Perry JK, Shaw DE, Francis P, Shenkin PS. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J Med Chem.* 2004;47(7):1739-1749.
42. Bowers KJ, Chow, E., Huafeng Xu, Dror, R.O., Eastwood, M.P., Gregersen, B.A., Klepeis, J.L., Kolossvary, I., Moraes, M.A., Sacerdoti, F.D., Salmon, J.K., Yibing Shan, Shaw, D.E., editor Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters. *SC '06: Proceedings of the 2006 ACM/IEEE conference on Supercomputing;* 2006.
43. Kaminski GA, Friesner RA, Tirado-Rives J, Jorgensen WL. Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. *J Phys Chem B.* 2001;105(28):6474-6487.
44. J. Feng KE, F. Hansen, L. Kivi, C. Kriegshauser, D. Morosini, T. Shen, A. Sireci, P. Thorne-Nuzzo, Brian B. Tuch. TRK wild-type and fusion protein expression in solid tumors: Characterization by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Annals of Oncology.* 2018:80.
45. Murphy DA, Ely HA, Shoemaker R, Boomer A, Culver BP, Hoskins I, Haines JD, Walters RD, Fernandez D, Stahl JA, Lee J, Kim KM, Lamoureux J, Christiansen J. Detecting Gene Rearrangements in Patient Populations Through a 2-Step Diagnostic Test Comprised of Rapid IHC Enrichment Followed by Sensitive Next-Generation Sequencing. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2017;25(7):513-523.
46. Mardy S, Miura Y, Endo F, Matsuda I, Sztriha L, Frossard P, Moosa A, Ismail EA, Macaya A, Andria G, Toscano E, Gibson W, Graham GE, Indo Y. Congenital

insensitivity to pain with anhidrosis: novel mutations in the TRKA (NTRK1) gene encoding a high-affinity receptor for nerve growth factor. *Am J Hum Genet.* 1999;64(6):1570-1579.

47. van Schijndel JE, van Loo KM, van Zweeden M, Djurovic S, Andreassen OA, Hansen T, Werge T, Kallunki P, Pedersen JT, Martens GJ. Three-cohort targeted gene screening reveals a non-synonymous TRKA polymorphism associated with schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2009;43(15):1195-1199.

48. Cozza A, Melissari E, Iacopetti P, Mariotti V, Tedde A, Nacmias B, Conte A, Sorbi S, Pellegrini S. SNPs in neurotrophin system genes and Alzheimer's disease in an Italian population. *J Alzheimers Dis.* 2008;15(1):61-70.

49. Shatzky S, Moses S, Levy J, Pinsk V, Hershkovitz E, Herzog L, Shorer Z, Luder A, Parvari R. Congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA) in Israeli-Bedouins: genetic heterogeneity, novel mutations in the TRKA/NGF receptor gene, clinical findings, and results of nerve conduction studies. *Am J Med Genet.* 2000;92(5):353-360.

50. Shankar GM, Taylor-Weiner A, Lelic N, Jones RT, Kim JC, Francis JM, Abedalthagafi M, Borges LF, Coumans JV, Curry WT, Nahed BV, Shin JH, Paek SH, Park SH, Stewart C, Lawrence MS, Cibulskis K, Thorner AR, Van Hummelen P, Stemmer-Rachamimov AO, Batchelor TT, Carter SL, Hoang MP, Santagata S, Louis DN, Barker FG, Meyerson M, Getz G, Brastianos PK, Cahill DP. Sporadic hemangioblastomas are characterized by cryptic VHL inactivation. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2:167.

51. Gimm O, Greco A, Hoang-Vu C, Dralle H, Pierotti MA, Eng C. Mutation analysis reveals novel sequence variants in NTRK1 in sporadic human medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(8):2784-2787.

52. Lipska BS, Drozynska E, Scaruffi P, Tonini GP, Izycka-Swieszewska E, Zietkiewicz S, Balcerska A, Perek D, Chybicka A, Biernat W, Limon J. c.1810C>T polymorphism of NTRK1 gene is associated with reduced survival in neuroblastoma patients. *BMC Cancer.* 2009;9:436.

53. Saito Y, Koya J, Araki M, Kogure Y, Shingaki S, Tabata M, McClure MB, Yoshifuji K, Matsumoto S, Isaka Y, Tanaka H, Kanai T, Miyano S, Shiraishi Y, Okuno Y, Kataoka K. Landscape and function of multiple mutations within individual oncogenes. *Nature.* 2020;582(7810):95-99.

54. Chen Z, Feng J, Saldivar JS, Gu D, Bockholt A, Sommer SS. EGFR somatic doublets in lung cancer are frequent and generally arise from a pair of driver mutations uncommonly seen as singlet mutations: one-third of doublets occur at five pairs of amino acids. *Oncogene*. 2008;27(31):4336-4343.
55. Schneider G, Schmidt-Supprian M, Rad R, Saur D. Tissue-specific tumorigenesis: context matters. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(4):239-253.

9. Saját publikációk jegyzéke

9.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények

Zoltán Lippai, Bálint Péterfia, Gergő Papp, Katalin Dezső, Gábor Bedics, Zsuzsanna Pápai, Meindert H Lamers, Rosan CM Kuin, Károly Szuhai#, Zoltán Sági#. A recurrent NTRK1 tyrosine kinase domain mutation pair is characteristic in a subset of dedifferentiated liposarcomas. Eur. J. Cancer. 2024 May;202:114005. *IF: 8,4*

Lippai Zoltán, Sági Zoltán. A neurotrofikus tropomiozin receptor-tirozin-kináz génfüziót tartalmazó daganatok diagnosztikai megközelítése. Orv Hetil. 2020; 161(41): 1753–1763. *IF: 0,540*

Lippai Zoltán, Sági Zoltán. Az NTRK génfüziók, mint szövet-agnosztikus biomarker szerepe különböző daganatok diagnosztikájában és célzott kezelésében. Orvosképzés. 2021; XCVI. évfolyam, 3:455-468. *IF: -*

9.2. Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent közlemények

Rónai Zsolt, **Lippai Zoltán**, Elek Zsuzsanna, Somogyi Anikó. Komplex jellegek genetikai hátterének elemzése. Orv Hetil. 2018; 159(31): 1254–1261. *IF: 0,564*

Zoltán Sági*, **Zoltán Lippai***, Gergő Papp, Lajos Hegyi, Johanna Sági, Katalin Dezső, Károly Szuhai. Nodular fasciitis: a comprehensive, time-correlated investigation of 17 cases. Mod. Pathol. (2021) 34:2192–2199. *IF: 8,209*

Imre Antal, Zsuzsanna Pápai, Miklós Szendrői, Tamás Perlaky, Katalin Dezső, **Zoltán Lippai**, Zoltán Sági. Pathol. Oncol. Res. (2022) 28:1610633. *IF: 2,8*

10. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni hálámat a családomnak, amiért lehetővé tették a tanulmányaimat, támogattak minden tekintetben.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Sági Zoltán professzor úrnak, aki kiváló kutatásvezető. Átala megismerhettem a jó kutató gondolkodásmódját, hozzáállását. Mindvégig segítette a munkámat, mindig fogadott, bármivel is fordultam hozzá.

Köszönettel tartozom Dr. Matolcsy András professzor úrnak. A lehető legjobb helyen végeztem kutatást, a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében.

Köszönettel tartozom Dr. Merkely Béla rektor úrnak. A lehető legjobb helyen végeztem kutatást, a Semmelweis Egyetemen.

Továbbá hálával tartozom mindenkinek, aki bármilyen módon segítette a munkámat: Polgárné Zoltánné, Dr. Papp Gergő, Dr. Dezső Katalin, Dr. Szuhai Károly, Dr. Péterfia Bálint, Dr. Bödör Csaba, Dr. Nagy Ákos, Dr. Krizsán Szilvia, Dr. Gángó Ambrus, Dr. Bedics Gábor, Gróf Stefánia, Lévy Luca, Kremper Zsanett, Pallag Adrienne, Hegyi Lajos, Zajta Erik, Dr. Baghy Kornélia, Dr. Krencz Ildikó, Laczik Cecília, valamint az összes munkatársamnak a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben.