



Narodowy Instytut Onkologii
im. Marii Skłodowskiej-Curie -
Państwowy Instytut Badawczy

Klinika Nowotworów Tkanek Miękkich,
Kości i Czerniaków

Agnieszka Zając

**Opracowanie systemu immunologiczno-
molekularnego profilowania
chrzęstniakomięsaków**

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Piotr Rutkowski
Klinika Nowotworów Tkanek Miękkich, Kości i Czerniaków

Warszawa, 2024

Praca finansowana ze środków przyznanych przez:
Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu 2019/33/B/NZ5/02510

Serdecznie dziękuję:

Prof. dr hab. n. med. Piotrowi Rutkowskiemu - mojemu promotorowi, za możliwość ciągłego rozwoju w trakcie realizacji pracy doktorskiej oraz za okazane mi zaufanie i wsparcie.

Prof. dr hab. n. med. Annie M. Czarneckiej za wsparcie merytoryczne w trakcie realizacji całego projektu oraz za wszelkie uwagi i wskazówki podczas pisania pracy.

Dr hab. n. med. Annie Szumerze-Ciećkiewicz, prof. NIO-PIB za nadzór nad pracą od strony patomorfologa, za poświęcony czas na ocenę materiału do badań oraz analizę barwień immunohistochemicznych, a także za wykonane do pracy zdjęcia oraz wszelkie okazane podczas realizacji pracy wsparcie.

Dr Jakubowi Piątkowskiemu za poświęcony czas przy opracowaniu analizy bioinformatycznej, pomoc i nadzór merytoryczny w trakcie pracy laboratoryjnej i interpretacji danych genetycznych, a także wsparcie podczas realizacji doktoratu.

Dr n. med. Pawłowi Teteryczowi za przeprowadzone analizy statystyczne, pomoc w programowaniu w środowisku R i interpretacji danych od strony statystycznej, a także stworzenie bazy danych na potrzeby realizacji tej pracy.

Prof. dr hab. Pawłowi Golikowi za stworzenie warunków pracy do przeprowadzenia badań molekularnych oraz za wsparcie merytoryczne w trakcie realizacji projektu.

Dr n. med. Andrzejowi Tysarowskiemu oraz Zespołowi z Zakładu Diagnostyki Genetycznej i Molekularnej Nowotworów za udostępnienie sprzętu do badania i pomoc w przeprowadzeniu oznaczeń niestabilności mikrosatelitarnej na potrzeby realizacji projektu.

Pracownikom z Zakładu Patomorfologii Nowotworów, w szczególności Pani Darii Owczarek, mgr Monice Kaweckiej, lek. Justynie Tuziak oraz mgr Beacie Puton za przygotowanie materiału do badania, przeprowadzenie barwień immunohistochemicznych i pomoc w ich ocenie oraz liczeniu komórek.

Prof. dr hab. Ewie Bartnik za cenne uwagi merytoryczne i poprawki do tej pracy.

Pracownikom z Kliniki Nowotworów Tkanek Miękkich, Kości i Czerniaków NIO-PIB, Instytutu Genetyki i Biotechnologii UW, a także z Zakładu Genetyki NIO-PIB, z którymi miałam okazję współpracować w trakcie realizacji doktoratu za wszelką pomoc i udzielone w trakcie realizacji pracy wsparcie.

Moim bliskim, w szczególności Damianowi i najbliższej rodzinie za cierpliwość, wyrozumiałość oraz niezastąpione w realizacji doktoratu wsparcie, a także przyjaciółom i znajomym za zrozumienie i słowa otuchy w trudnych chwilach.

STRESZCZENIE

Opracowanie systemu immunologiczno-molekularnego profilowania chrzęstniakomięsaków

Chrzęstniakomięsak (ChS, ang. chondrosarcoma) jest drugim co do częstości występowania pierwotnym złośliwym nowotworem kości, należącym do mięsaków kości. ChS obejmują heterogenną grupę o wielu podtypach histologicznych ze zróżnicowaną patomorfologią i rokowaniem. Leczenie pacjentów z rozpoznaniem ChS ogranicza się głównie do resekcji chirurgicznej, a inne opcje terapeutyczne są niedostępne z uwagi na oporność tych nowotworów na chemioterapię i radioterapię. ChS są uważane za guzy o słabej odpowiedzi na immunoterapię, jednak zarówno ich mikrośrodowisko, jak i podłoże molekularne oraz patogeneza są nadal słabo poznane. Celem pracy było opracowanie sposobu klasyfikacji ChS w oparciu o ocenę czynników immunologicznych, zmian genetycznych oraz wyników terapii pacjentów.

Do badania włączono 99 pacjentów ze zdiagnozowanym pierwotnym ChS o różnych podtypach histologicznych (28 G1, 37 G2, 24 G3 i 10 odróżnicowanych ChS). Materiał do badań pochodził z bloczków parafinowych. Do analiz immunologicznych wykorzystano barwienia immunohistochemiczne dla 20 markerów, obejmujących m.in. efektorowe limfocyty T, limfocyty B, komórki prezentujące antygen, makrofagi M1/M2, „wyczerpane” limfocyty T, czy ekspresję PD-L1 na komórkach nowotworowych. Oceny nacieków komórek odpornościowych dokonano w centralnym i obwodowym regionie guza z wykorzystaniem mikromacierzy tkankowych. Dodatkowo na podgrupie 53 pacjentów oceniono ekspresję genów związanych z mikrośrodowiskiem guza przy pomocy reakcji qPCR z wykorzystaniem komercyjnego panelu 84 genów (Human Cancer Inflammation & Immunity Crosstalk RT² Profiler PCR Array). W celu analizy profilu molekularnego i obciążenia mutacyjnego guza (TMB, ang. *tumor mutational burden*) przeprowadzono sekwencjonowanie następnej generacji z wykorzystaniem celowanego panelu 409 genów (OncomineTM Tumor Mutation Load Assay). Dodatkowo oceniono niestabilność mikrosatelitarną (MSI, ang. *microsatellite instability*) z użyciem IdyllaTM MSI Test. Wpływ czynników immunologiczno-molekularnych na przeżycia całkowite pacjentów oceniono przy wykorzystaniu wieloparametrycznego modelu Coxa penalizowanego LASSO.

Analiza immunologiczna wykazała, że zarówno w centralnym, jak i obwodowym regionie guza występuje największy udział komórek HLA-DR+, monocytów/makrofagów

CD14+, makrofagów M1 CD68+ i makrofagów M2 CD163+, a także komórek Gal-9+. Na podstawie markerów immunologicznych wytypowano trzy różne klastry odpowiadające immunofenotypom: „zimnemu”, „gorącemu” i „pośredniemu”. Immunofenotypy różniły się znacząco między podtypami ChS ($p < 0,001$). Udział immunofenotypu „zimnego” malał wraz ze wzrostem stopnia złośliwości histologicznej, w przeciwieństwie do immunofenotypu „gorącego”. Z kolei analiza qPCR wykazała, że w przypadku wszystkich podtypów ChS następował spadek ekspresji genów zaangażowanych w różne procesy immunologiczne np. regulację odpowiedzi nabytej czy produkcję molekularnych mediatorów odpowiedzi immunologicznej. Analiza molekularna wykazała, że mediana TMB dla badanej grupy pacjentów wyniosła 2,35 mut/Mb i w żadnej z badanych próbek nie wykryto MSI. Najczęściej występujące mutacje ($> 10\%$ pacjentów) dotyczyły genów *IDH1/2*, *TP53*, *TAF1* i *RNF213*. Obecność mutacji w genach *IDH1/2* lub *TP53* była związana z ChS o wyższym stopniu złośliwości histologicznej ($FDR < 0,05$). Dodatkowo podtypy o wyższym stopniu złośliwości histologicznej (G2/G3 i odróżnicowany) cechowała obecność bardziej złożonych zmian molekularnych. Ponadto wykazano, że szlaki związane z receptorami kinaz tyrozynowych, białkiem p53, czy remodelowaniem chromatyny były najczęściej deregulowane w badanej grupie pacjentów. W przypadku pacjentów o „gorącym” immunofenotypie obserwowano generalnie więcej aberracji chromosomowych, również w wyżej wymienionych szlakach molekularnych. W wieloczynnikowej analizie obecność immunofenotypu „gorącego” z większą liczbą nacieków immunologicznych w centralnym regionie guza (HR: 3,3; CI: 1,13-9,8; $p < 0,05$) oraz obecność mutacji w genie *IDH1* (HR: 3,8; CI: 1,75-8,1; $p < 0,001$) były niezależnymi, negatywnymi czynnikami prognostycznymi, podobnie jak podtyp histologiczny, czy wielkość guza.

W pracy wykazano, że w rozwoju ChS istotną rolę odgrywają zarówno czynniki genetyczne, jak i immunologiczne. Deregulacje szlaków związanych z epigenetycznymi modyfikacjami histonów, regulacją cyklu komórkowego i szlakami kinaz mogą odgrywać znaczącą rolę w rozwoju i progresji ChS, podobnie jak mutacje *IDH1*. Mikrośrodowisko ChS zdaje się wykazywać cechy immunosupresji, w której największą rolę mogą odgrywać makrofagi naciekające guz oraz markery związane z „wyczerpaniem” limfocytów np. ekspresja Gal-9. Przedstawione wyniki sugerują, że zastosowanie skojarzenia immunoterapii z inhibitorami IDH1 może przynieść potencjalne korzyści kliniczne dla wybranych pacjentów.

Słowa kluczowe: chrzestniakomięsak, immunoonkologia, profilowanie molekularne.

SUMMARY

Development of an immunological-molecular system of chondrosarcoma profiling

Chondrosarcoma (ChS) is the second most common primary malignant bone tumor, which belongs to bone sarcomas. ChS is a heterogeneous group of numerous histological subtypes with different pathomorphology and prognosis. Treatment of these tumors is limited to surgical resection with no other therapeutic options due to the resistance of these tumors to chemotherapy and radiotherapy. ChS is considered to have a poor response to immunotherapy; however, both the ChS microenvironment and molecular background, as well as pathogenesis, remain poorly understood. The aim of this study was to develop a classification method for ChS based on the assessment of immunological factors, genetic changes, and the clinical outcomes of patients.

The study included 99 patients diagnosed with primary ChS of different histological subtypes (28 G1, 37 G2, 24 G3, and 10 dedifferentiated ChS). Formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks were used for further analysis. Immunological analysis was performed using immunohistochemical staining of 20 markers, including e.g., effector T lymphocytes, B lymphocytes, antigen-presenting cells, M1/M2 macrophages, exhausted T lymphocytes, and PD-L1 expression in tumor cells. Immune cell infiltrations were evaluated in both the central and peripheral regions of the tumor using tissue microarrays. Additionally, in a subset of 53 patients, gene expression analysis related to the tumor microenvironment was assessed using qPCR with a commercial panel of 84 genes (Human Cancer Inflammation & Immunity Crosstalk RT² Profiler PCR Array). The molecular profile and tumor mutational burden (TMB) were analyzed by targeted next-generation sequencing of the 409 gene panel (OncoPrint™ Tumor Mutation Load Assay). Microsatellite instability (MSI) was analyzed using the Idylla™ MSI Test. The impact of immunological and molecular factors on overall patient survival was evaluated using a multivariate LASSO penalized Cox model.

Immunological analysis revealed that both the central and peripheral regions of the tumor had the highest presence of HLA-DR⁺ cells, CD14⁺ monocytes/macrophages, CD68⁺ M1 macrophages, CD163⁺ M2 macrophages, and Gal-9⁺ cells. Based on immunological markers, three distinct groups were identified corresponding to immunophenotypes: “cold”, “hot”, and “intermediate”. The immunophenotypes were significantly different between ChS subtypes ($p < 0.001$). The proportion of the “cold”

immunophenotype decreased along with histological grade, in contrast to the “hot” one. The qPCR analysis showed decreased expression of genes related to various immunological processes, such as regulation of the acquired immune response or production of molecular mediators of the immune response, in all ChS subtypes. Molecular analysis showed that the median TMB was 2.35 mutations/Mb and none of the patients had MSI. The most common mutations (> 10% of patients) were in the *IDH1/2*, *TP53*, *TAF1*, and *RNF213* genes. The presence of *IDH1/2* or *TP53* mutations was associated with high-grade ChS (FDR<0.05). Additionally, high-grade ChS (G2/G3 and dedifferentiated) were characterized by the presence of more complex molecular alterations. In addition, receptor tyrosine kinase-signaling, p53 protein, and chromatin remodeling pathways were the most frequently deregulated in the study population. Genetic abnormalities related to these pathways were prevalent in the group of patients with a “hot” immunophenotype. In multivariate analysis, the presence of a “hot” immunophenotype with a higher number of immune infiltrates in the central region of the tumor (HR: 3.3; CI: 1.13-9.8; p<0.05) and the presence of *IDH1* mutations (HR: 3.8; CI: 1.75-8.1; p<0.001) were independent negative prognostic factors, as well as histological subtype and tumor size.

Both genetic and immunological factors have been shown to play a significant role in the development of ChS. Deregulations in pathways related to epigenetic modifications, cell cycle regulation, and kinase pathways, as well as *IDH1* mutations, may play an important role in the development and progression of ChS. The ChS microenvironment seems to exhibit an immunosuppressive phenotype, in which the tumor-associated macrophages and markers related to exhausted lymphocytes, such as Gal-9 expression, may play an important role. These results suggest that the use of immunotherapy combined with IDH1 inhibitors may have potential as a future therapy for selected patients.

Keywords: chondrosarcoma, immuno-oncology, molecular profiling.

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	15
1. Wprowadzenie	27
1.1. Charakterystyka chrzęstniakomięsaka	29
1.1.1. Opis choroby.....	29
1.1.2. Podtypy histologiczne chrzęstniakomięsaka	30
1.1.3. Podłoże molekularne chrzęstniakomięsaków	35
1.1.3.1. Mutacje IDH	36
1.1.3.2. Mutacje genu TP53 i deregulacja ścieżki sygnałowej p53 oraz pRb	37
1.1.3.3. Pozostałe zmiany molekularne i deregulowane szlaki	38
1.1.3.4. Aberracje chromosomowe	40
1.1.4. Leczenie chrzęstniakomięsaka	42
1.2. Terapie celowane w chrzęstniakomięsakach	43
1.2.1. Inhibitory angiogenezy	43
1.2.2. Inhibitory IDH	44
1.2.3. Inhibitory szlaku PI3K-AKT-mTOR	44
1.2.4. Epigenetyczne strategie w leczeniu pacjentów z rozpoznaniem ChS.....	45
1.2.5. Pozostałe terapie celowane	45
1.3. Mikrośrodowisko nowotworów i jego rola w odpowiedzi na immunoterapię	46
1.3.1. Guzy immunologicznie „gorące” i „zimne”	49
1.3.2. Immunofenotyp chrzęstniakomięsaka.....	50
1.3.3. Zastosowanie immunoterapii w chrzęstniakomięsakach	53
1.3.3.1. Obciążenie mutacyjne guza i jego rola w immunoterapii	53
1.3.3.2. Rola niestabilności mikrosatelitarnej w immunoterapii	54
2. Cel pracy.....	56
3. Materiały i metody	57

3.1.	Charakterystyka pacjentów.....	57
3.2.	Materiał biologiczny do badań	58
3.3.	Schemat badania.....	59
3.4.	Metodyka	59
3.4.1.	Analizy molekularne	59
3.4.1.1.	Izolacja DNA i RNA ze skrawków parafinowych	59
3.4.1.2.	Panel genetyczny do oceny profilu genetycznego.....	60
3.4.1.3.	Przygotowanie bibliotek DNA.....	61
3.4.1.4.	Przebieg sekwencjonowania następnej generacji	64
3.4.1.5.	Analiza bioinformatyczna danych z sekwencjonowania następnej generacji	66
3.4.1.6.	Sekwencjonowanie metodą Sangera	74
3.4.1.7.	Ocena niestabilności mikrosatelitarnej.....	75
3.4.2.	Analizy immunologiczne.....	76
3.4.2.1.	Analiza immunohistochemiczna.....	76
3.4.2.2.	Analiza ekspresji genów związanych z mikrośrodowiskiem guza.....	77
3.4.3.	Analizy statystyczne i wizualizacja danych	81
4.	Wyniki	83
4.1.	Charakterystyka pacjentów wytypowanych do analiz immunologiczno-molekularnych.....	83
4.1.1.	Ocena wpływu czynników klinicznych na przeżycie pacjentów	85
4.2.	Ocena profilu genetycznego	88
4.2.1.	Sekwencjonowanie metodą Sangera.....	88
4.2.2.	Ocena obciążenia mutacyjnego guza oraz niestabilności mikrosatelitarnej..	91
4.2.3.	Ocena profilu mutacyjnego	93
4.2.3.1.	Korelacja najczęściej deregulowanych genów	99
4.2.3.2.	Ocena deregulowanych szlaków molekularnych.....	101

4.2.4.	Znaczenie kliniczne wykrytych zmian genetycznych.....	105
4.3.	Ocena profilu immunologicznego	106
4.3.1.	Rozkład markerów immunologicznych w obrębie guza.....	106
4.3.1.1.	Ekspresja PD-L1 oraz ocena 3-rzędowych struktur limfoidalnych.....	111
4.3.2.	Określenie immunofenotypu	113
4.3.2.1.	Ekspresja PD-L1 oraz ocena 3-rzędowych struktur limfoidalnych.....	117
4.3.3.	Ocena zależności pomiędzy poszczególnymi immunofenotypów a przeżyciami pacjentów z rozpoznaniem chłoniaka	119
4.3.4.	Ocena ekspresji genów związanych z mikrośrodowiskiem guza na podgrupie pacjentów.....	121
4.4.	Korelacja danych immunologiczno-molekularnych	124
5.	Dyskusja	129
5.1.	Ocena prognostycznych czynników klinicznych u pacjentów z rozpoznaniem chłoniaka	129
5.2.	Ocena profilu molekularnego chłoniaka.....	131
5.3.	Ocena profilu immunologicznego chłoniaka	140
5.4.	Korelacja danych immunologiczno-molekularnych	150
6.	Podsumowanie i wnioski.....	157
	Bibliografia	159
	Spis tabel.....	188
	Spis rycin	189
	Załącznik 1. Porównanie różnych metod analizy bioinformatycznych danych z sekwencjonowania następnej generacji	192
	Załącznik 2. Sekwencje starterów użyte do sekwencjonowania metodą Sangera	193
	Załącznik 3. Wykaz przeciwciał użytych do immunohistochemii.....	194
	Załącznik 4. Szczegółowy opis genów użytych do oceny ekspresji genów.....	196
	Załącznik 5. Wyniki testów Fishera dla danych genetycznych.....	199
	Załącznik 6. Szczegółowe wyniki analizy Coxa danych molekularnych.....	201

Załącznik 7. Barwienia immunohistochemiczne	202
Załącznik 8. Wykaz publikacji i monografii opublikowanych w trakcie realizacji pracy doktorskiej	207
Załącznik 9. Wykaz prac prezentowanych podczas konferencji związanych z realizacją pracy doktorskiej.....	208

Wykaz stosowanych skrótów

<i>ABL1</i>	gen kodujący białko Abl (ang. <i>v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>)
<i>ACKR3</i>	gen kodujący ACKR3, inaczej CXCR7 (ang. <i>atypical chemokine receptor 3</i>)
<i>ACVR2A</i>	gen receptora aktywiny A typu 2 (ang. <i>activin A receptor, type II</i>)
<i>ADGRA2</i>	gen kodujący jeden z receptorów sprzężonych z białkiem G (ang. <i>adhesion G protein-coupled receptor A2</i>)
<i>AF</i>	frekwencja (alternatywnego) allelu (ang. <i>allele frequency</i>)
<i>AKT</i>	kinaza białkowa B (ang. <i>protein kinase B</i>)
<i>AKT2</i>	gen kodujący kinazę AKT (ang. <i>AKT serine/threonine kinase 2</i>)
<i>ALK</i>	gen kodujący kinazę chłoniaka anaplastycznego (ang. <i>anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase</i>)
<i>AP</i>	miejsce w DNA pozbawione zasady azotowej (ang. <i>apurinic/apyrimidinic sites</i>)
<i>APC</i>	komórki prezentujące antygen (ang. <i>antigen-presenting cells</i>)
<i>ARID1A</i>	gen kodujący białko ARID1A, inaczej BAF250a lub p270 (ang. <i>AT-rich interaction domain 1A</i>)
<i>ARID2</i>	gen kodujący białko ARID2, inaczej BAF200 (ang. <i>AT-rich interaction domain 2</i>)
<i>ATM</i>	gen kodujący kinazę ATM (ang. <i>Ataxia telangiectasia mutated</i>)
<i>ATR</i>	gen kodujący kinazę ATR (ang. <i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>)
<i>ATRX</i>	gen kodujący regulator transkrypcji ATRX (ang. <i>alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked</i>)
<i>B7-H3</i>	inne określenie markera CD276 (ang. <i>B7 homolog 3</i>)
<i>BAM</i>	format pliku z binarnym zapisem przyrównania do sekwencji referencyjnej w wyniku mapowania (ang. <i>Binary Alignment Map</i>)
<i>BCL11B</i>	gen kodujący białko BCL11B (ang. <i>B-cell lymphoma/leukemia 11B</i>)
<i>Bcl-2</i>	białko z rodziny Bcl-2 (ang. <i>B-cell lymphoma 2</i>)
<i>BCR</i>	gen kodujący białko BCR (ang. <i>BCR activator of RhoGEF and GTPase</i>)
<i>BER</i>	szlak naprawy przez wycięcie zasad (ang. <i>base excision repair</i>)
<i>BQSR</i>	re-kalibracja jakości zasad azotowych (ang. <i>Base Quality Score Recalibration</i>)

<i>BRAF</i>	gen kodujący białko BRAF (ang. <i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>)
<i>BRD3</i>	gen kodujący białko zawierające bromodomenę (ang. <i>bromodomain-containing protein 3</i>)
<i>BWA</i>	narzędzie do mapowania sekwencji o niskim stopniu rozbieżności z dużym genomem referencyjnym np. ludzkim (ang. <i>Burrows-Wheeler Alignment Tool</i>)
<i>CARD11</i>	gen kodujący białko Carma 1 (ang. <i>caspase recruitment domain family member 11</i>)
<i>CBL</i>	gen kodujący białko c-Cbl (ang. <i>Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene</i>)
<i>CD</i>	antygen różnicowania komórkowego (ang. <i>cluster of differentiation</i>)
<i>CDH1</i>	gen kodujący E-kadherynę (ang. <i>E-cadherin</i>)
<i>CDK4/6</i>	gen kinazy 4/6 zależnej od cyklin (ang. <i>cyclin-dependent kinase 4/6</i>)
<i>CDKN2A/B</i>	gen inhibitora kinazy cyklinozależnej 2A/B (ang. <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B</i>)
<i>CDX1</i>	gen kodujący białko CDX-1 (ang. <i>caudal type homeobox 1</i>)
<i>CHEK2</i>	gen kodujący kinazę CHK2 (ang. <i>checkpoint kinase 2</i>)
<i>ChS</i>	chrzęstniakomięsak (ang. <i>chondrosarcoma</i>)
<i>CI</i>	przedział ufności (ang. <i>confidence interval</i>)
<i>CIC</i>	gen represora transkrypcyjnego, odrywającego rolę w rozwoju ośrodkowego układu nerwowego (ang. <i>Capicua transcriptional repressor</i>)
<i>CNV</i>	zmienność liczby kopii (ang. <i>copy number variation</i>)
<i>COL2A1</i>	gen kolagenu typu II (ang. <i>collagen type II alpha 1</i>)
<i>CREBBP</i>	gen kodujący białko wiążące białko CREB (ang. <i>CREB binding protein</i>)
<i>CSF1</i>	czynnik wzrostu kolonii makrofagów (ang. <i>colony stimulating factor 1</i>)
<i>CSF1R</i>	receptor czynnika wzrostu kolonii makrofagów (ang. <i>colony stimulating factor 1 receptor</i>)
<i>CSMD3</i>	gen kodujący białko (ang. <i>CUB and Sushi domain-containing protein 3</i>)
<i>CSV</i>	format pliku z wartościami rozdzielonymi przecinkami (ang. <i>comma-separated values</i>)
<i>CT</i>	wartości cyklu progowego (ang. <i>cycle threshold</i>)

CTLA-4	antygen cytotoksycznych limfocytów typu 4 (ang. <i>cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4</i>)
CXCL12	chemokina CXCL12 (ang. <i>C-X-C motif chemokine ligand 12</i>)
CXCR7	receptor chemokinowy CXCR7 (ang. <i>C-X-C chemokine receptor type 7</i>)
DAB	3,3'-diaminobenzydyna (ang. <i>3,3'-diaminobenzidine</i>)
dbSNP	baza zbierająca informacje o polimorfizmach pojedynczego nukleotydu w populacji (ang. <i>single nucleotide polymorphism database</i>)
DC	komórki dendrytyczne (ang. <i>dendritic cells</i>)
DC-SIGN	gen kodujący białko CD209 (ang. <i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>)
DDCS	odróżnicowany chrząstniakomięsak (ang. <i>dedifferentiated chondrosarcoma</i>)
DDR	szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA (ang. <i>DNA damage response</i>)
DFS	czas przeżycia wolnego od choroby (ang. <i>disease-free survival</i>)
DNMT3A	gen kodujący metylotransferazę DNA DNMT3a (ang. <i>DNA methyltransferase 3 alpha</i>)
dNTP	deoksynukleotyd (ang. <i>deoxynucleotide triphosphate</i>)
DP	parametr minimalnego pokrycia w pojedynczym locus genowym (ang. <i>depth</i>)
DR	„receptory „śmierci” (ang. <i>death receptors</i>)
DSS	przeżycie swoiste dla choroby (ang. <i>disease specific survival</i>)
ECM	macierz zewnątrzkomórkowa (ang. <i>extracellular matrix</i>)
EGF	czynnik wzrostu naskórka (ang. <i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	gen kodujący receptor EGF (ang. <i>epidermal growth factor receptor</i>)
EP300	gen kodujący acetylotransferazę KAT3B/p300 (ang. <i>E1A binding protein P300</i>)
EP400	gen kodujący białko p400 (ang. <i>E1A-binding protein P400</i>)
EPHA7	gen kodujący receptor efriny typu A7 (ang. <i>EPH receptor A7</i>)
EPHB1	gen kodujący receptor efriny B1 (ang. <i>ephrin type-B receptor 1</i>)
ERBB2/4	geny kodujące kinazy erbB2/4 (ang. <i>v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2/4</i>)
ERCC2/4	geny kodujące białka ERCC2/4 (ang. <i>excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2/4</i>)
ERK	kinaza regulowana sygnałami zewnątrzkomórkowymi (ang. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>)

<i>EXT1/2</i>	gen kodujący egzostozynę-1/2 (ang. <i>exostosin 1/2</i>)
<i>FBXW7</i>	gen kodujący białko FBXW7 (ang. <i>F-box and WD repeat domain containing 7</i>)
FC	parametr opisujący zmianę ekspresji genów między kolejnymi pomiarami (ang. <i>fold change</i>)
FDR	wskaźnik fałszywych odkryć (ang. <i>false discovery rate</i>)
FFPE	bloczek parafinowy (ang. <i>formalin-fixed paraffin-embedded</i>)
<i>FGFR1</i>	gen kodujący receptor FGF1 (ang. <i>fibroblast growth factor receptor 1</i>)
<i>FGFR3</i>	gen kodujący receptor FGF3 (ang. <i>fibroblast growth factor receptor 3</i>)
<i>FGFR4</i>	gen kodujący receptor FGF4 (ang. <i>fibroblast growth factor receptor 4</i>)
<i>FGL-1</i>	białko podobne do fibrynogenu 1 (ang. <i>fibrinogen-like protein 1</i>)
<i>FHIT</i>	gen kodujący białko FHIT z rodziny triady histydynowej (ang. <i>fragile histidine triad diadenosine triphosphatase</i>)
<i>FLT3</i>	gen kodujący receptor FLT3 (CD135) (ang. <i>Fms-like tyrosine kinase 3</i>)
Foxp3	czynn timeranskrypcyjny odgrywający istotną rolę w regulacji odpowiedzi odpornościowej (ang. <i>Forkhead box P3</i>)
Funcotator	program z pakietu GATK (ang. <i>FUNCTIONal annOTATOR</i>)
<i>FZR1</i>	gen kodujący białko CDH1 (ang. <i>fizzy and cell division cycle 20 related 1</i>)
G	stopień złośliwości histologicznej (ang. <i>grading</i>)
<i>GAL-3/9</i>	galektyna 3/9 (ang. <i>galectin-3/9</i>)
<i>GATA3</i>	gen kodujący czynnik transkrypcyjny GATA3 (ang. <i>GATA binding protein 3</i>)
GATK	zbiór pakietów do analiz genomowych (ang. <i>Genome Analysis Toolkit</i>)
GCP	Dobra Praktyka Kliniczna (ang. <i>good clinical practice</i>)
<i>GLI1</i>	czynn timeranskrypcyjny zaangażowany w szlak sygnałowy „jeża” (ang. <i>glioma-associated oncogene</i>)
G-MDSC	granulocytarne mieloidale komórki supresorowe (ang. <i>granulocytic myeloid-derived suppressor cells</i>)
gnomAD	baza zbierająca dane o genomach w populacji (ang. <i>Genome Aggregation Database</i>)
GO	baza danych zbierająca informacje o ontologii genów (ang. <i>Gene Ontology</i>)
GOBP	baza GO dotycząca procesów biologicznych (ang. <i>Gene Ontology biological process</i>)
<i>GRM8</i>	gen kodujący receptor GRM8 (ang. <i>glutamate metabotropic receptor 8</i>)

HAT	acetylotransferaza histonowa (ang. <i>histone acetyltransferases</i>)
HDAC	deacetylaza histonowa (ang. <i>histone deacetylase inhibitors</i>)
HEY1	gen kodujący białko HEY1 (ang. <i>hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1</i>)
2-HG	2-hydroksyglutaran (ang. <i>2-hydroxyglutarate</i>)
Hh	szlak sygnałowy „jeża” (ang. <i>Hedgehog</i>)
HIF1 α	czynn timer indukowany hipoksją 1 (ang. <i>hypoxia-inducible factor 1</i>)
HIF1A	gen kodujący HIF1 α (ang. <i>hypoxia inducible factor 1 subunit alpha</i>)
HKGs	geny metabolizmu podstawowego (ang. <i>housekeeping genes</i>)
HLA	ludzki antygen leukocytarny, inaczej MHC (ang. <i>human leukocyte antigen</i>)
HLA-B	gen kodujący HLA-B (ang. <i>HLA Class I Histocompatibility Antigen, B Alpha Chain</i>)
HMO	zespół mnogich wyrosła chrzęstno-kostnych (ang. <i>hereditary multiple osteochondromas</i>)
HNF1A	gen kodujący białko HNF-1 α (ang. <i>hepatocyte nuclear factor-1 alpha</i>)
HPF	duże pole widzenia (ang. <i>high power field</i>)
HR	współczynnik ryzyka (ang. <i>hazard ratio</i>)
HRD	upośledzenie systemu rekombinacji homologicznej (ang. <i>homologous recombination deficiency</i>)
ICK	gen kodujący białko ICK (ang. <i>intestinal cell kinase</i>)
ICPs	immunologiczne punkty kontrolne (ang. <i>immune checkpoints</i>)
IDH	dehydrogenaza izocytrynianowa (ang. <i>isocitrate dehydrogenase</i>)
IDO	2,3-dioksygenaza indoloaminy (ang. <i>indoleamine dioxigenase</i>)
IGF1	gen kodujący insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. <i>insulin like growth factor 1</i>)
IGF-1R	receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (ang. <i>insulin-like growth factor 1 receptor</i>)
IGF1R	gen kodujący IGF-1R (ang. <i>insulin-like growth factor 1 receptor</i>)
IHC	immunohistochemia (ang. <i>immunohistochemistry</i>)
IHH	białko zaangażowane w szlak „jeża” (ang. <i>indian hedgehog protein</i>)
IL	interleukina (ang. <i>interleukin</i>)
INDEL	insercje lub delecje nukleotydów (ang. <i>indel - insertion or deletion</i>)
IR	oprogramowanie komercyjne do panelu genetycznego - Ion Reporter™

<i>IRF2BP2</i>	gen kodujący czynnik transkrypcyjny IRF2 (ang. <i>interferon regulatory factor 2</i>)
<i>IRS2</i>	gen kodujący białko IRS-2 (ang. <i>insulin receptor substrate 2</i>)
<i>JAK1/2</i>	geny kodujące kinazy Janusowe (ang. <i>Janus activated kinases 1</i>)
<i>KDM4A/B</i>	demetylazy histonowe KDM4A/B (ang. <i>lysine (K)-specific demethylase 4A/B</i>)
<i>KDM5C</i>	gen kodujący demetylazę histonową KDM5C (ang. <i>lysine demethylase 5C</i>)
<i>KDM6A</i>	gen kodujący demetylazę histonową KDM6A (ang. <i>lysine demethylase 6A</i>)
<i>KIT</i>	gen kodujący kinazę c-Kit (ang. <i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>)
<i>KMT2A</i>	gen kodujący N-metylotransferazę histonową KMT2A (ang. <i>histone-lysine N-methyltransferase 2A</i>)
<i>KMT2C</i>	gen kodujący N-metylotransferazę histonową KMT2C (ang. <i>histone-lysine N-methyltransferase 2C</i>)
<i>KMT2D</i>	gen kodujący N-metylotransferazę histonową KMT2D (ang. <i>histone-lysine N-methyltransferase 2D</i>)
<i>LAG-3</i>	receptor limfocytów T (ang. <i>lymphocyte activation gene-3</i>)
<i>LAMP3</i>	glikoproteina błonowa (ang. <i>lysosome-associated membrane glycoprotein</i>)
<i>LASSO</i>	technika regresji liniowej stosowana do oszacowania współczynników modelu, która wprowadza regularyzację L1 (ang. <i>Least Absolute Shrinkage and Selection Operator</i>)
<i>LRP1B</i>	gen kodujący cholesterol frakcji lipoprotein o małej gęstości (ang. <i>LDL receptor related protein 1B</i>)
<i>MAF</i>	format pliku zawierający skategoryzowane informacje o mutacjach (ang. <i>Mutation Annotation Format</i>)
<i>MAML2</i>	gen kodujący białko MAML2 (ang. <i>mastermind like transcriptional coactivator 2</i>)
<i>MAP2K1</i>	gen kodujący kinazę MAP2K1 (ang. <i>mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>)
<i>MAP2K2</i>	gen kodujący kinazę MAP2K2 (ang. <i>mitogen-activated protein kinase kinase 2</i>)
<i>MAPK</i>	kinaza aktywowana mitogenami (ang. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
<i>Mb</i>	megabaza, milion par zasad (ang. <i>mega base pair</i>)

MCS	mezenchymalny chrzęstniakomięsak (ang. <i>mesenchymal chondrosarcoma</i>)
MDM2	ligaza białkowa ubikwityny E3 (ang. <i>mouse double minute 2 homolog</i>)
MDM2	gen kodujący białko MDM2 (ang. <i>Mdm2, Transformed 3T3 Cell Double Minute 2, P53 Binding</i>)
MDM4	gen kodujący białko MDM4 (ang. <i>Mdm4, Transformed 3T3 Cell Double Minute 4, P53 Binding</i>)
MDR1	gen oporności wielolekowej (ang. <i>multidrug resistance 1</i>)
MDSC	mieloidalne komórki supresorowe (ang. <i>myeloid-derived suppressor cells</i>)
MEK	kinaza fosforylująca MAPK (ang. <i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>)
MEN1	gen kodujący białko meninę (ang. <i>multiple endocrine neoplasia I</i>)
MET	gen kodujący receptor HGF (ang. <i>MET proto-oncogene</i>)
MFS	czas wolny od przerzutów (ang. <i>metastasis-free survival</i>)
MHC	główny układ zgodności tkankowej (ang. <i>major histocompatibility complex</i>)
MIF	gen kodujący czynnik zahamowania migracji makrofagów (ang. <i>macrophage migration inhibitory factor</i>)
MMPs	metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. <i>matrix metalloproteinases</i>)
MMR	system naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych (ang. <i>mismatch repair</i>)
MN1	gen kodujący aktywator transkrypcji MN1 (ang. <i>meningioma 1</i>)
MNP	polimorfizm więcej niż jednego nukleotydu (ang. <i>multiple nucleotide polymorphism</i>)
MSH6	gen kodujący białko MSH6 (ang. <i>MutS homolog 6</i>)
MSI	niestabilność mikrosatelitarna (ang. <i>microsatellite instability</i>)
MSS	stabilność mikrosatelitarna (ang. <i>microsatellite stable</i>)
mTOR	ssaczy cel rapamycyny (ang. <i>mammalian target of rapamycin</i>)
MYC	gen kodujący c-MYC (ang. <i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog 2</i>)
MYH9	gen kodujący izoformę ciężkiego łańcucha miozyny IXA/MYO9A (ang. <i>myosin heavy chain 9</i>)
NADP+	fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NADPH	zredukowany NADP+

NCCN	organizacja skupiająca wiodące ośrodki leczące nowotwory w Stanach Zjednoczonych (ang. <i>National Comprehensive Cancer Network</i>)
NCOA2	gen kodujący białko NCoA-2 (ang. <i>nuclear receptor coactivator 2</i>)
NF1	gen kodujący białko neurofibrominę 1 (ang. <i>neurofibromin 1</i>)
NFAT1	jądrowy czynnik 1 aktywowanych limfocytów T (ang. <i>nuclear factor of activated T cells</i>)
NF-κB	jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B (ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NIO-PIB	Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowy Instytut Badawczy
NK	komórki NK (ang. <i>natural killer</i>)
NOTCH2/4	geny kodujące białka Notch 2/4 (ang. <i>neurogenic locus notch homolog protein 2/4</i>)
NRAS	gen kodujący białko NRAS (ang. <i>neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>)
NSD1	gen kodujący metylotransferazę histonową KMT3B (ang. <i>nuclear receptor binding SET domain protein 1</i>)
NTRK	neurotroficzny receptor kinazy tyrozynowej (ang. <i>neurotrophic tyrosine receptor kinase</i>)
NTRK1/2	geny kodujące NTRK (ang. <i>neurotrophic receptor tyrosine kinase 1/2</i>)
ORR	objektywna odpowiedź na leczenie (ang. <i>objective response rate</i>)
OS	przeżycie całkowite pacjentów (ang. <i>overall survival</i>)
P4HA1	gen kodujący podjednostkę alfa-1 4-hydroksylazy prolinowej (ang. <i>prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1</i>)
PCA	analiza głównych składowych (ang. <i>principal components analysis</i>)
PD-1	receptor programowanej śmierci 1 (ang. <i>programmed death receptor 1</i>)
PDE4DIP	gen kodujący białko PDE4DIP (ang. <i>phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin)</i>)
PDGF	płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. <i>platelet derived growth factors</i>)
PD-L1/2	ligand receptora programowanej śmierci 1/2 (ang. <i>programmed death ligand 1/2</i>)
PFS	przeżycie wolne od progresji (ang. <i>progression-free survival</i>)

<i>PGDFRA/B</i>	geny kodujące białka PDGFR α/β (ang. <i>platelet-derived growth factor receptor, alpha/beta</i>)
<i>PGE2</i>	prostaglandyna E2 (ang. <i>prostaglandin E2</i>)
<i>PI3K</i>	kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (ang. <i>phosphoinositide 3-kinase</i>)
<i>PIK3CG</i>	gen kodujący białko PIK3CG (ang. <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma</i>)
<i>PLCG1</i>	gen kodujący fosfolipazę C γ 1 (ang. <i>phospholipase C gamma 1</i>)
<i>PLOD1</i>	gen kodujący hydroksylazę lizylową (ang. <i>procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1</i>)
<i>POLE</i>	gen kodujący katalityczną podjednostkę polimerazy DNA ϵ (ang. <i>DNA polymerase epsilon catalytic subunit</i>)
PolyPhen-2	jeden z predyktorów <i>in silico</i> przewidujący funkcję białek (ang. <i>polymorphism phenotyping v2</i>)
PoN	baza wariantów germinalnych w populacji (ang. <i>panel of normals</i>)
PR	częściowa odpowiedź na leczenie (ang. <i>partial response</i>)
pRb	białko siatkówczaka (ang. <i>retinoblastoma protein</i>)
<i>PSIP1</i>	gen kodujący białko LEDGF/p75 (ang. <i>PC4 and SRSF1 interacting protein 1</i>)
<i>PTCH1</i>	gen kodujący białko PTCH1 (ang. <i>protein patched homolog 1</i>)
<i>PTEN</i>	gen kodujący białko PTEN (ang. <i>phosphatase and tensin homolog</i>)
<i>PTGS2</i>	gen kodujący cyklooksygenazę-2 (ang. <i>prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i>)
PTHrP	peptyd podobny do parathormonu (ang. <i>parathyroid hormone-related peptide</i>)
<i>PTPN11</i>	gen kodujący białko PTPN11 (ang. <i>protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11</i>)
<i>PTPRT</i>	gen kodujący receptor białkowej fosfatazy tyrozynowej (ang. <i>protein tyrosine phosphatase receptor type T</i>)
qPCR	PCR w czasie rzeczywistym (ang. <i>real-time PCR/quantitative PCR</i>)
<i>RAF1</i>	gen kodujący kinazę RAF (ang. <i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>)
<i>RB1</i>	gen kodujący białko pRB (ang. <i>retinoblastoma 1</i>)
<i>RET</i>	gen kodujący kinazę RET (ang. <i>proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor RET</i>)

RFS	przeżycie wolne od nawrotu choroby (ang. <i>relapse-free survival</i>)
RNF213	gen kodujący atypową ligazę ubikwityny E3 (ang. <i>ring finger protein 213</i>)
ROS1	gen kodujący kinazę ROS (ang. <i>v-ros Avian UR2 sarcoma virus oncogene homolog 1</i>)
RTK	receptorowa kinaza tyrozynowa (ang. <i>receptor tyrosine kinase</i>)
RUNX2	gen kodujący czynnik transkrypcyjny związany z domeną runt 2 (ang. <i>runt-related transcription factor 2</i>)
RUNX3	gen kodujący czynnik transkrypcyjny związany z domeną runt 3 (ang. <i>runt-related transcription factor 3</i>)
SETD2	gen kodujący metylotransferazę histonową SETD2 (ang. <i>SET domain containing 2</i>)
SIFT	jeden z predyktorów <i>in silico</i> przewidujący funkcję białek (ang. <i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>)
SIRPA	glikoproteina błonowa SIRPα (ang. <i>signal regulatory protein alpha</i>)
SMO	gen kodujący receptor SMO (ang. <i>smoothened</i>)
SNP	polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SNV	wariant pojedynczego nukleotydu (ang. <i>single nucleotide variant</i>)
SPP1	gen kodujący osteopontynę (ang. <i>secreted phosphoprotein 1</i>)
SRC	niereceptorowa kinaza tyrozynowa z rodziny SRC (ang. <i>v-src avian sarcoma (schmidt-ruppin A-2) viral oncogene</i>)
STAT3	gen kodujący białko z rodziny STAT (ang. <i>signal transducer and activator of transcription 3</i>)
STK11	gen kodujący kinazę LKB1 (ang. <i>serine/threonine kinase 11</i>)
SWI/SNF	kompleks remodelujący chromatynę typu SWI/SNF (ang. <i>SWItch/Sucrose Non-Fermentable</i>)
SYNE1	gen kodujący białko Syne-1 (ang. <i>spectrin repeat containing nuclear envelope protein 1</i>)
TAF1	gen kodujący czynnik transkrypcyjny TFIID (ang. <i>TATA-Box binding protein associated factor 1</i>)
TAF1L	gen czynnik transkrypcyjny zbliżony do TFIID (ang. <i>TATA-Box binding protein associated factor 1-like</i>)
TAMs	makrofagi naciekające guz (ang. <i>tumor-associated macrophages</i>)

TCF12	gen kodujący czynnik transkrypcyjny Tcf12 (ang. <i>transcription factor 12</i>)
TCGA	baza danych TCGA (ang. <i>The Cancer Genome Atlas</i>)
TE	bufor elucyjny TE (ang. <i>Tris-EDTA</i>)
TERT	genu odwrotnej transkryptazy telomerazy (TERT, ang. <i>telomerase reverse transcriptase</i>)
TET	rodzina enzymów TET (ang. <i>ten-eleven translocation</i>)
TGF- β	transformujący czynnik wzrostu beta (ang. <i>transforming growth factor β</i>)
TGFB1	gen kodujący TGF- β (ang. <i>transforming growth factor beta 1</i>)
THBS1	gen kodujący trombospondynę 1 (ang. <i>thrombospondin 1</i>)
TILs	limfocyty naciekające guz (ang. <i>tumor infiltrating lymphocytes</i>)
TIM-3	immunoglobulino-podobny receptor limfocytów T (ang. <i>T cell immunoglobulin and mucin domain-3</i>)
TLOD	parametr w analizie bioinformatycznej (ang. <i>tumor log-odd</i>)
TLS	3-rzędowa struktura limfoidalna (ang. <i>tertiary lymphoid structures</i>)
TMA	mikromacierz tkankowa (ang. <i>tissue microarray</i>)
TMB	parametr obciążenia mutacyjnego guza (ang. <i>tumor mutational burden</i>)
TNB	obciążenie neoantygenem (ang. <i>tumor neoantigen burden</i>)
TNF	czynnik martwicy nowotworu (ang. <i>tumor necrosis factor</i>)
TP53	gen kodujący białko p53
TRAIL	ligand związany z indukcją apoptozy, należący do rodziny TNF (ang. <i>tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>)
Tregs	limfocyty T regulatorowe (ang. <i>regulatory T cells</i>)
TRRAP	gen kodujący białko z rodziny PIKK (ang. <i>transformation/transcription domain associated protein</i>)
TS	oprogramowanie do sekwenatora - Torrent Suite TM
TSC1	gen kodujący hamartynę (ang. <i>Tuberous Sclerosis 1</i>)
UBR5	gen kodujący koniec N ligazy ubikwityny E3 (ang. <i>ubiquitin protein ligase E3 Component N-recognin 5</i>)
UDG	glikozylaza uracyl-DNA (ang. <i>uracil-DNA glycosylase</i>)
VCF	format pliku zawierający zidentyfikowane warianty (ang. <i>Variant Call Format</i>)
VEGF-A	czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego A (ang. <i>vascular endothelial growth factor A</i>)

<i>VEGFA</i>	gen kodujący VEGF-A (ang. <i>vascular endothelial growth factor A</i>)
<i>VEP</i>	oprogramowanie do adnotacji wariantów (ang. <i>Variant Effect Predictor</i>)
<i>WHO</i>	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i>)
<i>WT1</i>	gen kodujący czynnik transkrypcyjny WT1 (ang. <i>Wilms tumor 1</i>)
<i>YEATS2</i>	gen kodujący białko YEATS (ang. <i>YEATS domain containing 2</i>)

1. Wprowadzenie

Nowotwory są jedną z chorób cywilizacyjnych i są przyczyną śmierci co piątej osoby w Polsce [1]. Pomimo ciągłego postępu badań naukowych ich leczenie wciąż stanowi wyzwanie dla współczesnej medycyny. Szczególnie trudną do leczenia grupę chorób onkologicznych stanowią nowotwory rzadkie, które obejmują ponad 200 różnych podtypów a charakteryzują się niską częstością występowania tj. poniżej 15 zachorowań na 100 000 przypadków rocznie [2,3]. Do rzadkich nowotworów należą m.in. mięsaki, które są heterogenną grupą nowotworów, obejmujących ponad 100 różnych podtypów o różnej patomorfologii, genetyce, rokowaniu i leczeniu. Mięsaki stanowią około 1% wszystkich nowotworów występujących u osób dorosłych [4,5]. Niska częstość występowania mięsaków prowadzi do trudności w przeprowadzaniu szczegółowych badań translacyjnych i klinicznych na większej grupie chorych. Na skutek braku dostatecznej wiedzy z zakresu nauk podstawowych i klinicznych oraz niewystarczającej liczby ekspertów często dochodzi do błędnych diagnoz i w konsekwencji także trudności w leczeniu mięsaków i innych nowotworów rzadkich [6].

Konwencjonalna chemioterapia jest często nieefektywna w przypadku rzadkich nowotworów, w tym mięsaków, co wymaga indywidualnego podejścia do pacjenta. Takie możliwości daje medycyna personalizowana, która w ostatnich latach zaczęła rozwijać się intensywniej [7]. Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie następnej generacji (NGS, *ang. next-generation sequencing*) oraz wykorzystanie multi-omiki w badania biomedycznych przyczyniły się do znacznego postępu w opracowywaniu nowych terapii dla pacjentów z nowotworami rzadkimi [2]. Z kolei badania translacyjne pozwoliły na przełożenie wyników badań laboratoryjnych na zastosowanie kliniczne [7]. Przykładem takiego osiągnięcia może być wykorzystanie fuzji obejmujących geny kodujące neurotroficzny receptor kinazy tyrozynowej (NTRK, *ang. neurotrophic tyrosine receptor kinase*) w diagnostyce i leczeniu niektórych mięsaków tkanek miękkich [8,9].

Leczenie ukierunkowane molekularnie, immunoterapia czy terapie skojarzone stanowią obiecującą perspektywę w leczeniu chorych na nowotwory rzadkie, w tym mięsaki [10]. Jednak ze względu na heterogenność komórek nowotworowych w guzie oraz złożony mechanizm rozwoju poszczególnych podtypów mięsaków, nadal konieczne jest dokładne poznanie podłoża molekularnego i mikrośrodowiska guza w celu opracowania nowych terapii personalizowanych.

1.1. Charakterystyka chrzęstniakomięsaka

1.1.1. Opis choroby

Mięsaki kości należą do rzadkiej grupy nowotworów (mięsaków) wywodzących się z tkanki łącznej, stanowiących około 0,5% nowych przypadków wszystkich nowotworów złośliwych u dorosłych [11]. Chrzęstniakomięsak (ChS, ang. *chondrosarcoma*) jest pierwotnym złośliwym nowotworem kości, należącym do grupy mięsaków kości, charakteryzujących się wytwarzaniem macierzy chrzęstnej i wywodzącym się z chondrocytów [12]. Nowotwór ten stanowi około 20-30% wszystkich złośliwych nowotworów kości i jest drugim co do częstości występowania, po kostniakomięsaku [13].

Odsetek zapadalności na ChS wynosi 0,1–0,3 na 100 000 osób rocznie na całym świecie [14] z nieznaczną przewagą mężczyzn [15]. W Polsce liczba zachorowań wynosi około 40-60 nowych rozpoznań rocznie [16]. Mediana wieku pacjentów u których rozpoznawany jest ChS wynosi powyżej 50 lat, przy czym ponad 70% pacjentów w momencie rozpoznania ma ponad 40 lat [13,17]. Częstość występowania ChS rośnie wraz z wiekiem [18]. U dzieci i młodych dorosłych odsetek występowania pierwotnego ChS jest znacznie mniejszy i wynosi 3% [18]. Najczęstszą lokalizacją ChS są kości szkieletu osiowego (miednica, łopatka, mostek lub żebra) oraz bliższa część kości udowej lub ramiennej [19]. Inne rzadsze lokalizacje, w których rozwija się ChS obejmują kości czaszki oraz paliczki stóp i rąk [20].

ChS charakteryzuje się powolnym wzrostem ale często dużymi rozmiarami w momencie rozpoznania - zwykle powyżej 5 cm [21]. Typowymi objawami choroby może być ból, który może nasilać się w nocy, a także ograniczony zakres ruchu zajętego stawu, złamanie patologiczne oraz obrzęk czy wyczuwalny guz. Wśród innych dolegliwości związanych z lokalizacją i wzrostem guza są np. bolesne/częste oddawanie moczu, nietrzymanie moczu, niedrożność jelit, drętwienia kończyn oraz inne objawy neurologiczne [22,23]. Czas trwania objawów przed rozpoznaniem ChS wynosi średnio od 10 do 15 miesięcy [24].

Przeżycia chorych na ChS są bardzo zróżnicowane i zależne od podtypu histologicznego, które zostały opisane szerzej w kolejnym podrozdziale (1.1.2). Najwyższe wskaźniki przeżycia 5-letniego obserwuje się u pacjentów z atypowym guzem chrzęstnym/ChS w 1 stopniu złośliwości histologicznej (G1, ang. *grade 1*), gdzie 87-99% pacjentów przeżywa 5 lat; jasnokomórkowym - 85% i okostnowym - 83%. Niższe odsetki

przeżyć pięcioletnich obserwowane są u chorych z rozpoznaniem ChS o wyższym stopniu złośliwości histologicznej tj. G2 oraz G3 gdzie odpowiednio 74-99% oraz 31-77% pacjentów przeżywa 5 lat. Najniższe odsetki przeżycia pięcioletniego opisano u chorych u których rozpoznano ChS o podtypie mezenchymalnym (MCS, ang. *mesenchymal chondrosarcoma*) (60%) i odróżnicowanym (DDCS, ang. *dedifferentiated chondrosarcoma*) (7-24%) [12,25,26].

Częstość występowania przerzutów w czasie trwania choroby u chorych na ChS jest skorelowana ze stopniem złośliwości histologicznej i waha się od 10% (G2) do nawet 70% (G3) [27,28]. W podtypach o niższej złośliwości np. G1, czy okostnowy ryzyko to jest mniejsze niż 10% [12,23]. Wysoki odsetek występowania przerzutów obserwuje się także w MCS i DDCS (ponad 20% przypadków ma przerzuty w momencie diagnozy) [12,25]. Najczęstszą lokalizacją przerzutów są płuca, a inne lokalizacje obejmują m.in. kości, wątrobę, skórę, nerki, czy mózg [29,30].

1.1.2. Podtypy histologiczne chrzęstniakomięsaka

ChS stanowi heterogenną grupę nowotworów, obejmującą wiele podtypów histologicznych. Po pierwsze ChS możemy podzielić ze względu na pochodzenie na pierwotne - rozwijające się *de novo* lub wtórne - powstające z istniejącej już wcześniej łagodnej zmiany - chrzęstniaka śródkostnego (ang. *enchondroma*) lub wyrośli chrzęstno-kostnej [12,28]. Transformacja *enchondroma* do ChS występuje w przebiegu choroby Olliera, czy w zespole Maffucciego z odpowiednio 5-50% i 53% ryzykiem rozwoju [12,20]. Z kolei na podłożu wyrośli chrzęstno-kostnej wtórny obwodowy ChS rozwija się w 1% przypadków [12]. Odsetek ten wzrasta do 15% u pacjentów z dziedzicznym zespołem mnogich wyrośli chrzęstno-kostnych (HMO, ang. *hereditary multiple osteochondromas*), który zwiększa ryzyko transformacji w ChS do 5% [31,32]. Kolejny podział ChS opiera się na lokalizacji guza - jeżeli ChS rozwija się śródszpikowo wyróżniamy ChS typu centralnego, natomiast kiedy występuje na powierzchni kości, czy w obrębie pokrywy wyrośli chrzęstno-kostnej - ChS typu obwodowego [12].

Zgodnie z obowiązującą klasyfikacją Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) ChS ma następujące podtypy [12]:

- ❖ Centralny atypowy guz chrzęstny/ChS G1
- ❖ Centralny ChS G2 i G3
- ❖ Wtórny obwodowy atypowy guz chrzęstny/ChS G1

- ❖ Wtórny obwodowy ChS G2 i G3
- ❖ Okostnowy ChS
- ❖ DDCS
- ❖ MCS
- ❖ Jasnokomórkowy ChS

Najczęściej występującym podtypem (klasycznym) są pierwotne centralne ChS, które stanowią aż 85-90% rozpoznawanych przypadków, podczas gdy wtórne obwodowe ChS stanowią 10-15% wszystkich przypadków ChS [27,33]. Wtórne obwodowe ChS występują częściej u osób młodszych - w 2-3 dekadzie życia [12] (Tabela 1).

Tabela 1. Charakterystyka podtypów histologicznych chrzęstniakomięsa.

Podtyp	Częstość występowania	Płeć (M:K)	Szczyt zachorowań (lata)	5-letnie przeżycia
Centralne/Obwodowe	85-90%/ 10-15%	1:1	30-60/ 20-40	G1:87-99% G2:74-99% G3:31-77%
Okostnowy	2,5%	1,9:2	30-40	83%
Odróżnicowany	10-15%	1.1:1	50-60	7-24%
Mezenchymalny	2-4%	1,3:1	20-30	60%
Jasnokomórkowy	2%	3:1	30-50	85%

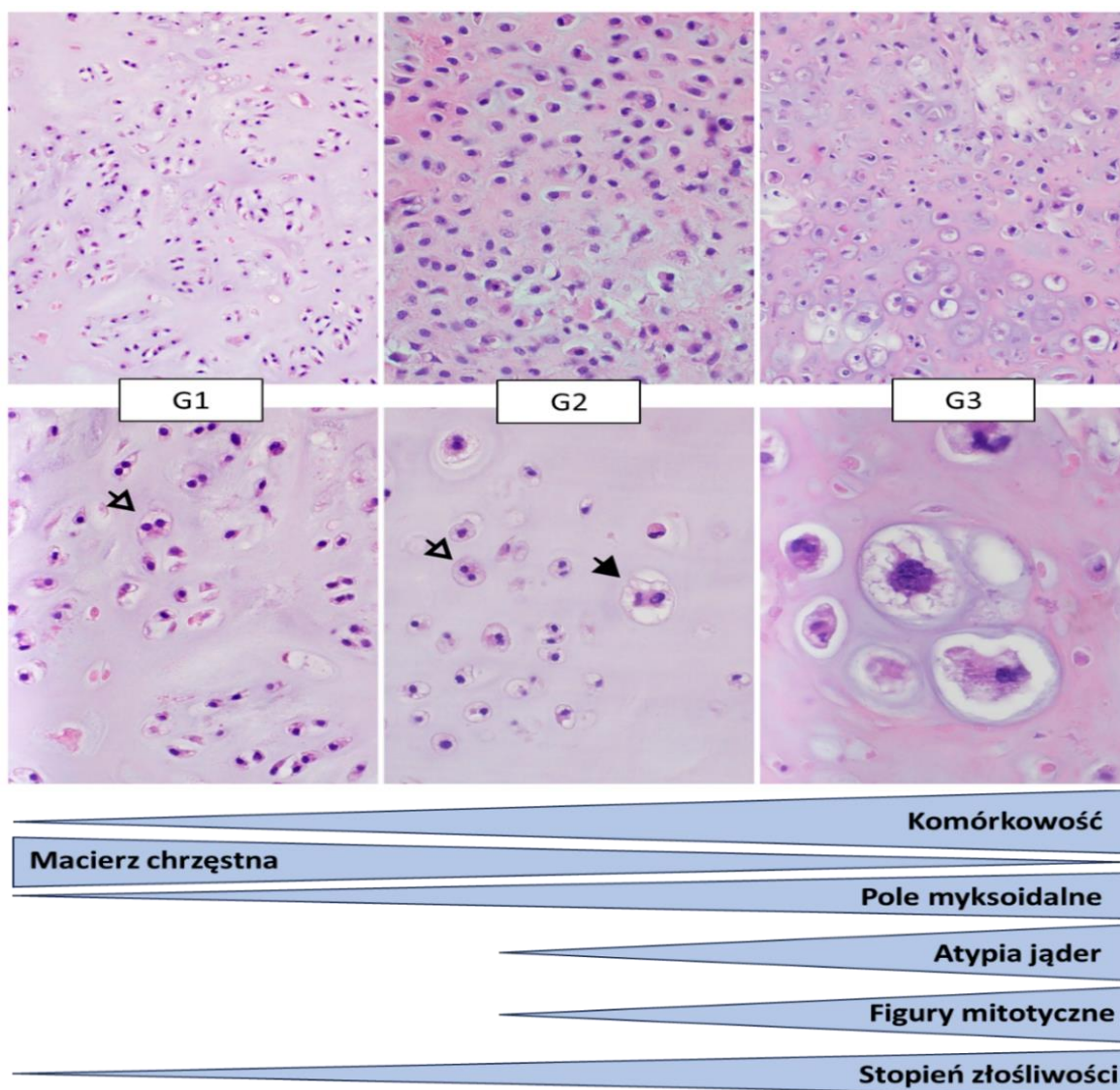
Skróty: K – kobiety, M- mężczyźni. Zmodyfikowano w oparciu o [12,33].

W przypadku centralnych i obwodowych ChS kluczowy dla oceny rokowania i wyboru sposobu leczenia jest podział na 3 stopnie złośliwości histologicznej (ang. *grading*) zaproponowany przez Evans'a i wsp. [34], który jest także obecnie najlepszym czynnikiem prognostycznym dla ChS [27] (Tabela 1). Podtypy te różnią się także morfologią (Rycina 1):

1. **G1** (niski stopień) – w obrazie mikroskopowym przypomina normalną chrząstkę lub łagodnego chrzęstniaka śródkostnego. Komórkowość jest niska do umiarkowanej, a chondrocyty mają małe, gęsto ułożone i dwujądrowe jądra, zwykle niepowiększone. Figury mitotyczne nie są obecne. Zrąb jest w większości tkanką

chrzęstną z widocznymi zrazikami chrząstki szklistej oraz z nielicznymi lub nieobecnymi obszarami myksoidalnymi [12,21,23,27].

2. **G2** (pośredni) - charakteryzuje się zwiększoną komórkowością i mniejszą ilością macierzy chondroidalnej. Zrąb guza zawiera pola chrzęstne oraz obszary myksoidalne. Jądra komórkowe są powiększone, pęcherzykowe lub hiperchromatyczne. Liczne są chondrocyty dwujądrowe i wielojądrowe. Aktywność mitotyczna jest niska tj. $< 2/10$ na duże pole widzenia (HPF, ang. *high power field*) [21,27].
3. **G3** (wysoki) - charakteryzuje się najwyższą komórkowością i skąpą macierzą chondroidalną z dominującymi obszarami myksoidalnymi. Chondrocyty są nieregularne i wrzecionowate i mają tendencję do agregacji. Jądra mają kształt pęcherzykowy lub wrzecionowaty i mogą być 5-10 razy większe niż w zdrowych chondrocytach. Często obserwowane są figury mitotyczne ($> 2/10$ HPF). W przeciwieństwie do niższych stopni odróżnicowania w guzach G3 nie obserwuje się kostnienia wtórnego [12,21,23,27].



Rycina 1. Histologiczny stopień złośliwości chrzęstniakomięsaka wraz z podsumowaniem różnic morfologicznych.

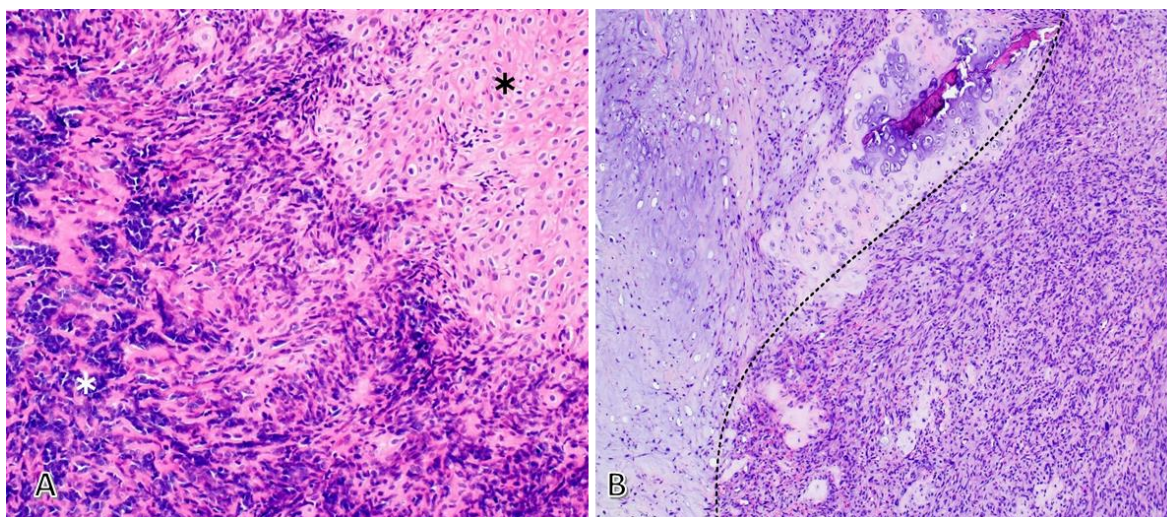
Białą strzałką oznaczono binuklearne chondrocyty, czarną strzałką - duży, wysoce nietypowy chondrocyt.

Barwienie hematoksylina i eozyna, powiększenie: rząd górny 100x, rząd dolny 200x i 600x. Zdjęcia zostały udostępnione przez prof. Annę Szumerę-Ciećkiewicz. Rycinę zmodyfikowano w oparciu o [33,35].

Do rzadszych podtypów ChS o mało agresywnym przebiegu i stanowiących po ok. 2-2,5% wszystkich ChS należą ChS jasnokomórkowy oraz okostnowy [12]. ChS jasnokomórkowy charakteryzuje się w badaniu histopatologicznym dużą liczbą przezroczystych komórek z przejrzystą, bladą cytoplazmą z obecnością glikogenu i wakuoli. Chondrocyty są widoczne jako jednorodne, duże i okrągłe komórki z łatwo obserwowalnymi jąderkami wewnątrz jądra [21,36]. Co ciekawe, podtyp ten charakteryzuje się znacznie częstszym występowaniem u mężczyzn niż u kobiet (Tabela 1) [12]. ChS okostnowy, inaczej pierwotny obwodowy, rozwija się *de novo* przykostnie bez naciekania jamy szpikowej [27].

Cechuje się dobrze zróżnicowaną zrazikową i średniokomórkową chrząstką ze zwapnieniem i kostnieniem śródchrzęstnym, przypominając histologicznie ChS G1/G2 [27,37].

Podtypy ChS o wysokim stopniu złośliwości to także rzadziej występujące MCS i DDCS. MCS poza typowymi lokalizacjami w obrębie kości, często występuje też wewnątrzczaszkowo oraz w około 20-40% przypadkach lokalizuje się w obrębie tkanek miękkich np. w oponach mózgowo-rdzeniowych czy tkance miękkiej uda [12,27,38]. Stanowi on jedynie 2-4% wszystkich ChS (Tabela 1) [12]. W obrazie histologicznym MCS składa się z dwóch komponentów (Rycina 2A) - z niezróżnicowanych, małych, okrągłych/wrzecionowatych komórek z macierzą kolagenową lub chrzęstną oraz z dobrze zróżnicowanych wysp dojrzałej chrząstki szklistej, mogącej ulegać procesowi wapnienia czy kostnienia [12,21,27].



Rycina 2. Charakterystyka mezenchymalnego i odróżnicowanego chrzęstniakomięsaka.

Mezenchymalny chrzęstniakomięsak (A) z komponentem okrągłych, niezróżnicowanych komórek (biała gwiazdka) i polem tkanki chrzęstnej (czarna gwiazdka). Odróżnicowany chrzęstniakomięsak z oznaczonym linią przerywaną fragmentem odróżnicowanym (B).

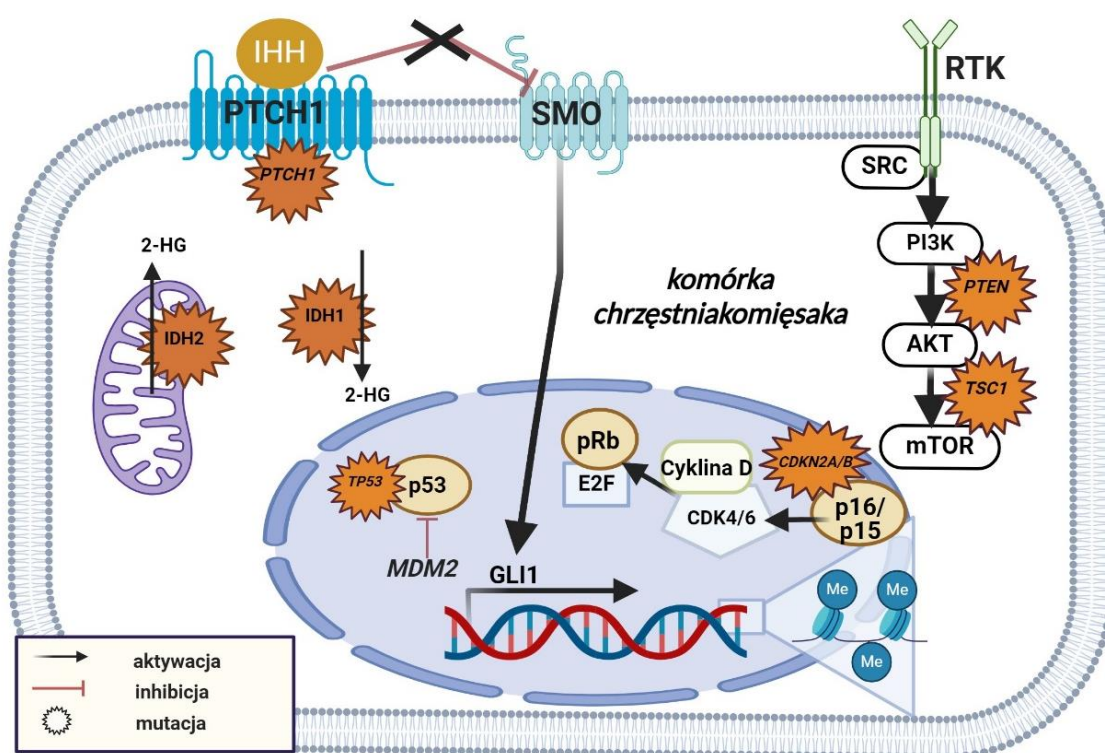
Barwienie hematoksylina i eozyna, powiększenie: 200x. Zdjęcia zostały udostępnione przez prof. Annę Szumerę-Ciećkiewicz.

DDCS stanowi około 10-15% przypadków centralnych ChS (Tabela 1) [12]. DDCS może rozwijać się na podłożu centralnego ale także obwodowego ChS G1/G2 [27]. W badaniu histologicznym odróżnicowany komponent guza o wysokiej agresywności stanowi niezróżnicowany mięsak pleomorficzny (Rycina 2B), włókniakomięsak, czy kostniakomięsak lub inny, rzadziej występujący mięsak np. naczyńniakomięsak, mięśniakomięsak gładkokomórkowy lub prążkowanokomórkowy) [27,39]. Komponent niechrzęstny (odróżnicowany) może mieć różną wielkość oraz koreluje ze złośliwością nowotworu [21,37]. Pozostała część guza stanowi komponent chrzęstny – najczęściej

klasyczny ChS G1 lub G2 [12]. W porównaniu z pozostałymi podtypami, DDCS nie wykazuje ekspresji białka S100 w odróżnicowanym komponentcie [40].

1.1.3. Podłoże molekularne chrzęstniakomięsaków

Podtypy ChS poza cechami patomorfologicznymi, różnią się także profilem genetycznym co wpływa na rokowanie pacjentów. Chociaż wciąż niewiele wiadomo na temat podłoża molekularnego ChS i jego patogenezy, znane są niektóre szlaki zaangażowane w patogenezę tego nowotworu oraz charakterystyczne mutacje występujące w poszczególnych podtypach ChS (Rycina 3).



Rycina 3. Charakterystyka deregulowanych ścieżek molekularnych i genów w chrzęstniakomięsakach.

Skróty: AKT - kinaza białkowa (ang. *protein kinase B*), CDK4/6 – kinaza 4/6 zależna od cyklin (ang. *cyclin-dependent kinase 4/6*), CDKN2A/B - inhibitor kinazy cyklozależnej 2A/B (ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B*), E2F - eukariotyczny czynnik elongacji 2 (ang. *eukaryotic elongation factor 2*), GLI1 - ang. *glioma-associated oncogene*, 2-HG - 2-hydroksyglutaran (ang. *2-hydroxyglutarate*), IDH – dehydrogenaza izocytrynianowa (ang. *isocitrate dehydrogenase*), IHH - ang. *Indian Hedgehog*, Me -metylacja, MDM2 - ligaza białkowa ubikwityny E3 (ang. *mouse double minute 2 homolog*), mTOR - ssaczy cel rapamycyny (ang. *mammalian target of rapamycin*), PI3K - kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (ang. *phosphoinositide 3-kinase*), pRb – białko siatkówczaka (ang. *retinoblastoma protein*), PTCH1 - ang. *protein patched homolog 1*, PTEN – ang. *phosphatase and tensin homolog*, RTK – receptorowa kinaza tyrozynowa (ang. *receptor tyrosine kinase*), SMO – receptor SMO (ang. *smoothened*), SRC – kinaza z rodziny SRC (ang. *v-src avian sarcoma (schmidt-ruppin A-2) viral oncogene*), TSC1 – gen kodujący hamartynę (ang. *Tuberous Sclerosis 1*).

Rycinę przygotowano z wykorzystaniem BioRender.com.

1.1.3.1. Mutacje IDH

Jednymi z najbardziej charakterystycznych i najczęściej obserwowanych zmian molekularnych w ChS są mutacje w obrębie genów kodujących dehydrogenazę izocytrynianową (IDH, ang. *isocitrate dehydrogenase*) 1 i 2 [12,41]. Mutacje w genach *IDH1/2* dotyczą ponad 50% ChS, z czego najczęściej obserwowanymi są mutacje substytucyjne argininy w 132 pozycji aminokwasowej (R132) w genie *IDH1* oraz R172 i rzadsze R140 w *IDH2* [42]. Mutacje te najczęściej są wykrywane w centralnych ChS i DDCS, jednak obserwowane są także sporadycznie w okostnowym ChS [12]. Obecność mutacji w genach *IDH1/2* jest pomocna w diagnostyce ChS, gdyż nie obserwuje się takich mutacji we wtórnych obwodowych ChS, jasnokomórkowym ChS oraz MCS [12,42].

IDH jest enzymem zaangażowanym w cykl Krebsa, który przekształca izocytrynian w alfa-ketoglutaran (α KG, ang. *α -ketoglutarate*) z wykorzystaniem redukcji fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADP⁺, ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) do NADPH [43,44]. W wyniku mutacji w genach *IDH1/2* dochodzi do zwiększonej produkcji i akumulacji w komórkach i macierzy zewnątrzkomórkowej 2-hydroksyglutaranu (2-HG, ang. *2 hydroxyglutarate*), będącego antagonistą α KG (Rycina 3). 2-HG jest uznawany za onkometabolit, który powoduje deregulację wielu procesów biologicznych, takich jak zmiany epigenetyczne, metabolomiczne, a także deregulację procesu naprawy DNA, czy zaburzenie struktury macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*), promując proces kancerogenezy [45]. W wyniku działania 2-HG dochodzi m.in. do zahamowania demetylaz zależnych od α KG - rodziny enzymów TET (ang. *ten-eleven translocation*) - TET1/2 oraz demetylaz histonowych - rodziny enzymów posiadających domenę Jumonji, w tym demetylasy lizynowej 4A/B (KDM4A/B, ang. *lysine (K)-specific demethylase 4A/B*). Prowadzi to w konsekwencji do zwiększonej globalnej metylacji DNA, szczególnie w regionach wysp CpG, oraz histonów (Rycina 3) [45,46]. W ChS opisano m.in. hipermetylację genów kodujących inhibitor kinazy cyklinozależnej 2A (*CDKN2A*, ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), czynnik transkrypcyjny *RUNX3* (ang. *runt-related transcription factor 3*), E-kadherynę (*CDH1*, ang. *E-cadherin*) oraz białko FHIT z rodziny triady histydynowej (*FHIT*, ang. *fragile histidine triad diadenosine triphosphatase*). Na skutek hipermetylacji dochodzi do inaktywacji prawidłowej funkcji tych genów, a w konsekwencji do proliferacji komórek ChS i progresji nowotworu [47–50]. Z kolei, metylacja histonów obejmuje w ChS najczęściej trimetylację lizyny 4, 9 i 27 histonu H3 (H3K4, H3K9 i H3K27) [51]. Niektóre

z badań sugerują, że mechanizm metylacji może być niezależny od mutacji *IDH1/2* w centralnych ChS [51,52]. Dodatkowo mutacje *IDH* poprzez zmniejszoną zdolność do wytwarzania NADPH oraz wykorzystanie dużej ilości tego enzymu do produkcji 2-HG skutkują ogólnie zmniejszonym poziomem NADPH w komórce, zaburzając tym samym równowagę NADP⁺/NADPH [44,45]. Niedobór NADPH może prowadzić do deregulacji funkcji mitochondriów i zakłócenia szlaków metabolicznych zależnych od NADP⁺/NADPH takich jak szlak pentozofosforanowy [53]. Może dochodzić także do zaburzenia potencjału redukcji reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*), co w konsekwencji prowadzi do zwiększonego stresu oksydacyjnego i uszkodzeń DNA [44].

Rola mutacji *IDH* jako czynnika prognostycznego w ChS jest wciąż niejasna. Część prac sugeruje brak wpływu na przeżycia pacjentów z ChS [51], z kolei inne pokazują pozytywny [54] lub negatywny wpływ na rokowania u pacjentów [55].

1.1.3.2. Mutacje genu *TP53* i deregulacja ścieżki sygnałowej p53 oraz pRb

Kolejnymi często obserwowanymi wśród pacjentów z rozpoznaniem ChS (20-50%) zmianami molekularnymi są szeroko rozpowszechnione w wielu innych typach nowotworów mutacje w genie *TP53* [36,56,57]. *TP53* koduje białko p53 pełniące funkcję supresorową i będące zaangażowane w wiele szlaków uczestniczących w rozwoju nowotworów, takich jak regulacja cyklu komórkowego, czy apoptoza [58]. Mutacje *TP53* są głównie wykrywane w centralnych ChS i DDCS, ale nadekspresja białka p53 była obserwowana także w podtypie jasnokomórkowym [59] i MCS [60]. Wiele badań wykazało korelację pomiędzy nadekspresją p53/mutacjami *TP53* a ryzykiem wystąpienia przerzutów lub stopniem histologicznym guza [61–64]. Obecność mutacji *TP53* głównie w ChS o wyższym stopniu złośliwości sugeruje ich rolę w progresji ChS [65]. Najnowsze badania wykazały także negatywny wpływ mutacji *TP53* na przeżycia całkowite pacjentów (OS, ang. *overall survival*) oraz czas wolny od przerzutów (MFS, ang. *metastasis-free survival*) [66]. W ChS najczęściej opisywane są mutacje powodujące powstanie przedwczesnego kodonu „STOP” (nonsensowne, ang. *nonsense*) oraz wstawienia (insercje) lub usunięcia (delecje) nukleotydów tzw. indele (ang. *indel - insertion or deletion*), prowadzące do przesunięcia ramki odczytu i powstania nieaktywnego białka p53. Ponadto u około 25% przypadków ChS obserwuje się utratę heterozygotyczności na chromosomie 17p w regionie odpowiadającym *locus* p53 [67].

W ChS obserwuje się także nadekspresję genów kodujących ligazę białkową ubiquityny E3 (*MDM2*, ang. *mouse double minute 2 homolog*) i kinazę 4 zależną od cyklin (*CDK4*, ang. *cyclin-dependent kinase 4*) związanych z amplifikacją w regionie genu 12q13, które działają hamująco na białko p53 (Rycina 3) [65]. Nadekspresję *CDK4* i *MDM2* obserwowano w przypadkach centralnych ChS, szczególnie w podtypach G2/G3 [68], a także w DDCS i MCS [69]. Z kolei w podtypach ChS okostnowego czy jasnokomórkowego nie obserwowano tych zmian [69,70].

Deregulacja cyklu komórkowego w ChS jest także pochodną delecji chromosomalnych genów *CDKN2A/B*, związanej ze szlakiem supresorowego białka siatkówczaka - pRb (ang. *retinoblastoma*). Geny te kodują odpowiednio białka p16/p15, będące inhibitorami CDK4/6 (Rycina 3) [68,71,72]. W centralnym ChS o wysokim stopniu złośliwości, utratę ekspresji p16, spowodowaną delecją w regionie 9p21, stwierdzono w 25% przypadków ChS G2 i nawet u 50% pacjentów z rozpoznaniem ChS G3. W przeciwieństwie do tego u pacjentów z rozpoznaniem ChS G1 lub *enchondromą* nie opisywano takich zmian molekularnych [73]. Delecje *CDKN2A* zaobserwowano także w 62% przypadkach DDCS, u około 30% pacjentów z rozpoznaniem jasnokomórkowym ChS i 25% chorych z rozpoznaniem MCS [69,73]. Zaburzenia szlaku pRb związane ze spadkiem ekspresji p16 obserwuje się także w patogenezie okostnowych ChS [12].

1.1.3.3. Pozostałe zmiany molekularne i deregulowane szlaki

W ponad 30% przypadków ChS obserwowane są mutacje w genie kolagenu typu II (*COL2A1*, ang. *collagen type II alpha 1*), kodującym łańcuch alfa-1 włókien kolagenowych typu II, a eksprymowanym w komórkach chrząstki [57]. Mutacje te obserwowano w centralnych ChS, głównie o wyższym stopniu złośliwości (G2/G3), jednak były one opisywane także w DDCS i jasnokomórkowym ChS [57,74]. Z kolei we wtórnych obwodowych ChS, szczególnie o niskim stopniu złośliwości, obserwuje się mutacje w genach egzostozyny-1/2 (*EXT1/EXT2*, ang. *exostosin 1/2*), biorące udział w proliferacji chondrocytów płytki wzrostowej [12,65]. Mutacje *EXT1/2* mogą być germinalne, występujące w linii zarodkowej (kiedy występują w zespole HMO) lub somatyczne, nabyte (w sporadycznie występujących wyroślach chrzęstno-kostnych) [12]. Najczęstsze mutacje w genach *EXT1/EXT2* to homozygotyczne delecje występujące w 80% sporadycznych wyrośli chrzęstno-kostnych [12,75].

Pośród szlaków molekularnych często zaburzonych w komórkach ChS można wyróżnić tzn. „szlak jeża”, czyli Hedgehog (Hh). Szlak Hh jest zaangażowany w regulację procesów proliferacji i różnicowania komórek, a jego zaburzenia prowadzą do transformacji nowotworowej i zwiększonej zdolności do tworzenia przerzutów oraz chemiooporności [76]. W różnicowaniu chondrocytów zaangażowany jest m.in. receptor PTCH1 (ang. *protein patched homolog 1*), będący ligandem dla białka IHH (ang. *indian hedgehog protein*) (Rycina 3). Poziom i aktywność IHH są regulowane na zasadzie sprzężenia ujemnego przez peptyd podobny do parathormonu (PTHrP, ang. *parathyroid hormone-related peptide*) [77]. Związanie na powierzchni białka IHH z receptorem PTCH1 aktywuje receptor SMO (ang. *smoothened*), co prowadzi do transdukcji sygnału do jądra komórkowego. Tam dochodzi następnie do aktywacji czynników transkrypcyjnych z rodziny onkogenów związanych z glejakiem (GLI, ang. *glioma-associated oncogene*), regulujących ekspresję genów docelowych odpowiedzialnych za proliferację i różnicowanie komórek np. *PTCH1* oraz *GLI1* w przypadku ChS [77]. W rozwoju ChS dochodzi do nadmiernej aktywacji szlaku Hh i ciągłej ekspresji IHH, co indukuje proliferację chondrocytów i wydzielanie PTHrP do macierzy zewnątrzkomórkowej. Z kolei sekrecja PTHrP pośredniczy w hamowaniu różnicowania i apoptozy chondrocytów [77–79]. Nieprawidłowa aktywacja szlaku Hh może wynikać m.in. z występowaniem w komórkach ChS mutacji w genach *PTCH* lub *SMO*, które skutkują niezależną od liganda IHH aktywacją szlaku Hh [78,80]. Mutacje w genach związanych ze szlakiem Hh, m.in. *PTCH1*, *SMO* oraz *GLI1*, były opisywane w centralnym ChS i DDOS z ogólną częstością nawet w 18% przypadków [57,81]. Wiele badań *in vitro* i *in vivo* potwierdziło, że zastosowanie inhibitorów Hh hamuje proliferację komórek ChS [63,82,83]. Niestety w badaniach klinicznych 2 fazy (NCT01310816) nie uzyskano satysfakcjonujących wyników leczenia [84].

Pośród innych deregulowanych w komórkach ChS ścieżek sygnałowych można wyróżnić szlaki związane ze wzrostem komórek, takie jak szlak kinazy SRC (ang. *v-src avian sarcoma (schmidt-ruppin A-2) viral oncogene*), szlak kinazy 3-fosfatidyloinozytolu i kinazy białkowej (PI3K–AKT, ang. *phosphoinositide 3-kinase - protein kinase B*), a także szlak kinazy ssaczego celu rapamycyny (mTOR, ang. *mammalian target of rapamycin*) (Rycina 3). Liczne badania *in vitro* wykazały zahamowanie wzrostu komórek ChS pod wpływem inhibitorów wyżej wymienionych szlaków [85–87]. Przykładowo pod wpływem inhibitorów SRC dochodziło do zniesienia chemiooporności, indukcji apoptozy i zahamowania migracji komórek ChS [88].

W komórkach centralnych ChS i DDCS obserwowano także mutacje w genach *PTEN* (ang. *phosphatase and tensin homolog*) oraz *TSC1* (ang. *Tuberous Sclerosis 1*), kodujących białka o tych samych nazwach [57,89]. Delecja genu *PTEN* wraz z mutacją w genie *TP53* były wykrywane w komórkach obu komponentów DDCS [56]. Białko PTEN jest negatywnym regulatorem szlaku sygnałowego PI3K-AKT, z kolei TSC1 działa hamująco na szlak sygnałowy mTOR. Dysfunkcje tych białek spowodowane np. przez mutacje w kodujących je genach mogą prowadzić do nadmiernej aktywacji szlaków PI3K-AKT oraz mTOR i promować rozwój nowotworów, w tym ChS [90,91].

Ponadto w badaniach *in vitro*, w komórkach 12% centralnych ChS, u których występowała mutacja w onkogenie *NRAS*, wykazano wrażliwość na traktowanie inhibitorami MEK (ang. *mitogen-activated protein kinase kinase*). Wskazuje to na istotny udział szlaku kinaz aktywowanych mitogenami/kinaz regulowanych sygnałami zewnątrzkomórkowymi (MAPK/ERK, ang. *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase*) w patogenezie ChS [85].

Pośród innych często obserwowanych w ChS zaburzeń molekularnych są mutacje w regionie promotorowym genu odwrotnej transkryptazy telomerazy (*TERT*, ang. *telomerase reverse transcriptase*), który odpowiada za regulację telomerów. Mutacje *TERT* są wykrywane w komórkach ChS w 20-46% przypadków centralnych ChS i DDCS [72,92]. W badaniu przeprowadzonym przez Zhanga i wsp., obecność mutacji *TERT* była istotnie skorelowana ze stopniem złośliwości ChS oraz stanowiła negatywny czynnik prognostyczny dla pacjentów z tym rozpoznaniem [92]. Ponadto w 12,3% przypadków centralnych ChS wykryto mutację w genie *YEATS2* (ang. *YEATS domain containing 2*), kodującym podjednostkę kompleksu jądrowej acetylotransferazy [93]. Mutacje *YEATS2* występowały istotnie częściej w komórkach ChS G2/G3 i wykluczały się z występowaniem mutacji w genie *COL2A1*. Dodatkowo w tej samej pracy autorzy opisali występowanie mutacji genu receptora aktywiny A typu 1 (*ACVR2A*, ang. *activin A receptor, type II*) w 7% przypadków ChS [93].

1.1.3.4. Aberracje chromosomowe

Poza wspomnianymi wcześniej aberracjami w genach *CDKN2A* i *CDKN2B*, często w komórkach ChS opisywana jest zmienność liczby kopii (CNV, ang. *copy number variation*) protoonkogenu *MYC*. W badaniu przeprowadzonym na ponad 100 pacjentach z rozpoznaniem ChS, amplifikacje w regionie 8q24.12-q24.13 wykryto w 15% przypadków

ChS G2, 20% - ChS G3 oraz 21% DDCS, podczas gdy nie obserwowano tych zmian w przypadku ChS G1 [94]. W komórkach ChS często wykrywane są także amplifikacje regionu 11q22, który koduje grupę kilku metaloproteinaz ECM (MMPs, ang. *matrix metalloproteinases*), w tym MMP1, MMP3, MMP7, MMP8, MMP10, MMP13, MMP20 oraz MMP27 [75,95].

W badaniu Hallora i wsp. u 59 z 67 przypadków centralnych i obwodowych ChS zaobserwowano CNV obejmującą nawet 1/3 genomu [95]. Najczęstszymi zmianami stwierdzonymi w komórkach ChS były aberracje w regionach 2q33.2, 3p21.31, 4q12-q13.1, 5q31.1, 9q13.1, 9q33.3, 12q14.1 i 21q22.11. W 25% przypadków wykazano amplifikacje w chromosomach 5, 12 i 19-22 oraz delecje w chromosomach 1, 4, 6, 9-11, 14 i 17, a także delecję ramienia długiego chromosomu 13 (13q) [95]. W sumie w komórkach ChS opisano około 200 kariotypów, co pokazuje ogromną heterogenność tych nowotworów [96].

Fuzje genetyczne są często opisywanymi zmianami molekularnymi w mięsakach i mają znaczenie diagnostyczne [39]. Jednak w przypadku ChS są one dużo rzadziej opisywane i do tej pory w diagnostyce wykorzystuje się jedynie fuzję genów *HEY1* (ang. *hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1*) oraz *NCOA2* (ang. *nuclear receptor coactivator 2*), będącą charakterystyczną dla MCS i powstałą na skutek delecji (del (8) (q13; q21)) lub translokacji chromosomu 8 (t(8;8) (q13;q21)). Ostatnie badania pokazały, że fuzja *HEY1-NCOA2* jest związana z deregulacją szlaku płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF, ang. *platelet derived growth factors*)/PI3K/AKT poprzez aktywację receptorów PDGF – PDGFRA (ang. *platelet-derived growth factor receptor alpha*) i PDGFB (ang. *platelet-derived growth factor receptor beta*), co w konsekwencji prowadzi do nadekspresji AKT [97]. Wśród innych, wykrytych do tej pory fuzji, jest opisana w MCS fuzja *IRF2BP2* (ang. *interferon regulatory factor 2*)-*CDX1* (ang. *caudal type homeobox 1*), powstała na skutek translokacji chromosomu 1 i 5 (t (1;5) (q42; q32)) [98].

Pomimo znanych zaburzeń molekularnych, wciąż mało wiadomo na temat podłoża molekularnego ChS i udziału poszczególnych genów w progresji tych nowotworów, czy występowaniu poszczególnych podtypów ChS. Konieczne są więc dalsze szczegółowe badania w tym zakresie w celu poznania mechanizmu rozwoju tych nowotworów i znalezienia potencjalnych celów molekularnych.

1.1.4. Leczenie chrzęstniakomięsaka

Leczenie ChS jest ograniczone głównie do wycięcia chirurgicznego, które uważane jest wciąż za złoty standard w leczeniu tych nowotworów [35]. Wycięcie z szerokimi marginesami, radykalnymi mikroskopowo (R0) jest najlepszą opcją terapeutyczną zarówno przy pierwotnych, jak i nawrotowych ChS. Resekcja całkowita zmniejsza ryzyko wznowy miejscowej oraz przerzutów. W przypadkach trudnych anatomicznie lokalizacji guza np. w kościach miednicy, a także w przypadkach miejscowo zaawansowanych ChS resekcja radykalna nie zawsze jest możliwa [35,99,100]. Ponadto wykazano, że nieradykalna resekcja oraz wielkość guza pierwotnego powyżej 10 cm są niezależnymi negatywnymi czynnikami rokowniczymi u pacjentów z rozpoznaniem ChS [101]. Ryzyko wznowy jest też większe u chorych na ChS o wyższym stopniu złośliwości [102]. Obecnie nawet w przypadku większych zmian i ChS o wyższym stopniu złośliwości kości długich u chorych zalecana jest operacja oszczędzająca z rekonstrukcją przy pomocy endoprotezy lub w rzadszych przypadkach konieczna jest amputacja [103].

Inne opcje terapeutyczne u pacjentów z rozpoznaniem ChS są ograniczone ze względu na oporność tych nowotworów na chemioterapię i radioterapię [29,104]. Wyjątek stanowią pacjenci z rozpoznaniem MCS i DDCS, u których obserwuje się pewne korzyści z leczenia systemowego, czy po napromienieniu [29,105,106]. Mechanizm oporności ChS na leczenie systemowe jest wciąż mało poznany, jednak za możliwą przyczynę uważa się słabe unaczynienie guza i niski odsetek dzielących się komórek, a także obecność macierzy chrzęstnej wokół komórek [65,107]. Ponadto w ChS obserwowano ekspresję glikoproteiny P, kodowanej przez gen oporności wielolekowej (*MDR1*, ang. *multidrug resistance 1*) [108], a także ekspresję białka antyapoptotycznego Bcl-2 (ang. *B-cell lymphoma 2*) oraz czynnika indukowanego hipoksją 1 (*HIF1 α* , ang. *hypoxia-inducible factor 1*), mogących mieć związek z chemioopornością ChS [65,109]. Z kolei za potencjalną przyczynę radiooporności uważa się także deregulacje w szlakach związanych z kontrolą cyklu komórkowego, m.in. w szlaku pRb [110].

Obecnie nie ma ustalonych schematów zalecanej chemioterapii dla chorych na lokalnie zaawansowane czy nieresekcyjne ChS w stopniach złośliwości G1-G3 [111]. W przypadku pacjentów z rozpoznaniem MCS zaleca się zastosowanie schematów chemioterapii jak do leczenia pacjentów z rozpoznaniem mięsaka Ewinga; z kolei dla pacjentów z rozpoznaniem DDCS jak w leczeniu pacjentów z rozpoznaniem kostniakomięsaka. W momencie choroby z przerzutami odległymi (M1), zgodnie

z obecnymi zaleceniami NCCN (ang. *National Comprehensive Cancer Network*), należy rozważyć terapie celowane z wykorzystaniem inhibitorów kinaz tyrozynowych czy IDH lub radioterapię [111]. Najczęstszym stosowanym schematem chemioterapii u chorych na ChS jest połączenie doksorubicyny z cisplatyną (schemat AP3) lub ifosfamidem (schemat AI) [72,112]. Radioterapię u pacjentów z rozpoznaniem ChS stosuje się głównie w chorobie przerzutowej jako leczenie objawowe w wybranych przypadkach m.in. po niepełnej resekcji lub w przypadku nieresekcyjnych guzów (w miejscach trudnych anatomicznie, takich jak podstawa czaszki lub okolica przykręgosłupowa) [111,113]. Najczęstszą formą radioterapii wykorzystywanej w leczeniu chorych na ChS jest terapia protonowa lub radioterapia jonami węgla (ciężkimi jonami) [114,115].

W związku z ograniczonymi możliwościami terapeutycznymi, sprowadzającymi się do leczenia chirurgicznego oraz opornością ChS na leczenie systemowe i radioterapię, poszukiwane są nowe opcje leczenia i potencjalne cele terapeutyczne mogące pomóc w udoskonaleniu obecnego postępowania z tymi nowotworami.

1.2. Terapie celowane w chrzęstniakomięsakach

W oparciu o dotychczasowe wyniki badań i wiedzę na temat deregulowanych szlaków molekularnych w ChS i innych guzach litych, testowano różnego rodzaju inhibitory konkretnych białek czy szlaków, a także immunoterapię (omówioną szerzej w kolejnym podrozdziale - 1.3.3). Wciąż jednak nie udało się znaleźć skutecznej i zatwierdzonej terapii w leczeniu pacjentów z rozpoznaniem ChS, jednak duża część potencjalnych celów terapeutycznych jest wciąż w fazie badań.

1.2.1. Inhibitory angiogenezy

Jednym z potencjalnych celów terapeutycznych w wielu typach nowotworów, w tym także ChS jest proces angiogenezy. Wykazano istotny wzrost ekspresji jednego z czynników zaangażowanych w proces angiogenezy – czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego A (VEGF-A, ang. *vascular endothelial growth factor A*) w ChS G2 i G3 w porównaniu do DDCS [116]. W wielu badaniach inhibitory angiogenezy prowadziły do zahamowania wzrostu i aktywności komórek ChS *in vitro* [117,118], w związku z czym ich efektywność zaczęto testować w badaniach klinicznych. W retrospektywnym badaniu przeprowadzonym na grupie 10 pacjentów z zaawansowanym ChS zbadano rolę dwóch leków

antyangiogennych - pazopanibu i ramucirumabu i u 7 z nich osiągnięto długotrwałą stabilizację choroby przez ponad pół roku [119]. Pozytywny efekt pazopanibu wykazało także prospektywne badanie 2 fazy na nieresekcyjnych i przerzutujących ChS [120].

1.2.2. Inhibitory IDH

Z uwagi na obecne w komórkach ChS mutacje w genach kodujących IDH, potencjalnymi lekami stały się inhibitory IDH. Jednym z badanych do tej pory inhibitorów zmutowanego IDH jest iwosidenib (AG-120). W badaniu 1 fazy przeprowadzonym na 21 pacjentach z rozpoznaniem ChS iwosidenib wykazał istotną skuteczność, z medianą przeżycia wolnego od progresji (PFS, ang. *progression-free survival*) wynoszącą 5,6 miesiąca i 6-miesięcznym odsetkiem PFS wynoszącym 39,5%. Wskaźniki te były lepsze u pacjentów z rozpoznaniem klasycznego ChS w porównaniu do pacjentów z rozpoznaniem DDCS. Ponadto ogólnie u 52% pacjentów zaobserwowano stabilizację choroby [121]. Obecnie iwosidenib jest rekomendowany przez NCCN w leczeniu pacjentów z rozpoznaniem ChS G1-G3 oraz DDCS z mutacją *IDH1* [111]. Inhibitory IDH1/2 są obecnie oceniane w wielu badaniach klinicznych fazy II (NCT06176989, NCT04278781, NCT04762602, NCT06127407 oraz NCT04521686) w których rekrutowani są pacjenci z rozpoznaniem ChS.

1.2.3. Inhibitory szlaku PI3K-AKT-mTOR

Dotychczasowe badania na pacjentach z rozpoznaniem ChS skupiały się głównie na hamowaniu funkcji kinazy mTOR. Przykładowo badanie oceniające synergistyczne działanie kombinacji inhibitorów mTOR – sirolimusu i cyklofosfamidu u pacjentów z nieresekcyjnymi ChS wykazało stabilizację choroby u 60% pacjentów [122]. Pozytywne działanie inhibitorów mTOR w połączeniu z blokadą receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1R, ang. *insulin-like growth factor 1 receptor*) wykazano także w innym wieloośrodkowym badaniu klinicznym 2 fazy (NCT01016015), gdzie u pacjentów z rozpoznaniem ChS zauważano częściową odpowiedź po zastosowaniu obu inhibitorów [123]. Ponadto prowadzono także badania kliniczne z wykorzystaniem inhibitora PI3K - TQB3525 na zaawansowanych mięsakach kości (NCT04690725, status nieznany).

1.2.4. Epigenetyczne strategie w leczeniu pacjentów z rozpoznaniem ChS

Liczne badania przedkliniczne wykazały działanie przeciwnowotworowe inhibitorów metylotransferaz, czy inhibitorów deacetylaz histonowych (HDAC, ang. *histone deacetylase inhibitors*) na liniach komórkowych ChS, m.in. poprzez indukcję apoptozy oraz zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych [124,125]. W związku z tym zastosowanie inhibitorów HDAC w terapii ChS stało przedmiotem dalszych badań. Obecnie trwa badanie kliniczne 2 fazy, gdzie oceniana jest terapia skojarzona z belinostatem (inhibitorem HDAC) i guadecytabiną (inhibitorem metylacji DNA) w nieresekcyjnych i przerzutujących ChS G1-G3 (NCT04340843).

1.2.5. Pozostałe terapie celowane

Wśród innych testowanych w ChS potencjalnych terapii można wymienić inhibitory kinaz tyrozynowych takie jak dasatynib czy imatynib. Jednak badania kliniczne prowadzone do tej pory na grupie pacjentów z rozpoznaniem ChS zakończyły się niesatysfakcjonującymi wynikami. U żadnego z pacjentów leczonych imatynibem nie zaobserwowano obiektywnej odpowiedzi na leczenie (ORR, ang. *objective response rate*) w badaniu 2 fazy [126]. Z kolei ORR i stabilizację choroby w okresie ponad roku obserwowano jedynie u ponad 10% pacjentów z rozpoznaniem ChS leczonych dasatynibem [127]. Obecnie prowadzone są także badania kliniczne z wykorzystaniem inhibitora CDK4/6 – abemaciclibu w mięsakach, w tym w ChS (NCT04040205). Z uwagi na obserwowane w badaniach przedklinicznych deregulacje szlaku Hh u pacjentów z rozpoznaniem ChS zaczęto testować jego inhibitory, takie jak wismodegib. Jednak w badaniu klinicznym 2 fazy, chociaż wismodegib wykazał pewną aktywność u pacjentów z rozpoznaniem ChS G1 lub G2, nie osiągnięto pierwszorzędowego punktu końcowego [84]. Wśród innych potencjalnych celów są osteoklasty, które obserwuje się w mikrośrodoisku (TME, ang. *tumor microenvironment*) ChS, a ich działanie przyczynia się do wzrostu ChS [128]. W 1 fazie badań klinicznych jest obecnie testowany inhibitor osteoklastów - kwas zoledronowy (NCT03173976).

Ostatnie badania wykazały, że tzw. receptory „śmierci” (DR, ang. *death receptors*) – DR4 lub DR5 mogą być obiecującymi celami terapeutycznymi ze względu na ich selektywną indukcję apoptozy w komórkach nowotworowych poprzez przyłączenie związanego z czynnikiem martwicy nowotworu (TNF, ang. *tumor necrosis factor*) ligandu indukującego apoptozę (TRAIL, ang. *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing*

ligand) [72]. Jednym z potencjalnych celów terapeutycznych może być inhibitor DR5 - INBRX-109, który w badaniu 1 fazy wykazał stabilizację choroby u 78% pacjentów z klasycznym ChS (NCT03715933) [129]. W związku z obiecującymi wynikami, badania te są kontynuowane w badaniach 2 fazy na pacjentach z nieresekcyjnymi i przerzutowymi ChS (ChonDRAGON, NCT04950075).

Pomimo licznych dotychczasowych prób, wciąż nie znaleziono skutecznej systemowej terapii celowanej w leczeniu ChS. Chociaż wyniki niektórych badań wyglądają obiecująco, wciąż istnieje ogromna potrzeba kolejnych badań w tym kierunku i poszukiwania nowych celów molekularnych.

1.3. Mikrośrodowisko nowotworów i jego rola w odpowiedzi na immunoterapię

W rozwoju nowotworów ważną rolę odgrywa układ immunologiczny, którego upośledzenie doprowadza do zaburzenia równowagi między jego aktywacją a supresją. W konsekwencji na skutek wieloetapowego procesu, zwanego teorią nadzoru immunologicznego lub immunoedycją (ang. *immunoediting*) dochodzi do niekontrolowanego namnażania komórek nowotworowych i rozwoju choroby. Proces immunoedycji został opisany już w 1967 r. przez Burneta i Thomasa [130] i składa się z 3 zasadniczych etapów:

- ❖ Eliminacja - rozpoznawanie i eliminacja komórek nowotworowych przez układ odpornościowy
- ❖ Równowaga - utrzymanie równowagi pomiędzy aktywacją układu odpornościowego, a jego supresją i rozwojem nowotworu
- ❖ Ucieczka - przewaga immunosupresji oraz niekontrolowany wzrost komórek nowotworowych

W procesie przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej zaangażowanych jest wiele komórek układu immunologicznego obecnych w TME. Skład TME różni się w zależności od typu nowotworu, jednak ogólnie mówiąc obejmuje komórki odpornościowe, komórki zrębu np. fibroblasty, naczynia krwionośne i ECM [131].

W odpowiedź przeciwnowotworowej zaangażowana jest zarówno swoista odpowiedź immunologiczna, w której uczestniczą limfocyty T, B czy komórki NK (ang. *natural killer*), jak i nieswoista, gdzie zaangażowane są makrofagi, neutrofile oraz komórki dendrytyczne [131]. Limfocyty obecne w TME określane są jako limfocyty naciekające guz

(TILs, ang. *tumor infiltrating lymphocytes*) [132]. W odpowiedzi przeciwnowotworowej kluczowe znaczenie mają limfocyty T cytotoksyczne, identyfikowane przez antygen różnicowania komórkowego (CD, ang. *cluster of differentiation*) - CD8. Wykrywają one nieprawidłowe antygeny nowotworowe tzn. neoantygeny prezentowane przez główny układ zgodności tkankowej (MHC, ang. *major histocompatibility complex*) klasy I, a następnie niszczą komórki nowotworowe. W odpowiedzi przeciwnowotworowej ogromną rolę odgrywają także komórki NK posiadające zdolność naturalnej cytotoksyczności i niszczące bezpośrednio komórki nieposiadające na swojej powierzchni MHC klasy I [131,133]. Kolejną grupą komórek zaangażowanych w odpowiedź przeciwnowotworową są limfocyty T CD4-dodatnie(+). Komórki te po rozpoznaniu antygeny prezentowanego przez MHC klasy II, obecnego na wyspecjalizowanych komórkach prezentujących antygen (APC, ang. *antigen-presenting cells*), pełnią funkcję pomocniczą wspierającą limfocyty CD8+. Limfocyty CD4+ mogą stymulować także limfocyty B poprzez wydzielane różnych cytokin [131]. Chociaż limfocyty B odgrywają mniejszą rolę w odpowiedzi przeciwnowotworowej, to uczestniczą w tworzeniu 3-rzędowych struktur limfoidalnych (TLS, ang. *tertiary lymphoid structures*) razem z dojrzałymi komórkami dendrytycznymi oraz limfocytami T. Obecność TLS w mikrośrodowisku guza odgrywa ważną rolę w kontrolowaniu inwazji nowotworu i jest pozytywnym czynnikiem rokowniczym w wielu typach nowotworów [134,135]. Ważną rolę w odpowiedzi przeciwnowotworowej odgrywają także komórki fagocytykujące - makrofagi, definiowane w TME jako makrofagi naciekające guz (TAMs, ang. *tumor-associated macrophages*). TAMs uczestniczą w prezentacji antygenów nowotworowych oraz poprzez wydzielanie cytokin i chemokin powodują napływ komórek dendrytycznych NK czy neutrofili [136].

W trakcie rozwoju nowotworu dochodzi do szeregu mechanizmów mających na celu „ucieczkę” spod nadzoru immunologicznego, a także modyfikację układu immunologicznego na fenotyp immunosupresyjny, wspierający rozwój nowotworu. Jednym z takich mechanizmów jest zmniejszenie ekspresji MHC klasy I przez komórki nowotworowe, przy jednoczesnych modyfikacjach genetycznych prowadzących do utraty neoantygenów czy maskowania epitopów rozpoznawanych przez limfocyty T [133]. Innym mechanizmem jest wydzielanie przez nowotwór czynników immunosupresyjnych tj. 2,3-dioksygenazy indoloaminy (IDO, ang. *indoleamine dioxygenase*), TNF- α , transformującego czynnika wzrostu beta (TGF- β , ang. *transforming growth factor β*), HIF1 α , czy interleukiny (IL, ang. *interleukin*)-10 [131,137]. W konsekwencji dochodzi do nagromadzenia

limfocytów T regulatorowych (Tregs, ang. *regulatory T cells*) zaangażowanych w proces wyciszenia odpowiedzi immunologicznej [131]. Ponadto w TME na skutek wydzielanych przez komórki nowotworowe czynników (takich jak TGF- β , IL-4, -6, -10 i -13, czynnik wzrostu kolonii makrofagów (CSF1, ang. *colony stimulating factor 1*) oraz prostaglandyna E2 (PGE2, ang. *prostaglandin E2*) zachodzi proces przeprogramowania makrofagów M1, o właściwościach antynowotworowych, w kierunku M2, działających immunosupresyjnie i wspierających rozwój nowotworów [136]. Dochodzi także do zahamowania funkcji komórek APC oraz pojawienia się limfocytów B regulatorowych, hamujących funkcję makrofagów, neutrofili, czy limfocytów CD8+ [131,133].

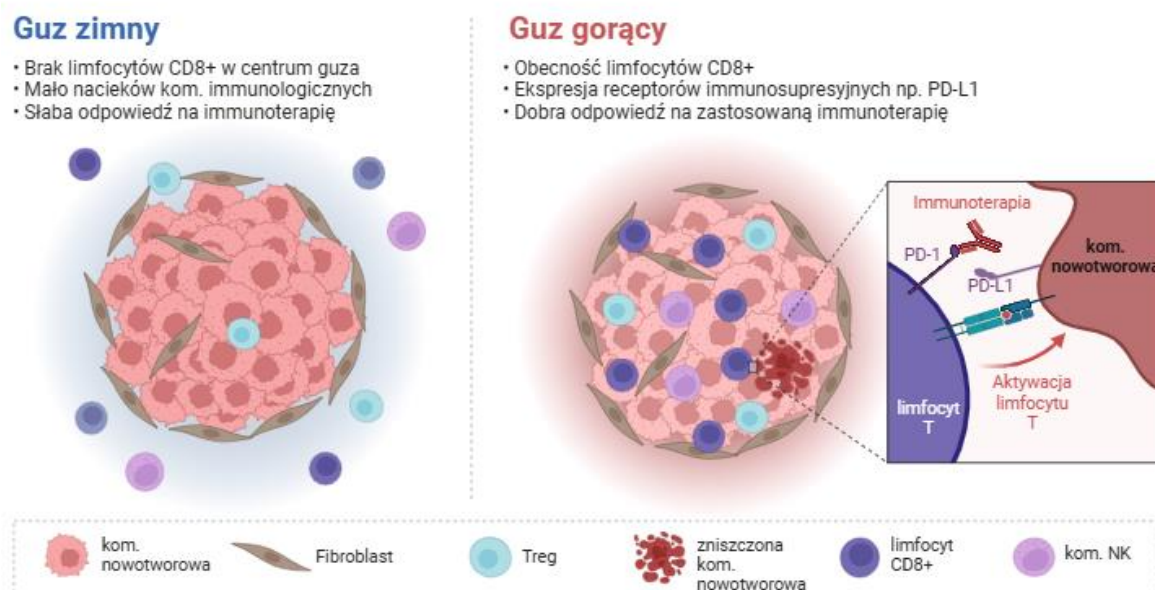
W TME może dochodzić również do „wyczerpania” limfocytów poprzez ekspresję receptorów hamujących odpowiedź immunologiczną - tzn. punktów kontrolnych (ICPs, ang. *immune checkpoints*), obecnych zarówno na komórkach immunologicznych, jak i nowotworowych [133]. Jednym z takich receptorów jest receptor programowanej śmierci 1 (PD-1, ang. *programmed death receptor 1*) występujący na TILs, który łączy się z ligandem receptora programowanej śmierci 1 lub 2 (PD-L1/PD-L2, ang. *programmed death ligand 1/2*), obecnymi na komórkach nowotworowych czy supresorowych komórkach dendrytycznych [138]. Interakcja PD-1/PD-L1 bezpośrednio hamuje działanie limfocytów T, zmniejszając produkcję cytokin oraz indukując anergię i apoptozę limfocytów T [139]. Innym ważnym receptorem, obecnym na aktywowanych limfocytach T, zwłaszcza Tregs czy CD8+, jest antygen cytotoksycznych limfocytów typu 4 (CTLA-4, ang. *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*) [138,139]. Hamowanie odpowiedzi immunologicznej w tym przypadku jest spowodowane konkurencją między antygenem CD28 i CTLA-4 o miejsce wiążące receptorów obecnych na APC tj. CD80/86. Aktywacja limfocytów T powoduje transport CTLA-4 na powierzchnię komórek T, gdzie następnie wiąże się on z CD80/86 ze względu na większe powinowactwo niż CD28 [139]. W konsekwencji prowadzi to do zahamowania aktywacji limfocytów T pomocniczych i cytotoksycznych oraz zwiększenia aktywności immunosupresyjnej Tregs [138,139]. Wśród innych istotnych ICPs można wymienić immunoglobulino-podobny receptor limfocytów T (TIM-3, ang. *T cell immunoglobulin and mucin domain-3*) obecny na limfocytach T, B, komórkach NK, komórkach dendrytycznych, czy nowotworowych, a także receptor LAG-3 (ang. *lymphocyte activation gene-3*) obecny na TILs [133]. Oba białka powodują wyciszenie odpowiedzi immunologicznej m.in. poprzez zahamowanie proliferacji limfocytów T efektorowych, czy zwiększenie ekspresji Tregs po związaniu z odpowiednimi ligandami [133]. W przypadku

LAG-3 są to np. MHC klasy II, a także galektyna 3 (Gal-3, ang. *galectin-3*), czy białko podobne do fibrynogenu 1 (FGL-1, ang. *fibrinogen-like protein 1*), wytwarzane m.in. przez komórki nowotworowe. Z kolei TIM-3 łączy się z Gal-3, Gal-9, czy fosfatydylloseryną [133,140].

Ekspresja ICPs została zaobserwowana w wielu typach nowotworów, stąd zastosowanie inhibitorów ICPs znalazło zastosowanie w immunoterapii. Blokada tych receptorów indukuje układ immunologiczny i pozwala na wydłużenie przeżyć np. u chorych na zaawansowane czerniaki, niedrobnokomórkowego raka płuca, czy raka nerki [138,141–143].

1.3.1. Guzy immunologicznie „gorące” i „zimne”

Zależnie od mechanizmu „ucieczki” nowotworów spod nadzoru immunologicznego, TME może znacznie się różnić, co wpływa na odpowiedź na immunoterapię [144]. Ze względu na przestrzenne rozmieszczenie i typ komórek immunologicznych, nowotwory można podzielić na immunofenotypy. Najczęstszy podział obejmuje guzy „zimne” i „gorące” (Rycina 4) [144]. Pierwsze z nich, określane często mianem „pustyni immunologicznej”, charakteryzują się całkowitym brakiem limfocytów CD8⁺ w centrum i na obrzeżach guza. Ponadto obserwuje się w nich mniejszą liczbę TILs, neoantygenów na komórkach nowotworu, a także niską ekspresję MHC czy ICPs. Są tutaj natomiast obecne supresorowe komórki tj. Tregs czy TAMs typu M2 [144,145]. Immunofenotyp „gorący” jest przeciwieństwem „zimnego”. Charakteryzuje się dużą liczbą TILs, zwłaszcza CD8⁺ w centrum guza, obecnością dużej liczby receptorów na komórkach nowotworowych, w tym także ICPs, oraz zapalnym środowiskiem immunologicznym. Z tego powodu guzy „zimne” rzadko odpowiadają na immunoterapię, w przeciwieństwie do „gorących” [144,145]. Wśród guzów „zimnych” wyróżnia się także podgrupę guzów „z wykluczeniem immunologicznym” (ang. *immune-excluded*), które posiadają komórki immunologiczne zlokalizowane jedynie na obrzeżach guza [144].



Rycina 4. Podział nowotworów na „zimne” i „gorące” w zależności od mikrośrodowiska guzów.

Skróty: kom. – komórka, NK - ang. *natural killer*, PD-1 - receptor programowanej śmierci 1 (ang. *programmed death receptor 1*), PD-L1 - ligand receptora programowanej śmierci 1 (ang. *programmed death ligand 1*), Treg – limfocyt T regulatorowy (ang. *regulatory T cells*).

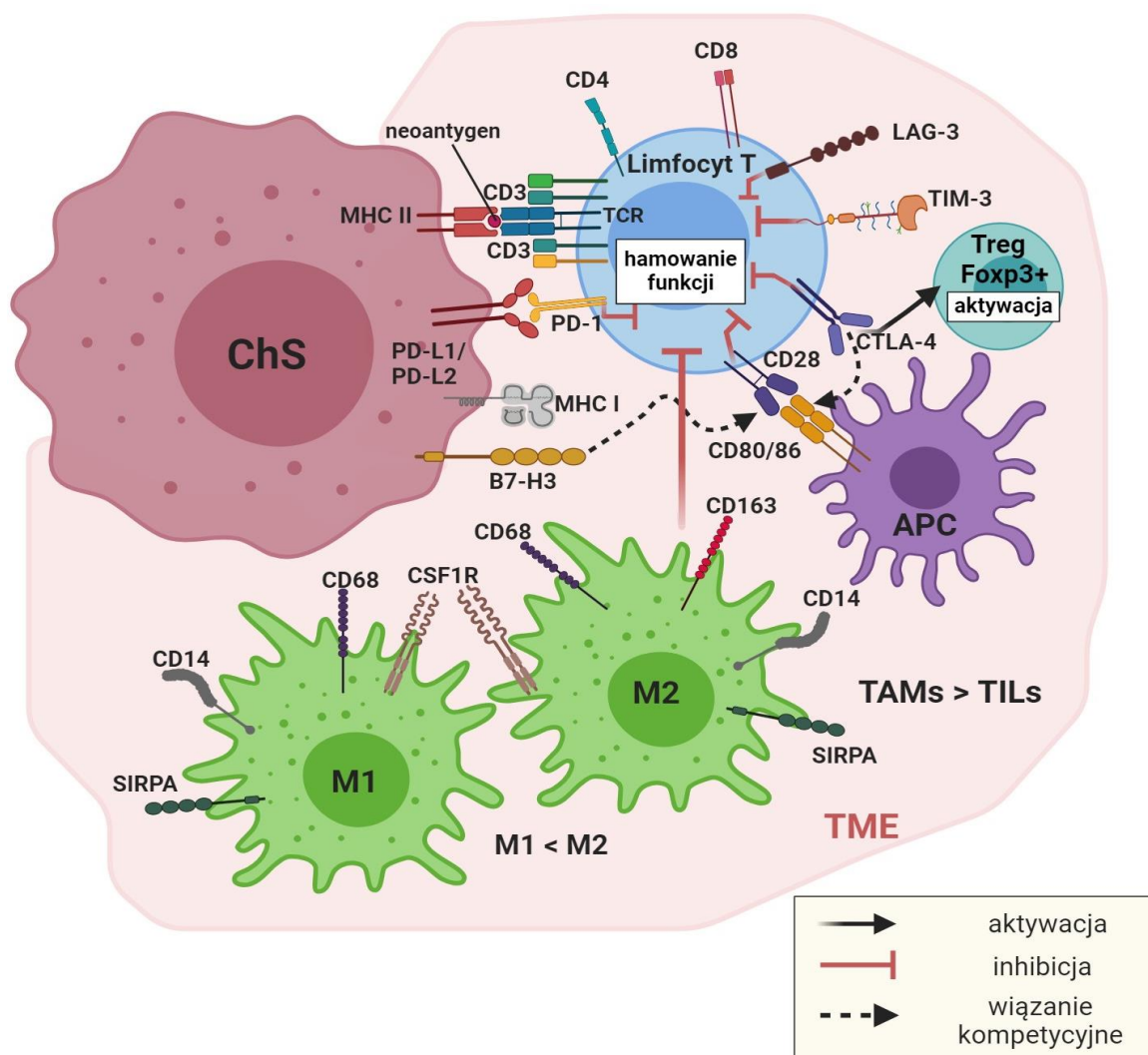
Rycinę przygotowano z wykorzystaniem BioRender.com.

Mięsaki, w tym ChS są z reguły „zimnymi” guzami o słabych odpowiedziach na immunoterapię (opisano szerzej w podrozdziale 1.3.3). W związku z tym próbuje się stosować terapie modulujące środowisko immunosupresyjne np. poprzez hamowanie funkcji Tregs i zmianę immunofenotypu z „zimnego” na „gorący” [146]. Są jednak znane mięsaki, które dobrze reagują na immunoterapię np. niezróżnicowany mięsak pleomorficzny, odróżnicowany i pleomorficzny tłuszczakomięsak, czy mięsak pęcherzykowy [146]. Wciąż jednak mało wiadomo na temat immunologii mięsaków i konieczne są dalsze badania w tym zakresie [147].

1.3.2. Immunofenotyp chrzęstniakomięsaka

Wiedza na temat immunologii ChS i jego TME, podobnie jak mięsaków, jest wciąż niewielka. Dotychczasowe prace pokazały że główną rolę w ChS odrywają TILs (m.in. CD3+, CD4+, CD8+) i TAMs (m.in. CD68+ i CD163+) (Rycina 5), z czego w przeważającej liczbie obserwowano TAMs [148–150]. Wykazano korelację pomiędzy naciekami komórek immunologicznych, a agresywnością nowotworu, czy przeżyciami pacjentów z rozpoznaniem ChS G1-G3 oraz DDGS [149,150]. W badaniu przeprowadzonym przez Richert’a i wsp., wysoki stosunek komórek CD68+/CD8+ oraz wysoki poziom makrofagów

CD68+ były negatywnymi czynnikami rokowniczymi w DDCS [149]. Ponadto autorzy zidentyfikowali obecność receptora czynnika wzrostu kolonii makrofagów (CSF1R, ang. *colony stimulating factor 1 receptor*), białka CD276 (B7-H3, ang. *B7 Homolog 3*), będącego inhibitorem kompetycyjnym dla CD28 [139] oraz SIRPA (ang. *signal regulatory protein alpha*) na TAMs w klasycznych ChS G1-G3 i DDCS [149] (Rycina 5). W innym badaniu, obecność TILs (CD8+, CD4+ oraz CD3+) była związana z lepszymi przeżyciami u pacjentów z rozpoznaniem ChS G1-G3. TILs lokalizowały się głównie na obrzeżach guza i występowały częściej w przypadkach ChS G2 i G3 [150]. Ponadto w przerzutowych DDCS wykazano obecność Tregs Foxp3+ (ang. *Forkhead box P3*), a także immunosupresyjnych makrofagów - CD163+CD14+ (obecnych także w guzach pierwotnych) [151].



Rycina 5. Charakterystyka mikrośrodowiska chrzęstniakomięsaka.

Skróty: APC - komórki prezentujące antygen (ang. *antigen-presenting cells*), B7-H3 - ang. *B7 homolog 3*, ChS - chrzęstniakomięsak (ang. *chondrosarcoma*), CD - antygen różnicowania komórkowego (ang. *cluster of differentiation*), CTLA-4 - antygen cytotoksycznych limfocytów typu 4 (ang. *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*), CSF1R – receptor czynnika wzrostu kolonii makrofagów (ang. *colony stimulating factor 1 receptor*), Foxp3 - ang. *Forkhead box P3*, LAG-3 - ang. *lymphocyte activation gene-3*, M1 - makrofag typu M1, M2 - makrofag typu M2, MHC - główny układ zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*), PD-1 - receptor programowanej śmierci 1 (ang. *programmed death receptor 1*), PD-L1/2 - ligand receptora programowanej śmierci 1 lub 2 (ang. *programmed death ligand 1/2*), SIRPA - ang. *signal regulatory protein alpha*, TAMs - makrofagi naciekające guz (ang. *tumor-associated macrophages*), TCR - receptor komórki T (ang. *T-cell receptor*), TIM-3 - immunoglobulino-podobny receptor limfocytów T (ang. *T cell immunoglobulin and mucin domain-3*), TILs - limfocyty naciekające guz (ang. *tumor infiltrating lymphocytes*), TME - mikrośrodowisko guza (ang. *tumor microenvironment*), Treg - limfocyty T regulatorowe (ang. *regulatory T cells*).

Rycinę przygotowano z wykorzystaniem BioRender.com.

W TME ChS została opisana także ekspresja niektórych ICPs (Rycina 5). Ekspresję PD-L1 zaobserwowano w klasycznym ChS (częściej w ChS G2/G3) i DDCS, podczas gdy nie wykazywał jej MCS [149,151–153]. W DDCS ekspresja PD-L1 występowała nawet

u 50% przypadków i była związana z ekspresją MHC klasy I [149,151]. W obu podtypach wykryto także limfocyty PD-1+, dodatkowo w guzach DDCCS stwierdzono współwystępowanie komórek PD-1+ i PD-L1+ [149]. Inne badanie wykazało negatywny wpływ między ekspresją PD-L1/PD-L2 a przeżyciem wolnym od nawrotu choroby (RFS, ang. *relapse-free survival*) u pacjentów z rozpoznaniem ChS [152]. Ponadto zarówno na komórkach klasycznego ChS, jak i na komórkach DDCCS zaobserwowano ekspresję LAG-3 i TIM-3 oraz w małym stopniu CTLA-4 [149].

1.3.3. Zastosowanie immunoterapii w chrzęstniakomięsakach

Dotychczas niewielka liczba badań klinicznych oceniała wpływ inhibitorów ICPs u pacjentów z rozpoznaniem ChS. Uzyskiwane wyniki nie były zadowalające i dotyczyły małej grupy chorych [154]. Przykładowo w badaniu klinicznym 2 fazy - SARC028, przeprowadzonym na 5 pacjentach z rozpoznaniem DDCCS, tylko u jednego pacjenta zaobserwowano częściową odpowiedź (PR, ang. *partial response*) na zastosowanie inhibitora PD-1 – pembrolizumabu [155]. W innym badaniu u 1/4 pacjentów z rozpoznaniem DDCCS leczonym niwolumabem stwierdzono PR [156]. W niektórych badaniach obserwowano natomiast pojedyncze przypadki z zaawansowanymi klasycznymi ChS i dobrą odpowiedzią na leczenie m.in. po zastosowaniu niwolumabu [157], czy pembrolizumabu [154]. Dodatkowo w badaniu 1/2 fazy, z wykorzystaniem doksorubicyny z pembrolizumabem, zaobserwowano regresję guza u 3 z 8 pacjentów z rozpoznaniem ChS. U jednego z tych pacjentów (z klasycznym ChS) guz zmniejszył się o 26% [158]. Daje to nadzieję na wykorzystanie immunoterapii u niektórych pacjentów z rozpoznaniem ChS, jednak konieczne są dalsze badania na większej grupie chorych. Obecnie w fazie badań klinicznych jest sporo potencjalnych terapii m.in. z wykorzystaniem inhibitorów: PD-1, PD-L1, czy CTLA-4 (NCT03277924, NCT03474640, NCT02982486, NCT05039801), a także z wykorzystaniem rekombinowanej IL-2 (NCT03449108) [72].

1.3.3.1. Obciążenie mutacyjne guza i jego rola w immunoterapii

Poza czynnikami immunologicznymi, ważnymi biomarkerami przewidującymi odpowiedź na immunoterapię są też czynniki genetyczne. Jednym z takich biomarkerów jest parametr obciążenia mutacyjnego guza (TMB, ang. *tumor mutational burden*). TMB jest określany jako liczba mutacji somatycznych występujących w przeliczeniu na megabazę,

czyli milion par zasad (Mb, ang. *mega base pair*) badanej sekwencji genomowej [mut/Mb] [159]. TMB jest często określanym parametrem w wielu nowotworach, a jego wartości zależnie od typu nowotworu wahają się od 0,001 mut/Mb do nawet 1000 mut/Mb [159,160]. W pracach spotykane są różne punkty odcięcia dla TMB, jednak najczęściej przyjmuje się, że wartości ≥ 10 mut/Mb określane są jako wysokie [159–161]. ChS, podobnie jak mięsaki, mają z reguły niskie TMB (< 5 mut/Mb) w porównaniu do innych nowotworów [89]. Wartości te mogą przyjmować jednak trochę wyższe wartości u pojedynczych pacjentów. Przykładowo w badaniu Tarpeya i wsp. TMB wynosiło od 1 do 115 mut/Mb oraz było 2-krotnie wyższe w podtypach o wyższej złośliwości (G2, G3, DDCS) w porównaniu do ChS G1 [57].

Duża liczba niesynonimicznych mutacji określana przez TMB jest związana ze zwiększonym prawdopodobieństwem powstawania po translacji zmienionych peptydów, prezentowanych następnie przez MHC w postaci neoantygenów [162]. Prezentacja neoantygenów przez komórki nowotworowe powoduje napływ i aktywację komórek immunologicznych, przyczyniając się do stymulacji układu odpornościowego i lepszych odpowiedzi na immunoterapię [163]. Z tego powodu TMB jest uznawany za jeden z biomarkerów skuteczności immunoterapii [162]. Z drugiej strony wpływ TMB na odpowiedzi na immunoterapię budzi też pewne kontrowersje. Przykładowo nowotwory z niskim TMB mogą odpowiadać dobrze na immunoterapię, i na odwrót - wysokie TMB nie zawsze koreluje z dobrą odpowiedzią [164]. Może to wynikać z faktu, iż nie każda mutacja związana jest z powstawaniem zmienionych peptydów. Ponadto tylko część zmienionych peptydów może zostać przetworzona i poprawnie zaprezentowana w formie antygenów na powierzchni komórki [162]. Z tego powodu TMB nie powinno być traktowane jako bezpośredni wskaźnik odpowiedzi na immunoterapię, w przeciwieństwie do obciążenia neoantygenem (TNB, ang. *tumor neoantigen burden*) [162]. TMB może być jednak pomocnym parametrem pośrednim w ocenie powstawania neoantygenów i jest łatwiej dostępny oraz często oceniany przy okazji NGS [160].

1.3.3.2. Rola niestabilności mikrosatelitarnej w immunoterapii

Niestabilność mikrosatelitarna (MSI, ang. *microsatellite instability*) jest kolejnym parametrem odgrywającym rolę w przewidywaniu odpowiedzi na immunoterapię [161]. MSI to stan nadmiernej zmienności genetycznej, który wynika z nieprawidłowościami w systemie naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych (MMR, ang. *mismatch repair*)

[165]. Tym samym występowanie MSI może przyczynić się do akumulacji mutacji i większego TMB, pośrednio wpływając na produkcję większej liczby neoantygenów [159]. Podobnie jak w przypadku TMB, wysoka MSI nie zawsze koreluje z lepszą odpowiedzią na immunoterapię i wartością TMB, co obserwowano w różnych typach nowotworów [166,167]. Brak tej korelacji może wynikać z obecności innych systemów naprawczych np. związanych ze szlakiem odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR, ang. *DNA damage response*). Występowanie dobrej odpowiedzi na immunoterapię, u pacjentów z wysokim TMB ale brakiem MSI, może być też związane z mutacjami w genach zaangażowanych w procesy naprawcze DNA. Takim przykładem są np. mutacje w genie *POLE* (ang. *DNA polymerase epsilon catalytic subunit*), kodującym katalityczną podjednostkę polimerazy DNA ϵ oraz mutacje *TP53* [159,167].

W przypadku ChS podobnie jak w mięsakach kości raczej nie obserwuje się fenotypu związanego z MSI lub jest on bardzo rzadkim zdarzeniem [89,168].

Dotychczasowe badania starające się wyjaśnić patogenezę ChS, jego podłoże molekularne, czy immunologię są nieliczne i często obejmują niewielkie grupy chorych. Zaledwie niewielka część czynników zaangażowanych w rozwój ChS została dobrze poznana i wciąż niewiele wiadomo na temat mechanizmów patogenezy i odpowiedzi immunologicznej w tych nowotworach. Z uwagi na brak opcji leczenia systemowego, a także rozbieżne wyniki uzyskiwane podczas dotychczas stosowanych terapii celowanych (w tym immunoterapii), konieczne są dalsze badania w zakresie biologii molekularnej i immunologii ChS.

2. Cel pracy

Głównym celem pracy było opracowanie klasyfikacji ChS w oparciu o ocenę czynników immunologicznych, zmian genetycznych oraz wyników leczenia chorych.

Cele szczegółowe pracy obejmowały:

1. Wytypowanie prognostycznych czynników klinicznych u pacjentów z rozpoznaniem ChS.
2. Ocenę TMB guzów pierwotnych ChS.
3. Oznaczenie statusu MSI u pacjentów z rozpoznaniem ChS.
4. Profilowanie molekularne guzów pierwotnych ChS poprzez analizę profilu mutacyjnego i deregulowanych ścieżek sygnałowych w różnych podtypach histologicznych ChS.
5. Określenie korelacji występujących mutacji z przeżyciami (OS) chorych na ChS.
6. Profilowanie immunologiczne guzów pierwotnych ChS w oparciu o charakterystykę nacieków immunologicznych w centrum i na obrzeżach guza oraz analizę ekspresji genów związanych z TME.
7. Określenie immunofenotypów oraz ich występowania w różnych podtypach histologicznych ChS.
8. Ocenę zależności pomiędzy poszczególnymi immunofenotypami guza a przeżyciem (OS) pacjentów z rozpoznaniem ChS.
9. Korelację danych immunologicznych i molekularnych wraz z wytypowaniem istotnych czynników rokowniczych.
10. Wytypowanie pacjentów mogących odnieść potencjalną korzyść z immunoterapii i/lub innych terapii celowanych.

Pośrednim celem pracy było wytypowanie potencjalnych biomarkerów pomocnych w diagnostyce ChS i/lub potencjalnych celów terapeutycznych.

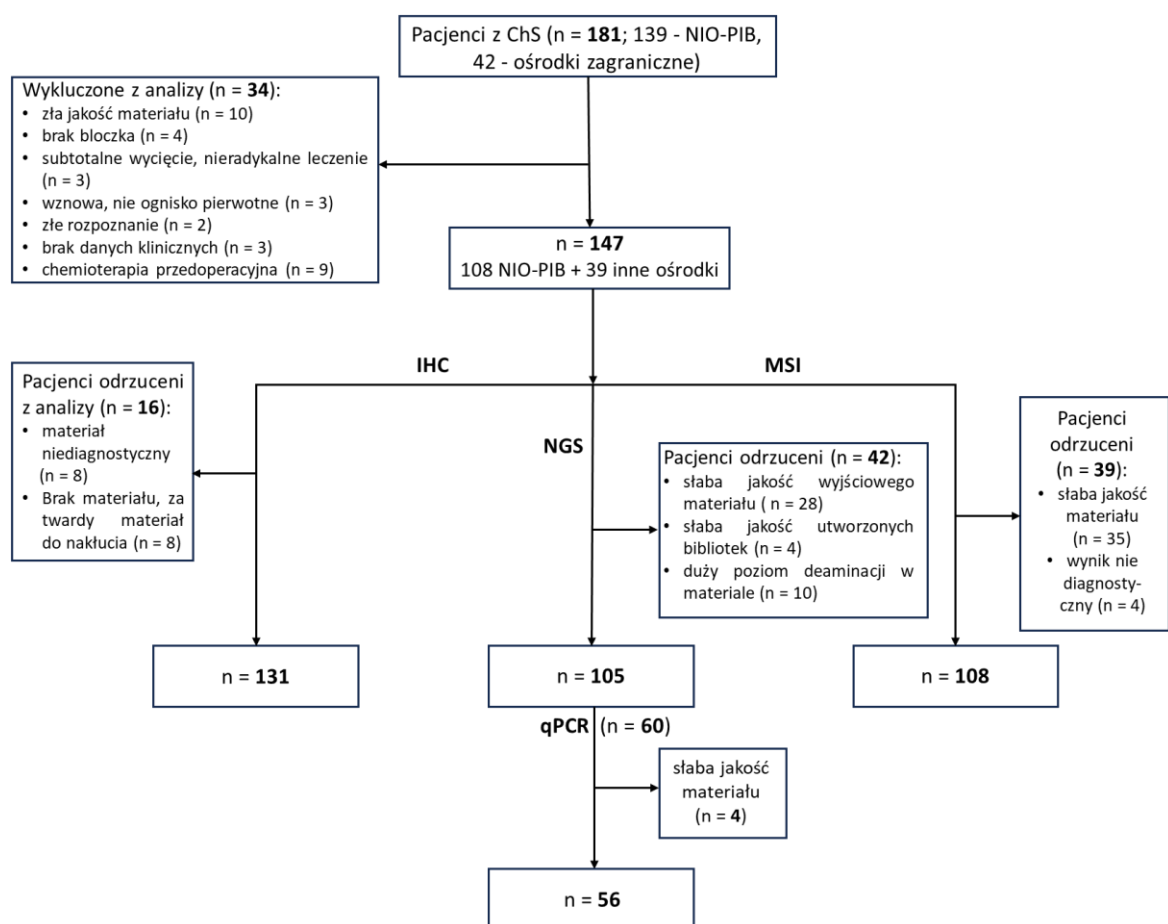
3. Materiały i metody

3.1. Charakterystyka pacjentów

Do badania włączono dane i utrwalony materiał tkankowy 147 pacjentów z pierwotnie rozpoznanym ChS w latach 2010-2022 leczonym radykalnie przez zabieg chirurgiczny (Rycina 6). Wśród włączonych pacjentów byli pacjenci z rozpoznaniem ChS G1, G2, G3, DDCS i MCS. Pacjenci zakwalifikowani do badania byli leczeni w Klinice Nowotworów Tkanek Miękkich, Kości i Czerniaków (KNTMKiCz) Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie - Państwowego Instytutu Badawczego (NIO-PIB) (108 pacjentów), a także w ośrodkach zagranicznych – Istituto Ortopedico Rizzoli (Bologna, Włochy) oraz Centre Léon Bérard, (Lyon, Francja) (39 pacjentów). W oparciu o jakość pobranego od pacjentów materiału spośród wytypowanych 147 pacjentów do oceny barwień immunohistochemicznych włączono 131 pacjentów. Z tej samej grupy 147 chorych, do analiz molekularnych wybrano 105 i 108 pacjentów odpowiednio do oceny NGS i MSI. Do analizy ekspresji genów wytypowano reprezentatywną grupę 60 pacjentów, z czego dla 56 uzyskano dobrej jakości wyniki (Rycina 6).

Pacjenci byli kwalifikowani na podstawie obecności pełnych danych klinicznych z co najmniej rocznym czasem obserwacji (ang. *follow-up*) oraz obecnością materiału do badań pochodzącego z resekcji ogniska pierwotnego guza. Kryteriami wyłączenia było wcześniejsze leczenie przedoperacyjne z zastosowaniem chemio- lub radioterapii oraz brak leczenia radykalnego w przypadku resekcji subtotalnej (niecałkowitej).

Każdy pacjent wyraził pisemną zgodę na wykorzystanie pobranego od nich materiału biologicznego do celów diagnostycznych, leczniczych i naukowych. Projekt uzyskał zgodę lokalnej Komisji Bioetycznej (nr 7/2020) i był prowadzony zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Klinicznej (GCP, ang. *good clinical practice*).



Rycina 6. Schemat pacjentów włączonych do poszczególnych analiz.

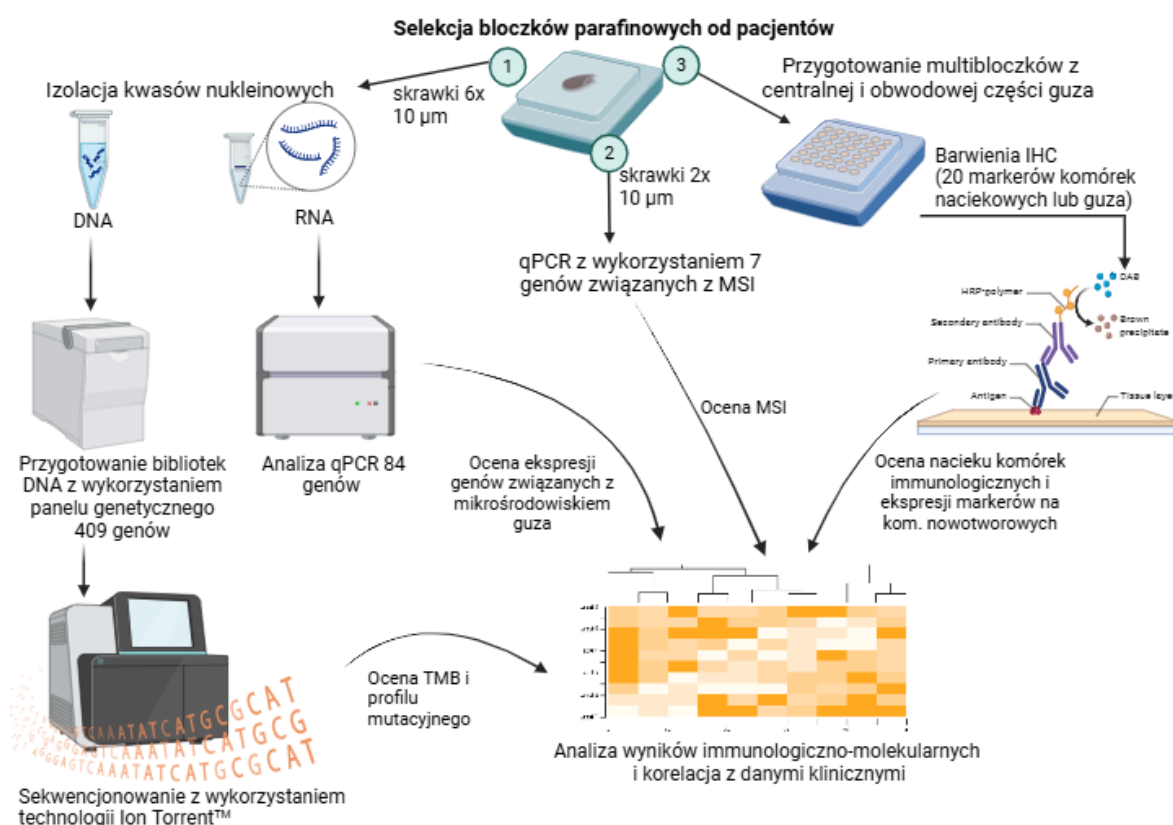
Skróty: ChS - chrzęstniakomięsak (ang. *chondrosarcoma*), IHC - immunohistochemia (ang. *immunohistochemistry*), MSI - niestabilność mikrosatelitarna (ang. *microsatellite instability*), NIO-PIB - Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowy Instytut Badawczy, NGS - sekwencjonowanie następnej generacji (ang. *next-generation sequencing*), qPCR - PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR/quantitative PCR*).

3.2. Materiał biologiczny do badań

Materiałem do badań były tkanki utrwalone w buforowanej 10% formalinie (czas utrwalania był nie dłuższy niż 48h) i zatopione w bloczkach parafinowych (FFPE, ang. *formalin-fixed paraffin-embedded*). Utkanie nowotworowe w bloczkach wybranych do analizy stanowiło co najmniej 80%. Do analiz molekularnych wybierano bloczki, które nie były wcześniej poddawane działaniu odwapniacza, stosowanego do obróbki kości lub innych zwapnionych tkanek. Jego zastosowanie przyczynia się m.in. do uszkodzeń materiału genetycznego, uniemożliwiając dalsze analizy molekularne [169]. Ponadto w celu walidacji analizy molekularnej (podrozdział 3.4.1.5) wykorzystano materiał z dostępnej tkanki zdrowej pochodzącej z bloczków FFPE (obejmującej węzeł chłonny, skórę lub płuco) oraz z krwi.

3.3. Schemat badania

Materiał pobrany od pacjentów był podstawą do trzech dalszych analiz – molekularnej z wykorzystaniem DNA lub RNA, oceny MSI oraz przygotowania barwień immunohistochemicznych (IHC, ang. *immunohistochemistry*). Dane ze wszystkich analiz były na koniec zbiorczo analizowane w kontekście danych klinicznych pacjentów (Rycina 7).



Rycina 7. Schemat przeprowadzonych doświadczeń.

Skróty: IHC - immunohistochemia (ang. *immunohistochemistry*), MSI - niestabilność mikrosatelitarna (ang. *microsatellite instability*), TMB - obciążenie mutacyjne guza (ang. *tumor mutation burden*), qPCR - PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR/quantitative PCR*). Rycinę przygotowano z wykorzystaniem BioRender.com.

3.4. Metodyka

3.4.1. Analizy molekularne

3.4.1.1. Izolacja DNA i RNA ze skrawków parafinowych

Do izolacji zarówno DNA jak i RNA zastosowano dedykowany do materiału FFPE zestaw Biosystems™ MagMAX™ FFPE DNA/RNA Ultra (Thermo Fisher Scientific Inc.,

Waltham, MA, Stany Zjednoczone) wykorzystujący metodę izolacji z użyciem kulek magnetycznych. W tym celu wykorzystano skrojony w Zakładzie Patomorfologii Nowotworów NIO-PIB materiał z całej powierzchni bloczka, w postaci 6 skrawków grubości 10 µm. Następnie postępowano zgodnie z zaleceniami producenta, stosując wariant całonocnej inkubacji tkanek z proteazą w 57 °C w celu dokładnego strawienia tkanki. Próbkę przechowywano odpowiednio w -20 °C (DNA) i -70 °C (RNA).

W celu oceny wydajności izolacji kwasów nukleinowych (DNA i RNA) i ich czystości próbki mierzono spektrofotometrycznie przez pomiar absorbancji przy długości fali A260 nm, oceniając współczynnik A260/A280 oraz A260/A230 (spektrofotometr NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific Inc.), a także fluorymetrycznie aby ocenić stężenie kwasów nukleinowych - z użyciem odpowiednio zestawów Qubit dsDNA HS Assay Kit oraz Qubit RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) na fluorymetrze Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

3.4.1.2. Panel genetyczny do oceny profilu genetycznego

Do oceny profilu mutacyjnego oraz TMB w ChS wybrano panel genetyczny Oncomine™ Tumor Mutation Load Assay (Thermo Fisher Scientific Inc.). Panel zawiera 2 pule starterów umożliwiając jednoczesną amplifikację pełnej sekwencji kodującej 409 genów (Tabela 2), obejmujących około 1,7 Mb genomu, z czego 1,2 Mb sekwencji eksonowej. Panel z użyciem dedykowanego oprogramowania Ion Reporter™ (IR) umożliwia określenie wartości TMB, definiowanego dokładnie jako liczba wariantów niesynonimicznych, w tym wariantów pojedynczych nukleotydów (SNV, ang. *single nucleotide variant*) typu zmiany sensu (ang. *missense*) oraz nonsensownych, a także indeli wykrytych na Mb sekwencji eksonowej. Długość sekwencji użyta do obliczeń TMB jest zależna od liczby zmapowanych odczytów o długości co najmniej 60 bp [170]. Dodatkowo panel umożliwia wykrycie wariantów somatycznych przy użyciu jedynie tkanki nowotworowej (bez konieczności analizy sparowanej tkanki zdrowej) z zastosowaniem filtracji wariantów germinalnych w oparciu o bazy „1000 Genomów”, „500 Exomes” oraz ExAC (ang. *Exome Aggregation Consortium*) [171].

Tabela 2. Wykaz genów zawartych w panelu Oncomine™ Tumor Mutation Load Assay.

ABL2	CD79A	EPHB1	GRM8	LIFR	MYH9	PMS1	SOX2	WAS	GNAS	ATRX	TSC2
ACVR2A	CD79B	EPHB4	GUCY1A2	LPHN3	NCOA1	POT1	SSX1	WHSC1	HPN1A	BAP1	WT1
ADAMTS20	CDC73	EPHB6	HCAR1	LPP	NCOA2	POU5F1	STK36	WRN	HRAS	CDK12	
AFF1	CDH1	ERCC1	HIF1A	LRP1B	NCOA4	PPARG	SUFU	XPA	IDH1	CDKN2A	
AFF3	CDH11	ERCC3	HLF	LTF	NFKB1	PPP2R1A	SYK	XPC	IDH2	CDKN2B	
AKAP9	CDH2	ERCC4	HOKK3	LTK	NFKB2	PRDM1	SYNE1	XPO1	JAK2	CEBPA	
APC	CDH20	ERCC5	HSP90AA1	MAF	NIN	PRKAR1A	TAF1	XRCC2	KOR	CHEK1	
ARID2	CDH5	ERG	HSP90AB1	MAFB	NKX2-1	PRKDC	TAF1L	ZNF384	KIT	CHEK2	
ARNT	CDK8	ETS1	ICK	MAGEA1	NLRP1	PSIP1	TAL1	ZNF521	KRAS	CREBBP	
ATF1	CDKN2C	ETV1	IGF1R	MAG1	NOTCH4	PTGS2	TBX22	ABL1	MAP2K1	DNMT3A	
AURKA	CIC	ETV4	IGF2	MALT1	NSD1	PTPRD	TCF12	AKT1	MAP2K2	FANCA	
AURKB	CKS1B	EXT1	IGF2R	MAML2	NUMA1	PTPRT	TCF3	AKT2	MAP2K4	FANCD2	
AURKC	CMPK1	EXT2	IKBK	MAP3K7	NUP214	RALGDS	TCF7L1	AKT3	MAPK1	FBXW7	
BAI3	COL1A1	FAM123B	IKBKE	MAPK8	NUP98	RARA	TCF7L2	ALK	MET	MLH1	
BCL10	CRBN	FANCC	IKZF1	MARK1	PAK3	RECQL4	TCL1A	AR	MPL	MSH2	
BCL11A	CREB1	FANCF	IL2	MARK4	PARP1	REL	TET1	AXL	MTOR	MSH6	
BCL11B	CRKL	FANCG	IL21R	MBD1	PAX3	RHOH	TFE3	BRAF	MYC	NBN	
BCL2	CRTC1	FANCI	IL6ST	MCL1	PAX5	RNASEL	TGFB2	CEB1	MYCN	NF1	
BCL2L1	CSMD3	FAS	IL7R	MDM2	PAX7	RNF2	TGM7	CCND1	NFE2L2	NF2	
BCL2L2	CTNNA1	FH	ING4	MDM4	PAX8	RNF213	THBS1	CDK4	NRAS	NOTCH1	
BCL3	CTNNA1	FLCN	IRF4	MEN1	PBRM1	RPS6KA2	TIMP3	CDK6	NTRK1	NOTCH2	
BCL6	CYLD	FLI1	IRS2	MITF	PBX1	RRM1	TLR4	CSF1R	NTRK3	NPM1	
BCL9	CYP2C19	FLT1	ITGA10	MLL	PDE4DIP	RUNX1T1	TLX1	DDR2	PDGFRA	PALB2	
BCR	CYP2D6	FLT4	ITGA9	MLL2	PDGFB	SAMD9	TNFAIP3	EGFR	PDGFRB	PIK3R1	
BIRC2	DAXX	FN1	ITGB2	MLL3	PER1	SBDS	TNFRSF14	ERBB2	PIK3CA	PMS2	
BIRC3	DCC	FOXO1	ITGB3	MLL10	PGAP3	SDHA	TNK2	ERBB3	PIK3CB	PTCH1	
BIRC5	DDIT3	FOXO1	JAK1	MMP2	PHOX2B	SDHB	TOP1	ERBB4	PTPN11	PTEN	
BLM	DDIT3	FOXO3	JAK3	MM1	PIK3C2B	SDHC	TPR	ERCC2	RAF1	RADSO	
BLNK	DEK	FOXP1	JUN	MRE11A	PIK3CD	SOHD	TRIM24	ESR1	RE1	RB1	
BMPR1A	DICER1	FOXP4	KAT6A	MTR	PIK3CG	SEPT9	TRIM33	EZH2	ROS1	RUNX1	
BRD3	DPYD	FZR1	KAT6B	MTRR	PIK3R2	SGK1	TRIP11	FGFR1	SF3B1	SETD2	
BTX	DST	G6PD	KDM5C	MUC1	PIK1	SH2D1A	TRRAP	FGFR2	SMO	SMARCA4	
BUB1B	EML4	GATA1	KDM6A	MUTYH	PKHD1	SMAD2	TSHR	FGFR3	SHC	SMARCB1	
CARD11	EP300	GATA2	KEAP1	MYB	PLAG1	SMAD4	UBR5	FGFR4	ARID1A	STK11	
CASC5	EP400	GATA3	KLF6	MYCL1	PLCG1	SMUG1	UGT1A1	FLT3	ASXL1	TET2	
CCND2	EPHA3	GDNF	LAMP1	MYD88	PLEKHG5	SOC1	USP9X	GNA11	ATM	TP53	
CCNE1	EPHA7	GPR124	LCK	MYH11	PML	SOX11	VHL	GNAQ	ATR	TSC1	

Na niebiesko zaznaczono geny o funkcji onkogenów, na fioletowo geny supresorowe zgodnie z opisem producenta panelu. Źródło: [171].

3.4.1.3. Przygotowanie bibliotek DNA

Do przygotowania bibliotek wykorzystano wyizolowane wcześniej DNA. Biblioteki przygotowano manualnie z użyciem zestawu Ion AmpliSeq™ Library Kit Plus (Thermo Fisher Scientific Inc.) i postępowano zgodnie z zaleceniami producenta. Przygotowanie bibliotek DNA przebiegało w 6 etapach (Rycina 8).



Rycina 8. Schemat przygotowywania bibliotek DNA.

Skróty: UDG - glikozylaza uracylu-DNA (ang. *uracil-DNA glycosylase*).

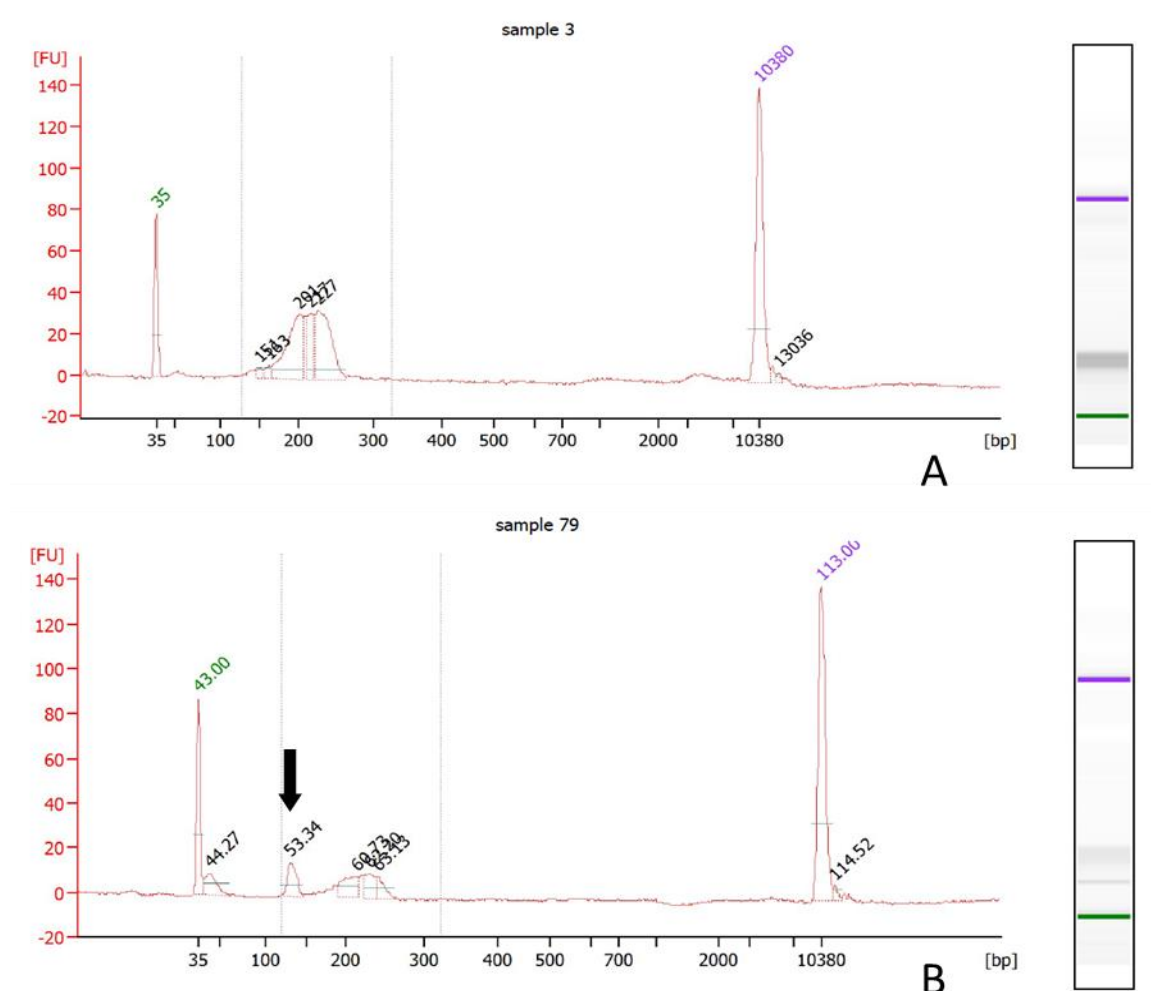
Materiał FFPE pozwala na wydłużenie trwałości materiału i analizy molekularne podczas wielu badań, w tym także retrospektywnych. Jest on najczęściej wykorzystywanym materiałem do badań w praktyce klinicznej [169]. Jego wykorzystanie wiąże się jednak z pewnymi ograniczeniami i uszkodzeniami materiału genetycznego. Jednym z nich jest znaczna degradacja materiału do fragmentów długości około 100-200 nukleotydów [166]. Dużo większy problem stanowi proces indukowanej formaliną deaminacji, który przyczynia

się do fałszywie dodatnich wyników podczas interpretacji danych z NGS [172]. Podczas tego procesu dochodzi do przekształcenia cytozyny do uracylu lub 5-metylocytozyny (5-mC) do tyminy, co skutkuje nieprawidłowym sparowaniem guaniny i przyłączeniem w to miejsce adeniny, a w efekcie podmianami C:G>T:A [173]. Proces ten w żywych organizmach jest redukowany przez enzymy – glikozylazy, w tym glikozylazę uracyl-DNA (UDG, ang. *uracil-DNA glycosylase*), biorącą udział w szlaku naprawy przez wycięcie zasad (BER, ang. *base excision repair*) [172,173]. Enzym ten w wielu przeprowadzonych dotychczas pracach skutecznie redukował proces deaminacji w tkankach FFPE traktowanych UDG w porównaniu do nietraktowanych [172,173]. Jego działanie polega na hydrolizowaniu wiązania N-glikozydowego pomiędzy zasadą uracylową a cukrem w DNA. Powstałe w ten sposób miejsca pozbawione zasady azotowej (AP, ang. *apurinic/apyrimidinic sites*) są następnie naprawiane za pomocą systemu naprawy BER [174]. W związku z czym traktowanie UDG jest rekomendowane przed amplifikacją DNA podczas przygotowywania bibliotek do NGS [173], także według zaleceń producenta panelu Oncomine™ [175]. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy oraz zaobserwowaniem deaminacji w poprzednich badaniach prowadzonych przez współpracowników [55], prewencyjnie zastosowano trawienie rekomendowanym przez producenta panelu genetycznego nietrwałym termicznie enzymem UDG (Thermo Fisher Scientific Inc.) wszystkich próbek jako pierwszy etap przygotowania bibliotek. W tym celu 20 ng DNA poddano trawieniu z jedną jednostką UDG przez 2 min. w 37 °C, a następnie zahamowano reakcję przez umieszczenie mieszaniny reakcyjnej w 50 °C na 10 min.

Kolejne etapy były właściwymi etapami tworzenia bibliotek i przebiegały zgodnie z zaleceniami producenta. W pierwszym etapie przy użyciu reakcji PCR amplifikowano poddane wcześniej trawieniu UDG DNA z użyciem 2 puli starterów z panelu genetycznego i mieszaniną reakcyjną z zestawu do przygotowywania bibliotek. Następnie uzyskane w ten sposób amplikony z 2 pul starterów łączono i poddawano trawieniu enzymem FuPA. W kolejnym etapie – ligacji, dołączano na obu końcach amplikonów adaptory umożliwiające namnożenie amplikonów w dalszym etapie PCR-u emulsyjnego oraz oznaczenie próbek (Ion P1 Adapter oraz Ion Xpress™ Barcode Adapters 33-48 Kit, Thermo Fisher Scientific Inc.). Następnie przygotowane w ten sposób biblioteki oczyszczano przy użyciu kulek magnetycznych (Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter Inc., Brea, Kalifornia, Stany Zjednoczone) i amplifikowano w reakcji PCR. Na koniec biblioteki poddano kolejnemu czyszczeniu celem usunięcia zbyt krótkich i długich fragmentów z użyciem kulek

magnetycznych i eluowano buforem TE (Tris-EDTA), z niską zawartością EDTA (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*). Gotowe biblioteki przechowywano w -20 °C.

Przygotowane w ten sposób biblioteki mierzono następnie przy pomocy Qubit 2.0 w celu oceny stężenia i przygotowania rozcieńczeń do właściwego pomiaru na urządzeniu do oceny jakościowej i ilościowej bibliotek - Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Kalifornia, USA). Próbkę do oceny były przygotowywane zestawem Agilent High Sensitivity DNA Kit. Biblioteki oceniano pod względem obecności ewentualnych zanieczyszczeń, widocznych w postaci pików przed lub poza spodziewanym zakresem wielkości bibliotek tj. 125-325 bp. Następnie przy pomocy oprogramowania (2100 Expert Software) odczytywano molarność bibliotek (pmol/L). W przypadku obecności zanieczyszczeń, próbki ponownie doczyszczano. Przykładowe wyniki z oceny bibliotek przedstawiono na Rycinie 9.



Rycina 9. Przykładowe wyniki pomiaru bibliotek DNA na Bioanalyzerze 2100.

A – biblioteka prawidłowa bez zanieczyszczeń. B – biblioteka z zanieczyszczeniami w postaci krótkich fragmentów widocznymi w postaci „piku” zaznaczonego czarną strzałką.

3.4.1.4. Przebieg sekwencjonowania następnej generacji

Do przeprowadzenia sekwencjonowania wykorzystano technologię Ion Torrent™, która opiera się na sekwencjonowaniu półprzewodnikowym. Technologia ta wykorzystuje proces uwalniania jonów wodorowych (H^+) podczas dobudowywania przez polimerazę deoksynukleotydu (dNTP, ang. *deoxynucleotide triphosphate*) do nici DNA. Przyłączenie sparowanego dNTP powoduje uwolnienie H^+ i zmianę pH, która jest rejestrowana przez półprzewodniki na chipie. Następnie informacja ta jest przetwarzana na sygnał cyfrowy (0,1), który następnie zapisywany jest na sekwenatorze [176].

Gotowe biblioteki grupowano zależnie od stężenia (biblioteki o mniejszych stężeniach były analizowane osobno od takich, które miały bardzo wysokie stężenia) w celu uzyskania jak najlepszego pokrycia podczas sekwencjonowania. Następnie próbki rozcieńczano do stężeń w zakresie 50-100 pmoli/L i łączono po 4 w objętości 6,8 μ l każda, zgodnie z rekomendacją producenta.

W kolejnym etapie próbki były nanoszone na chipy półprzewodnikowe. Na 1 chip przypadały 4 próbki w celu uzyskania jak największego pokrycia niezbędnego do wykrycia mutacji somatycznych. Proces ten przebiegał automatycznie z wykorzystaniem urządzenia Ion Chef™ (Thermo Fisher Scientific Inc.) i zestawu Ion PI™ Hi-Q™ Chef Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). Zachodziła tu reakcja PCR-u emulsyjnego w kroplach emulsji mająca na celu namnożenie pojedynczych amplikonów na matrycach w formie kulek - Ion Sphere™ (Thermo Fisher Scientific Inc.) [177,178]. W idealnych warunkach 1 kropla zawiera 1 kulkę z przyłączoną pojedynczą matrycą DNA, która następnie jest namnażana. Jeśli amplikonów w kropli jest więcej mówimy o poliklonalności. Kolejnym etapem jest wzbogacanie, w którym kulki pozbawione amplikonów są usuwane i zostają tylko te, w których są przyłączone i namnożone amplikony [179]. W ostatnim etapie gotowe matryce są nakładane na chipy - Ion 540™ Chip (Thermo Fisher Scientific Inc.), które następnie umieszcza się w sekwenatorze. Do przeprowadzenia sekwencjonowania wykorzystano sekwenator Ion Proton™ (Thermo Fisher Scientific Inc.) i postępowano zgodnie z instrukcją producenta w celu przygotowania inicjalizacji oraz właściwej reakcji sekwencjonowania z wykorzystaniem zestawów odczynników i materiałów zużywalnych dedykowanych do tego aparatu - Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit, Ion PI™, Sequencing Nucleotides oraz Ion Proton™ Sequencing Supplies (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Surowe dane były następnie zapisywane na sekwenatorze, gdzie następowała wstępna obróbka danych, polegająca na odczytaniu sekwencji poszczególnych próbek

i odcięciu sekwencji adapterowych, a następnie mapowanie (ang. *mapping*) do genomu referencyjnego (hg19, Homo Sapiens) oraz analiza pokrycia i identyfikacja wariantów (ang. *variant calling*) z wykorzystaniem wtyczek do oprogramowania Torrent Suite™ (TS) w wersji 5.14.0 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Na koniec analizy program generował raport umożliwiający ocenę stopnia załadowania (ang. *loading*) chipa i wydajności całego procesu sekwencjonowania oraz jakości uzyskanych odczytów (Rycina 10).



Rycina 10. Przykładowy raport z oprogramowania Torrent Suite™ przedstawiający poprawnie wykonane sekwencjonowanie.

W górnej części ryciny przedstawiono wydajność załadowania chipa, procent wzbogaconych matryc, klonalność, procent prawidłowych bibliotek bez sekwencji adapterowych czy odczytów złej jakości oraz długość odczytów. Z kolei w dolnej części widoczny jest procent prawidłowo zmapowanych do genomu referencyjnego sekwencji wraz z oceną jakościową.

Do oceny jakościowej przyjęto następujące kryteria: załadowanie chip'a $\geq 80\%$, poliklonalność $\leq 30\%$. Dodatkowo zgodnie z rekomendacją producenta do dalszej analizy bioinformatycznej wybierano próbki z min. 12 milionami zmapowanych odczytów, średnią

głębokością pokrycia ≥ 1100 oraz wartością określaną jako „*uniformity*” $\geq 80\%$ (Rycina 11). Parametr „*Uniformity*” określa procent zasad we wszystkich docelowych regionach, który jest pokryty przez co najmniej 20% średniej głębokości pokrycia odczytów [170]. Przy dobrych pozostałych parametrach akceptowano także próbki mające powyżej 10 milionów zmapowanych odczytów oraz pokrycie w przedziale 900-1000. W niektórych przypadkach z trochę mniejszą ilością odczytów czy pokryciem łączono także odczyty z 2 niezależnych sekwencjonowań dla 1 próbki aby uzyskać większą liczbę zmapowanych odczytów.

coverageAnalysis v5.12.0.0 (551)

View Log Delete

Completed 59.8 MB

•coverageAnalysis.html

Library type: AmpliSeq DNA

Target regions: target_region_Oncomine_Tumor_Mutation_Load_Regions_v2.1

Barcode Name	Sample	Mapped Reads	On Target	Mean Depth	Uniformity
IonXpress_034	smpl25	13,381,259	99.12%	857	89.24%
IonXpress_037	smpl106	21,872,086	98.64%	1,400	90.72%
IonXpress_038	smpl130	11,289,352	98.99%	737.8	85.82%
IonXpress_046	smpl94	34,136,276	99.06%	2,176	94.43%

1

20

items per page

1 - 4 of 4 items

Rycina 11. Przykładowe wyniki z analizy pokrycia z oprogramowania Torrent Suite™.

Na rycinie przedstawiono liczbę i procent zmapowanych odczytów, średnią głębokość sekwencjonowania oraz wartość „*uniformity*”.

3.4.1.5. Analiza bioinformatyczna danych z sekwencjonowania następnej generacji

Opracowanie skryptu do przedstawionych poniżej analiz zostało opracowane wspólnie z dr Jakubem Piątkowskim z Instytutu Genetyki i Biotechnologii (Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski). Dane do analizy bioinformatycznej pochodziły z trzech różnych etapów analizy. W pierwszym etapie z serwera TS ściągano dane surowe w postaci sekwencji nukleotydów wraz z informacją o jakości odczytanych nukleotydów – plik w formacie FASTQ, a także pliki z binarnym zapisem przyrównania do sekwencji referencyjnej w wyniku mapowania – BAM (ang. *Binary Alignment Map*) oraz pliki zawierające zidentyfikowane warianty – VCF (ang. *Variant Call Format*). Do identyfikacji wariantów użyto domyślnych ustawień dla oprogramowania "AmpliSeq Panel - Proton - Somatic - Low Stringency", wersja 5.12.0.2 (552).

W kolejnym etapie warianty były analizowane od surowego, ściągniętego wcześniej formatu FASTQ z użyciem pakietu oprogramowania - GATK (ang. *Genome Analysis*

Toolkit) wersja 4.2.2.0 [180]. W tym celu najpierw przeprowadzano wstępną obróbkę danych i ich kalibrację m.in. mapowanie programem BWA (ang. *Burrows-Wheeler Alignment Tool*) [181] i re-kalibrację jakości wykrytych podczas sekwencjonowania zasad azotowych (BQSR, ang. *Base Quality Score Recalibration*), która miała na celu m.in. wyeliminowanie błędów wynikających z sekwencjonowania [182]. W wyniku tego etapu otrzymywano plik BAM, który służył jako plik wyjściowy do procesu identyfikacji wariantów. W celu identyfikacji wariantów somatycznych użyto oprogramowania Mutect2 z pakietu GATK [183]. Do odfiltrowywania wariantów germinalnych użyto dane populacyjne z bazy gnomAD (ang. *Genome Aggregation Database*), a także PoN (ang. *panel of normals*), który zawiera informacje o potencjalnych artefaktach z puli tkanek normalnych przygotowany przez autorów GATK w oparciu o bazę TCGA (ang. *The Cancer Genome Atlas*) [182]. W kolejnych etapach następowała weryfikacja zanieczyszczeń pochodzących z innych próbek, rozdział wariantów multiallelicznych na warianty monoalleliczne przy użyciu BCFtools, a następnie wyrównywanie wariantów do lewej strony za pomocą narzędzia LeftAlignAndTrimVariants [184]. W ostatnim kroku warianty były filtrowane w oparciu o następujące parametry:

- 1) Dla polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP, ang. *single nucleotide polymorphism*) lub więcej niż jednego nukleotydu (MNP, ang. *multiple nucleotide polymorphism*):
 - a. Minimalne pokrycie w pojedynczym *locus* genowym (parametr DP, ang. *depth*): 15
 - b. Minimalna frekwencja alternatywnego (zmutowanego) allelu w populacji, określona jako frakcja odczytów wspierających alternatywny allel (parametr AF, ang. *allele frequency*): 0,015 lub 0,075 (dla próbek o wyższym stopniu deaminacji, co zostało szczegółowo omówione poniżej przy opisie analizy wyników z IR)
- 2) Dla indeli:
 - a. Minimalne DP: 70
 - b. Przedział AF: 0,35 – 0,55
 - c. Minimalne prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji somatycznej w próbce w skali logarytmicznej (parametr TLOD, ang. *tumor log-odd score*): 14.

[185,186]

Poszczególne typy wariantów po filtracji łączono na koniec w jeden plik VCF.

Trzecim typem VCF były pliki pobrane z oprogramowania IR (wersja 5.20), który generował plik VCF w oparciu o pobrany wcześniej z TS plik BAM i wybrany skrypt - Oncomine Tumor Mutation Load - w3.4 - DNA - Single Sample. IR umożliwia wygenerowanie raportów (Rycina 12) z wartością TMB, określeniem charakterystycznych sygnatur mutacyjnych, liczbą wykrytych wariantów germinalnych i somatycznych oraz określeniem stopnia deaminacji próbki (ang. *deamination score*). Przyjęty w oprogramowaniu punkt odcięcia dla stopnia deaminacji to 100, jednak z uwagi na duże ryzyko deaminacji w próbkach oraz znacznie zwiększone TMB przy obserwowanym jednocześnie wyższym stopniu deaminacji, do dalszych analiz kwalifikowano próbki o stopniu deaminacji < 10 . W przypadku wartości w zakresie 10 - 25 i/lub TMB (otrzymanego z oprogramowania IR) w zakresie 11 - 50 mut/Mb dla 6 próbek zastosowano zaostrzone warunki filtracji wariantów poprzez zwiększenie minimalnego AF z domyślnej wartości 0,05 na 0,1 zgodnie z rekomendacją producenta panelu genetycznego [170]. Analogicznie postępowano z wartością AF przy filtracji z wykorzystaniem GATK, gdzie empirycznie określono minimalną wartość na 0,075 opierając się na zachowaniu tego samego stosunku ilości odfiltrowywanych wariantów przed i po zmianie parametru AF, co przy zmianie tego parametru w IR. Zidentyfikowane warianty były eksportowane w postaci VCF'ów po zastosowaniu rozszerzonych parametrów filtracji - Oncomine Extended (5.14). Wyjątek stanowiły próbki o zaostrzonych parametrach AF, w przypadku których warianty podlegały domyślnej filtracji - Oncomine Variants (5.10).

Tumor Mutational Burden Analysis Report

Tumor Mutational Burden
(Mutations/Mb): 2.54

Analysis

smpl32_c1669_2022-09-25-12-00-57-431

Ion Reporter Version
5.18

Launched by
Agnieszka Zając

Launched on
Sep 25 2022 10:01 AM

Workflow
OncoPrint Tumor Mutation Load - w3.3
- DNA - Single Sample r.0

Annotations
OncoPrint Tumor Mutation Load Assay
Annotations v1.4 r.0

Reference
OncoPrint Tumor Mutation Load
Hotspots v2.2, hg19, OncoPrint Tumor
Mutation Load Mask v2.0, OncoPrint
Tumor Mutation Load Regions v2.1

Samples

smpl32

Gender
Unknown

Relationship
Proband

QC Metrics

Average Coverage
1531.0

Number of bases used in calculating TMB
1179863

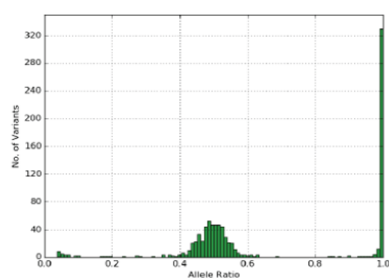
Number of variant calls
3

Deamination Score
2 (QC: PASS; observed (2) < threshold
(100.0))

TMB classification (based on
specified parameters)
Undefined

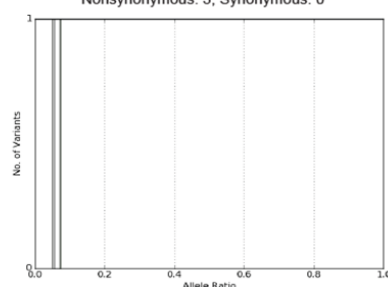
Analysis Results

Germline and Somatic Variants: 897

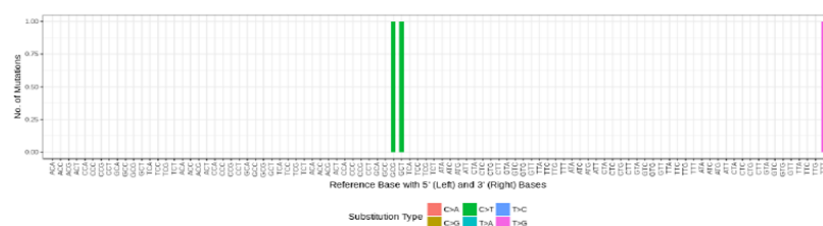


Only Somatic Variants: 3

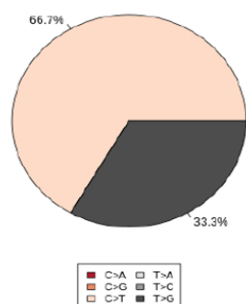
Nonsynonymous: 3; Synonymous: 0



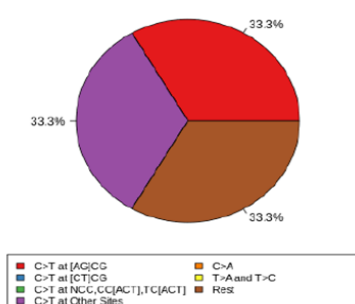
Substitution Type and Context of Somatic Mutations



Substitution Type of Somatic Mutations



Signature Pattern of Somatic Mutations



Additional Information:



¹ Alexandrov LB et al. *Nature*. 2013; ² Hayward NK et al. *Nature*. 2017; ³ Alexandrov LB et al. *Cancer Etiology*. 2016; ⁴ Wong SQ et al. *BMC Medical Genomics*. 2014;

Rycina 12. Przykładowy raport z oprogramowania Ion Reporter™.

W trakcie ustalania metodyki testowano różne opcje doboru parametrów filtracji oraz różne oprogramowania. Oprogramowanie TS generowało bardzo zawyżone dane, szczególnie pod względem indeli (wynikające z tendencji do błędów w regionach homopolimerowych sekwencji DNA) i nie było skuteczne pod względem filtracji wariantów germinalnych. Uwzględniało z kolei potencjalne artefakty sekwencjonowania wynikające z technologii Ion Torrent™ [187,188]. Pakiet GATK natomiast odfiltrowywał warianty germinalne przy zastosowaniu odpowiedniej opcji filtracji, zamiast standardowej filtracji GATK, jednak najprawdopodobniej ze względu na brak testowania i dostosowania do technologii Ion Torrent™ usuwał niektóre warianty wiarygodne, a zachowywał część fałszywie pozytywnych m.in. indeli. Z kolei w przypadku IR ograniczone możliwości manipulacji i doboru poszczególnych parametrów stanowiły problem do dalszej obróbki danych. Dodatkowo w przypadku ściśle ustalonych kryteriów, które nie podlegały znacznym modyfikacjom, program generował ograniczoną liczbę wyników, które mogły pomijać niektóre mniej znane warianty genetyczne. W związku z przedstawionymi ograniczeniami każdej z metod, zdecydowano się połączyć wszystkie typy wariantów uzyskanych z 3 oprogramowań poprzez funkcję intersekcji (wygenerowania zbioru wspólnego) z wykorzystaniem BCFtools dla wariantów uzyskanych z TS i GATK. Pozwoliło to na zachowanie optymalnego stosunku wariantów typu SNP do indeli. Następnie dodano dodatkowo warianty z IR, aby uzyskać jak najpełniejszą pulę wariantów do dalszego etapu filtracji. Przykładowe wyniki z porównania różnych metod zostały przedstawione w Załączniku 1 (Rycina Z1).

Scalony plik VCF był następnie anotowany przez program Funcotator (ang. *FUNCTIONal annOTATOR*) z pakietu GATK, który odfiltrowywał „oflagowane” zdarzenia m.in. wykryte jako warianty germinalne, występujące w PoN (z Mutect2), a także warianty o niższym pokryciu i niskiej jakości mapowania, allele multialleliczne, warianty występujące tylko na jednej nici oraz blisko końca odczytów, a także warianty położone blisko innych odfiltrowanych już wariantów w obrębie tego samego haplotypu. Następnie odfiltrowane pliki były zapisywane jako pliki VCF - do dalszego etapu analizy oraz pliki MAF (ang. *Mutation Annotation Format*) - do wizualizacji danych.

W celu walidacji metodyki i wykrycia potencjalnych artefaktów wynikających z użytej technologii, a także z uwagi na brak sparowanych próbek od pacjentów (będących najwiarygodniejszym sposobem filtracji wariantów germinalnych [189]), utworzono grupę kontrolną ze zdrowej populacji. W tym celu 9 dostępnych tkanek (5 pochodzących z tkanek

FFPE: ze skóry, węzłów chłonnych lub płuc oraz 4 wyizolowane z krwi osób zdrowych) poddano takiej samej procedurze przygotowania bibliotek DNA, sekwencjonowania, a następnie analizy danych jak opisano powyżej. Otrzymano w ten sposób plik VCF zawierający pulę wariantów ze wszystkich tkanek zdrowych, nienowotworowych. Następnie z wcześniej otrzymanych plików VCF odfiltrowywano warianty które występowały w grupie kontrolnej, będące potencjalnymi wariantami germinalnymi, wariantami niepatogennymi (niezwiązanymi z rozwojem danej choroby) lub artefaktami. W ten sposób uzyskano warianty potencjalnie somatyczne. Dodatkowo została przeprowadzona filtracja o zaokrąglonych parametrach po identyfikacji wariantów w celu identyfikacji wiarygodniejszych wariantów tj. $AF \geq 0,05$ oraz $DP \geq 50$ [185,190,191].

Następnie przeprowadzano adnotację zidentyfikowanych wariantów z wykorzystaniem narzędzia Ensembl VEP (ang. *Variant Effect Predictor*) wersja 110.1 [192]. Do predykcji patogenności wariantów wykorzystano następujące predyktory: SIFT (ang. *Sorting Intolerant From Tolerant*), przewidujący czy podstawienie aminokwasu wpływa na funkcję białka w oparciu o homologię sekwencji i właściwości fizyczne aminokwasów [193]; PolyPhen-2 (ang. *Polymorphism Phenotyping v2*), przewidujący możliwy wpływ podstawienia aminokwasu na strukturę i funkcję ludzkiego białka na podstawie prostych rozważań fizycznych i porównawczych [194]; oraz AlphaMissense, wykorzystujący uczenie maszynowe do przewidywania zmian pojedynczych aminokwasów na funkcję białka i określenia patogenności danego wariantu [195]. Warianty określone przez VEP jako „nieszkodliwe”, o przewidywanym niskim wpływie na strukturę białka (ang. *low*), czyli obejmujące m.in. mutacje synonimiczne tj. zmiany nukleotydu przy jednoczesnym braku zmiany aminokwasu, które identyfikowano w kolumnie „IMPACT” w pliku wyjściowym oraz warianty oznaczone w bazie ClinVar [196] w kolumnie „CLIN_SIG” jako łagodne (ang. *benign*), czyli nie mające potencjalnie związku z chorobą, były odfiltrowywane w pierwszej kolejności. Następnie zachowywano warianty które były określone jako szkodliwe jednocześnie według SIFT i PolyPhen-2 lub jako patogenne w AlphaMissense, charakteryzującym się wysoką precyzją, jednak wykrywający jedynie SNV [195].

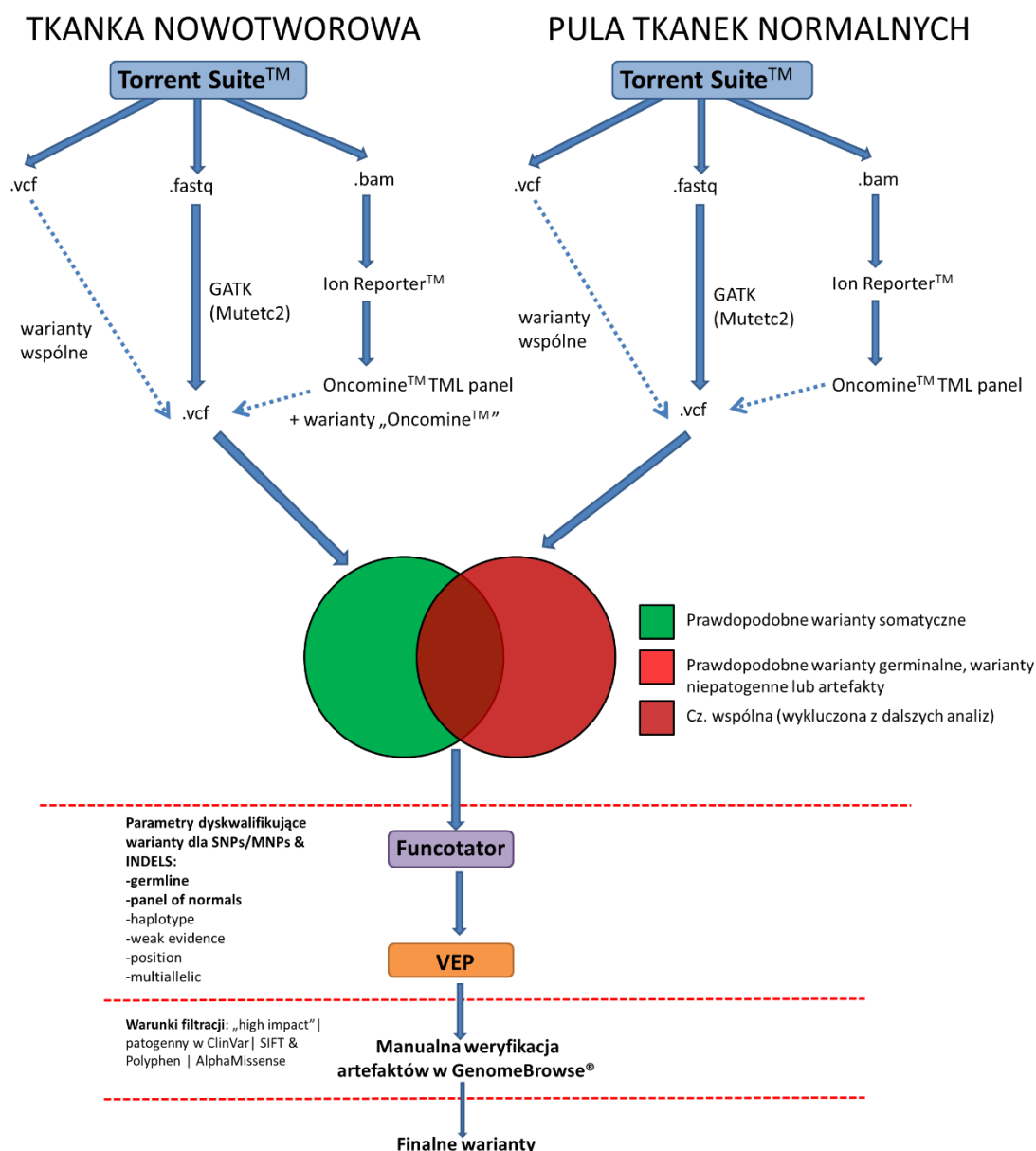
Na koniec warianty oceniano manualnie w celu dodatkowej weryfikacji wystąpienia potencjalnych artefaktów (szczególnie w przypadku indeli) w programie Golden Helix GenomeBrowse® wersja 3.0.0 (sekwencja referencyjna GRCH37 g1k, 1000 Genomes) (Rycina 13). W tym celu wszystkie warianty, które nie były do tej pory opisane w bazie

zbierającej informacje o SNPs w populacji – dbSNP (ang. *Single Nucleotide Polymorphism Database*) zostały dodatkowo sprawdzone pod względem odczytów – zidentyfikowany wariant musiał występować w co najmniej 2 odczytach na każdej z nici („-” oraz „+”) oraz na co najmniej 5 odczytach sumarycznie (przy zachowaniu AF = 0,05). Pozostałe warianty wykluczano z analizy. Odfiltrowywano także warianty obecne w bazie „1000 Genomów” o częstości powyżej 0,005. Dodatkowo w Golden Helix GenomeBrowse® sprawdzano indele pod względem występowania w próbkach tkanek zdrowych i powtarzające się warianty także wykluczano [190,191]. W ten sposób uzyskano ostateczną listę potencjalnie somatycznych i patogennych wariantów (Rycina 14).



Rycina 13. Przykładowy widok z programu Golden Helix GenomeBrowse®.

Na rycinie przedstawiono fragment genu wraz z pokryciem w danym regionie oraz zidentyfikowanymi mutacjami w stosunku do sekwencji referencyjnej.



Rycina 14. Schemat bioinformatycznej analizy danych z sekwencjonowania następnej generacji.

Skróty: BAM – ang. *Binary Alignment Map*, Funcotator – ang. *FUNCTIONal annOTATOR*, GATK – ang. *Genome Analysis Toolkit*, INDELS – insercje, delecje - indele (ang. *insertion or deletion*), MNPs – zmiany kilku nukleotydów (ang. *multiple nucleotide polymorphism*), Polyphen – ang. *Polymorphism Phenotyping*, SNPs – polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism*), SIFT – ang. *sorting intolerant from tolerant*, TML – ang. *tumor mutation load*, VCF – ang. *Variant Call Format*, VEP – ang. *Variant Effect Predictor*.

W celu identyfikacji CNV wykorzystano pakiet R - PureCN w wersji 2.0.2 [197]. Jako pliki wyjściowe wykorzystano BAM’y uzyskane wcześniej z GATK. Następnie przeprowadzono etap identyfikacji wariantów z użyciem Mutect2 oraz obliczano średnie pokrycie w próbkach. Następnie przeprowadzano normalizację ilości zasad GC i w oparciu o pulę próbek zdrowych (opisanych powyżej) normalizację i segmentację liczby kopii.

W efekcie uzyskiwano plik w formacie CSV (ang. *comma-separated values*) z listą genów z wykrytą amplifikacją lub delecją wraz z wykrytą w danym regionie liczbą kopii.

3.4.1.6. Sekwencjonowanie metodą Sanger

Sekwencjonowanie metoda Sanger jest wciąż złotym standardem przy wykrywaniu mutacji. Z tego powodu jest rekomendowanym sposobem na niezależną kontrolę wykrywanych w NGS mutacji i dodatkowe potwierdzenie lub wykluczenie zidentyfikowanych u pacjentów wariantów [186,198,199]. W celu walidacji analizy bioinformatycznej, opisanej w poprzednim podrozdziale, często powtarzające się w wielu próbkach warianty (stanowiące ponad 10% wszystkich próbek) i obecne zarówno w próbkach nowotworowych jak i w puli próbek tkanek zdrowych, potwierdzono sekwencjonowaniem metodą Sanger. Na tej podstawie zwalidowano proces wykluczania wariantów będących potencjalnymi polimorfizmami lub artefaktami sekwencjonowania, a także potwierdzono obecność wariantów często opisywanych i ważnych w ChS. Warianty zidentyfikowane zarówno w tkankach zdrowych jak i nowotworowych były odrzucane z analizy NGS.

Do sekwencjonowania metodą Sanger zostały wytypowane następujące geny obecne zarówno w tkance nowotworowej jak i zdrowej: *HNF1A* (p.P291), *NOTCH4* (p.G349), *EPHB1* (p.R865), *RNF213* (p.L4649), *CSMD3* (p.Y1575) i *THBS1* (p.Q882). Z kolei wśród wytypowanych genów często występujących w ChS były *IDH1* (p.R132) oraz *IDH2* (p.R172). Startery do namnożenia wybranych fragmentów genów zostały zaprojektowane przy wykorzystaniu programu SciEd Central wersja 7.11. Uzyskane w ten sposób produkty PCR miały wielkość około 400 par zasad. Do starterów przednich (ang. *forward*) dołączano sekwencje uniwersalną (T7) udostępnioną przez Pracownię Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk (oligo.pl). Zaprojektowany starter stanowił jednocześnie starter do sekwencjonowania (wyjątek stanowiły osobno zaprojektowane startery dla genów *HNF1A* oraz *IDH1*). Produkt namnażano z użyciem polimerazy Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Inc., Ipswich, Massachusetts, Stany Zjednoczone) i postępowano zgodnie protokołem przygotowania reakcji PCR. Następnie produkt sprawdzano na żelu agarozowym, poddawano oczyszczaniu z użyciem GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.), eluowano 20 µl buforu elucyjnego i mierzono stężenie z wykorzystaniem urządzenia NanoDrop™ 2000. Objętość próbek

zawierającą 100 ng DNA dopełniano do 5 μ l ultraczystą wodą miliQ. i dodawano 1 μ l startera do sekwencjonowania w stężeniu 5 μ M, zgodnie z instrukcją na stronie Pracowni. Wykorzystane sekwencje starterów przedstawiono w Załączniku 2 (Tabela Z1). Wyniki z sekwencjonowania analizowano w programie FinchTV wersja 1.4.0.

3.4.1.7. Ocena niestabilności mikrosatelitarnej

Do oceny MSI w badanej grupie pacjentów wykorzystano Idylla™ MSI Test (Biocartis US, Inc., Raritan, NJ, Stany Zjednoczone). Test ten wykorzystuje do oceny 7 biomarkerów związanych z MSI - *ACVR2A*, *BTBD7*, *DIDO1*, *MRE11*, *RYR3*, *SEC31A* i *SULF2*. Test uznaje wynik za ważny jeśli co najmniej pięć genów zostało pomyślnie zanalizowanych. Obecność co najmniej dwóch zmutowanych biomarkerów pozwala na zidentyfikowanie próbki jako MSI, natomiast obecność zera lub jednego zmutowanego biomarkera wskazuje na fenotyp stabilności mikrosatelitarnej (MSS, ang. *microsatellite stable*) [200]. Do analizy wykorzystano 1-2 skrawki z tkanek FFPE o grubości 10 μ m, które umieszczano w specjalnej kasetce i ładowano do aparatu - Idylla™ system. Następowala tu zautomatyzowana liza komórek, izolacja kwasów nukleinowych oraz amplifikacja i detekcja z użyciem PCR w czasie rzeczywistym (qPCR, ang. *real-time PCR/quantitative PCR*). Po zakończeniu analizy program generował raport (Rycina 15) z informacją o ważności testu oraz obecności lub braku MSI.

RAPORT Z WYNIKÓW TESTÓW

Test wykonany w PRACOWNI DIAGNOSTYKI GENETYCZNEJ I MOLEKULARNEJ NOWOTWORÓW, UL.
RENTGENA 5 02-781 WARSZAWA, POLSKA, PRACOWNIA DIAGNOSTYKI GENETYCZNEJ I MOLEKULARNEJ
NOWOTWORÓW, +48 225462891



ID próbki	18439/14		
Typ próbki	tkanka FFPE		
ID Kasety	57890280		
Typ testu	MSI_IVD/1.0	Wersja TTP	1.6
ID serii	00005789	Data ważności	21 mar 2023
Numer seryjny Instrumentu	SER2203		
Wersja oprogram. Instrumentu	26.0		
Nr seryjny Konsoli	C00001497		
Wersja oprogram. Konsoli	4.4.0.630		
Zlecenie Testu wprowadzone	06 wrz 2022 (09:18)		
Rozpoczęto Test	06 wrz 2022 (09:18)		
Test zakończony	06 wrz 2022 (11:38)		
Status Testu	Zatwierdzony wynik: Automatycznie, 06 wrz 2022 (11:38)		
Operator	test		

Wynik testu (1) Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro. Do użytku w procedurach diagnostycznych.

Idylla MSI Test

Status próbki MSI	MSS
ACVR2A	Nie wykryto mutacji
Wynik MSI	0.00
BTBD7	Nie wykryto mutacji
Wynik MSI	0.00
DIDO1	Nie wykryto mutacji
Wynik MSI	0.00
MRE11	Nie wykryto mutacji
Wynik MSI	0.00
RYR3	Nie wykryto mutacji
Wynik MSI	0.00
SEC31A	Nie wykryto mutacji
Wynik MSI	0.00
SULF2	Nie wykryto mutacji
Wynik MSI	0.00
Status jakości	7 biomarkerów MSI zostało wzmocnionych prawidłowo, w związku z czym wynik testu jest WAŻNY.

Strona 1 z 2



Rycina 15. Przykładowy raport z Idylla™ system.

3.4.2. Analizy immunologiczne

3.4.2.1. Analiza immunohistochemiczna

Przygotowanie materiału do barwień IHC oraz ocena barwień zostały wykonane przez pracowników Zakładu Patomorfologii Nowotworów (NIO-PIB). Z blozków FFPE zostały przygotowane mikromacierze tkankowe (TMA, ang. *tissue microarray*). W tym celu wybrano po 2 regiony z części centralnej i obwodowej guza i wycięto rdzenie tkankowe (ang. *core*) o średnicy 2 mm przy użyciu Grand Master (3DHISTECH Ltd., Budapeszt,

Węgry). Następnie każdy z rdzeni umieszczano w bloczkach parafinowych zgodnie z zaprogramowanym układem w oprogramowaniu TMA Control. W każdym bloku TMA jako tkankę kontrolną wykorzystano wątrobę, migdałek, nerkę i jądro. W ten sposób przygotowano 8 TMA do dalszych barwień IHC.

Barwienia IHC przeprowadzono na skrawkach tkanek o grubości 4 μm przy użyciu automatycznego urządzenia Autostainer Link 48 (Agilent Technologies, Inc.) oraz Ventana Benchmark Ultra (Ventana Medical System Inc., Oro Valley, Arizona, Stany Zjednoczone). Do barwień wykorzystano pierwszorzędowe przeciwciała przeciwko: **CD45** (marker leukocytów ogółem); **CD3** (limfocyty T ogółem); **CD8** (limfocyty T cytotoksyczne); **CD4** (limfocyty T pomocnicze); **CD20** (limfocyty B); **FoxP3** (Treg), **CD68 [PG-M1]** (makrofagi o fenotypie M1-podobnym), **CD68 [KP1]** i **CD163** (makrofagi o fenotypie M2-podobnym); **CD14** (monocyty i makrofagi); **CD80**, **HLA-DR** (MHC klasy II; APC); **CD1a** i **CD141** (komórki dendrytyczne niedojrzałe i dojrzałe); **PD-1**, **TIM-3** i **LAG-3** (markery „wyczerpania” limfocytów/ICPs) oraz **Gal-9** (TILs, APC, komórki nowotworowe/ICPs). Dodatkowo oceniano ekspresję **PD-L1** na komórkach nowotworowych, a także obecność TLS w oparciu o pozytywną ekspresję 3 markerów - CD3, CD20 oraz markera dojrzałych komórek dendrytycznych zaangażowanych w formowanie się TLS - **LAMP3** (ang. *lysosome-associated membrane glycoprotein 3*) [135]. Specyfikację poszczególnych przeciwciał wraz z zastosowanym systemem detekcji przedstawiono w Załączniku 3 (Tabela Z2).

Gotowe preparaty skanowano przy pomocy skanera Ventana DP 200 (Roche Diagnostics International Ltd., Rotkreuz, Szwajcaria). Analizy obrazowe przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania QuPath wersja 0.4.3 [201], a także weryfikowano manualnie. Dla markerów komórek odpornościowych określono gęstość, jako liczbę dodatnich komórek na powierzchnię (mm^2) [148,202]. Ekspresję PD-L1 oceniano jako procent komórek pozytywnych w skali od 0 do 2 (0 - brak ekspresji: $< 1\%$ kom. pozytywnych; 1 - niska ekspresja: 1-30% kom. pozytywnych; 2 - wysoka ekspresja: $\geq 30\%$ kom. pozytywnych) [203].

3.4.2.2. Analiza ekspresji genów związanych z mikrośrodowiskiem guza

Do analizy ekspresji genów wykorzystano qPCR. Metoda ta wykorzystuje barwniki fluorescencyjne lub wyznakowane sondy do ilościowego pomiaru amplifikowanego DNA w celu określenia stężenia wyjściowego oraz określenia przyrostu produktu w czasie

rzeczywistym [204]. Do przeprowadzenia reakcji qPCR użyto komercyjnego panelu Human Cancer Inflammation & Immunity Crosstalk RT² Profiler PCR Array (RT² Profiler PCR Array Format E 384 (4 x 96), Quiagen®, Hilden, Niemcy), który zawiera 84 geny zaangażowane w pośredniczenie między komórkami nowotworowymi, a komórkami układu odpornościowego (Tabela 3). Szczegółowy opis genów zawarto w Tabeli Z3 w Załączniku 4.

Tabela 3. Lista genów z panelu Human Cancer Inflammation & Immunity Crosstalk RT² Profiler PCR Array.

<i>ACKR3</i>	<i>CSF3</i>	<i>HIF1A</i>	<i>KITLG</i>
<i>AICDA</i>	<i>CTLA4</i>	<i>HLA-A</i>	<i>MICA</i>
<i>BCL2</i>	<i>CXCL1</i>	<i>HLA-B</i>	<i>MICB</i>
<i>BCL2L1</i>	<i>CXCL10</i>	<i>HLA-C</i>	<i>MIF</i>
<i>CCL18</i>	<i>CXCL11</i>	<i>IDO1</i>	<i>MYC</i>
<i>CCL2</i>	<i>CXCL12</i>	<i>IFNG</i>	<i>MYD88</i>
<i>CCL20</i>	<i>CXCL2</i>	<i>IGF1</i>	<i>NFKB1</i>
<i>CCL21</i>	<i>CXCL5</i>	<i>IL10</i>	<i>NOS2</i>
<i>CCL22</i>	<i>CXCL9</i>	<i>IL12A</i>	<i>PDCD1</i>
<i>CCL28</i>	<i>CXCR1</i>	<i>IL12B</i>	<i>PTGS2</i>
<i>CCL4</i>	<i>CXCR2</i>	<i>IL13</i>	<i>SPP1</i>
<i>CCL5</i>	<i>CXCR3</i>	<i>IL15</i>	<i>STAT1</i>
<i>CCR1</i>	<i>CXCR4</i>	<i>IL17A</i>	<i>STAT3</i>
<i>CCR10</i>	<i>CXCR5</i>	<i>IL1A</i>	<i>TGFB1</i>
<i>CCR2</i>	<i>EGF</i>	<i>IL1B</i>	<i>TLR2</i>
<i>CCR4</i>	<i>EGFR</i>	<i>IL2</i>	<i>TLR3</i>
<i>CCR7</i>	<i>FASLG</i>	<i>IL23A</i>	<i>TLR4</i>
<i>CCR9</i>	<i>FOXP3</i>	<i>IL4</i>	<i>TNF</i>
<i>CD274</i>	<i>GBP1</i>	<i>IL6</i>	<i>TNFSF10</i>
<i>CSF1</i>	<i>GZMA</i>	<i>CXCL8</i>	<i>TP53</i>
<i>CSF2</i>	<i>GZMB</i>	<i>IRF1</i>	<i>VEGFA</i>

Źródło: [205]

W panelu zostały zawarte dodatkowo kontrole umożliwiające ocenę jakości i wydajności reakcji qPCR, w tym kontrola pozytywna ogólnej wydajności reakcji PCR, kontrola wydajności odwrotnej transkryptazy, a także kontrola wykrywająca zanieczyszczenie genomowym DNA. Dodatkowo w panelu znajdowało się 5 genów

referencyjnych (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1*, *RPLP0*) o stałej ekspresji niezależnie od tkanki czyli genów metabolizmu podstawowego (HKGs, ang. *housekeeping genes*), umożliwiającą normalizację uzyskanych wyników.

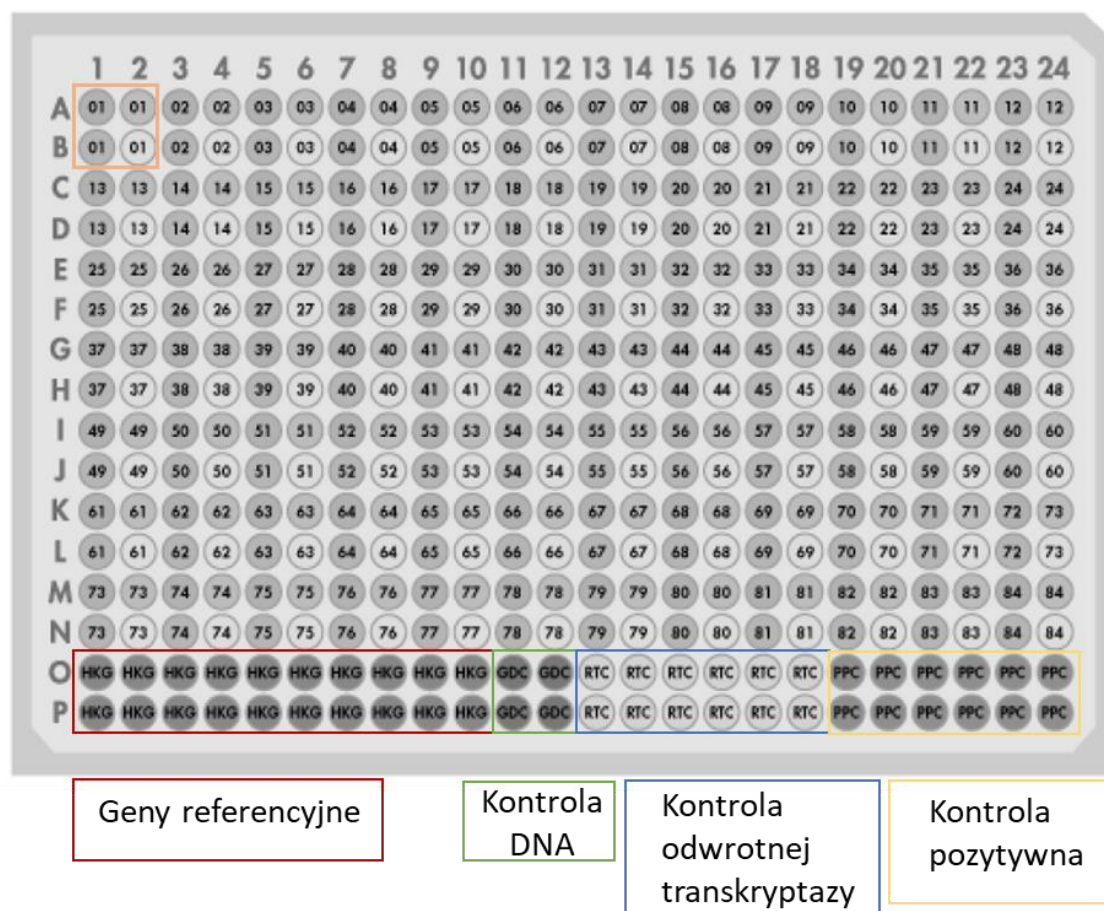
Do analizy ekspresji genów pomiędzy poszczególnymi podtypami histologicznymi ChS wytypowano próbki o najlepszych parametrach jakościowych RNA (reprezentatywna podgrupa 60 pacjentów ze 105, Rycina 6). W celu uzyskania jak najlepszej czystości i stężenia RNA rutynowo wszystkie próbki oczyszczano z ewentualnych zanieczyszczeń, m.in. genomowych. W tym celu próbki poddano trawieniu DNazą (DNase I, RNase-free, Thermo Fisher Scientific Inc.) w stężeniu 1 U/μg RNA z dodatkiem inhibitora RNaz (RiboLock RNase Inhibitor (40 U/μL), Thermo Fisher Scientific Inc.) w stężeniu 1 U/μl mieszaniny i inkubowano w 37 °C przez 30 min., a następnie reakcję zahamowywano przez dodanie 50 mM EDTA i 10-minutową inkubację w 65 °C. Następnie próbki oczyszczano na kolumnkach przy użyciu zestawu Monarch® RNA Cleanup Kit (10 μg) (New England Biolabs), postępując zgodnie z instrukcją producenta i eluowano 20 μl wolnej od nukleaz wody. Następnie uzyskane w ten sposób RNA mierzono spektrofotometrycznie (NanoDrop™ 2000). Do dalszych etapów kwalifikowano próbki o parametrach A260/A280: 1,8-2,0 i stężeniu co najmniej 40 μg/ml, zgodnie z rekomendacją producenta panelu.

Właściwy eksperyment z wykorzystaniem zestawu RT² Profiler PCR Array przebiegał w 4 etapach:

- 1) Eliminacja genomowego DNA.
- 2) Odwrotna transkrypcja.
- 3) Dodanie mieszaniny z barwnikiem fluorescencyjnym interkalującym w DNA.
- 4) Nałożenie mieszaniny na płytkę 384-dołkową ze starterami dla odpowiednich sekwencji genowych.

W 1 etapie przygotowano mieszaninę 2 μl buforu GE i 400 ng RNA z wykorzystaniem zestawu RT2 First Strand Kit (Quiagen®) i inkubowano w 42 °C przez 5 min. W kolejnym etapie przygotowano mieszaninę reakcyjną do odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem odczynników z tego samego zestawu i wymieszano z wcześniej uzyskaną mieszaniną w stosunku 1:1. Całość inkubowano w 42 °C przez 15 min., a następnie w 95 °C przez 5 min. Do uzyskanego w ten sposób cDNA dodawano mieszaninę z barwnikiem SYBR green (RT2 SYBR® Green qPCR Mastermix, Quiagen®) postępując zgodnie z rekomendacją producenta. Następnie 10 μl mieszaniny nakładano na docelową płytkę

z panelu Human Cancer Inflammation & Immunity Crosstalk RT² Profiler PCR Array.
Wariant płytki 384-dółkowej umożliwił analizę 4 próbek jednocześnie (Rycina 16).



Rycina 16. Schemat płytki 384-dółkowej dołączonej do zestawu RT² Profiler PCR Array Format E 384 (4 x 96).

W kolorowych ramkach (czerwonej, zielonej, niebieskiej i żółtej) oznaczono miejsca zawierające poszczególne kontrole i geny referencyjne. W ramce pomarańczowej oznaczono powtarzalny schemat umieszczenia zestawu starterów dla 1 z genów, pozwalający na analizę 4 próbek jednocześnie. Schemat zmodyfikowano w oparciu o [206].

Przygotowaną w ten sposób płytkę następnie wirowano i umieszczano w aparacie LightCycler® 480 (384-well block) (Roche Diagnostics International Ltd.) i nastawiano reakcję qPCR zgodnie z warunkami opisanymi w protokole.

Do wstępnej analizy wyników wykorzystano oprogramowanie LightCycler®, przy pomocy którego wyznaczono wartości cyklu progowego (CT, ang. *cycle threshold*), czyli wartość pierwszego cyklu w którym wykrywalna jest fluorescencja w badanej próbce w oparciu o metodę analizy maksimum drugiej pochodnej (ang. *second derivative maximum*) [207]. Następnie surowe wartości CT były pobierane i analizowane z użyciem oprogramowania komercyjnego - GeneGlobe Data Analysis Center (Quiagen®).

Do dalszych analiz wybierano próbki które przeszły kontrolę jakości w programie, tj. nie miały zanieczyszczeń genomowych oraz kontrola wydajności odwrotnej transkryptazy i kontrola pozytywna przeszły pomyślnie. Za limit detekcji uznano $CT = 35$.

Następnie próbki były analizowane (w tym samym oprogramowaniu) w oparciu o metodę komparatywną ($\Delta\Delta Ct$) [208], w której oblicza się różnicę między genem badanym a referencyjnym (ΔCt) w grupie badanej i kontrolnej. Następnie określano poziom zmiany ekspresji – parametr FC (ang. *fold change*) w stosunku do grupy kontrolnej wg. wzoru: $FC = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, gdzie $\Delta\Delta Ct$ to różnica średniej wartości ΔCt między grupą badawczą, a kontrolną [209]. Jako grupy kontrolnej użyto RNA pochodzące z 4 tkanek zdrowych z materiału FFPE (tych samych użytych do analizy NGS). Genem referencyjnym wybranym do analizy był gen *HPRT1*.

3.4.3. Analizy statystyczne i wizualizacja danych

Do przygotowania wykresów oraz statystycznej analizy danych wykorzystano środowisko R (wersja 4.3.1). Do wizualizacji danych otrzymanych z NGS użyto pakietu Maftools (wersja 2.18.0) [210].

TMB zostało obliczone jako liczba wykrytych wariantów (bez CNV) na rozmiar genomu określonego przez producenta panelu genetycznego tj. 1,7 Mb. Analizy funkcjonalnej deregulowanych genów dokonano na podstawie danych dostępnych z dwóch różnych prac [211,212] z wykorzystaniem wspomnianego pakietu Maftools.

Czas OS obliczono jako okres od daty diagnozy ChS do daty zgonu (niezależnie od przyczyny) lub do daty ostatniej obserwacji. Czas przeżycia wolnego od choroby (DFS, ang. *disease-free survival*) został obliczony jako okres od daty zakończenia leczenia (radykalnej resekcji chirurgicznej) do daty nawrotu, rozsiania, zgonu lub daty ostatniej obserwacji. Medianę czasu OS i DFS oszacowano przy użyciu metody Kaplana-Meiera. Różnice w OS pomiędzy wybranymi czynnikami na krzywych Kaplana-Meiera określono z wykorzystaniem testu log-rank. Jednoczynnikową i wieloczynnikową analizę zależności pomiędzy czynnikami klinicznymi, genetycznymi lub immunologicznymi a przeżyciem pacjentów (OS lub DFS) przeprowadzono z wykorzystaniem regresji Coxa. Wieloparametrycznej oceny wpływu czynników genetycznych, klinicznych i immunologicznych na OS dokonano poprzez selekcję zmiennych o najbardziej znaczącym udziale z wykorzystaniem modelu Coxa penalizowanego LASSO (ang. *Least Absolute Shrinkage and Selection Operator*) z 10-krotną walidacją krzyżową. Optymalną wartość λ

wybrano jako mieszczącą się w granicach 1 odchylenia standardowego minimalnego błędu walidacji krzyżowej. Wartości $p < 0,05$ uznano za istotne statystycznie.

Do porównań wartości TMB pomiędzy poszczególnymi podtypami histologicznymi ChS czy klastrami immunologicznymi wykorzystano test Kruskala-Wallisa. Wartości $p < 0,05$ uznano za istotne statystycznie.

Do porównania zmiennych kategorycznych (tj. obecność mutacji, klastra immunologicznego, podtypu histologicznego ChS, TLS lub pozytywnej ekspresji PD-L1) zastosowano dokładny test Fishera z poprawką Benjamini-Hochberga na wielokrotne testowanie (tam gdzie było to wymagane). Wartości FDR $< 0,05$ uznano za istotne statystycznie.

Różnice w ilości nacieków komórek immunologicznych w centralnej i obwodowej części guza określono przy wykorzystaniu testu Wilcoxa dla par obserwacji z poprawką Benjamini-Hochberg'a na wielokrotne testowanie. Korelację pomiędzy poszczególnymi markerami w różnych regionach guza oraz pomiędzy różnymi markerami immunologicznymi określono z wykorzystaniem korelacji rang Spearmana z poprawką Benjamini-Hochberga na wielokrotne testowanie. W przypadku obu testów wartości FDR $< 0,05$ uznano za istotne statystycznie.

Do wytypowania poszczególnych klastrow immunologicznych zastosowano klastrowanie hierarchiczne w oparciu o metodę Warda D2 oraz odległość euklidesową. Liczba klastrow została określona przy użyciu 30 indeksów zaimplementowanych w pakiecie NbClust (wersja 3.0.1) [213]. Oceny udziału poszczególnych markerów w poszczególnych klastrach dokonano z wykorzystaniem analizy głównych składowych (PCA, ang. *principal components analysis*).

Różnice w ekspresji genów pomiędzy poszczególnymi podtypami ChS oceniono przy pomocy wspomnianego wcześniej oprogramowania komercyjnego (GeneGlobe Data Analysis Center). Do porównań pomiędzy podtypami histologicznymi wykorzystano test t Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga na wielokrotne testowanie. Wyniki powyżej $|\log_2(FC)| \geq 1$ oraz FDR $< 0,05$ uznano za istotne statystycznie. Do analizy wzbogacenia istotnych w analizie genów z wykorzystaniem GO (ang. *Gene Ontology*) użyto pakiet clusterProfiler (wersja 4.10.0). Reprezentatywność podgrupy pacjentów u których oceniano ekspresję genów w qPCR potwierdzono dodatkowo przy użyciu testu χ^2 .

4. Wyniki

4.1. Charakterystyka pacjentów wytypowanych do analiz immunologiczno-molekularnych

Prezentowane w pracy analizy oparto o dane dotyczące 99 pacjentów z pełnymi wynikami z NGS i oceny IHC. Ze względu na brak różnic w wynikach uzyskanych z oceny MSI pomiędzy pacjentami (opisane w podrozdziale 4.2.2) nie włączano ich do analizy wieloczynnikowej, aby nie zawęzić ostatecznej grupy badanej. Pomimo obecności pełnych danych, z analizy wykluczono 1 pacjenta z MCS ze względu na zbyt małą liczebność grupy.

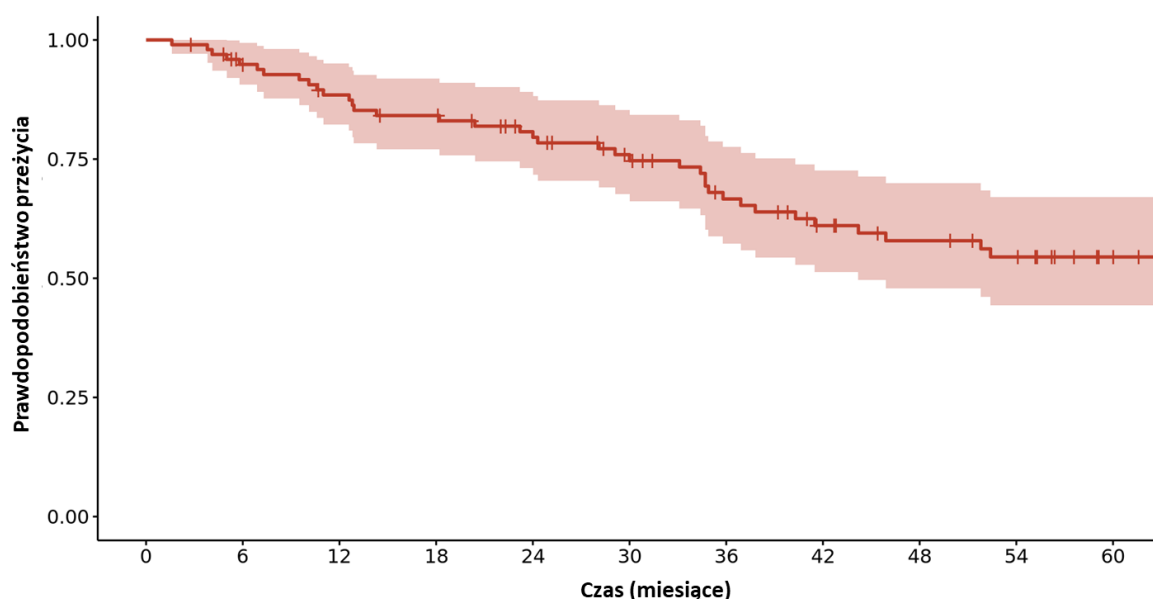
W analizowanej grupie pacjentów średnia wieku wynosiła 53 lata i występowała niewielka przewaga liczebna mężczyzn w stosunku do kobiet (1,36:1). Do badania włączono 28 pacjentów z rozpoznaniem ChS G1, 37 z G2, 24 z G3 oraz 10 z rozpoznaniem DDCS. Najczęstszą lokalizacją guza pierwotnego ChS była kończyna górna (36,4% pacjentów). Średnia wielkość guza wynosiła około 12 cm. 90 pacjentów miało przeprowadzoną resekcję po pobranej wcześniej biopsji. Resekcja radykalna dotyczyła 79 z 90 pacjentów. Wznowę miejscową lub przerzuty odległe zaobserwowano u prawie 1/3 pacjentów (28 przypadków). Pełną charakterystykę pacjentów przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Charakterystyka pacjentów włączonych do analizy.

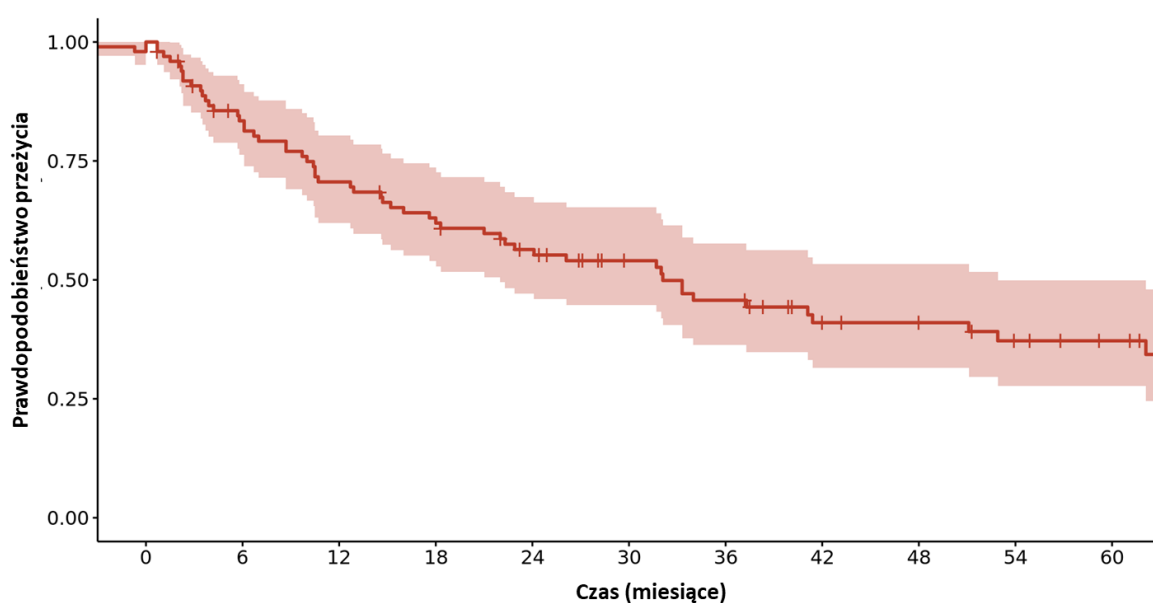
Typ cechy	Cecha	Wartość
Grupa badana - liczba	-	99
Płeć - liczba; %	Kobieta	42; 42,4
	Mężczyzna	57; 57,6
Wiek w momencie diagnozy - średnia (odch. stand.) [lata]	-	53,00 (17,13)
Wielkość guza – średnia (odch. stand.) [mm]	-	122,64 (65,83)
Podtyp - liczba; %	Odróżnicowany	10; 10,1
	G1	28; 28,3
	G2	37; 37,4
	G3	24; 24,2
Lokalizacja - liczba; %	Osiowa	35; 35,4
	Kończyna dolna	28; 28,3
	Kończyna górna	36; 36,4
Rodzaj zabiegu - liczba; %	Resekcja lokalna	64; 64,6
	Resekcja z implantacją protezy	17; 17,2
	Amputacja	18; 18,2
Margines chirurgiczny - liczba; %	R0	79; 79,8
	R1	11; 11,1
	R2	9; 9,1
Typ resekcji - liczba; %	Biopsja wycinająca	3; 3,0
	Resekcja po biopsji	90; 90,9
	łupu-cupu*	6; 6,1
Wznowa - liczba; %	Tak	28; 28,9
	Nie	69; 71,1
Przerzuty odległe - liczba; %	Tak	28; 28,9
	Nie	69; 71,1

* operacja bez wcześniejszej biopsji (ang. „whoops” operation).

W badanej grupie pacjentów mediana czasu OS wynosiła 64,6 (95% CI: 44,2 - NR) miesięcy (Rycina 17), z kolei mediana DFS - 32,1 (95% CI: 22 - 52,9) miesięcy (Rycina 18).



Rycina 17. Przeżycie całkowite 99 pacjentów z rozpoznaniem chrzęstniakomięsaka.



Rycina 18. Czas przeżycia wolnego od choroby 99 pacjentów z rozpoznaniem chrzęstniakomięsaka.

4.1.1. Ocena wpływu czynników klinicznych na przeżycie pacjentów

W celu wytypowania istotnych czynników klinicznych warunkujących długość przeżycia (OS, DFS) w badanej grupie pacjentów wybrano następujące czynniki: płeć, wielkość guza pierwotnego, wiek pacjenta w momencie rozpoznania, obecność złamania patologicznego w momencie rozpoznania, lokalizacja guza pierwotnego, margines

chirurgiczny oraz podtyp histologiczny ChS. Analiza jednoczynnikowa wykazała, że istotny statystycznie ($p < 0,05$) negatywny wpływ na przeżycie (zarówno na OS, jak i DFS) miały następujące czynniki: większy rozmiar guza oraz zwiększający się wiek pacjenta (analizowane jako zmienne ciągłe), wystąpienie złamania patologicznego, lokalizacja nowotworu na kończynach, a także wyższy stopień złośliwości histologicznej (Tabela 5).

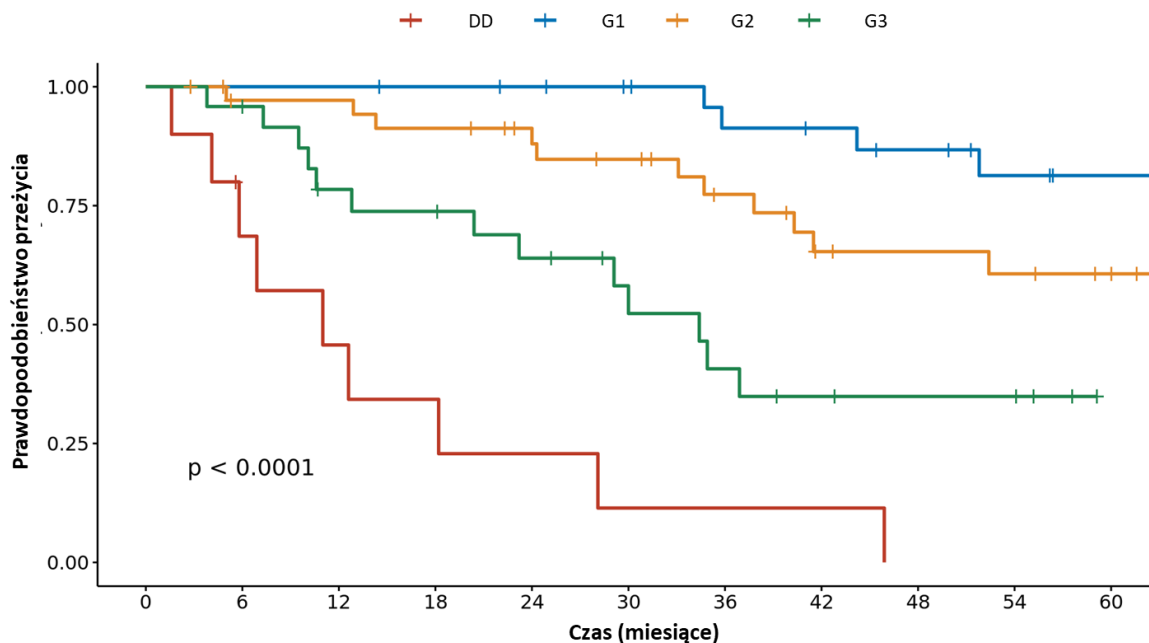
Do analizy wieloczynnikowej wybrano czynniki, które wykazały istotność w modelu jednoczynnikowym. Niezależnymi negatywnymi czynnikami prognostycznymi istotnie wpływającymi na OS i DFS był podtyp histologiczny oraz wielkość guza, a w przypadku DFS także lokalizacja nowotworu w obrębie kończyny dolnej. Wiek miał istotne znaczenie jedynie w przypadku OS. Obecność złamania patologicznego oraz margines chirurgiczny nie były istotne statystycznie (Tabela 5).

Tabela 5. Analiza jedno- i wieloczynnikowa wpływu wybranych czynników klinicznych na przeżycia pacjentów.

			OS		DFS	
	Cecha	Liczba	HR (95% CI; p- wartość) - analiza jednoczynni- kowa	HR (95% CI; p- wartość) - analiza wieloczynni- kowa	HR (95% CI; p- wartość) - analiza jednoczynni- kowa	HR (95% CI; p- wartość) - analiza wieloczynni- kowa
Płeć	Kobieta	42	-	-	-	-
	Mężczyzna	57	1,24 (0,66-2,35; p=0,504)	-	1,16 (0,68-1,98; p=0,594)	-
Wiek (wartość ciągła zmiany)	-	-	1,04 (1,02-1,05; p <0,001)	1,02 (1,00-1,05; p=0,037)	1,03 (1,01-1,04; p <0,001)	1,02 (1,00-1,04; p=0,056)
Wielkość guza (wartość ciągła zmiany)	-	-	1,01 (1,01-1,01; p <0,001)	1,01 (1,00-1,01; p=0,001)	1,01 (1,00-1,01; p <0,001)	1,01 (1,00-1,01; p=0,007)
Złamanie patologiczne	Nie	90	-	-	-	-
	Tak	9	2,59 (1,19-5,62; p=0,016)	1,51 (0,66-3,46; p=0,328)	2,28 (1,08-4,83; p=0,032)	2,14 (0,92-4,95; p=0,077)
Lokalizacja	Osiowa	35	-	-	-	-
	Kończyna dolna	28	4,56 (1,87- 11,13; p=0,001)	2,48 (0,89-6,87; p=0,081)	2,72 (1,38-5,38; p=0,004)	2,27 (1,06-4,89; p=0,036)
	Kończyna górna	36	3,40 (1,41-8,16; p=0,006)	1,99 (0,76-5,26; p=0,164)	2,00 (1,04-3,84; p=0,038)	1,19 (0,54-2,62; p=0,666)
Podtyp histologiczny	Odróżnico- wany	10	-	-	-	-
	G1	28	0,04 (0,01-0,13; p <0,001)	0,16 (0,04-0,66; p=0,011)	0,03 (0,01-0,09; p <0,001)	0,08 (0,02-0,28; p <0,001)
	G2	37	0,10 (0,04-0,25; p <0,001)	0,27 (0,09-0,80; p=0,018)	0,09 (0,04-0,21; p <0,001)	0,19 (0,07-0,51; p=0,001)
	G3	24	0,28 (0,12-0,66; p=0,004)	0,59 (0,21-1,65; p=0,315)	0,22 (0,09-0,52; p=0,001)	0,43 (0,16-1,17; p=0,099)
Margines chirurgiczny	R0	79	-	-	-	-
	R1	11	1,08 (0,45-2,59; p=0,867)	-	0,99 (0,46-2,11; p=0,979)	-
	R2	9	0,76 (0,23-2,50; p=0,657)	-	0,77 (0,27-2,13; p=0,610)	-

Pogrubioną czcionką zaznaczono wyniki istotne statycznie (p <0,05). Skróty: DFS - czas przeżycia wolnego od choroby (ang. *disease-free survival*), HR - współczynnik ryzyka (ang. *hazard ratio*), CI - przedział ufności (ang. *confidence interval*), OS - przeżycie całkowite (ang. *overall survival*).

Pośród analizowanych czynników największe znaczenie miał podtyp histologiczny. Odsetek 3-letniego OS wynosił jedynie 11,4% u pacjentów z rozpoznaniem DDCS i 40,7% u pacjentów z rozpoznaniem ChS G3. Z kolei w przypadku ChS G2 i G1, było to odpowiednio 77,3% i 91,3% (Rycina 19).



Rycina 19. Przeżycie całkowite pacjentów w zależności od podtypu histologicznego ChS.

4.2. Ocena profilu genetycznego

4.2.1. Sekwencjonowanie metodą Sanger

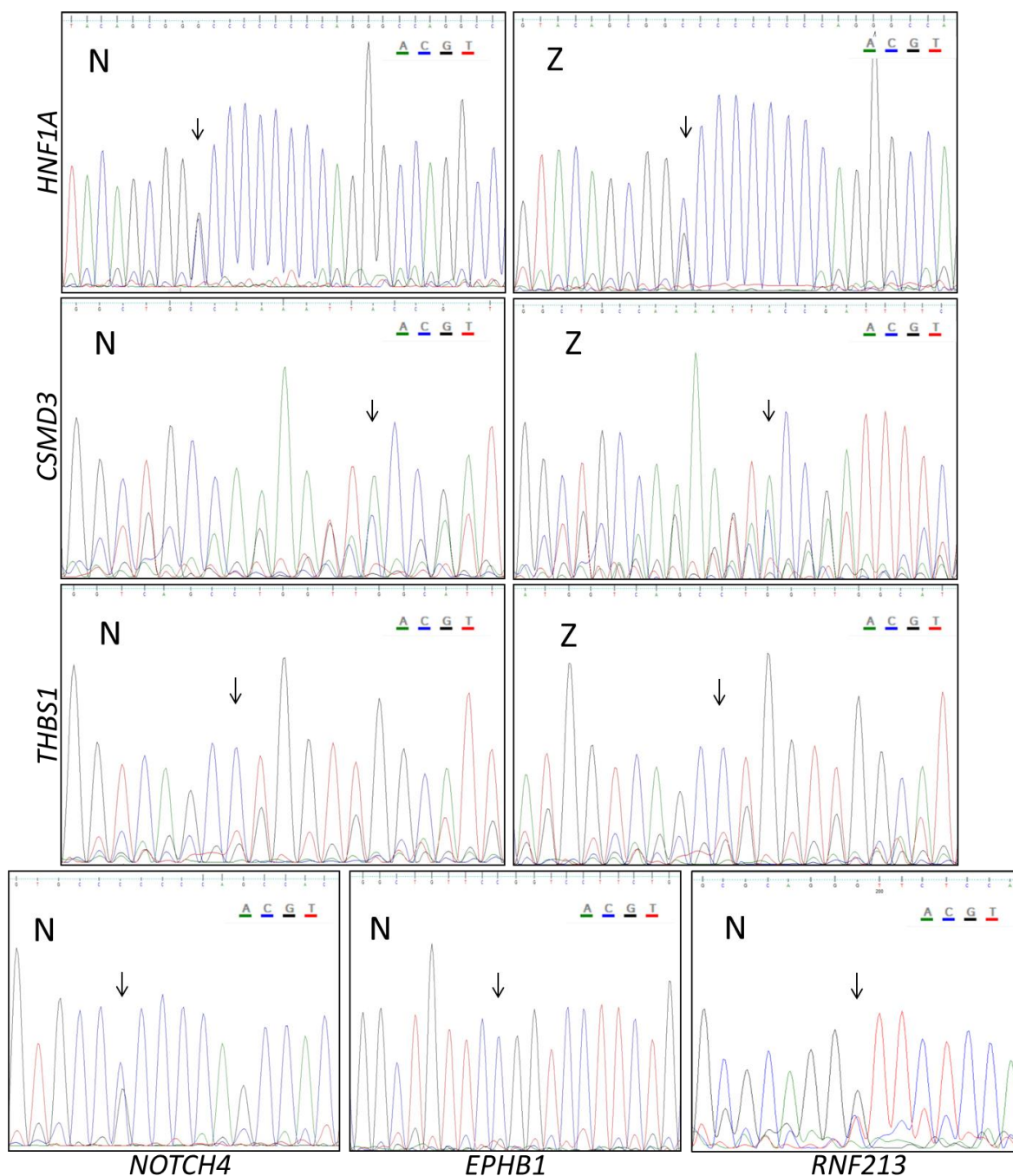
Sekwencjonowanie metodą Sanger w przypadku wszystkich 6 wybranych genów pozwoliło na wykrycie artefaktów sekwencjonowania oraz wytypowanie polimorfizmów populacyjnych, które zostały odrzucone z dalszej analizy wariantów potencjalnie patogennych.

W wyniku NGS u ponad 50% pacjentów zidentyfikowano patogenną mutację w genie *HNF1A*:c.864del (p.Pro291fsTer51), prowadzącą do zmiany ramki odczytu i sekwencji aminokwasowej z przedwczesną terminacją procesu translacji. Tę samą mutację wykryto także w połowie tkanek zdrowych. Przeprowadzone sekwencjonowanie metodą Sanger nie potwierdziło jednak wykrytego wariantu w żadnej, kwalifikującej się do analizy próbce. Zamiast tego zidentyfikowano mutację synonimiczną c.864G>C (p.Gly 288=), obecną zarówno w tkankach zdrowych, jak i nowotworowych, będącej polimorfizmem genu

w badanej populacji. Mutacje synonimiczną wykryto także dla wariantu genu *NOTCH4*:c.1044C>G (p.Gly348=), błędnie zidentyfikowanego w NGS jako wariant c.1044del (p.Gly349AlafsTer49).

W przypadku 2 genów zidentyfikowano inne niż w wyniku z NGS warianty genetyczne - *RNF213*:c.13945C>G (p.Leu4649Val), zamiast c.13945del (p.Leu4649Val) oraz *CSMD3*:c.4723T>G (p.Tyr1575Asp), zamiast c.4723T>C (p.Tyr1575His).

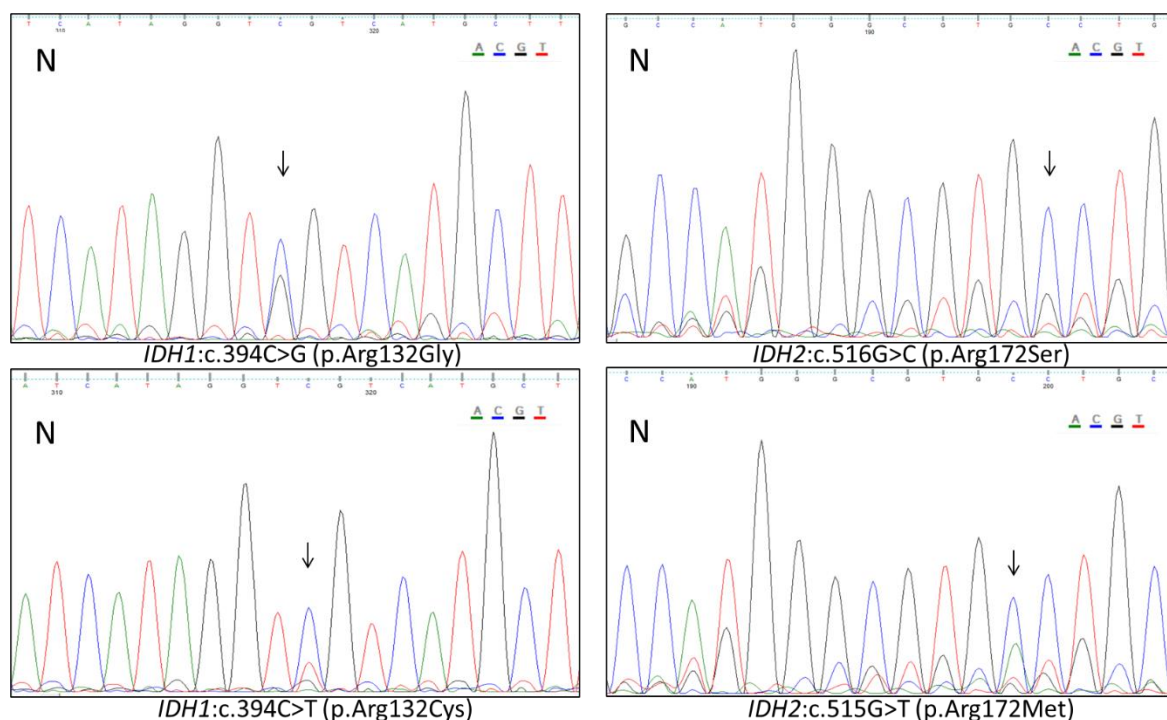
Dla 2 genów nie potwierdzono zidentyfikowanych w NGS wariantów, tj. *EPHB1*:c.2594G>A (p.Arg865Gln) oraz *THBS1*:c.2646G>T (p.Gln882His). W przypadku genu *THBS1* wykryto artefakt w postaci słabego sygnału fluorescencyjnego w miejscu wariantu c.2646G>T widocznego w obu tkankach. Wyniki wybranych próbek reprezentujące wykryte warianty przedstawiono na Rycinie 20.



Rycina 20. Fluorogramy przedstawiające sekwencje wybranych do walidacji genów - *HNF1A*, *CSMD3*, *THBS1*, *NOTCH4*, *EPHB1* oraz *RNF213*.

Strzałkami zaznaczono lokalizację badanej zmiany genetycznej. Skróty: N – tkanka nowotworowa, Z – tkanka zdrowa. Fluorogramy przedstawiają zmianę nukleotydów na nici niekodującej (poza genem *HNF1A*).

W sekwencjonowaniu metodą Sanger'a potwierdzono występowanie wariantów *IDH1*:c.394C>T/G (p.Arg132Cys/Gly) oraz *IDH2*:c.516G>C (p.Arg172Ser) i *IDH2*:c.515G>T (p.Arg172Met) dla wszystkich kwalifikujących się do analizy próbek. Przykładowe wyniki przedstawiono na Rycinie 21.

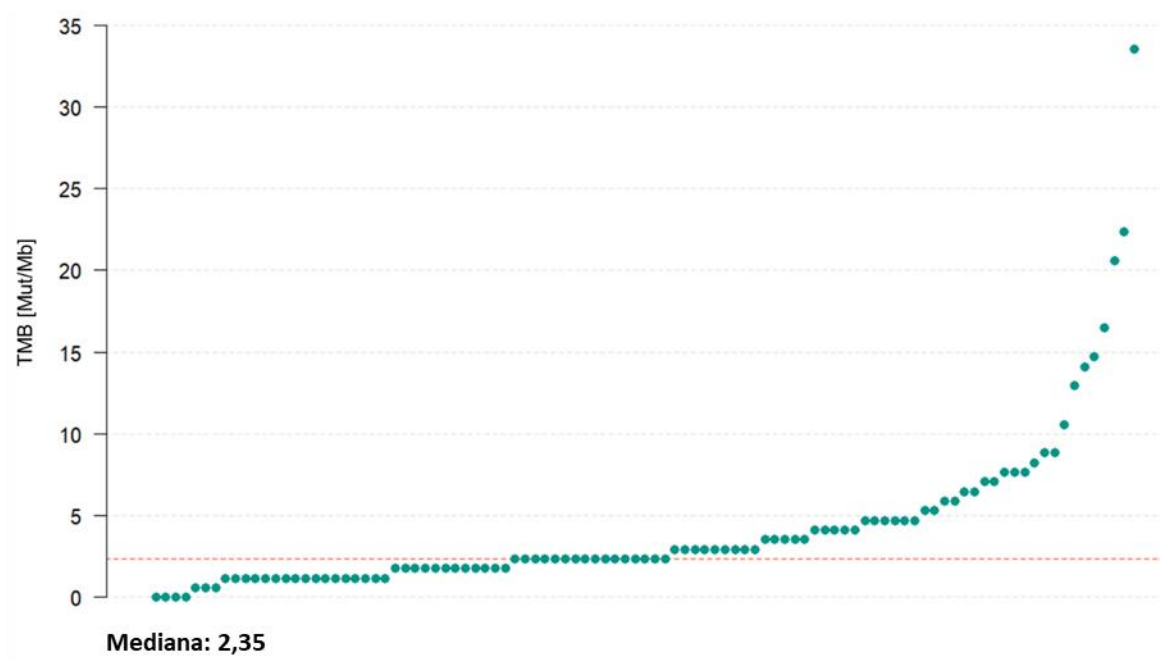


Rycina 21. Fluorogramy przedstawiające sekwencje potwierdzonych wariantów genetycznych w genach *IDH1* oraz *IDH2*.

Skróty: N – tkanka nowotworowa. Fluorogramy dla genu *IDH2* przedstawiają zmianę nukleotydów na nici niekodującej.

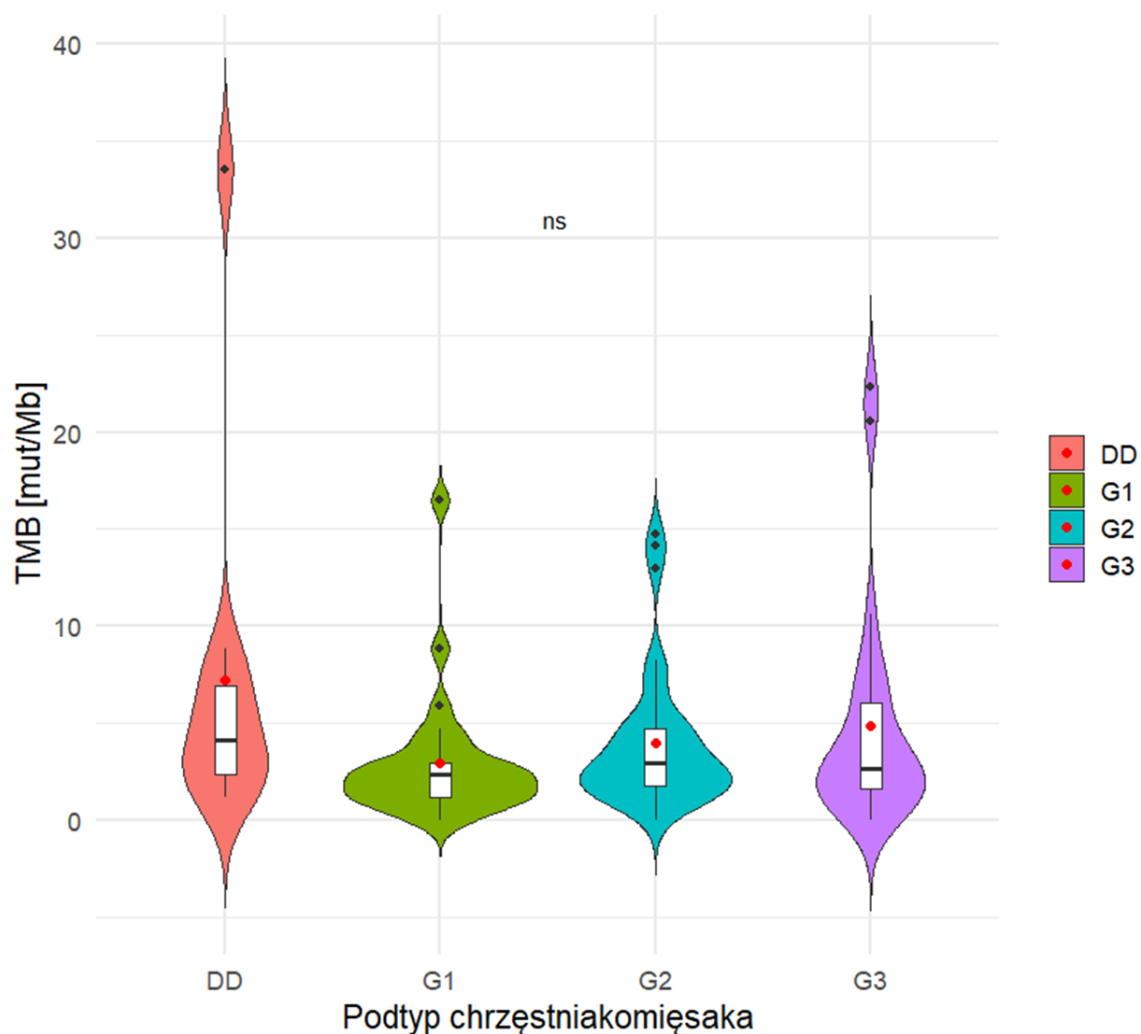
4.2.2. Ocena obciążenia mutacyjnego guza oraz niestabilności mikrosatelitarnej

W żadnej z analizowanych 108 próbek nie wykryto MSI. Średnia wartość TMB w badanej grupie pacjentów (99 zgodnie z opisem w podrozdziale 4.1) była niska i wynosiła 4,21 mut/Mb (w przedziale od 0 do 33,5 mut/Mb). Mediana TMB dla badanej grupy wyniosła 2,35 mut/Mb (Rycina 22).



Rycina 22. Wartości TMB dla poszczególnych pacjentów z rozpoznaniem chrzęstniakomięsaka wraz z medianą badanej populacji.

TMB było wyższe w ChS o wyższym stopniu złośliwości histologicznej, chociaż różnice te nie były istotne statystycznie (Rycina 23). Największe wartości zaobserwowano dla pojedynczych przypadków DDCS i ChS G3 (> 20 mut/Mb). Jednak u 92% pacjentów TMB wynosiło < 10 mut/MB. Mediany TMB dla poszczególnych podtypów wynosiły 2,35; 2,95; 2,65 oraz 4,12 mut/Mb odpowiednio dla ChS G1, G2, G3 oraz DDCS.

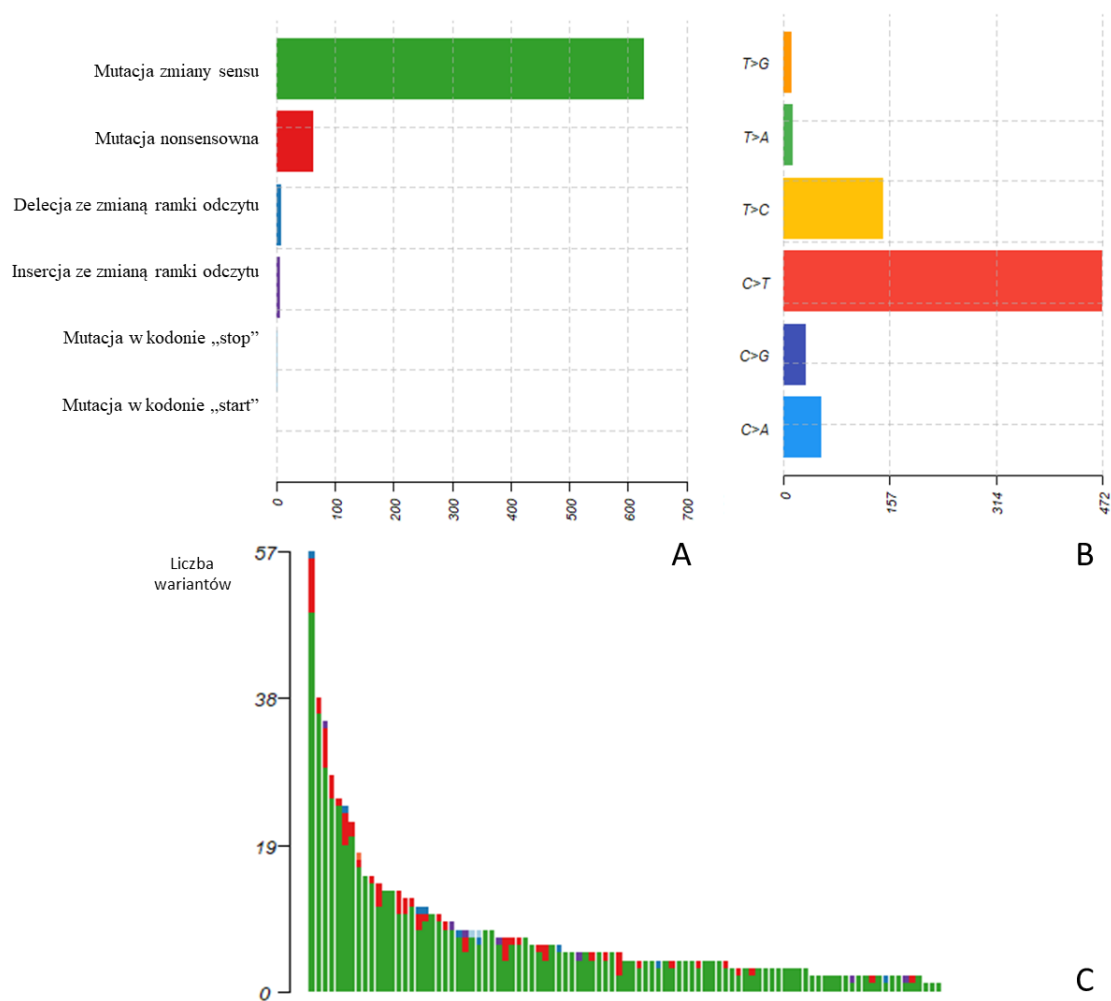


Rycina 23. Wykresy pudełkowe dla wartości TMB w zależności od podtypu histologicznego chrzęstniakomięsaka.

Skróty: TMB – obciążenie mutacyjne guza (ang. *tumor mutational burden*); ns - brak istotności statystycznej. Czerwoną kropką oznaczono średnią. Do porównań pomiędzy grupami wykorzystano test Kruskala-Wallisa.

4.2.3. Ocena profilu mutacyjnego

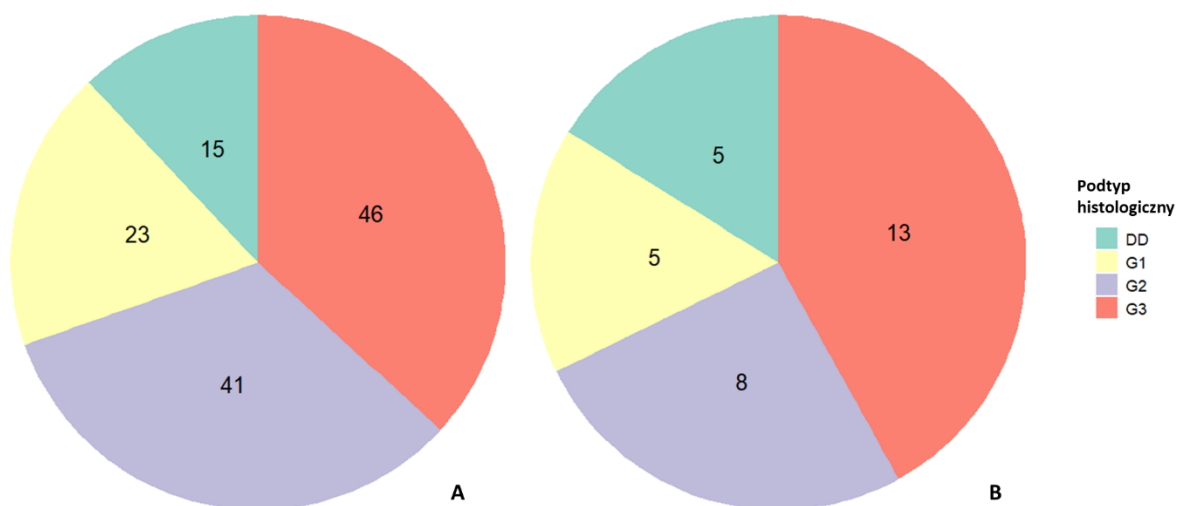
Wśród 99 przeanalizowanych próbek zidentyfikowano 709 potencjalnie patogennych i somatycznych wariantów, w których w przeważającej liczbie były warianty zmiany sensu, a w drugiej kolejności warianty nonsensowne (Rycina 24A). Dominującym typem podmian nukleotydowych w SNV były zamiany C>T oraz T<C (Rycina 24B). Średnia ilość wykrytych na próbkę wariantów wynosiła około 7 i wahała się od 0 do 57 (Rycina 24C).



Rycina 24. Podsumowanie wariantów wyrywanych u 99 pacjentów z rozpoznaniem chłoniaka.

A – typ wykrytego wariantu genetycznego wraz z liczebnością, B – rodzaj podmiiany nukleotydowej wraz z liczebnością, C – liczba wariantów w poszczególnych próbkach.

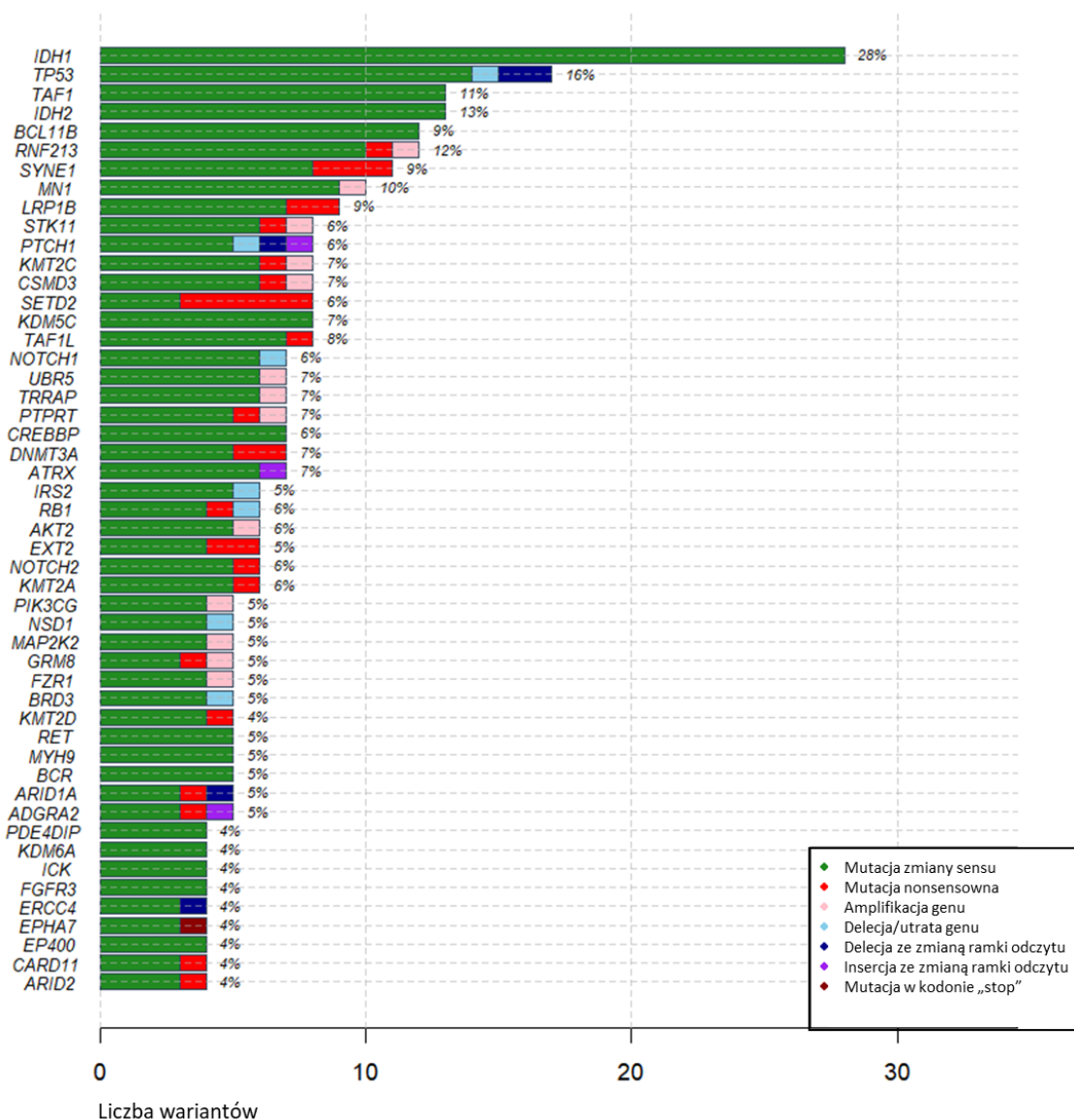
Dodatkowo poza SNV i indelami wykryto 156 przypadków CNV (125 amplifikacji i 31 delecji). CNV wykryto u 26 pacjentów (26,3%). Zarówno amplifikacje, jak i delecje były najczęściej obserwowane w podtypie G3 (Rycina 25). Dla 2 próbek nie zidentyfikowano żadnych potencjalnie istotnych wariantów (zarówno SNV czy CNV).



Rycina 25. Rozkład liczbowy zmienności liczby kopii w zależności od podtypu histologicznego chrzęstniakomięsaka.

A – amplifikacje genów, B – delecje/utraty genów. Skróty: DD – odróżnicowany chrzęstniakomięsaka.

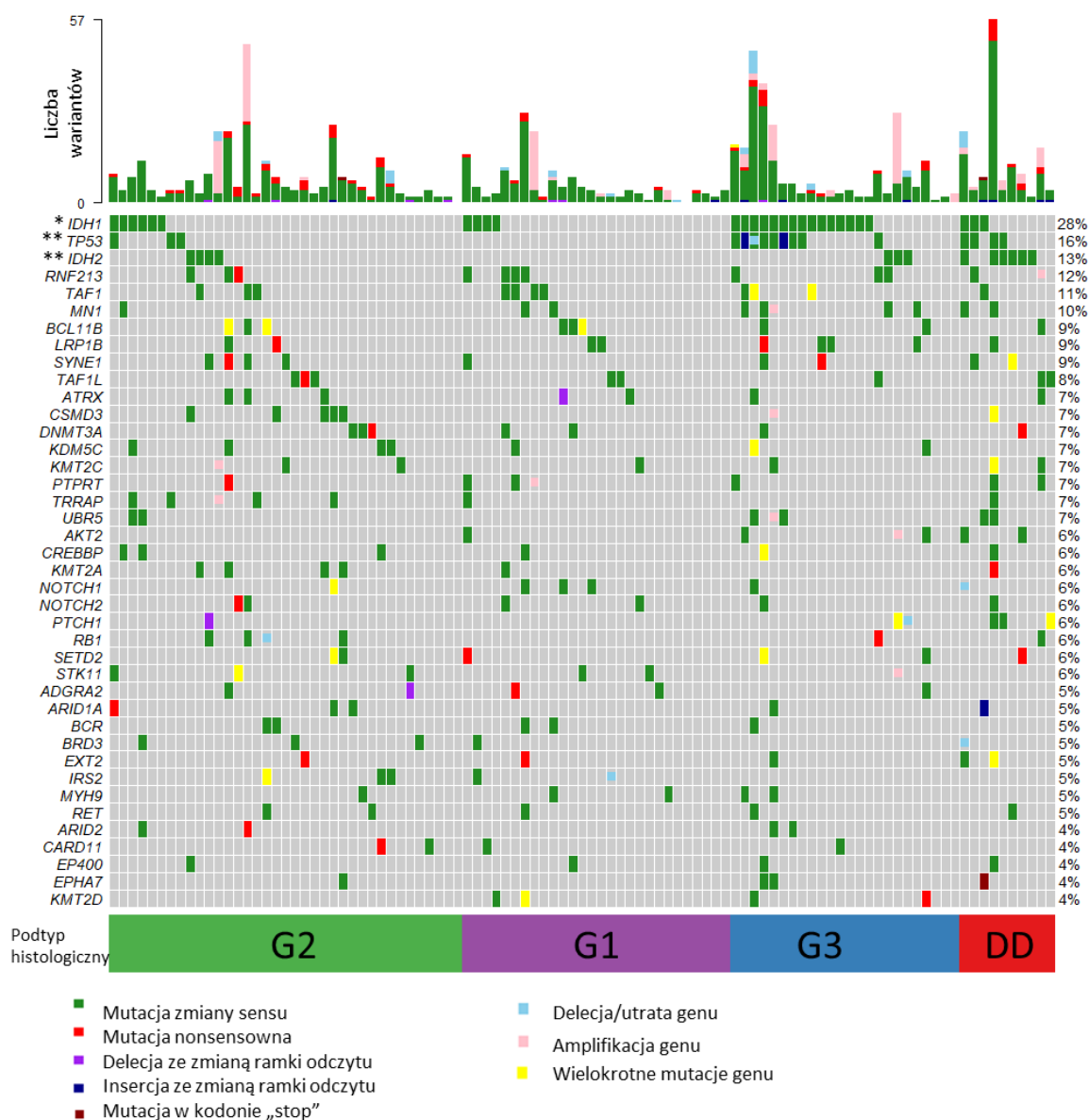
Najczęściej mutacje identyfikowano w genach *IDH1* (28% przypadków), *TP53* (16%), *IDH2* (13%), *RNF213* (12%), *TAF1* (11%) oraz *MN1* (10%). Najwięcej mutacji nonsensownych wykryto w genie *SETD2*, z kolei w genie *PTCH1* zaobserwowano najwięcej typów mutacji tj. zmiany sensu, indele, a także utraty genu (Rycina 26).



Rycina 26. Charakterystyka 50 najczęściej występujących mutacji w genach u 99 pacjentów z rozpoznaniem chrzestniakomięsaka.

W ramce oznaczono kolorystycznie typ wariantu genetycznego; z prawej strony słupków oznaczono częstości występowania poszczególnych mutacji w genach (%). Oś pionowa – geny, oś pozioma – liczba wariantów danego genu we wszystkich próbkach.

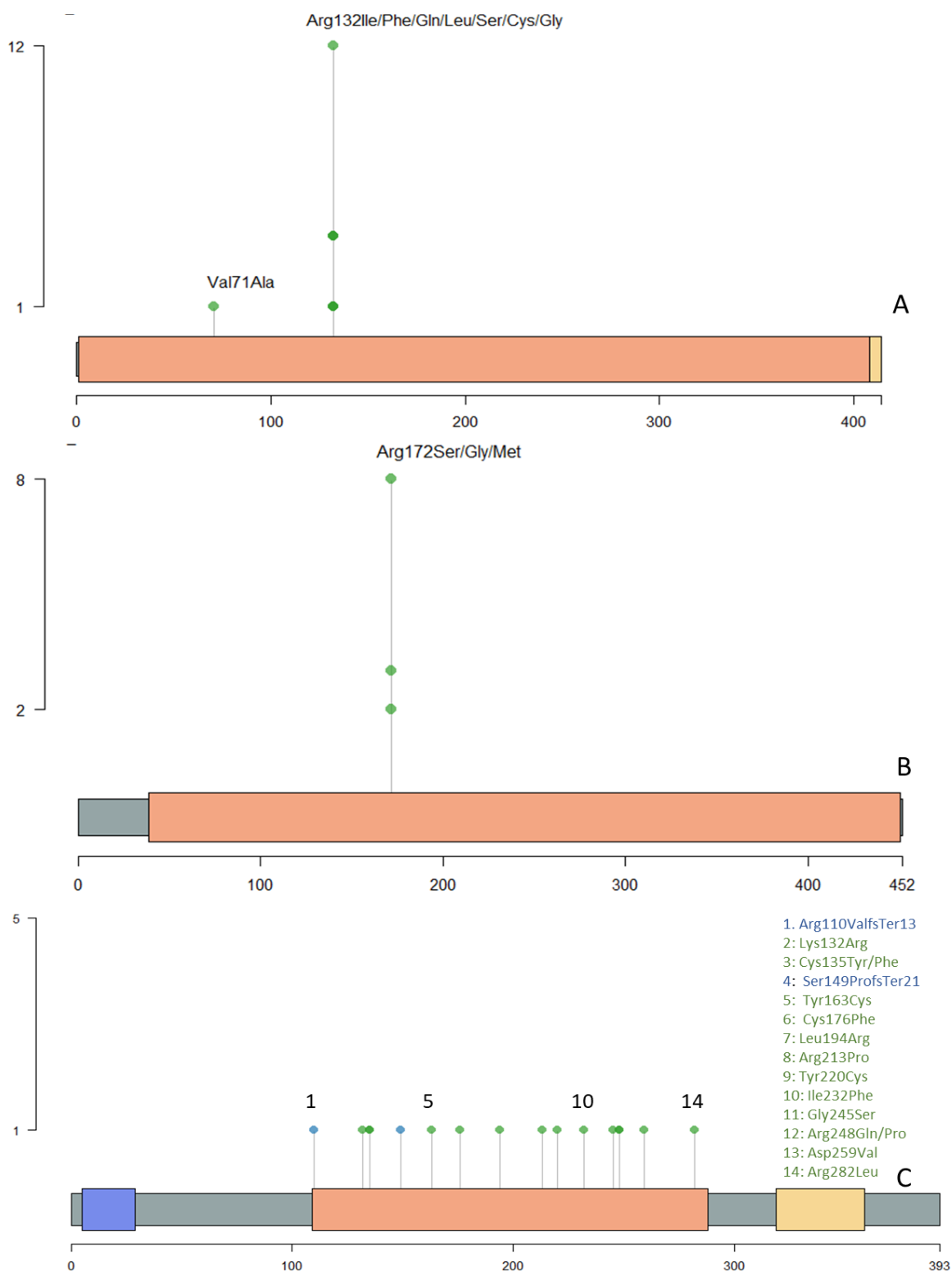
Tylko w przypadku mutacji w genach *IDH1* (FDR <0,05), *IDH2* (FDR <0,01) lub *TP53* (FDR <0,01) wykazano istotne różnice pomiędzy podtypami histologicznymi ChS (Rycina 27 oraz Tabela Z4, Załącznik 5). Mutacje w genie *IDH1* były obserwowane częściej w podtypach ChS o wyższym stopniu złośliwości histologicznej tj. G2/G3. Z kolei w ChS G1 nie wykryto mutacji w genach *IDH2* lub *TP53*, w porównaniu do podtypów G2, G3, czy DDCS. Najwięcej mutacji w genach *IDH1* i *TP53* (w tym utratę genu *TP53*) zaobserwowano w podtypie G3. Mutacje w genie *IDH2* występowały natomiast najczęściej w DDCS (Rycina 27).



Rycina 27. Zestawienie 40 najczęstszych mutacji w genach występujących w poszczególnych podtypach histologicznych chrzęstniakomięsaka.

W rzędach przedstawiono geny, w kolumnach poszczególnych pacjentów. Legenda kolorystyczna poniżej wykresu przedstawia typ wariantu genetycznego. Z prawej strony wykresu przedstawiono częstość występowania poszczególnych mutacji w badanej populacji. Skróty: DD – odróżnicowany chrzęstniakomięsak. Mutacje istotnie różniące się pomiędzy podtypami histologicznymi oznaczono gwiazdkami: * FDR <0,05; ** FDR <0,01. Do porównań pomiędzy grupami wykorzystano dokładany test Fishera.

Wśród mutacji *IDH1* wykryto mutacje zmiany sensu w pozycji p.R132 (R132/L/C/S/F/G/Q, z przewagą R132/C) oraz mutację V71A. W przypadku genu *IDH2* wszystkie mutacje dotyczyły pozycji p.R172 (R172/G/S/M). Dla genu *TP53* wykryto wiele wariantów obejmujących 14 różnych lokalizacji w sekwencji aminokwasowej (Rycina 28).



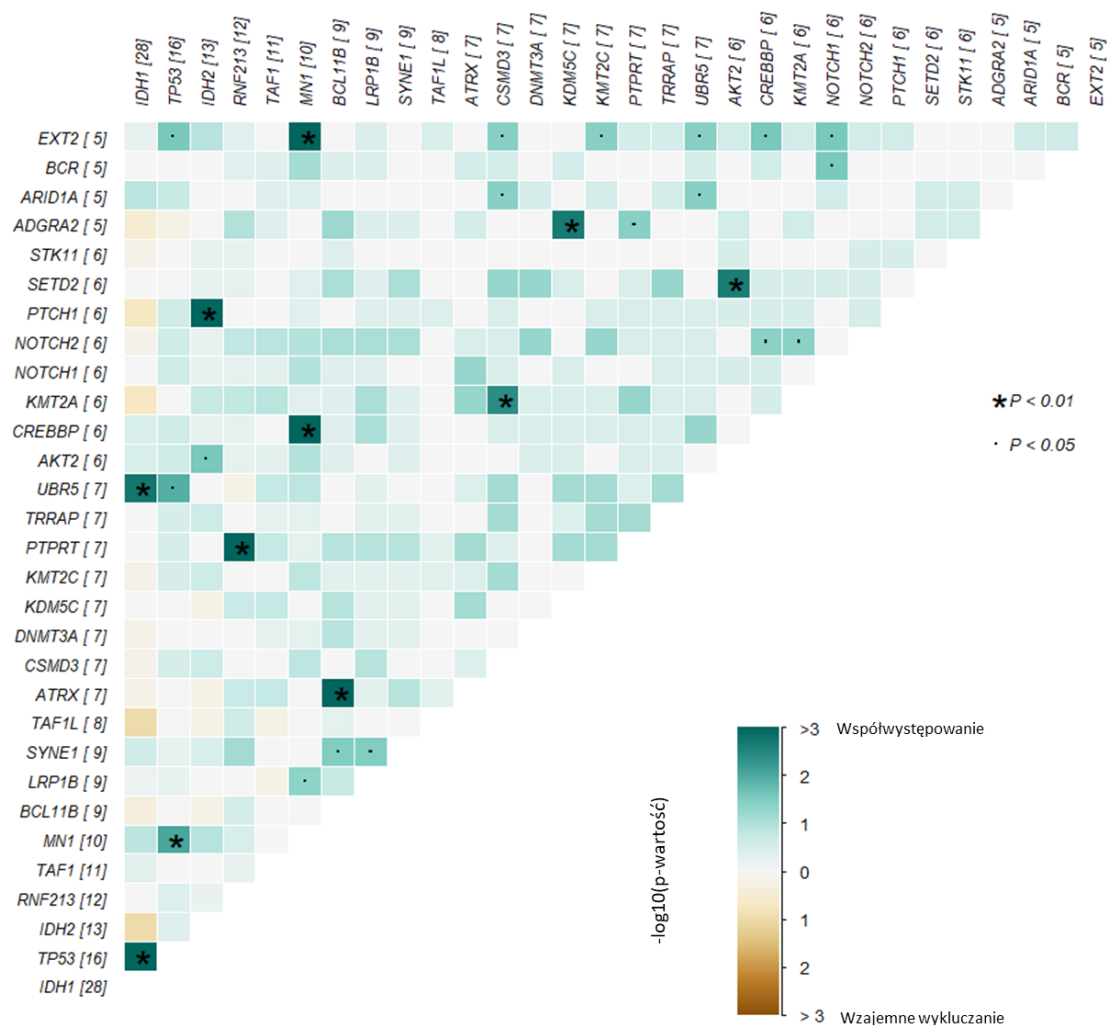
Rycina 28. Charakterystyka wariantów w wybranych genach wraz z ich lokalizacją.

A - *IDH1*, B - *IDH2*, C - *TP53*. Kolorem zielonym oznaczono mutacje zmiany sensu, a niebieskim delecje ze zmianą ramki odczytu i przedwczesnym kodonem „stop”. Na osi z lewej strony przedstawiono liczbę poszczególnych wariantów, a na dolnej osi pozycję aminokwasową.

Poza opisanymi wcześniej mutacjami w istotnych genach, podtypy histologiczne ChS różniły się także w zakresie innych istotnych genów, choć nie były to różnice istotne statystycznie. Przykładowo w podtypie G1 nie wykryto mutacji w genach *RB1*, a także *PTCH1*, w przeciwieństwie do pozostałych podtypów histologicznych (Rycina 27). Wśród mutacji zidentyfikowanych jedynie w podtypie G3 były utraty genu *PTCH1* oraz amplifikacje genów *STK11*, *AKT2*, *CSMD3*, *UBR5* i *MN1*. Z kolei w ChS G2 zidentyfikowano utratę genu *RB1* oraz amplifikacje *KMT2C* i *TRRAP*, a w DDCS utraty genów *NOTCH1* czy *BRD3* (Rycina 27).

4.2.3.1. Korelacja najczęściej deregulowanych genów

Pośród 30 najczęściej deregulowanych genów istotne statystycznie było jedynie zjawisko współwystępowania dwóch genów, które występowało w większości przypadków. Wzajemne wykluczanie się mutacji w genach obserwowano w widocznym stopniu jedynie w przypadku genów *IDH1* i *TAF1L*, *IDH2*, *KMT2A* lub *PTCH1*, jednak nie było istotne statystycznie (Rycina 29).



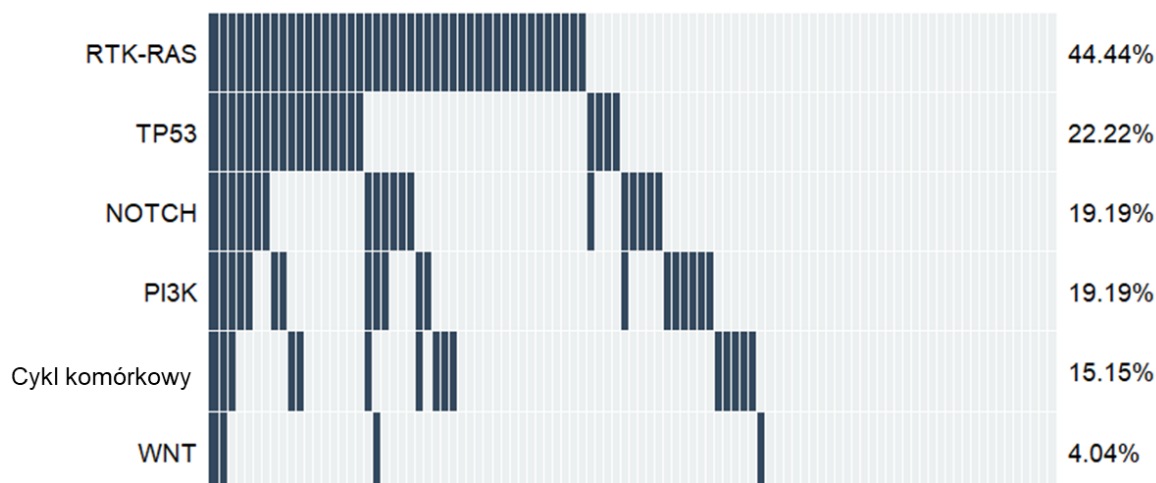
Rycina 29. Macierz korelacji 30 najczęściej występujących mutacji w genach w badanej grupie chrzestniakomięsaków.

Do porównań pomiędzy grupami wykorzystano dokładany test Fishera.

Istotne współwystępowanie mutacji zaobserwowano m.in. w genach *IDH1* i *TP53* oraz *IDH1* i *UBR5* ($p < 0,01$), a także w genach *TP53* i *MN1* ($p < 0,01$) oraz *TP53* i *UBR5* lub *EXT2* ($p < 0,05$). Ponadto występowanie mutacji w genie *MN1* korelowało dodatnio z występowaniem mutacji genów *EXT2* lub *CREBBP* ($p < 0,01$) oraz w genie *LRP1B* ($p < 0,05$). Z kolei mutacje w genie *EXT2* korelowały także dodatnio z mutacjami w genach *CSMD3*, *KMT2C*, *UBR5*, *CREBBP* lub *NOTCH1* ($p < 0,05$). Inne mutacje współwystępujące ze sobą dotyczyły genów *PTPRT* i *RNF213* oraz *AKT2* i *SETD2* ($p < 0,01$), a także *IDH2* i *PTCH1*, *KDM5C* i *ADGRA2* oraz *KMT2A* i *CSMD3* ($p < 0,01$) (Rycina 29).

4.2.3.2. Ocena deregulowanych szlaków molekularnych

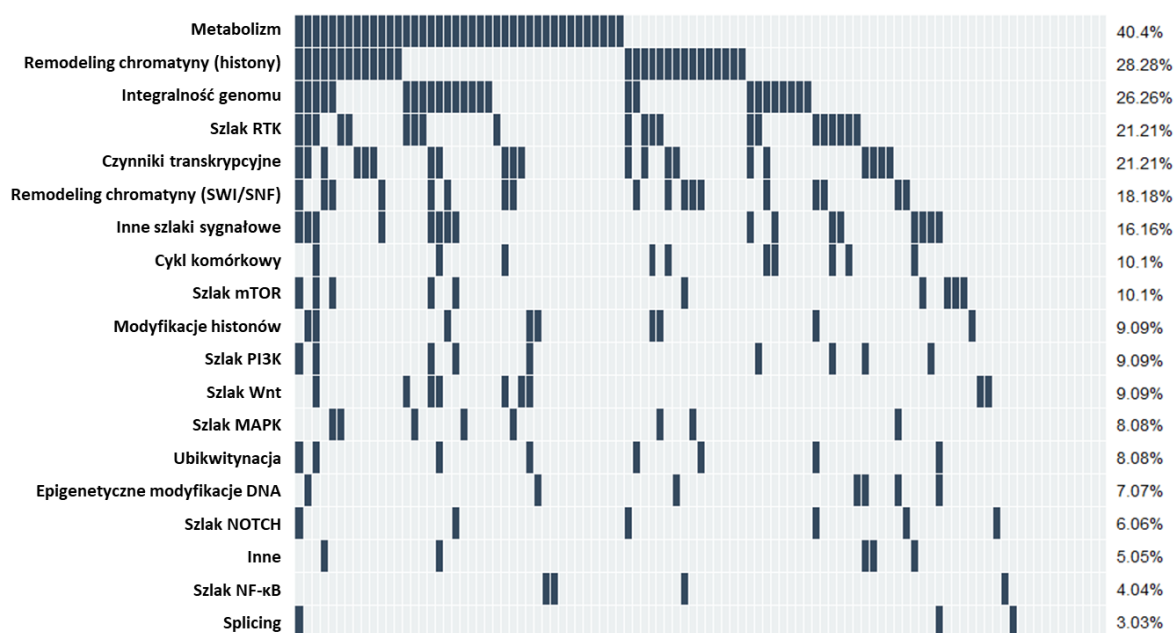
Najczęściej deregulowanymi szlakami w oparciu o obie przeprowadzone analizy [211,212] były: szlak związany z receptorowymi kinazami tyrozynowymi (RTK, ang. *receptor tyrosine kinase*) m.in. RTK-RAS (21-44% przypadków), szlak sygnałowy z udziałem białka p53 (22-26% przypadków), szlak PI3K (9-19%) oraz NOTCH (6-19%) (Ryciny 30, 31).



Rycina 30. Charakterystyka deregulowanych ścieżek sygnałowych w grupie 99 pacjentów z rozpoznaniem chrzęstniakomięsaka wraz z częstością ich występowania.

Skróty: NOTCH – białko Notch (ang. *neurogenic locus notch homolog protein*), PI3K - kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (ang. *phosphoinositide 3-kinase*), RTK - receptorowa kinaza tyrozynowa (ang. *receptor tyrosine kinase*). Podział genów na funkcję oparto o system zaproponowany przez Sanchez-Vega i wsp. [211]. Na wykresie przedstawiono szlaki obejmujące mutacje w genach zidentyfikowane u co najmniej 3 pacjentów.

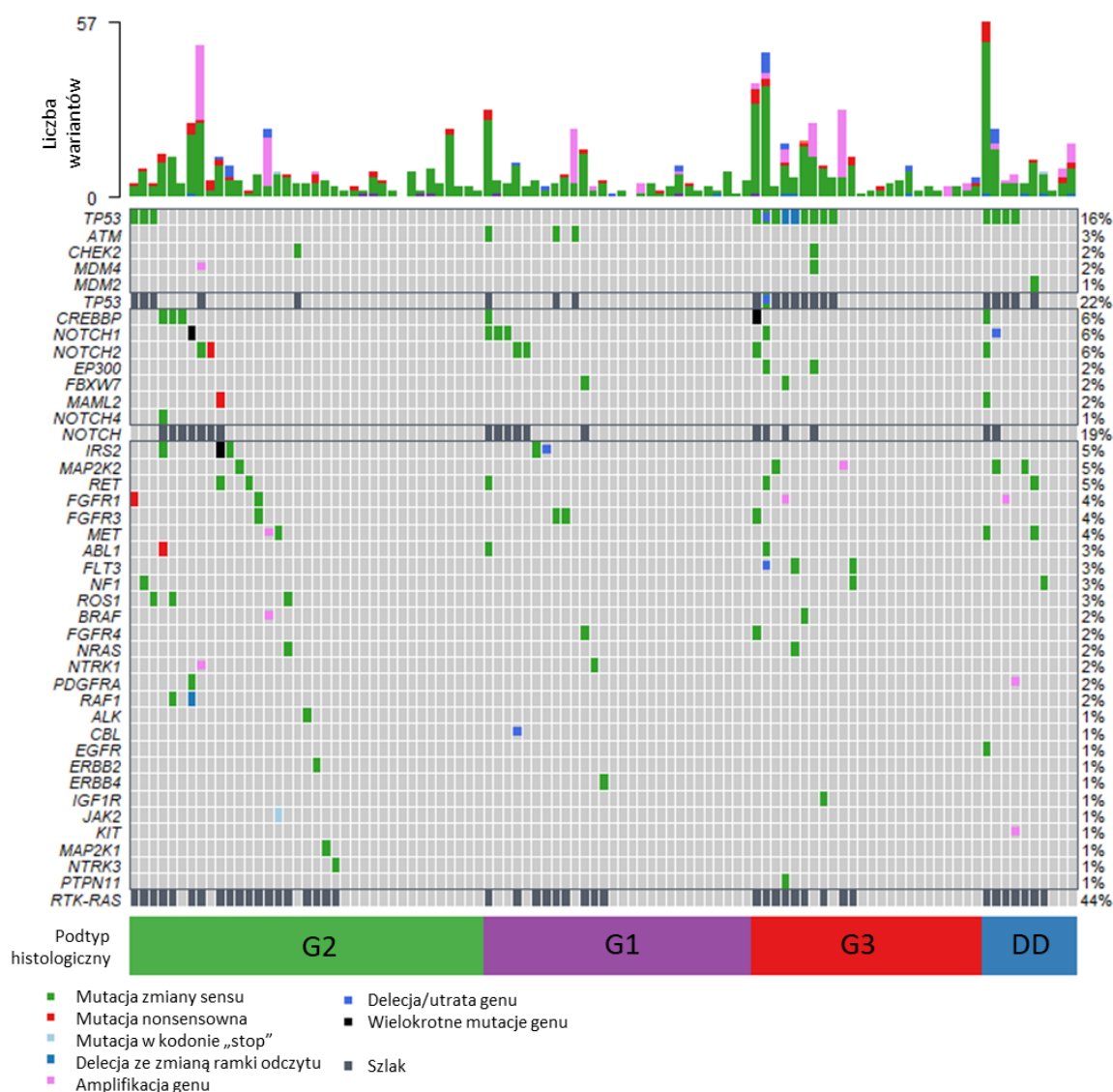
Poza wyżej wspomnianymi szlakami, częstym zjawiskiem były deregulacje w metabolizmie komórkowym (40% przypadków), a także zaburzenia szlaków związanych z procesami epigenetycznymi tj. modyfikacjami chromatyny przez białka histonowe, czy poprzez kompleks SWI/SNF (ang. *SWItch/Sucrose Non-Fermentable*) (odpowiednio 28% i 18% przypadków) oraz zmiany w genach kodujących czynniki transkrypcyjne (21% przypadków) (Rycina 31).



Rycina 31. Charakterystyka deregulowanych ścieżek sygnałowych w grupie 99 pacjentów z rozpoznaniem chrzestniakomięsa wraz z częstością ich występowania.

Skróty: MAPK - ang. *mitogen-activated protein kinase*, mTOR - ssaczy cel rapamycyny (ang. *mammalian target of rapamycin*), NF-κB – czynnik NF kappa B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), NOTCH – białko Notch (ang. *neurogenic locus notch homolog protein*), PI3K - kinaza 3-fosfatydylinozytolu (ang. *phosphoinositide 3-kinase*), RTK - receptorowa kinaza tyrozynowa (ang. *receptor tyrosine kinase*), SWI/SNF – kompleks remodelujący chromatynę (ang. *SWItch/Sucrose Non-Fermentable*). Podział genów na funkcję oparto o system zaproponowany przez Bailey'a i wsp. [212]. Na wykresie przedstawiono szlaki obejmujące mutacje w genach zidentyfikowane u co najmniej 3 pacjentów.

Deregulacja szlaków związanych z RTKs występowała licznie we wszystkich podtypach ChS, z niewielką przewagą w DDSCS i ChS G2. Chociaż w przypadku podtypów o wyższym stopniu złośliwości histologicznej częściej były one związane ze zmianami genetycznymi na poziomie chromosomalnym. Przykładowo delecje *FLT3* i amplifikacje genów *BRAF*, *MET*, *MAP2K2*, czy *FGFR1* nie były obserwowane w ChS G1, w przeciwieństwie do innych podtypów (Rycina 32). Ponadto amplifikacje *MYC* lub *KIT* były obserwowane odpowiednio w ChS G3 lub DDSCS, podczas gdy nie zaobserwowano ich w innych podtypach ChS (Rycina 33). Dodatkowo w DDSCS wykryto amplifikację genu *PGDFRA*, a w ChS G1 delecję *CBL* (Rycina 32).

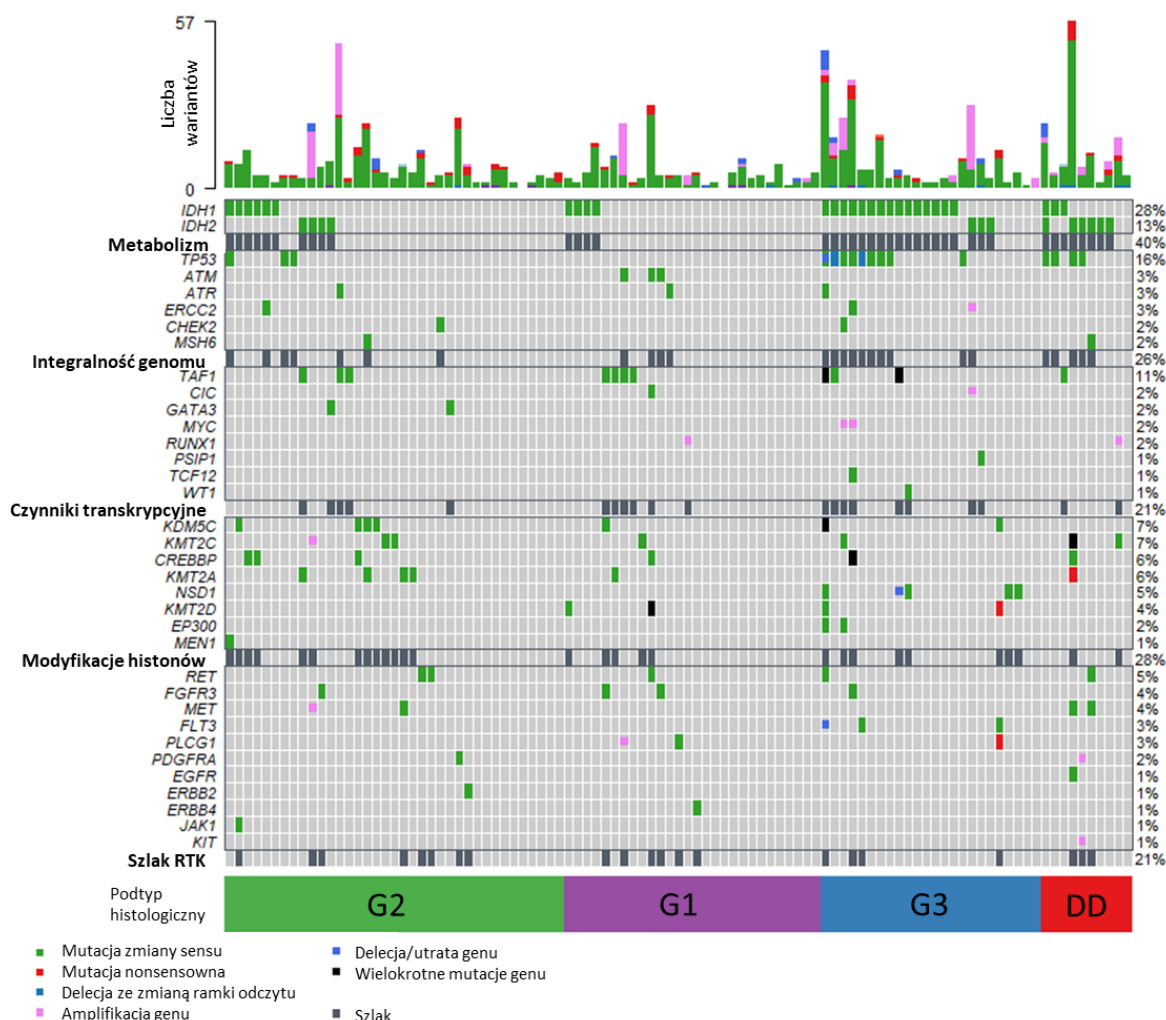


Rycina 32. Charakterystyka trzech najczęściej deregulowanych ścieżek sygnałowych i zaangażowanych w nie genów z podziałem na podtyp histologiczny chłoniaka.

Z prawej strony wykresu przedstawiono częstość występowania poszczególnych genów oraz szlaków molekularnych deregulowanych w badanej populacji. Skróty: DD - odróżnicowany chłoniak, NOTCH – białko Notch (ang. *neurogenic locus notch homolog protein*), RTK - receptorowa kinaza tyrozynowa (ang. *receptor tyrosine kinase*). Podział genów na funkcję oparto o system zaproponowany przez Sanchez-Vega i wsp. [211].

Poza wspomnianymi wcześniej genami zaangażowanymi w szlaki związane z RTKs, najczęstszymi zmianami były te związane z metabolizmem komórkowym. Dotyczyły one jedynie mutacji *IDH1/2*, w związku z czym występowały w przeważającej liczbie w podtypach G3, G2 czy DDCS. Z uwagi na znaczne nagromadzenie mutacji w genie *TP53* (typu SNV czy utrata genu) w ChS G3, deregulacje ścieżki związanej ze stabilnością/integralnością genomową występowały najczęściej w tym podtypie (Rycina 32, 33). Z kolei mutacje w genach obejmujących szlaki związane z procesami

epigenetycznymi tj. modyfikacją histonów najczęściej lokalizowały się w ChS G2 (Rycina 33). W ChS G2 zaobserwowano także mutacje w genach *JAK1/2*, przy czym jeden z wariantów obejmował kodon „STOP” (Rycina 32, 33). Deregulacje szlaku sygnałowego NOTCH były z kolei częstsze w podtypach G1 oraz G2 (Rycina 32).



Rycina 33. Charakterystyka pięciu najczęściej deregulowanych ścieżek sygnałowych i zaangażowanych w nie genów z podziałem na podtyp histologiczny chrzęstniakomięsaka.

Z prawej strony wykresu przedstawiono częstość występowania poszczególnych genów oraz szlaków molekularnych deregulowanych w badanej populacji. Skróty: DD - odróżnicowany chrzęstniakomięsak, RTK - receptorowa kinaza tyrozynowa (ang. *receptor tyrosine kinase*). Podział genów na funkcję oparto o system zaproponowany przez Bailey’a i wsp. [212].

Niektóre amplifikacje występowały zarówno w podtypach niższego i wyższego stopnia złośliwości histologicznej. Takim przykładem jest mutacja w genie *RUNX2*, który zidentyfikowano zarówno w ChS G1 jak i DDChS (Rycina 33).

4.2.4. Znaczenie kliniczne wykrytych zmian genetycznych

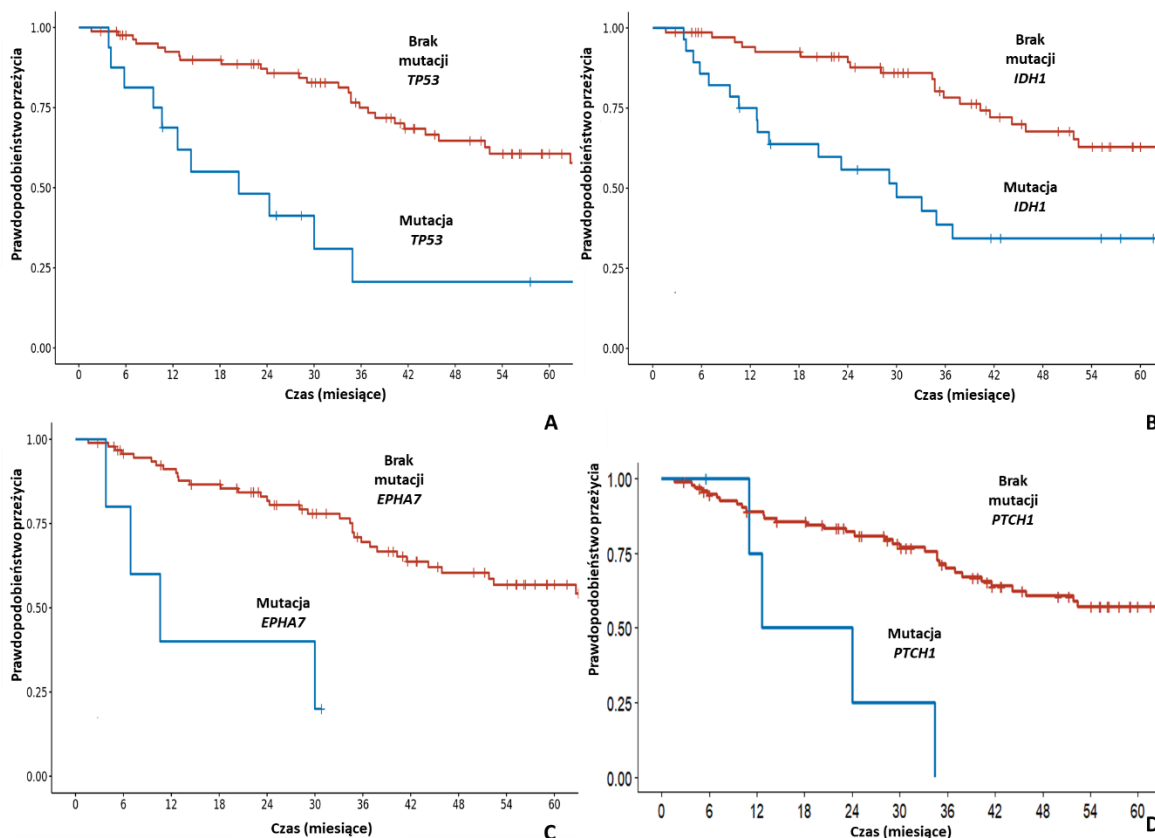
W jednoczynnikowej analizie Coxa istotny negatywny wpływ na OS pacjentów z rozpoznaniem ChS miały mutacje w 4 genach tj. *IDH1* i *TP53* (FDR <0,01) oraz *EPHA7* i *PTCH1* (FDR <0,05) (Tabela 6 oraz Tabela Z6, Załącznik 6).

Tabela 6. Wyniki modelu proporcjonalnego hazardu Coxa dla przeżycia całkowitego pacjentów z rozpoznaniem chrzęstniakomięsak z uwzględnieniem mutacji w wybranych genach.

Gen	HR	95% CI	p-wartość	FDR
<i>IDH1</i>	1,25	0,62 - 1,88	<0,001	0,004
<i>TP53</i>	1,35	0,64 - 2,07	<0,001	0,004
<i>EPHA7</i>	1,81	0,72 - 2,89	0,001	0,014
<i>PTCH1</i>	1,71	0,63 - 2,79	0,002	0,012

Skróty: FDR – wskaźnik fałszywych odkryć (ang. *false discovery rate*), HR – współczynnik ryzyka (ang. *hazard ratio*), CI – przedział ufności (ang. *confidence interval*).

Odsetek 5-letnich przeżyć dla pacjentów z mutacją *TP53* wynosił zaledwie 21%, podczas gdy u pacjentów bez tych mutacji odsetek OS wynosił 61%. W przypadku pacjentów z i bez mutacji *IDH1* 5-letnie OS wynosiło odpowiednio 34% i 63%. Z kolei pacjenci z mutacjami w genach *EPHA7* i *PTCH1* nie osiąkali 3-letnich OS, podczas gdy odsetki przeżyć 5-letnich u pacjentów bez tych zmian wynosiły 57% (Rycina 34).



Rycina 34. Przeżycia całkowite pacjentów z obecną mutacją lub jej brakiem w wybranych genach.

A - TP53, B - IDH1, C - EPHA7, D - PTCH1.

4.3. Ocena profilu immunologicznego

4.3.1. Rozkład markerów immunologicznych w obrębie guza

Zarówno w centralnym, jak i obwodowym regionie guza zaobserwowano największy udział (gęstość > 100 kom./mm²) APC HLA-DR+, monocytów CD14+, makrofagów M1 CD68+ i makrofagów M2 CD163+, a także komórek Gal-9+. Drugim co do częstości (> 50 kom./mm²) typem komórek obserwowanych w obu regionach guza były makrofagi M2 CD68+ oraz limfocyty TIM-3+. Średnia gęstość wszystkich wspomnianych wyżej komórek była większa w części obwodowej guza, chociaż różnice te nie były istotne statystycznie. Wyjątek stanowiły makrofagi M2, które nieznacznie przeważały w centralnym regionie guza, jednak ponownie nie wykazano w tym przypadku różnic istotnych statystycznie. Istotnie wyższa w części obwodowej była natomiast gęstość komórek CD45+. Istotne różnice zaobserwowano także dla limfocytów PD-1+, CD3+ oraz CD4+ lub komórek dendrytycznych CD141+, chociaż ich gęstość była ogółem niższa niż

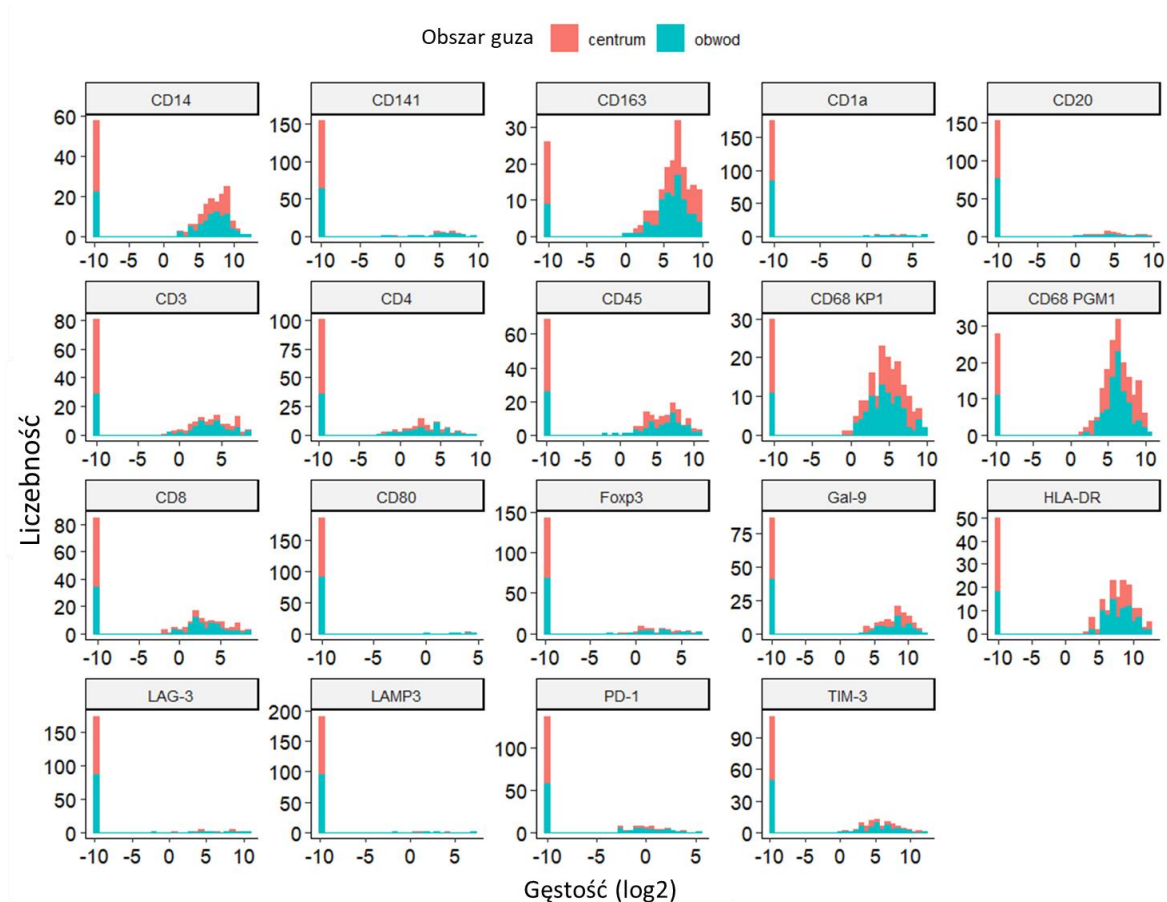
dla wszystkich powyższych markerów. W Tabeli 7 podsumowano statystyki 19 markerów ocenianych w oparciu o gęstość komórek.

Tabela 7. Charakterystyka markerów immunologicznych w obrębie centralnej i obwodowej części guza.

Marker	Typ oznaczanej komórki	Średnia gęstość (centrum)	Średnia gęstość (obwód)	Mediana (centrum)	Mediana (obwód)	p-wartość	FDR
CD14	monocyt	179,57	259,03	56,51	108,07	0,027	0,0733
CD141	komórka dendrytyczna	5,01	31,20	0,00	0,00	<0,0001	0,0002
CD163	makrofag M2	172,71	128,43	85,40	70,68	0,649	0,7987
CD1a	komórka dendrytyczna	0,95	3,50	0,00	0,00	0,0260	0,0733
CD20	limfocyt B	24,13	17,74	0,00	0,00	0,9586	0,9586
CD3	limfocyt T	23,21	24,70	0,00	5,33	0,0159	0,0603
CD4	pomocniczy limfocyt T	7,21	24,7	0,00	1,61	<0,0001	0,0008
CD45	leukocyty ogółem	94,60	148,70	9,54	34,03	0,0066	0,0313
CD68 KP1	makrofag M2	63,34	67,21	21,12	17,58	0,8564	0,9413
CD68 PGM1	makrofag M1	166,45	127,78	58,10	70,68	0,8918	0,9413
CD8	cytotoksyczny limfocyt T	20,25	19,06	0,00	3,09	0,3713	0,5609
CD80	APC	0,41	1,02	0,00	0,00	0,2300	0,4012
Foxp3	Tregs	3,30	5,77	0,00	0,00	0,0817	0,1941
Gal-9	TILs, APC komórka nowotworowa	297,28	313,01	16,69	50,57	0,5904	0,7987
HLA-DR	APC	447,97	517,22	112,07	133,53	0,1448	0,3057
LAG-3	TILs	23,65	36,90	0,00	0,00	0,3838	0,5609
LAMP3	komórka dendrytyczna	0,20	1,30	0,00	0,00	0,6726	0,7987
PD-1	TILs	0,40	1,27	0,00	0,00	0,0003	0,0016
TIM-3	TILs	86,50	92,51	0,00	0,00	0,2322	0,4012

Skróty: APC - komórka prezentująca antygen (ang. *antigen-presenting cells*), FDR – wskaźnik fałszywych odkryć (ang. *false discovery rate*), TILs - limfocyty naciekające guz (ang. *tumor infiltrating lymphocytes*), Tregs - limfocyty T regulatorowe (ang. *regulatory T cells*). Pogrubioną czcionką oznaczoną wyniki istotne statystycznie (FDR <0,05). Do porównań pomiędzy mediany gęstości poszczególnych markerów w centralnym i obwodowym regionie guza wykorzystano test Wilcozona dla par obserwacji.

Liczba limfocytów T (zarówno pomocniczych, jak i cytotoksycznych) była ogółem niższa w stosunku do monocytów i makrofagów, jednak wyższa w stosunku do limfocytów B czy Tregs. Udział komórek LAG-3+, LAMP3+, CD80+ oraz CD1a+ był niewielki w TME (Rycina 35).



Rycina 35. Rozkład poszczególnych markerów immunologicznych w centralnej i obwodowej części guza.

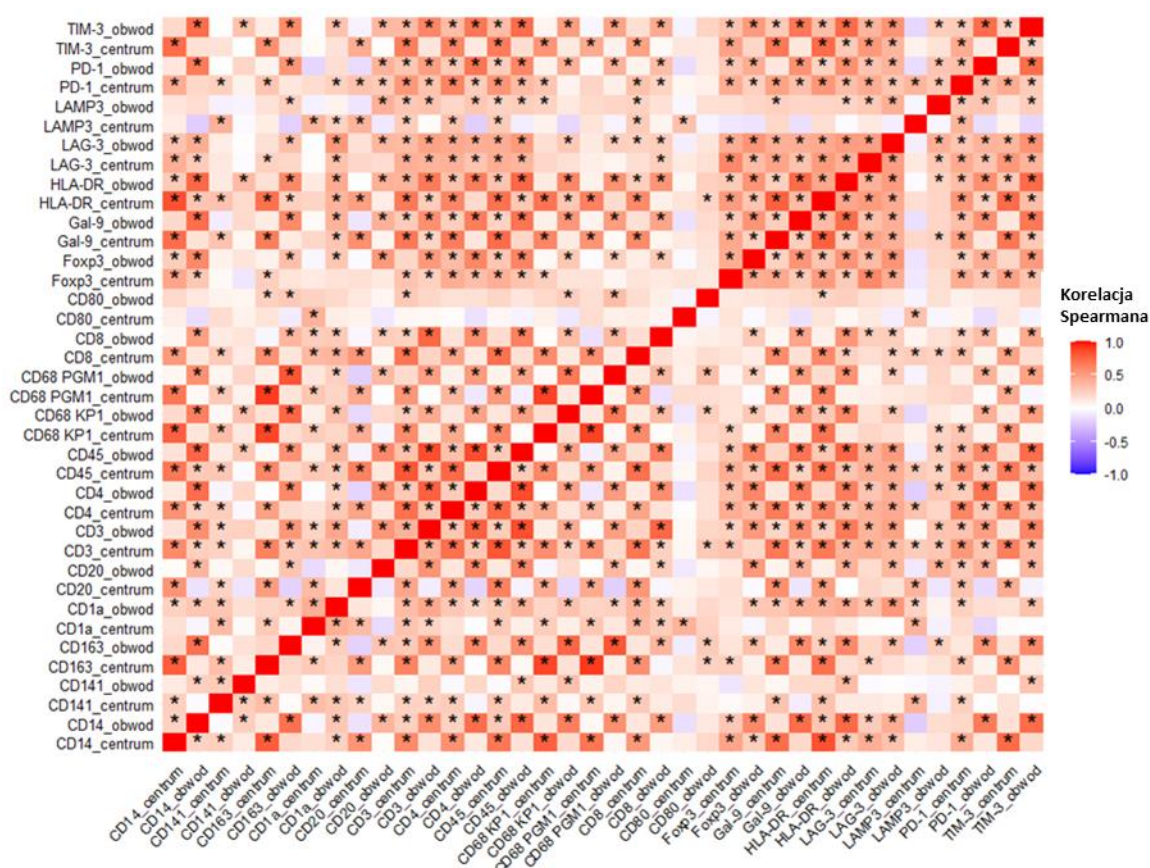
Nie wykazano silnej korelacji ($\rho > 0,7$) w obrębie ekspresji żadnego z markerów pomiędzy centralnym i obwodowym regionem guza. Natomiast dodatnią istotną korelację o średniej sile ($\rho > 0,4$) wykazano pomiędzy ekspresją 5 markerów w centralnym i obwodowym regionie guza (LAG-3, HLA-DR, Foxp3, CD1a oraz CD3) (Tabela 8).

Tabela 8. Korelacja ekspresji poszczególnych markerów w centralnej i obwodowej części guza.

Marker	Rho–Spearmana (centrum vs. obwód)	p-wartość	FDR
LAG-3	0,4947338	0,0000002	0,0000037
HLA-DR	0,4533051	0,0000025	0,0000233
Foxp3	0,4289243	0,0000094	0,0000598
CD1a	0,4185494	0,0000162	0,0000771
CD3	0,4107341	0,0000241	0,0000917
PD-1	0,3273265	0,0009427	0,0029852
CD4	0,2796149	0,0050639	0,0137450
CD45	0,2721769	0,0064226	0,0152537
Gal-9	0,2604280	0,0092303	0,0194862
CD141	0,2545843	0,0109918	0,0208845
CD14	0,2400178	0,0167154	0,0288721
TIM-3	0,2272974	0,0236629	0,0374662
CD163	0,2210071	0,0279260	0,0408149
CD68 KP1	0,1972440	0,0503594	0,0683449
CD8	0,1634162	0,1060499	0,1343299
CD20	-0,0949644	0,3497887	0,4153741
CD68 PGM1	0,0794388	0,4344474	0,4855589
CD80	-0,0523459	0,6068510	0,6405650
LAMP3	-0,0362591	0,7216094	0,7216094

Skróty: FDR – wskaźnik fałszywych odkryć (ang. *false discovery rate*). Pogrubioną czcionką oznaczoną wyniki istotne statystycznie (FDR <0,05).

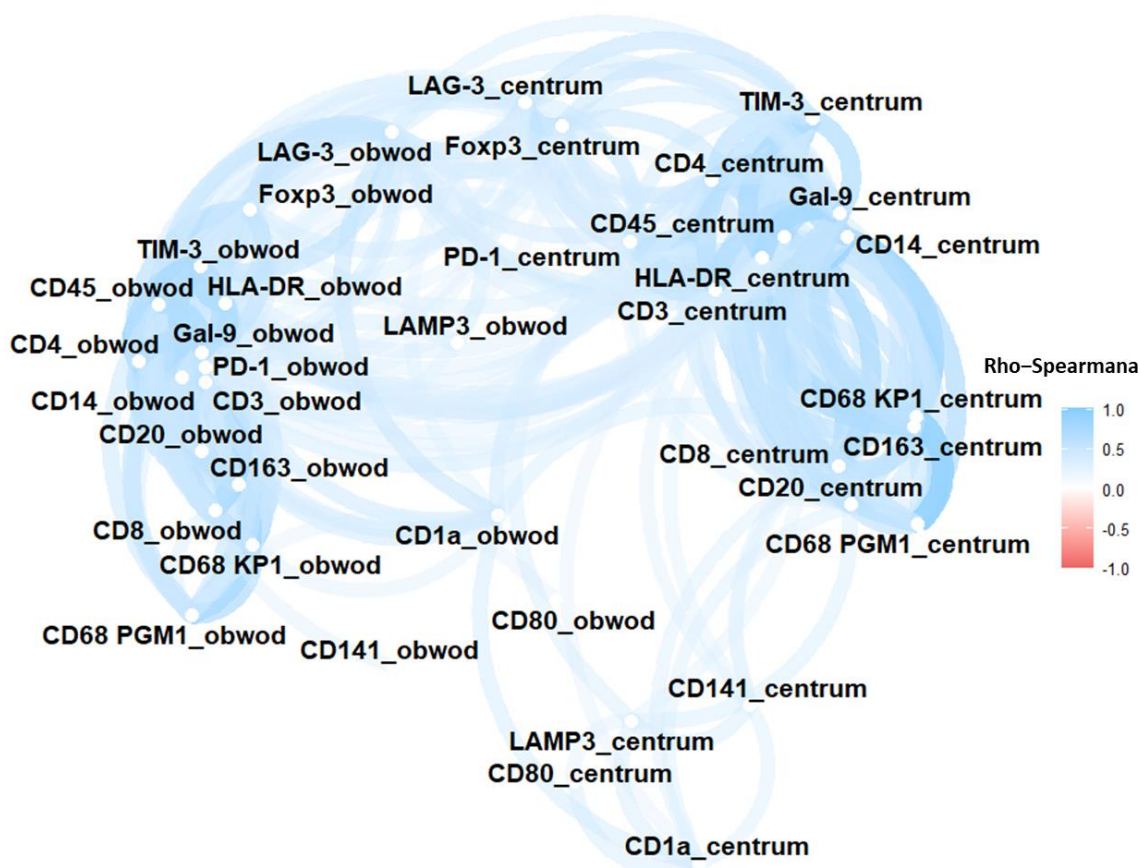
Nie zaobserwowano istotnej ujemnej korelacji pomiędzy ekspresją żadnych z analizowanych markerów (Rycina 36). Najsilniejsza dodatnia i istotna korelacja ($\rho > 0,9$) występowała pomiędzy obecnością makrofagów M1 i M2 (ekspresją markerów CD68 i CD163) w centralnej części guza. Silną korelację ($\rho > 0,7$) zaobserwowano także pomiędzy ekspresją markerów HLA-DR oraz CD45, CD14, Gal-9, TIM-3 lub CD163 w centralnym i obwodowym regionie guza (Rycina 36).



Rycina 36. Macierz korelacji pomiędzy ekspresją poszczególnych markerów immunologicznych z różnych obszarów guza.

Gwiazdkami oznaczono wyniki istotne statystycznie: * FDR < 0,05.

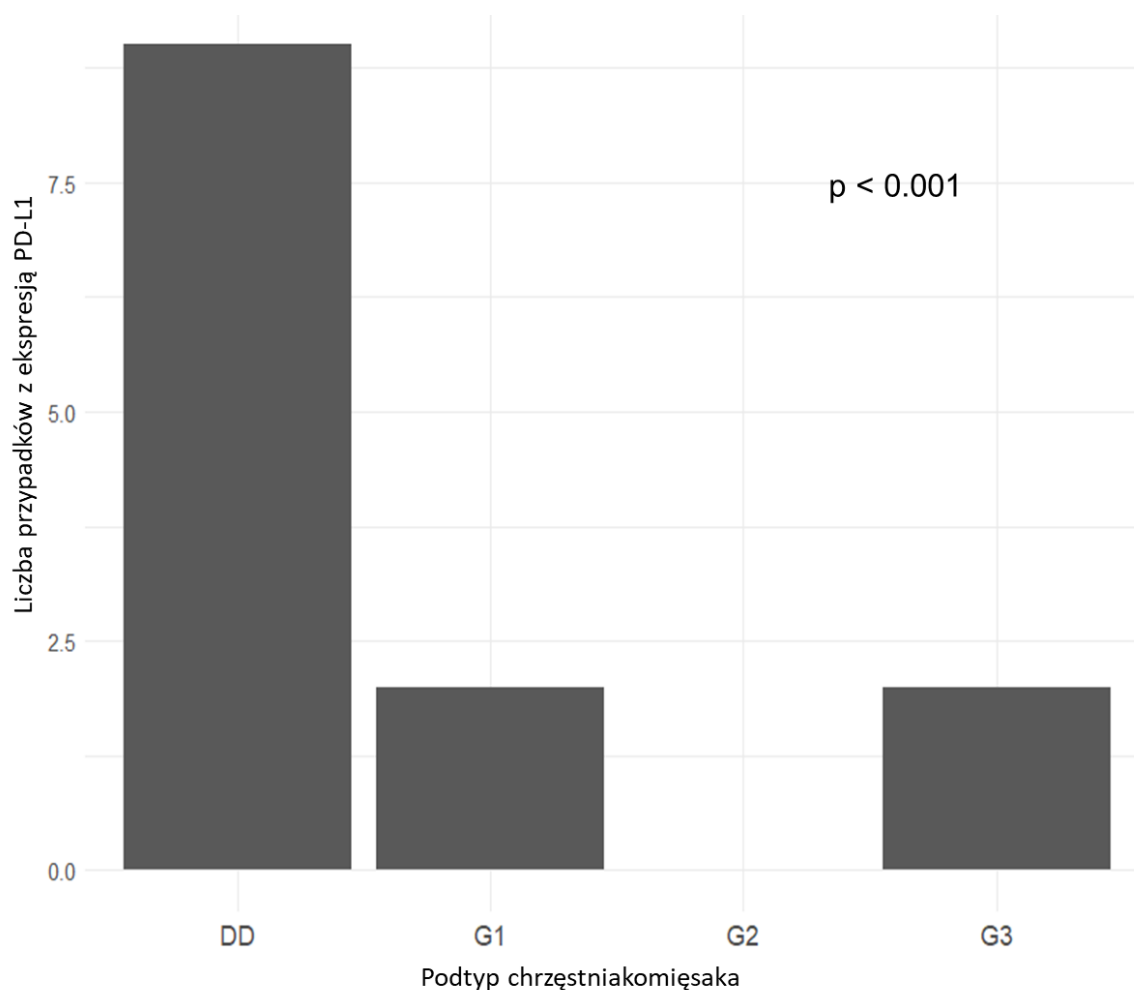
Obecność markera CD14 silnie korelowała z naciekiem makrofagów M2 CD163+, a także „wyczerpanych” limfocytów (Gal-9+ lub TIM-3+) w centralnym i obwodowym regionie guza. Na obwodzie obecność komórek CD14+ dodatkowo korelowała z obecnością pomocniczych limfocytów T (CD4+) lub leukocytów (CD45+). W przypadku markera limfocytów (CD3), silną korelację jego ekspresji zaobserwowano z obecnością komórek eksprymujących CD45, CD8 lub CD4 w centralnym regionie guza oraz komórkami z ekspresją CD45 lub CD4 na obwodzie guza. Z kolei na obwodzie limfocyty TIM-3+ silnie korelowały z obecnością limfocytów PD-1+ (Rycina 36, 37). Wzajemne oddziaływania pomiędzy poszczególnymi markerami przedstawiono graficznie na Rycinie 37.



Rycina 37. Graficzny schemat korelacji pomiędzy poszczególnymi markerami immunologicznymi w centralnym i obwodowym regionie guza.

4.3.1.1. Ekspresja PD-L1 oraz ocena 3-rzędowych struktur limfoidalnych

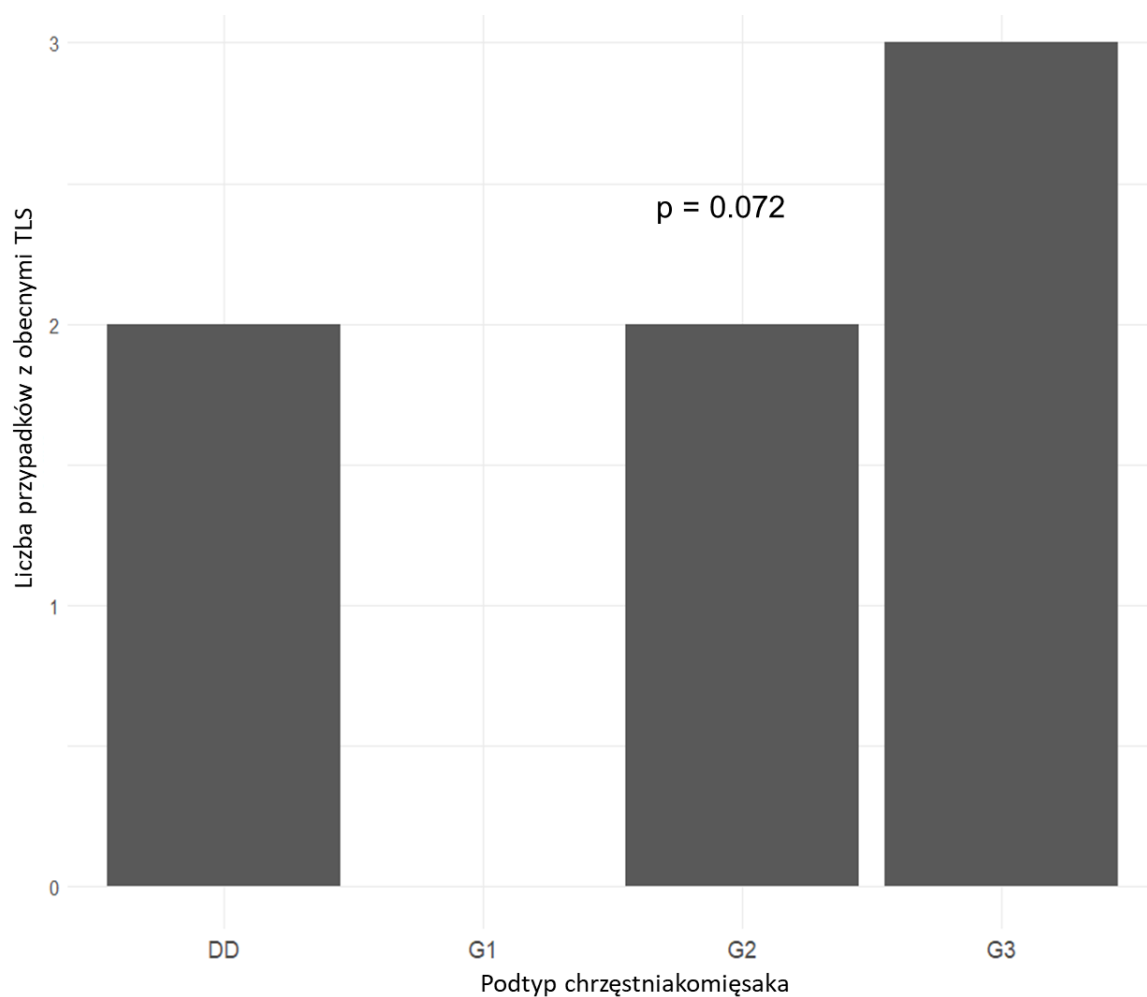
Z uwagi na fakt, że ekspresja PD-L1 była oceniana na komórkach nowotworowych jako procent komórek pozytywnych w skali od 0 do 2, wyniki te przeanalizowano osobno. Dodatnią ekspresję wykryto jedynie w 13 przypadkach spośród grupy 99 pacjentów. W 7 zidentyfikowanych przypadkach poziom ekspresji PD-L1 był niski („1” w analizowanej skali tj. w zakresie 1-30% komórek); u pozostałych 6 przypadków (dotyczących tylko DDCS) zaobserwowano wysoki poziom ekspresji („2” w analizowanej skali tj. w zakresie powyżej 30% komórek). Z uwagi na to, że wysoki poziom ekspresji dotyczył jedynie DDCS, nie rozgraniczano poziomu ekspresji PD-L1 do analiz porównawczych pomiędzy podgrupami. Poziom ekspresji PD-L1 różnił się istotnie w zależności od podtypu ChS i występował w największej liczbie w podtypie DDCS (9 przypadków) w stosunku do podtypów G1 i G3 (po 2 przypadki), podczas gdy w przypadku ChS G2 nie wykryto ekspresji PD-L1 (Rycina 38).



Rycina 38. Liczba przypadków z ekspresją PD-L1 zależnie od podtypu histologicznego chrząstniakomięsaka.

Skróty: DD - odróżnicowany chrząstniakomięsak. Do porównań pomiędzy grupami wykorzystano dokładany test Fishera.

Podobnie jak ekspresja PD-L1, obecność TLS nie była częstym zjawiskiem w analizowanej grupie pacjentów i dotyczyła jedynie 7 przypadków. Nie zaobserwowano tutaj różnic istotnych statystycznie pomiędzy poszczególnymi podtypami ChS (Rycina 39).

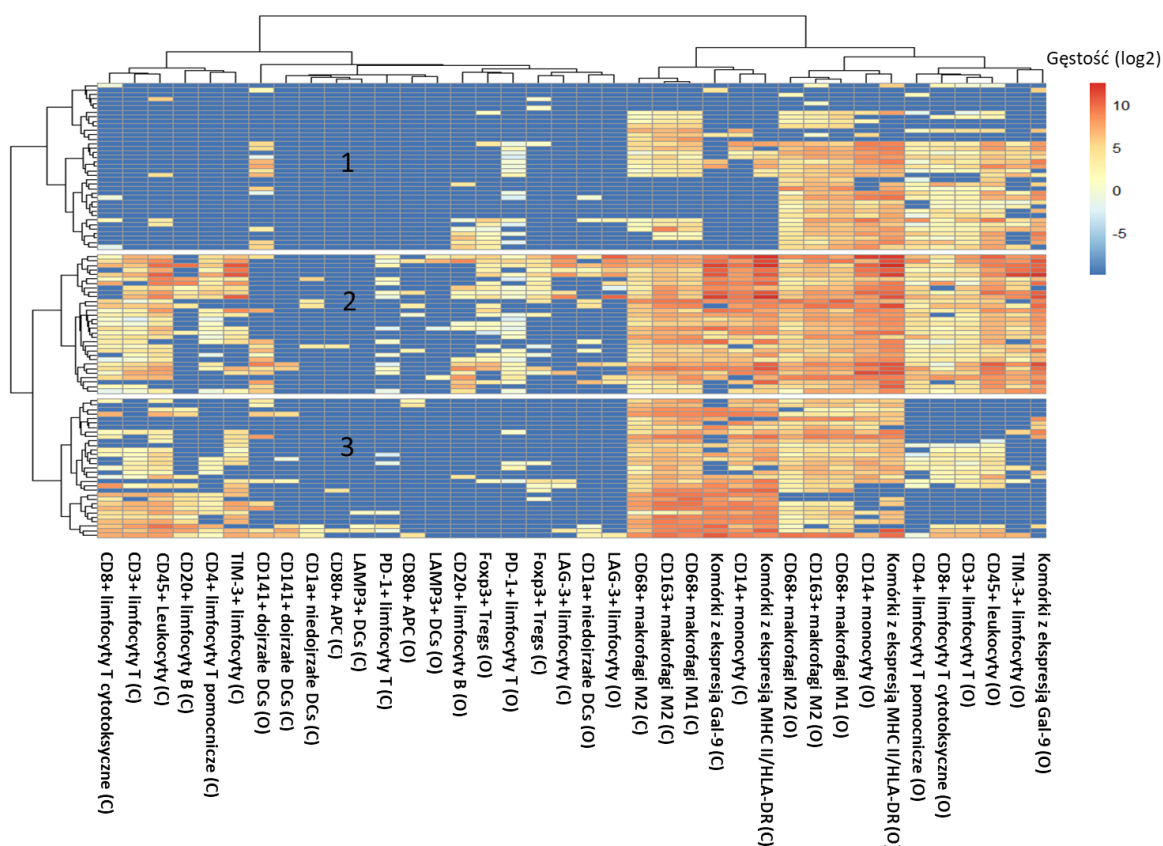


Rycina 39. Liczba przypadków z obecnymi 3-rzędowymi strukturami limfoidalnymi zależnie od podtypu histologicznego chrzęstniakomięsaka.

Skróty: DD - odróżnicowany chrzęstniakomięsak, TLS - 3-rzędowe struktury limfoidalne (ang. *tertiary lymphoid structures*). Do porównań pomiędzy grupami wykorzystano dokładany test Fishera.

4.3.2. Określenie immunofenotypu

Na podstawie wcześniej opisanych danych o gęstości dla 19 markerów, zarówno dla regionu centralnego i obwodowych, przeprowadzono klastrowanie celem wytypowania immunofenotypów. Matematycznie ustaloną, optymalną liczbą klastrow było 3. Dane przedstawiono na skali logarytmicznej w formie mapy cieplnej (ang. *heatmap*) (Rycina 40).



Rycina 40. Mapa cieplna obrazująca pogrupowane na immunofenotypy dane immunologiczne.

1 - immunofenotyp „zimny”, 2 - immunofenotyp „gorący”, 3 - immunofenotyp „pośredni”. Gęstość została przedstawiona na skali logarytmicznej od najniższej (kolor granatowy) do najwyższej (czerwony). Markery oceniane w części centralnej i obwodowej zostały oznaczone odpowiednio w nawiasach jako „C” i „O”. Skróty: APC – komórki prezentujące antygen (ang. *antigen-presenting cells*), DCs – komórki dendrytyczne (ang. *dendritic cells*), Tregs – limfocyty T regulatorowe (ang. *regulatory T cells*).

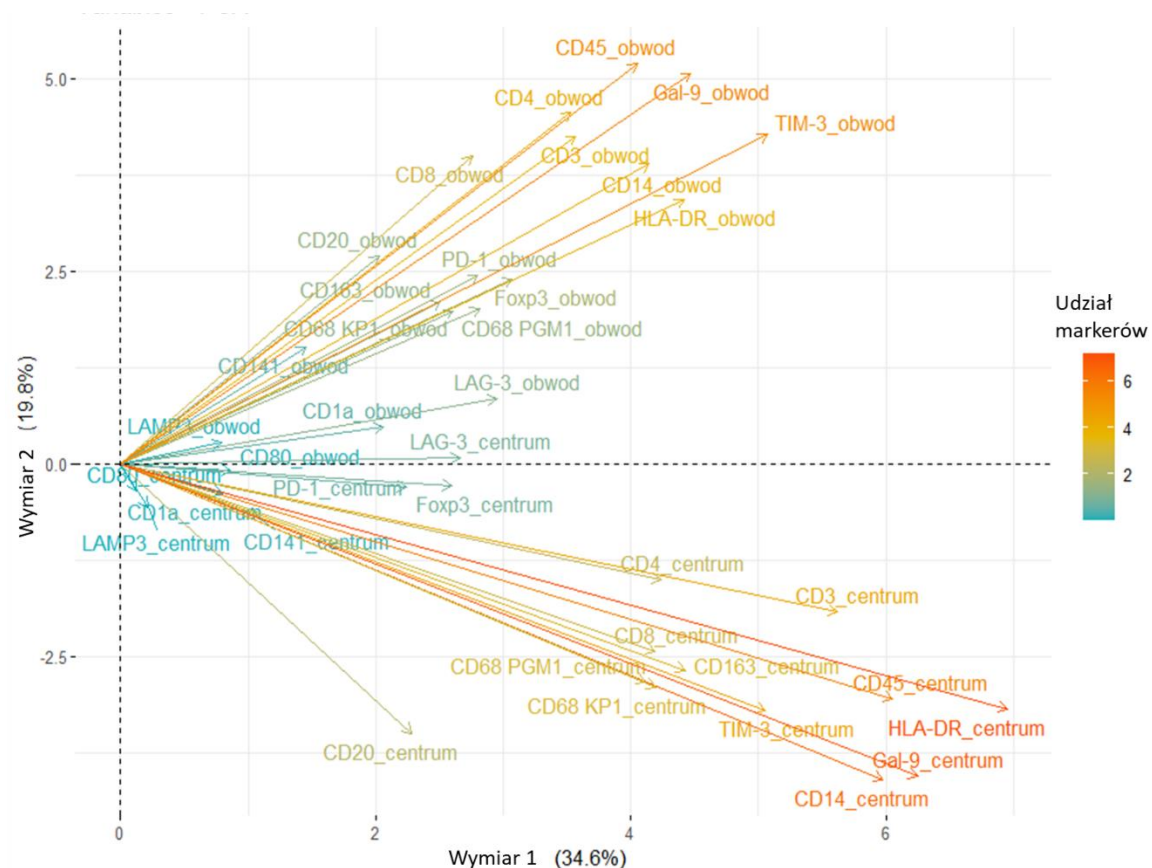
W oparciu o ekspresję poszczególnych markerów i ich lokalizację w wyniku klastrowania zidentyfikowano 3 podgrupy, które można sklasyfikować jako 3 różne potencjalne immunofenotypy:

1 – „**zimny**” – z najmniejszą gęstością komórek immunologicznych ogółem, ewentualnymi komórkami obecnymi głównie na obwodzie guza (z wyjątkiem makrofagów które obserwowano u niektórych pacjentów także w centrum, jednak w najmniejszej liczbie w porównaniu do pozostałych podgrup).

2 – „gorący” – o największej liczbie komórek immunologicznych zarówno w centralnym, jak i obwodowym regionie guza, największą ekspresją HLA-DR, Gal-9 oraz PD-1, a także widoczną ekspresją CD8+.

3 – „**pośredni**” – o mniejszej liczbie komórek immunologicznych w porównaniu do fenotypu „gorącego” i mniejszym udziałem limfocytów na obwodzie guza, jednak obecnymi naciekami komórek immunologicznych także w regionie centralnym.

W celu określenia, które markery prezentowane na komórkach miały największy udział w poszczególnych podgrupach, przeprowadzono PCA (Rycina 41).



Rycina 41. Analiza głównych składowych przeprowadzona dla danych immunologicznych.

Największy udział w poszczególnych immunofenotypach miała zwłaszcza obecność komórek z ekspresją HLA-DR, Gal-9, CD14 lub CD45 w centralnej części guza, a także ekspresja Gal-9, CD45 lub TIM-3 na obwodzie.

Przykładowe barwienia IHC guzów ChS o różnych immunofenotypach z wybraniem najbardziej znaczących markerów przedstawiono w Załączniku 7 na Rycinach Z2-4.

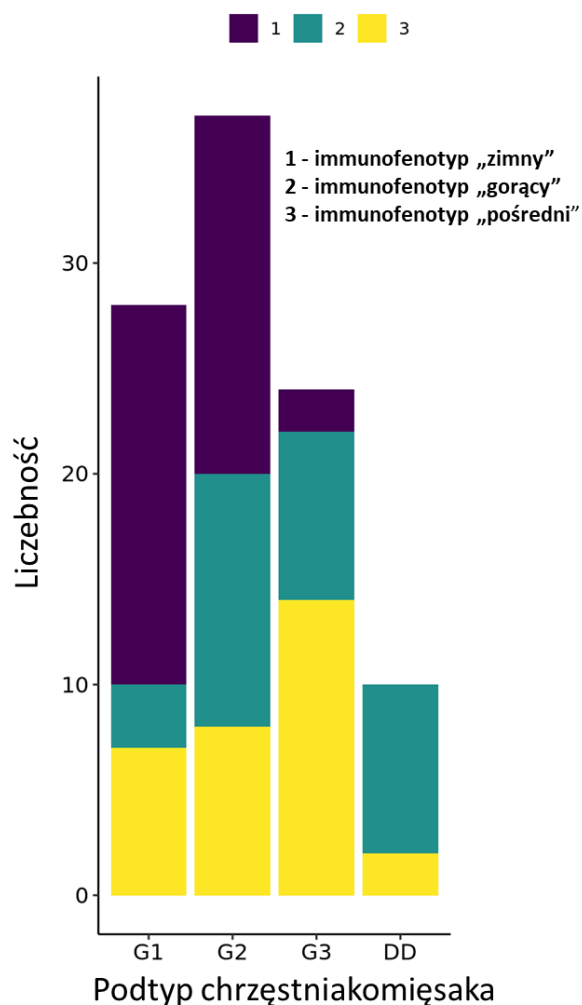
Udział poszczególnych immunofenotypów różnił się istotnie pomiędzy podtypami histologicznymi ChS (Tabela 9).

Tabela 9. Charakterystyka liczbowa poszczególnych immunofenotypów w obrębie podtypów chrzęstniakomięsaka.

IMMUNOFENOTYP	PODTYP HISTOLOGICZNY				LICZBA PRZYPADKÓW W DANYM IMMUNOFENOTYPIE	P-WARTOŚĆ (OGÓŁEM) p <0,001
	DD	G1	G2	G3		
„zimny”	0	18	17	2	37	
„gorący”	8	3	12	8	31	
„pośredni”	2	7	8	14	31	
Liczba przypadków w danym podtypie	10	28	37	24	99	

Skróty: DD – odróżnicowany chrzęstniakomięsak. Do porównań pomiędzy grupami wykorzystano dokładany test Fishera.

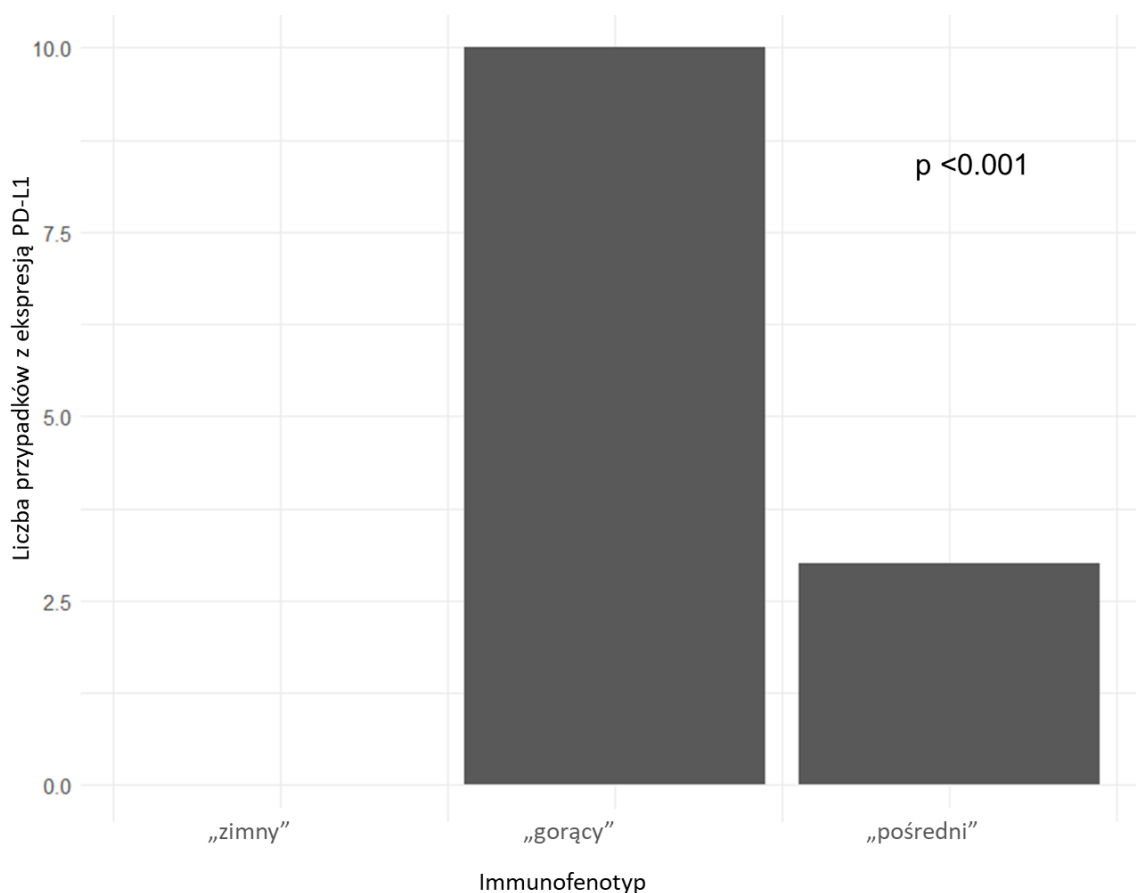
Pacjenci z rozpoznaniem ChS G2 charakteryzowali się podobnym udziałem immunofenotypu „zimnego” i „gorącego”, podczas gdy w przypadkach ChS G1 zaobserwowano znaczącą przewagę „zimnego” immunofenotypu. W ChS G3 udział immunofenotypu „zimnego” względem ChS G1 i G2 był najniższy, a w DDCS całkowicie nieobecny (Rycina 42). U pacjentów z rozpoznaniem DDCS występowała ogółem większa liczba nacieków komórek immunologicznych, szczególnie w komponencie odróżnicowanym guza (Ryciny Z5 i Z6, Załącznik 7).



Rycina 42. Charakterystyka immunofenotypów w obrębie podtypu histologicznego chrząstniakomięsaka.

4.3.2.1. Ekspresja PD-L1 oraz ocena 3-rzędowych struktur limfoidalnych

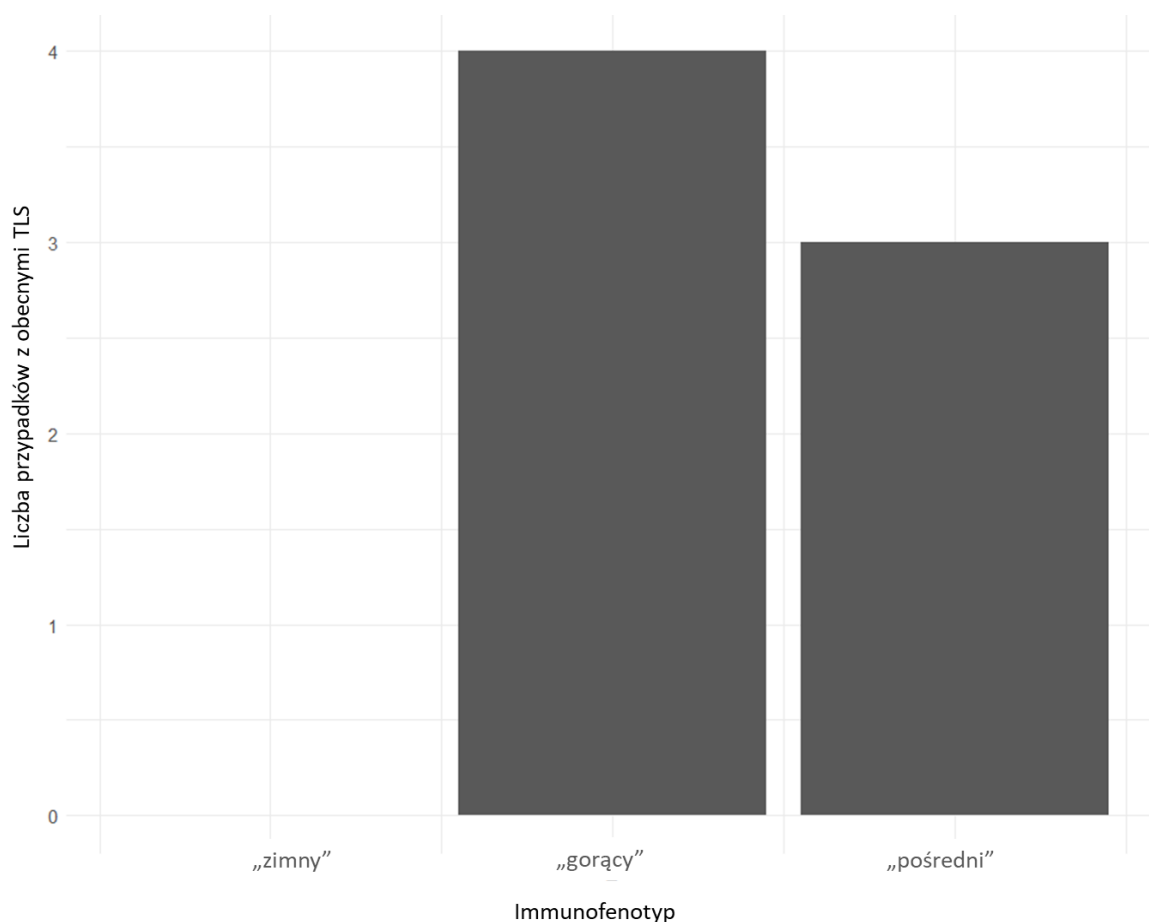
Dla poszczególnych immunofenotypów oceniono także osobno ekspresję PD-L1 oraz obecność TLS. Ekspresję PD-L1 wykryto jedynie u pacjentów o immunofenotypie „gorącym” i „pośrednim”, z istotną przewagą w „gorącym” (Rycina 43). Wysoka ekspresja PD-L1 została wykryta głównie u pacjentów o immunofenotypie „gorącym” (5 z 6 przypadków). Przykłady wysokiej i niskiej ekspresji PD-L1 przedstawiono na Rycinach Z5 i Z6 w Załączniku 7.



Rycina 43. Liczba przypadków z ekspresją PD-L1 zależnie od prezentowanego immunofenotypu.

Do porównań pomiędzy grupami wykorzystano dokładany test Fishera.

Podobnie jak ekspresja PD-L1, TLS nie były obecne w grupie pacjentów o immunofenotypie „zimnym”. Obecność TLS nieznacznie przeważała natomiast u pacjentów o immunofenotypie „gorącym” chociaż nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie (Rycina 44).



Rycina 44. Liczba przypadków z obecnymi 3-rzędowymi strukturami limfoidalnymi zależnie od prezentowanego immunofenotypu.

Skróty: TLS - 3-rzędowe struktury limfoidalne (ang. *tertiary lymphoid structures*). Do porównań pomiędzy grupami wykorzystano dokładany test Fishera.

4.3.3. Ocena zależności pomiędzy poszczególnymi immunofenotypów a przeżyciami pacjentów z rozpoznaniem chrzęstniakomięsaka

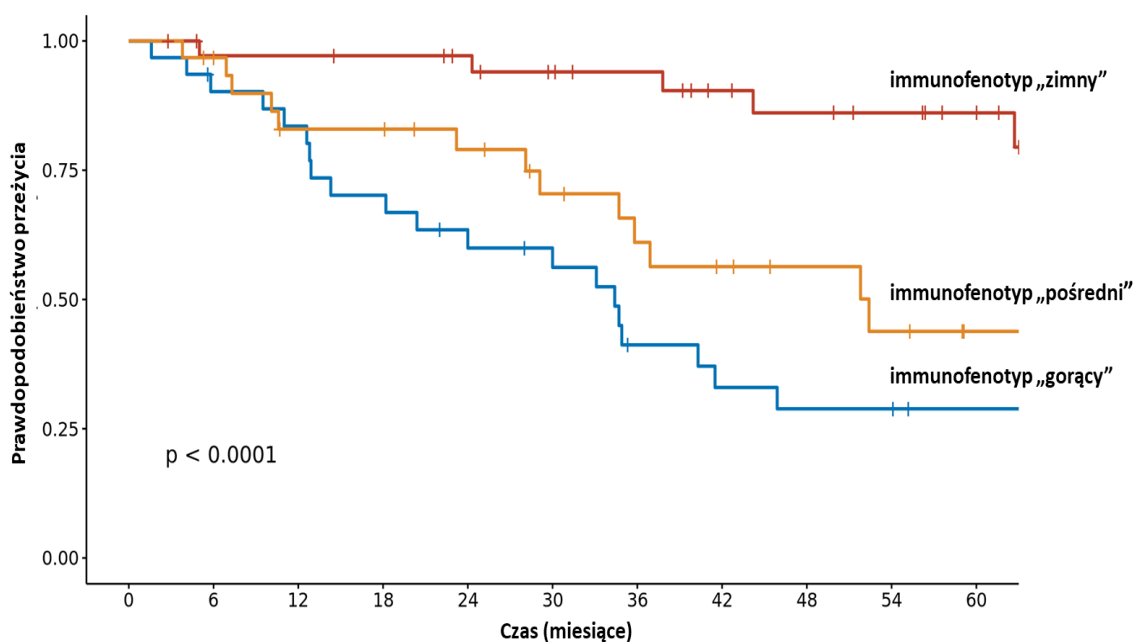
Wieloczynnikowa analiza Coxa wykazała, że obecność immunofenotypu „gorącego” lub „pośredniego” jest niezależnym negatywnym czynnikiem prognostycznym (Tabela 10).

Tabela 10. Wyniki modelu proporcjonalnego hazardu Coxa dla przeżycia całkowitego pacjentów z rozpoznaniem chrzęstniakomięsaka z uwzględnieniem poszczególnych immunofenotypów i podtypów histologicznych.

	<i>Cecha</i>	<i>HR (95% CI)</i>	<i>p-wartość</i>
Podtyp histologiczny	G1	-	-
	G2	1,95 (0,72-5,27)	0,187
	G3	4,10 (1,42-11,84)	0,009
	Odróżnicowany	12,85 (3,91-42,25)	<0,001
Immunofenotyp	„zimny”	-	-
	„gorący”	4,05 (1,41-11,57)	0,009
	„pośredni”	3,90 (1,35-11,28)	0,012

Pogrubioną czcionką zaznaczono wyniki istotne statycznie ($p < 0,05$). Skróty: HR - współczynnik ryzyka (ang. *hazard ratio*), CI - przedział ufności (ang. *confidence interval*).

Obecność immunofenotypu „gorącego” wiązała się z najkrótszymi przeżyciami u pacjentów z rozpoznaniem ChS. Odsetek 5-letnich przeżyć wynosił w tym wypadku zaledwie 29%, podczas gdy dla immunofenotypu „pośredniego” i „zimnego” odpowiednio 44% i 86% (Rycina 45).



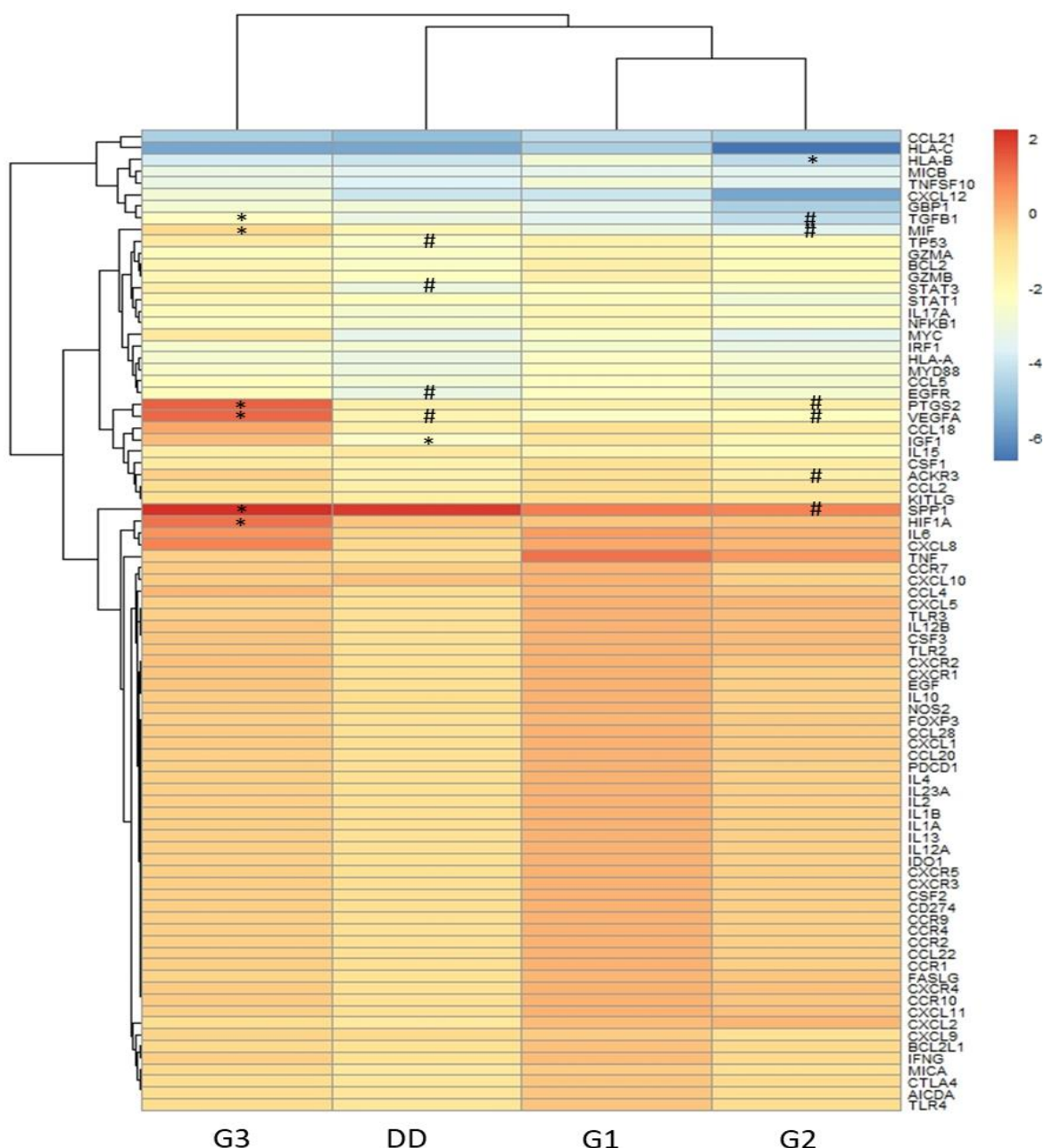
Rycina 45. Przeżycia całkowite pacjentów w zależności od obecnego immunofenotypu.

4.3.4. Ocena ekspresji genów związanych z mikrośrodowiskiem guza na podgrupie pacjentów

Z spośród 99 pacjentów 53 miała przeprowadzoną ocenę ekspresji genów 84 genów zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną nowotworów, z wykorzystaniem qPCR i została włączona do analizy. Oceniana grupa badana dotyczyła 12 przypadków ChS G1, 13 ChS G2, 19 ChS G3 oraz 9 DDCS.

Najwięcej genów o istotnie wyższej ekspresji zaobserwowano w ChS G3 (Rycina 46). Wzrost ekspresji w tym podtypie w stosunku do ChS G1 wykazano dla genów: *HIF1A*, *VEGFA*, *SPP1*, *PTGS2*, *MIF* oraz *TGFB1*. Ponadto podtyp G3 wykazywał zwiększoną ekspresję niektórych genów względem innych podtypów histologicznych ChS tj. DDCS (*VEGFA*, *EGFR*, *STAT3* oraz *TP53*) oraz G2 (*SPP1*, *ACKR3*, *VEGFA*, *PTGS2*, *MIF* oraz *TGFB1*).

Poza nadekspresją genów zaobserwowano również istotnie zmniejszoną ekspresję genów *HLA-B* (w ChS G2) oraz *IGF1* (w DDCS) względem G1 (Rycina 46).

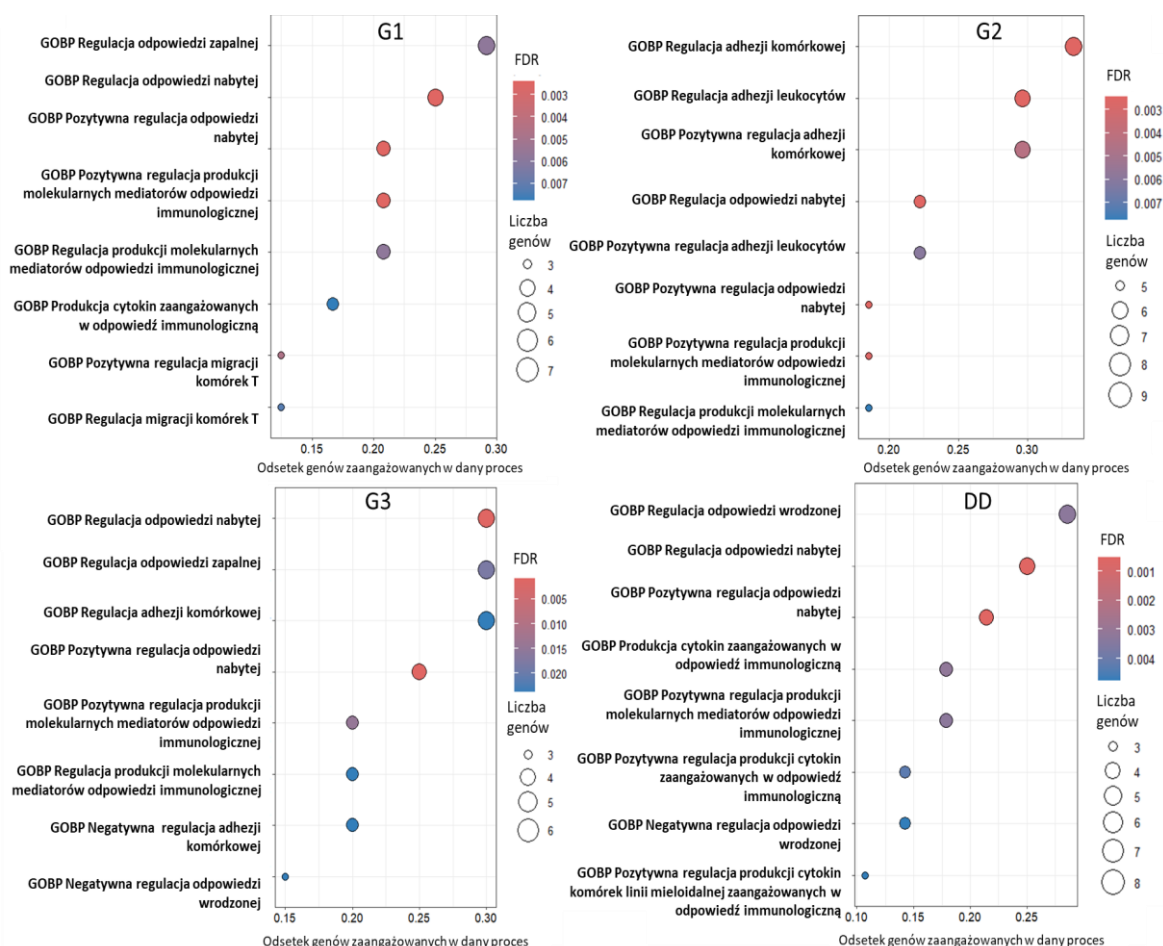


Rycina 46. Mapa cieplna przedstawiająca różnice w ekspresji genów, zawartych w panelu Human Cancer Inflammation & Immunity Crosstalk RT² Profiler PCR Array, pomiędzy podtypami histologicznymi chłoniaka.

Ekspresję genów przedstawiono na skali logarytmicznej od najniższej (kolor granatowy) do najwyższej (czerwony). Skróty: DD - odróżnicowany chłoniak. Geny istotnie różniące się ($|\log_2(FC)| \geq 1$ oraz $FDR < 0,05$) pomiędzy podtypami o wyższych stopniach złośliwości, a G1 oznaczono gwiazdkami (*); różnice pomiędzy G3 a pozostałymi podtypami o wyższych stopniach złośliwości oznaczono hasztagiem (#). Do porównań pomiędzy grupami wykorzystano test t Studenta.

Analiza wzbogacenia dla genów o istotnie różnej ekspresji względem kontroli (tkanka zdrowa) wykazała, że w przypadku wszystkich podtypów ChS następował spadek ekspresji genów zaangażowanych w różne procesy immunologiczne (Rycina 47). W przypadku ChS G1 najczęściej deregulowanym procesami były te związane z regulacją

odpowiedzi zapalnej oraz nabytej (zmniejszenie ekspresji genów zaangażowanych w odpowiedź nabytą). Innym częstym procesem było zmniejszenie migracji komórek, w tym limfocytów T. W przypadku ChS G2 największą rolę odgrywały zmiany w procesie adhezji komórkowej (w tym także leukocytów), który ulegał osłabieniu. W ChS G3 zaobserwowano deregulację wszystkich trzech procesów obecnych w ChS niższego stopnia złośliwości histologicznej (G1, G2). Poza zaburzeniami w regulacji odpowiedzi nabytej, zaobserwowano także przeciwny proces związany ze wzrostem regulacji odpowiedzi wrodzonej (spadek ekspresji genów związanych z jej negatywną regulacją). W przypadku DDCS, podobnie jak w ChS G3, deregulacji ulegała zarówno odpowiedź nabyta (spadek ekspresji genów), jak i wrodzona (wzrost ekspresji genów). Dodatkowo w DDCS występował spadek ekspresji genów zaangażowanych w produkcję cytokin komórek linii mieloidalnej.

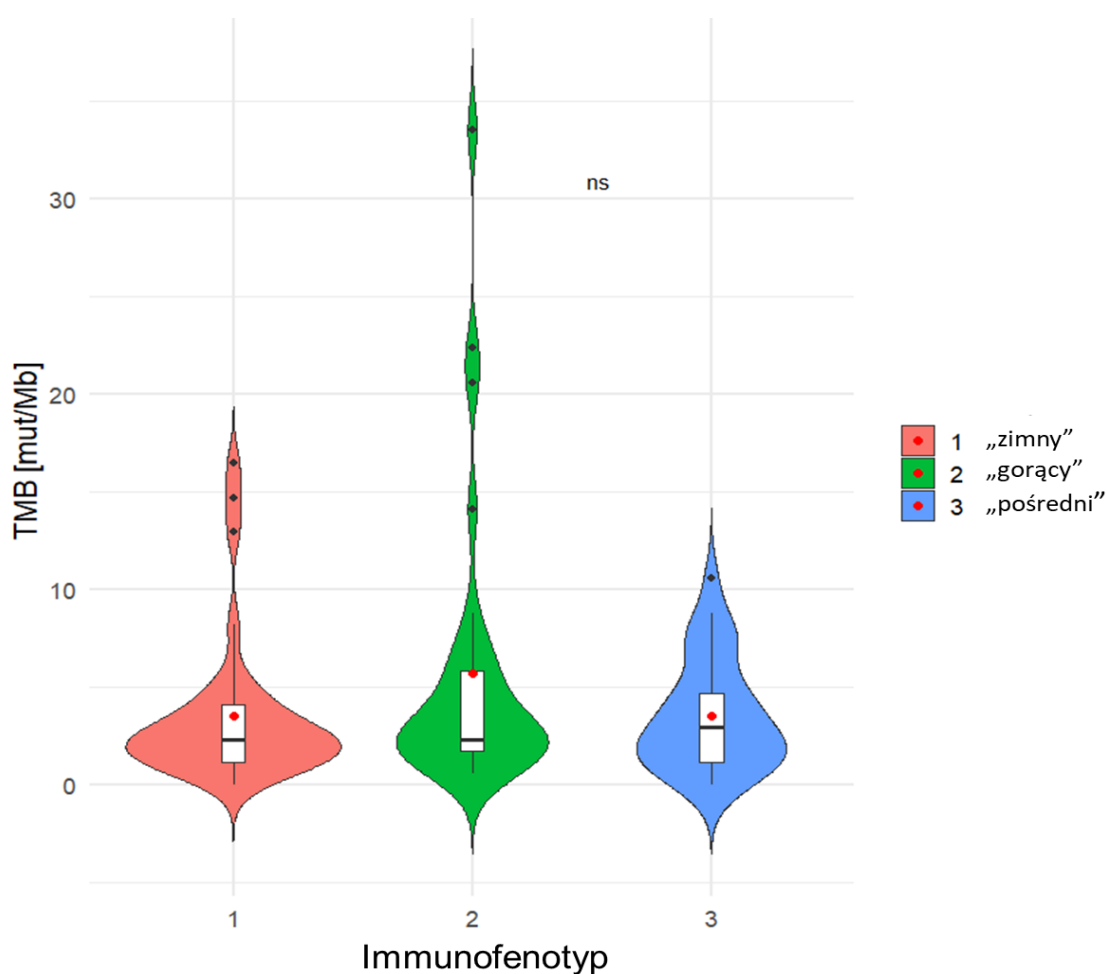


Rycina 47. Wykresy przedstawiające osiem najczęściej deregulowanych procesów w GO dla poszczególnych podtypów chrzęstniakomięsaka względem tkanek zdrowych.

Skróty: DD - odróżnicowany chrzęstniakomięsak, FDR – wskaźnik fałszywych odkryć (ang. *false discovery rate*), GOBP – ang. *Gene Ontology biological process*.

4.4. Korelacja danych immunologiczno-molekularnych

Pełne dane immunologiczne i molekularne dla 99 pacjentów skorelowano ze sobą i oceniono profil molekularny dla poszczególnych immunofenotypów. Nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy wartościami TMB w 3 klastrach immunologicznych (Rycina 48). Największe wartości TMB były obserwowane w grupie pacjentów o immunofenotypie „gorącym” ze średnim TMB równym 5,73 mut/Mb, podczas gdy dla pozostałych immunofenotypów średnie TMB wynosiło około 3,5 mut/Mb.

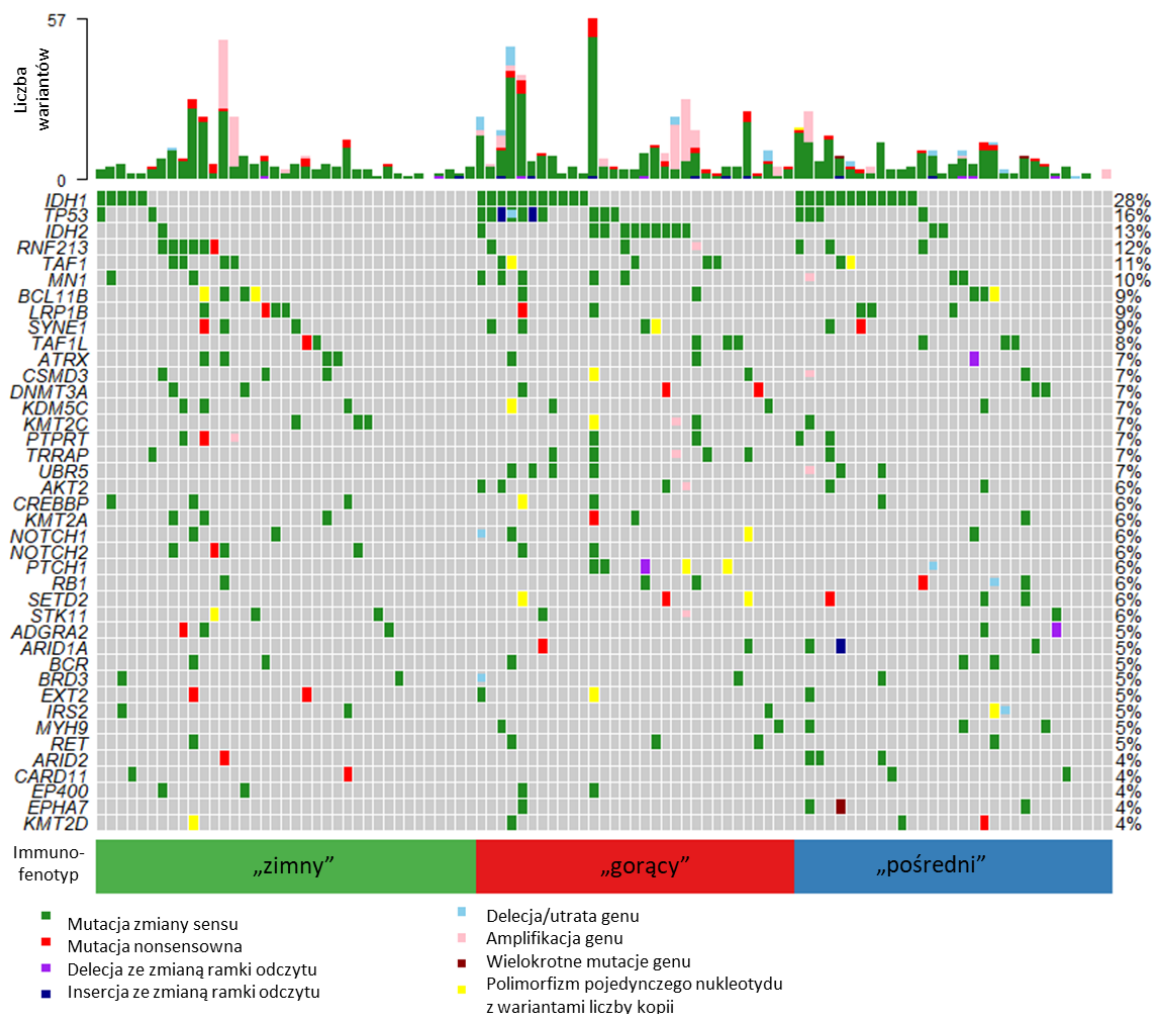


Rycina 48. Wykresy pudełkowe dla wartości TMB w zależności od immunofenotypu chrzęstniakomięsaka.

Skróty: TMB – obciążenie mutacyjne guza (ang. *tumor mutational burden*); ns - brak istotności statystycznej. Czerwoną kropką oznaczono średnią. Do porównań pomiędzy grupami wykorzystano test Kruskala-Wallisa.

Nie wykazano istotnych różnic w żadnym z genów pomiędzy poszczególnymi immunofenotypami (Tabela Z5, Załącznik 5). Pomimo tego profil molekularny w poszczególnych podgrupach był zróżnicowany (Rycina 49). W przypadku pacjentów o immunofenotypie „gorącym” zaobserwowano największą liczbę delecji/utrat genów

i amplifikacji, chociaż były one też obecne w pozostałych klastrach. Mutacje w genach *IDH1/2* i *TP53* występowały we wszystkich klastrach, chociaż najczęściej w podgrupie pacjentów o immunofenotypie „gorącym”. Dodatkowo w tej grupie obserwowano delecje genów *BRD3* i *NOTCH1*, a także amplifikacje w genach *AKT2*, *STK11*, *KMT2C*, *TRRAP*, czy *RNF213*.

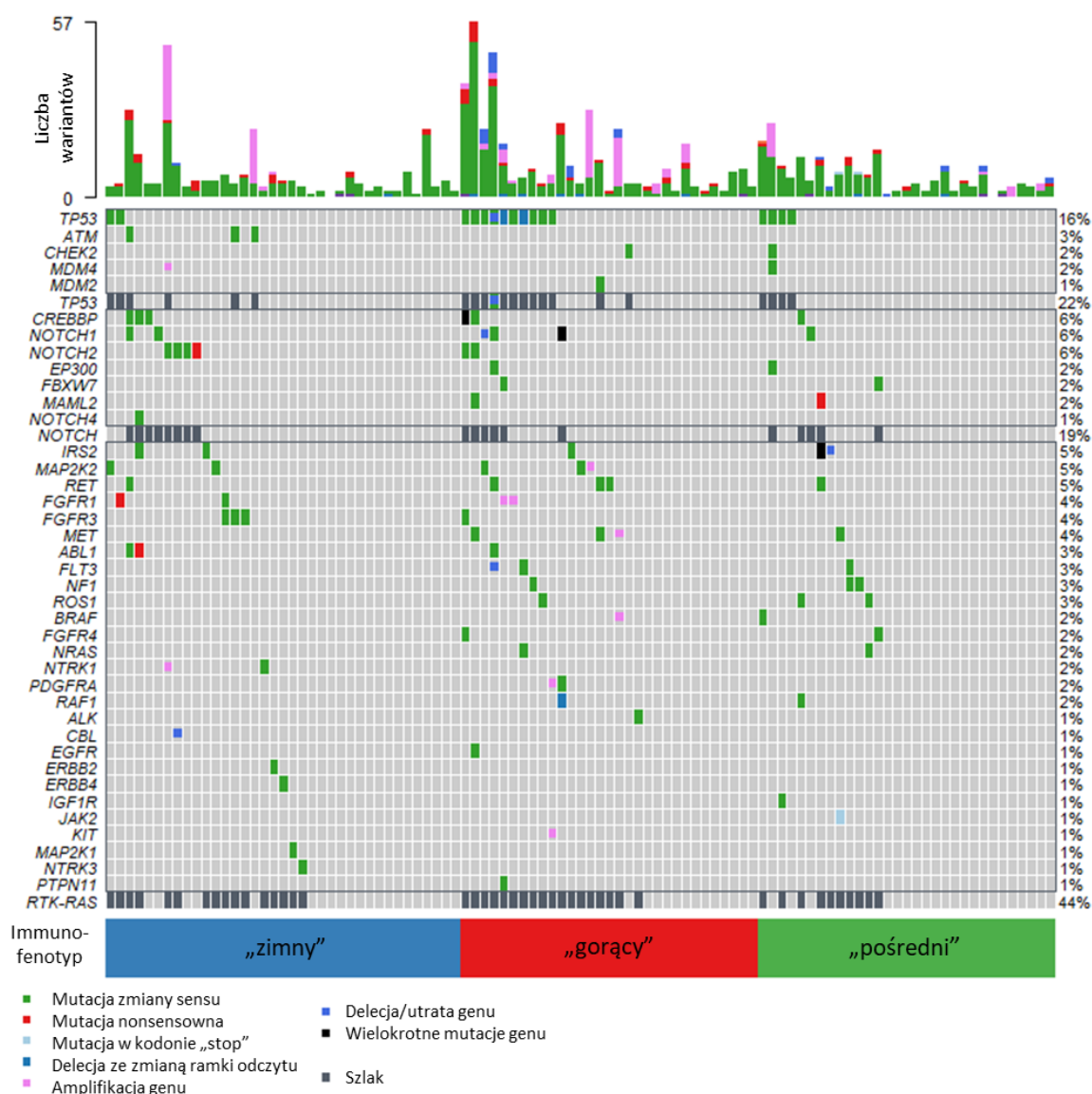


Rycina 49. Zestawienie 40 najczęstszych mutacji w genach występujących w poszczególnych immunofenotypach chłoniaka.

W rzędach przedstawiono geny, w kolumnach poszczególnych pacjentów. Legenda kolorystyczna poniżej wykresu przedstawia typ wariantu genetycznego. Z prawej strony wykresu przedstawiono częstość występowania poszczególnych mutacji w genach w badanej populacji.

W grupie pacjentów o immunofenotypie „pośrednim” zaobserwowano amplifikacje genów *MN1* i *UBR5*, czy utraty genów *PTCH1* i *RB1*. Mutacji w genach *PTCH1*, *RB1*, *AKT2* czy *UBR5* (w postaci SNV i CNV) nie obserwowano z kolei w podgrupie pacjentów o immunofenotypie „zimnym” (Rycina 49).

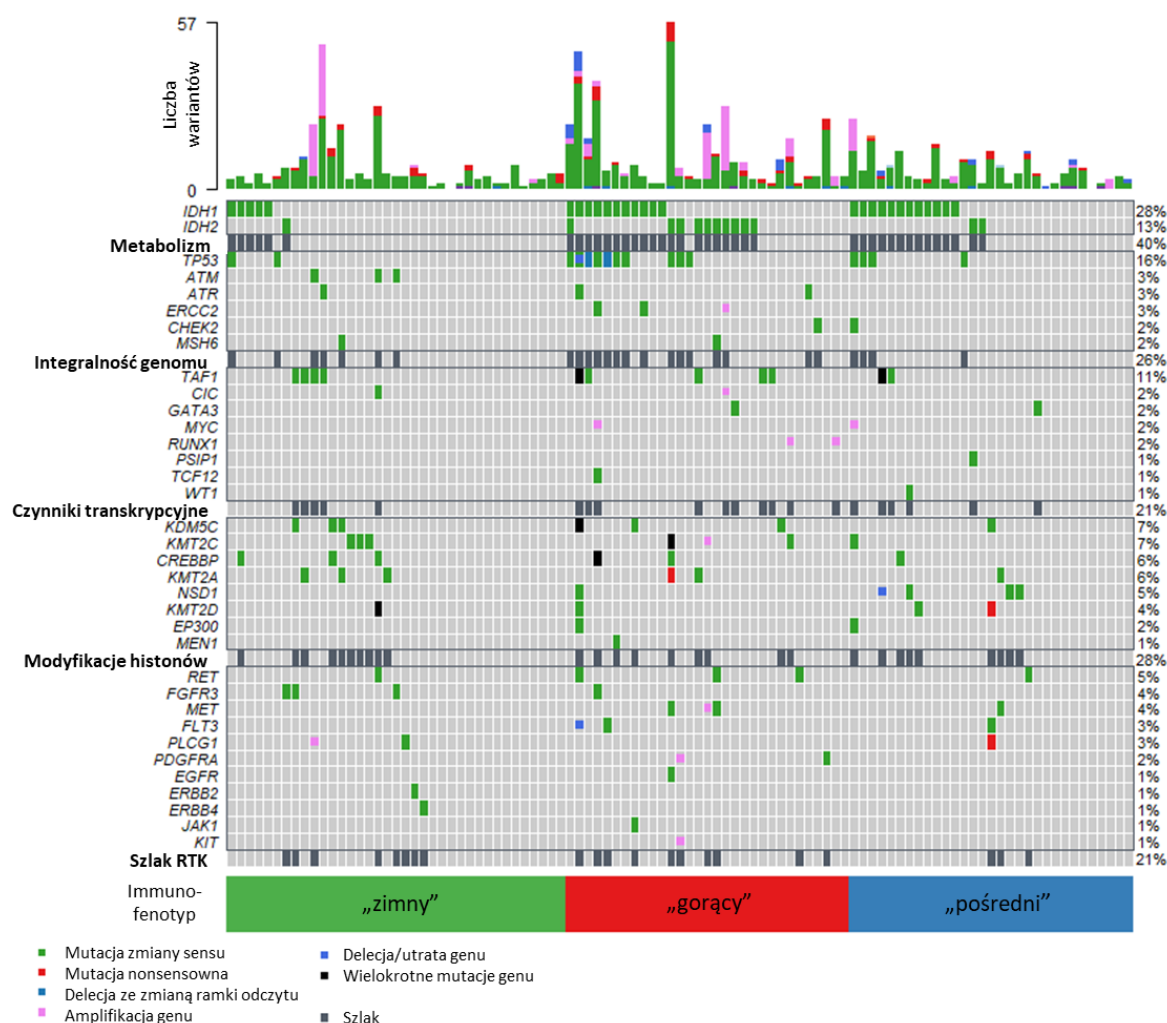
Różnice pomiędzy profilem molekularnym pacjentów o poszczególnych immunofenotypach widoczna była także w przypadku deregulowanych szlaków. Zaburzenia szlaku RTK-RAS obecne były we wszystkich podgrupach pacjentów, chociaż amplifikacje w genach z nim związanych (np. *MAP2K2*, *FGFR1*, *MET*, *BRAF*, *PDGFRA*, czy *KIT*) występowały głównie w przypadkach o immunofenotypie „gorącym”, podobnie jak mutacje w genie *TP53*, związane ze szlakami sygnałowymi z udziałem białka p53 (Rycina 50, 51). Z kolei u pacjentów o immunofenotypie „zimnym” występowała niewielka przewaga mutacji w genach zaangażowanych w szlak NOTCH (Rycina 50).



Rycina 50. Charakterystyka trzech najczęściej deregulowanych ścieżek sygnałowych i zaangażowanych w nie genów z podziałem na immunofenotyp chłoniaka.

Z prawej strony wykresu przedstawiono częstość występowania poszczególnych genów oraz szlaków molekularnych deregulowanych w badanej populacji. Skróty: NOTCH – białko Notch (ang. *neurogenic locus notch homolog protein*), RTK - receptorowa kinaza tyrozynowa (ang. *receptor tyrosine kinase*). Podział genów na funkcję oparto o system zaproponowany przez Sanchez-Vega i wsp. [211].

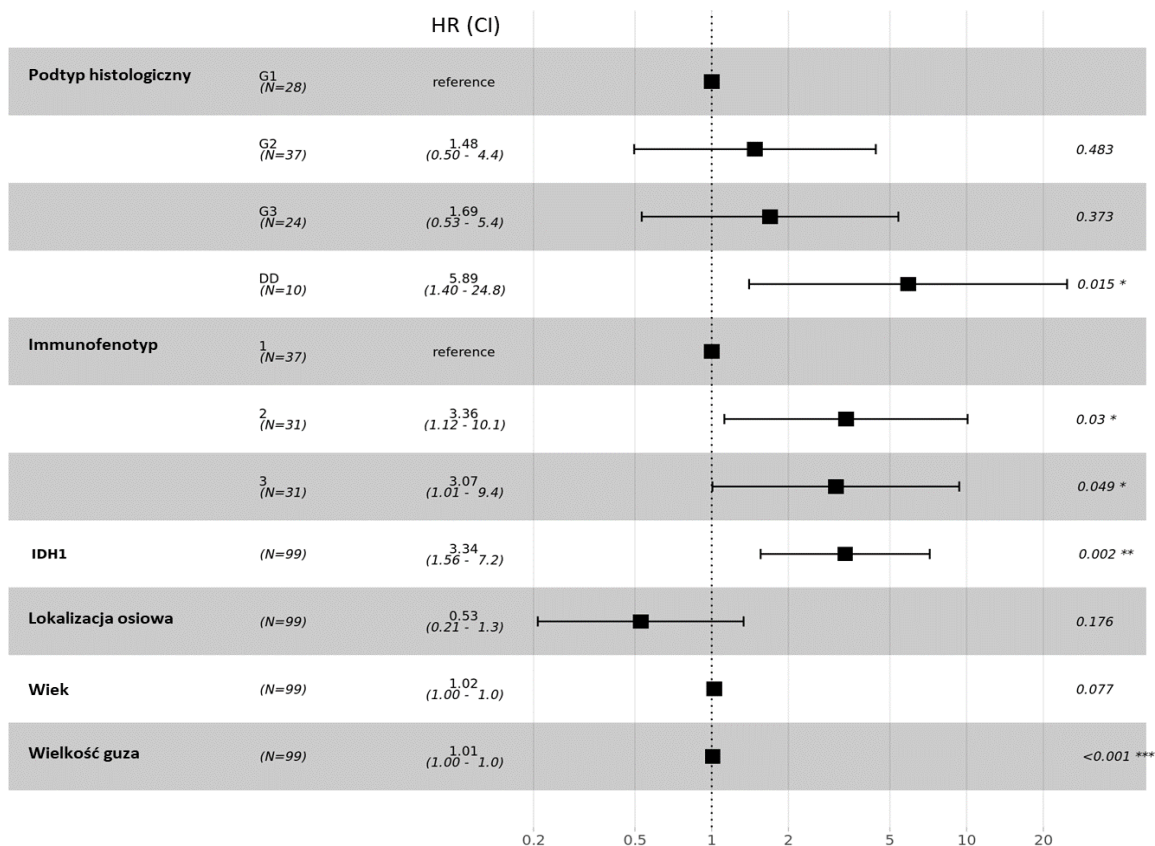
Udział zmian genetycznych związanych z czynnikami transkrypcyjnymi, czy modyfikacjami histonów był podobny we wszystkich immunofenotypach, jednak z przewagą CNV w immunofenotypie „gorącym” i „pośrednim” (Rycina 51). Mutacje *IDH1/2* znacząco przeważały u pacjentów o immunofenotypie „gorącym” i „pośrednim”, a w przypadku mutacji *IDH2* najczęściej związane były one z występowaniem immunofenotypu „gorącego”.



Rycina 51. Charakterystyka pięciu najczęściej deregulowanych ścieżek sygnałowych i zaangażowanych w nie genów z podziałem na immunofenotyp chłoniaka.

Z prawej strony wykresu przedstawiono częstość występowania poszczególnych genów oraz szlaków molekularnych deregulowanych w badanej populacji. Skrót: RTK - receptorowa kinaza tyrozynowa (ang. receptor tyrosine kinase). Podział genów na funkcję oparto o system zaproponowany przez Bailey'a i wsp. [212].

Na koniec analizy, dla pełnych danych dla 99 pacjentów, przeprowadzono wieloparametryczną analizę modelu Coxa penalizowanego LASSO (Rycina 52). Spośród wszystkich markerów immunologicznych znaczące okazało się jedynie występowanie określonych immunofenotypów w przeciwieństwie do pojedynczych markerów.



Rycina 52. Wieloczynnikowa analiza wpływu czynników klinicznych, molekularnych i immunologicznych na przeżycia całkowite pacjentów z rozpoznaniem chrzęstniakomięsaka. 1 – immunofenotyp „zimny”, 2 – „gorący”, 3 – „pośredni”. Skróty: DD - odróżnicowany chrzęstniakomięsak, HR - współczynnik ryzyka (ang. *hazard ratio*), CI - przedział ufności (ang. *confidence interval*). Gwiazdkami oznaczono wyniki istotne statystycznie *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Wieloparametryczna analiza wykazała, że poza wielkością guza i podtypem histologicznym ChS, istotny negatywny wpływ na przeżycia pacjentów z rozpoznaniem ChS miały także czynniki genetyczne i immunologiczne. Obecność immunofenotypu „gorącego” (HR: 3,3; CI: 1,13-9,8; p < 0,05) oraz występowanie mutacji w genie *IDH1* (HR: 3,8; CI: 1,75-8,1; p < 0,001) były niezależnymi, negatywnymi czynnikami prognostycznymi (Rycina 52).

5. Dyskusja

ChS należy do rzadkiej grupy nowotworów – mięsaków kości, stanowiącej około 0,5% złośliwych nowotworów [11]. ChS jest pierwotnym złośliwym nowotworem kości i stanowi heterogenną grupę nowotworów. Odsetki 5-letnich przeżyć u pacjentów z rozpoznaniem ChS wahają się od 99% do nawet 7%, zależnie od podtypu histologicznego [12,33]. Ze względu na oporność tych nowotworów na chemioterapię i radioterapię oraz brak innych efektywnych terapii, leczenie ogranicza się do resekcji chirurgicznej będącej standardem w leczeniu pacjentów z rozpoznaniem ChS [29,35].

Z uwagi na rzadkość występowania tych nowotworów, a tym samym brak dostępności materiału do badań, wciąż mało wiadomo na temat podłoża molekularnego ChS oraz udziału poszczególnych genów i szlaków molekularnych w rozwoju różnych podtypów ChS [72]. Tak samo niewiele jest prac dotyczących mikrośrodowiska i immunologii ChS [149–152], co wymaga dokładniejszych badań w tym zakresie. Dotychczasowe próby wykorzystania immunoterapii w tej grupie nowotworów nie dały satysfakcjonujących rezultatów [155,156]. Obecnie wiadomo, że znajomość podłoża molekularnego i złożoności zaburzeń genetycznych wraz z określeniem immunofenotypu nowotworów jest pomocna w przewidywaniu odpowiedzi na immunoterapię [162]. Stąd poznanie dokładnego podłoża immunologiczno-molekularnego ChS jest niezbędne dla zrozumienia dotychczasowych niezadowolających odpowiedzi na immunoterapię, a także może pomóc w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych.

Celem prezentowanej pracy było opracowanie systemu klasyfikacji pacjentów z rozpoznaniem ChS, w oparciu o ocenę czynników immunologicznych, zmian genetycznych oraz wyników leczenia pacjentów, który mógłby pomóc w selekcji pacjentów, mogących odnieść potencjalną korzyść z terapii celowanych, w tym immunoterapii.

5.1. Ocena prognostycznych czynników klinicznych u pacjentów z rozpoznaniem chrzęstniakomięsaka

Analiza jednoczynnikowa wykazała, że istotny statystycznie ($p < 0,05$) negatywny wpływ na OS i DFS u pacjentów z rozpoznaniem ChS miały: większy rozmiar guza, wyższy wiek pacjenta, wystąpienie złamania patologicznego, lokalizacja w obrębie kończyn (górnej

lub dolnej), a także wyższy stopień złośliwości histologicznej. Z kolei w analizie wieloczynnikowej niezależnymi negatywnymi czynnikami prognostycznymi, istotnie wpływającymi na OS i DFS u pacjentów z rozpoznaniem ChS, był podtyp histologiczny oraz wielkość guza. Dodatkowo wyższy wiek wpływał na gorsze OS u tych pacjentów, a lokalizacja nowotworu w obrębie kończyny dolnej na niższy odsetek DFS.

Uzyskane wyniki są zgodne z dotychczasowymi badaniami oceniającymi czynniki prognostyczne w ChS [55,214–217]. W badaniu prowadzonym na prawie 780 pacjentach z rozpoznaniem ChS (z lokalizacją w obrębie klatki piersiowej), wieloczynnikowa analiza wykazała, że wiek > 40 lat, obecność przerzutów, zastosowanie radioterapii oraz wyższy stopień złośliwości histologicznej były związane z gorszym OS [215]. W innym badaniu, przeprowadzonym na grupie 472 pacjentów z rozpoznaniem ChS w obrębie miednicy, analiza wieloczynnikowa wykazała, że wyższy stopień złośliwości histologicznej oraz obecność przerzutów są negatywnymi czynnikami rokowniczymi [216]. Z kolei w badaniu przeprowadzonym przez Crossa i wsp. także zaobserwowano najgorsze rokowanie u pacjentów z rozpoznaniem centralnego ChS w obrębie kończyny dolnej, chociaż nie były to różnice istotne statystycznie [217].

Pośród wszystkich analizowanych czynników największe znaczenie miał podtyp histologiczny, który zgodnie z obecną wiedzą determinuje przeżycie u pacjentów z rozpoznaniem ChS [12,33]. W przeprowadzonej analizie odsetek 3-letnich OS wynosił zaledwie 11,4% u pacjentów z rozpoznaniem DDCS oraz 40,7% u pacjentów z rozpoznaniem ChS G3, podczas gdy u chorych z rozpoznaniem ChS G2 i G1 było to odpowiednio 77,3% i 91,3%. Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami uzyskanymi poprzednio w naszym Zespole [55]. Ponadto w pracy wykazano, że wielkość guza oraz podtyp histologiczny ChS są niezależnymi negatywnymi czynnikami prognostycznymi wpływającymi zarówno na OS, jak i DFS pacjentów z rozpoznaniem ChS.

Z uwagi na ogromną rolę podtypu histologicznego jako czynnika determinującego przeżycia pacjentów z rozpoznaniem ChS [12,33], kluczowe w dalszych analizach było wytypowanie potencjalnych czynników, mogących mieć niezależne znaczenie w tych nowotworach.

5.2. Ocena profilu molekularnego chrzęstniakomięsaka

Wyniki z sekwencjonowania metodą Sangerą potwierdziły obecność artefaktów w NGS z wykorzystaniem technologii Ion Torrent™, które pierwotnie nie zostały wykryte w analizie bioinformatycznej (zarówno w oprogramowaniu komercyjnym, jak i własnej analizie). Głównym artefaktem, wykrytym w ponad 50% próbek dla tkanek zdrowych i nowotworowych była mutacja w genie *HNF1A* (c.864del, p.Pro291fsTer51). Innym częstym artefaktem tego samego rodzaju była delecja w genie *NOTCH4* (c.1044del, p.Gly349AlafsTer49). Sekwencjonowanie metodą Sangerą wykazało częstą dla zastosowanej technologii grupę błędów w regionach homopolimerowych (niepoprawnie klasyfikowanych jako indele, zamiast substytucji) [187,218]. Na tej podstawie wykluczono większość wykrytych w NGS wariantów klasyfikowanych jako delecje, które obecne były także w tkance zdrowej. W sumie z analizy wykluczono około 300 takich wariantów dla wszystkich 99 próbek. Z drugiej strony sekwencjonowanie metodą Sangerą tkanek zdrowych pozwoliło wykryć dodatkowe polimorfizmy populacyjne. Jednym z nich był wariant genu *RNF213* (p.Leu4649Val), który okazał się być łagodny według bazy dbSNP (rs61745599). Z kolei wykryty wariant genu *CSMD3* (p.Tyr1575Asp) nie został do tej zidentyfikowany, jednak z uwagi na wykrycie go w tkance zdrowej i nowotworowej, także został wykluczony z dalszej analizy.

Pomimo, że do oceny profilu genetycznego wybrano panel genetyczny dedykowany do analizy niesparowanej tkanki nowotworowej, walidacja metodologii z wykorzystaniem próbek zdrowych oraz wykorzystanie sekwencjonowania metodą Sangerą okazały się niezbędne dla przeprowadzenia końcowej analizy wyników z NGS. Zastosowanie dodatkowej kontroli w postaci tkanki zdrowej umożliwiło wykrycie błędów wynikających z ograniczenia samej technologii użytej do sekwencjonowania i w dużym stopniu zniwelowało ryzyko wystąpienia potencjalnych artefaktów. Przeprowadzona w tej pracy analiza i napotkane trudności w selekcji wariantów dowodzą, że prawidłowe wykrycie wariantów somatycznych bez analizy sparowanych tkanek zdrowych (w celu usunięcia wariantów germinalnych) nie jest możliwe, co jest zgodne z danymi literaturowymi [189,219]. Z tego względu zidentyfikowane w niniejszej pracy warianty należy traktować jako potencjalnie somatyczne. Należy mieć na uwadze, że pomimo zastosowania wszelkich dostępnych sposobów selekcji i filtracji wariantów (opisanych szerzej w metodyce), mających na celu zniwelowanie błędów w identyfikacji wariantów, część wariantów mogło mieć podłoże germinalne.

W przeprowadzonym badaniu nie wykazano MSI w żadnej z badanych próbek. Potwierdzają to dotychczasowe badania na mięsakach kości, które rzadko wykazywały MSI [168,220,221]. W badaniu przeprowadzonym na ponad 200 pacjentach z rozpoznaniem ChS o różnych podtypach histologicznych u żadnego pacjenta nie wykryto nieprawidłowości w systemie MMR [168]. W innym badaniu przeprowadzonym na materiale od 149 pacjentów z rozpoznaniem klasycznego ChS, MCS lub DDCS także nie wykryto MSI w żadnej z próbek [222]. Uzyskane wyniki sugerują, że nieprawidłowości w systemie MMR i związana z nimi MSI może nie mieć znaczącego udziału w powstawaniu zmian genetycznych w tych nowotworach. Nie wyklucza to natomiast udziału innych systemów naprawy DNA związanych ze szlakiem DDR np. powiązanych z genami *POLE* czy *TP53* [159,223]. Mutacje *POLE* zostały wykryte u pacjentów z mięsakiem Ewinga, nawet u 50% pacjentów [224], jednak pojedyncze przypadki zostały zaobserwowane także w ChS [57,225], czy w kostniakomięsaku [226]. Z kolei mutacje *TP53* są często obserwowane u chorych na ChS (20% do nawet 50% przypadków) [36,56,57].

Mediana TMB w badanej grupie pacjentów z rozpoznaniem ChS wynosiła 2,35 mut/Mb. Wartości TMB dla poszczególnych próbek wahały się jednak od 0 do nawet 33,5 mut/Mb, co znacznie zwiększało średnie TMB ogółem (4,21 mut/Mb). TMB w analizowanej grupie było więc niskie, podobnie jak w wynikach uzyskanych przez Cote i wsp. [89], czy w badaniu Zhu i wsp., gdzie mediana niesynonimicznych SNV na próbkę wynosiła 2 [54]. Najwyższe wartości TMB uzyskane dla 3 próbek tj. powyżej 20 mut/Mb, były efektem podwyższonej spontanicznej deaminacji, którą wykazało oprogramowanie IR. Dla tych próbek zastosowano zaokrąglone parametry filtracji (opisane szerzej w metodyce), natomiast niewątpliwie przyczyniło się to do zawyżonych wyników TMB dla tych próbek. Z drugiej strony, dla 5 próbek z TMB powyżej 10 mut/Mb nie zaobserwowano deaminacji podwyższonej w stosunku do pozostałych próbek. Pozwala to stwierdzić, że część próbek faktycznie miała wysokie TMB, o najwyższej wartości równej 16,47 mut/Mb. Sporadyczne przypadki TMB powyżej 10 mut/Mb w komórkach klasycznego ChS oraz DDCS były obserwowane także w innych badaniach [5,57,222,227].

Dominującą substytucją nukleotydów, w prezentowanej analizie, była podmiana C>T, a w dalszej kolejności T>C, co jest zgodne z dotychczasowymi badaniami oceniającymi sygnatury mutacyjne w komórkach ChS [54,93,217]. Jest to także najczęściej obserwowana sygnatura mutacyjna w innych nowotworach m.in. w czerniaku, czy

kostniakomięsaku [228]. W związku z tym, w przypadkach o wyższym TMB i podwyższonym stopniu deaminacji, nie można było dokładnie określić która, ze stwierdzonych zmian wynikała z nieprawidłowej deaminacji, a która była prawidłowa. Zastosowany w pracy zaostrożony sposób selekcji wariantów (zgodnie z rekomendacją producenta) dla próbek o nieznacznie podwyższonym stopniu deaminacji (ale mieszczącym się w granicach normy), miał na celu zminimalizowanie ryzyka błędu wykrycia nieprawidłowych wariantów. W przypadku 3 wspomnianych próbek (o najwyższych wartościach TMB) wynik ten mógł być jednak lekko zawyżony.

Pomimo, że w prezentowanej pracy TMB nie różniło się istotnie pomiędzy podtypami histologicznymi ChS, DDCS charakteryzował się większą liczbą mutacji w stosunku do innych podtypów ChS. Podobną zależność zaobserwowano w badaniu przeprowadzonym przez Wagnera i wsp. na 149 pacjentach z rozpoznaniem ChS, gdzie mediana TMB w przypadku DDCS była wyższa niż w klasycznym ChS, chociaż wartości TMB dla DDCS nie przekraczały 5 mut/Mb [222]. W badaniu prowadzonym przez Tarpeya i wsp. zaobserwowano z kolei 2-krotnie większą liczbę mutacji w podtypach G2, G3 oraz DDCS w stosunku do ChS G1 [57]. Pomimo że przeprowadzona w niniejszej pracy analiza nie wykazała tak znaczących różnic pomiędzy poszczególnymi podtypami histologicznymi ChS, to zaobserwowano tendencję do zwiększonej akumulacji mutacji w podtypach o wyższym stopniu złośliwości histologicznej. Było to także widoczne w przypadku przeprowadzonej analizy wariantów strukturalnych (CNV), gdzie najwięcej zmian, dotyczących zarówno delecji, jak i amplifikacji, zaobserwowano u pacjentów z rozpoznaniem ChS G2 i G3. Podobną tendencję zaobserwowano w badaniu przeprowadzonym na 54 przypadkach centralnych ChS i DDCS, w którym ChS o wysokim stopniu złośliwości i DDCS miały większą liczbę zmian genomowych niż ChS o niskim stopniu złośliwości [54]. Uzyskane wyniki mogą wyjaśniać bardziej agresywny przebieg podtypów G2/G3 i DDCS.

Wśród najczęstszych mutacji zidentyfikowanych w badanej grupie pacjentów z użyciem NGS były mutacje w genach *IDH1* i *IDH2* (obejmujące odpowiednio 28% i 13% przypadków) oraz *TP53* (występujące u 16% przypadków). Frekwencja występowania tych genów była zbliżona do tej obserwowanej w literaturze [5,54,55,57,217]. Warianty genu *IDH1* obejmowały opisywane dotąd mutacje zmiany sensu w pozycji p.R132C/G/L/S/F/Q [55,57,217,229,230], ale także nieopisywany dotąd w ChS wariant V71A. W przypadku

genu *IDH2* zidentyfikowano znane dotąd warianty R172/G/S/M [55,57,229]. Warianty R132/C/G (*IDH1*) oraz R172M/S (*IDH2*) zostały dodatkowo potwierdzone za pomocą sekwencjonowania metodą Sanger.

W przypadku genu *TP53* zaobserwowano pojedyncze mutacje w sekwencji kodującej w 14 pozycjach, z czego w 2 pozycjach (p.R135 i p.R248) wykryto po 2 różne warianty genetyczne. Dla 2 próbek zaobserwowano delecje ze zmianą ramki odczytu i terminacją łańcucha aminokwasowego. Pozostałe zmiany obejmowały mutacje zmiany sensu, z których 12 z 14 wariantów zostały sklasyfikowane według „The *TP53* Database” jako mutacje utraty funkcji białka [231]. Dodatkowo w przypadku 1 pacjenta zidentyfikowano wariant strukturalny w postaci utraty genu *TP53*.

Wśród innych często ulegających mutacjom genów w badanej grupie pacjentów z rozpoznaniem ChS (powyżej 10% przypadków) były *RNF213* (12%), *TAF1* (11%) oraz *MN1* (10%). Choć geny te nie były dotąd opisywane w kontekście ChS, nie można wykluczyć ich udziału w rozwoju tych nowotworów. Gen *RNF213* koduje ligazę ubikwityny tzn. enzym E3, który degraduje m.in. jądrowy czynnik 1 aktywowanych limfocytów T (NFAT1, ang. *nuclear factor of activated T cells*), który z kolei poprzez aktywację MDM2 bierze udział w degradacji p53 [232]. Ponadto *RNF213* jest zaangażowany w niekanoniczny szlak Wnt zależny od jonów wapnia związany z nowotworzeniem np. poprzez kontrolowanie procesu proliferacji, apoptozy, czy migracji komórek [232,233]. Kolejny gen, *TAF1* jest czynnikiem transkrypcyjnym posiadającym aktywność acetylotransferazy histonowej (HAT, ang. *histone acetyltransferases*), a także poprzez zdolność do fosforylacji przyczynia się do stabilizacji białka p53 [234]. Z kolei *MN1* jest genem o mało znanej funkcji. Niektóre badania sugerują jego udział w rozwoju kości poprzez zaangażowanie w prawidłowy wzrost i różnicowanie osteoblastów [235,236]. Z uwagi na to, że w trakcie wzrostu ChS dochodzi do zaburzenia równowagi między osteoblastami i osteoklastami oraz w dalszej kolejności degradacji kości [237], mutacje genu *MN1* także mogą mieć znaczenie w rozwoju ChS.

Przeprowadzona analiza występowania mutacji w poszczególnych genach w różnych podtypach histologicznych ChS wykazała istotne różnice (FDR <0,05) tylko dla genów *IDH1*, *IDH2* oraz *TP53*. Mutacje w genie *IDH1* dotyczyły wszystkich podtypów ChS, jednak były znacząco częściej obserwowane u pacjentów z rozpoznaniem ChS G3. Z kolei mutacje *IDH2* nie występowały u pacjentów z rozpoznaniem ChS G1, a ich największą

liczbę zaobserwowano w przypadkach DDCS. Współwystępowanie mutacji *IDH1* oraz *IDH2* zaobserwowano u jednego pacjenta z rozpoznaniem DDCS. Podobne wyniki uzyskano we wcześniej prowadzonym przez nasz Zespół badaniu na 80 pacjentach z rozpoznaniem ChS, gdzie mutacje *IDH1/2* były obecne u 21% pacjentów z rozpoznaniem ChS G1, 39% z rozpoznaniem ChS G2 oraz 44% z rozpoznaniem ChS G3 [55]. Również w badaniu przeprowadzonym przez Setola i wsp. mutacje genu *IDH* występowały częściej w przypadkach ChS G3 w porównaniu do G2 [229]. Z kolei badanie Wagnera i wsp. także zidentyfikowało większy udział mutacji *IDH2* w DDCS w porównaniu do klasycznego ChS (odpowiednio u 38,7% i 5,8% pacjentów) [222]. Z drugiej strony, w badaniu przeprowadzonym na grupie 350 pacjentów z rozpoznaniem ChS nie zaobserwowano istotnych różnic w występowaniu mutacji *IDH1* pomiędzy podtypami o niskim i wysokim stopniu złośliwości histologicznej. Badacze wykazali natomiast istotnie większy udział mutacji *IDH2* w podtypach G2/G3 i DDCS w porównaniu do G1 [217]. Uzyskane wyniki sugerują, choć mutacje *IDH* są szeroko rozpowszechnione w ChS, mogą mieć one różne znaczenie w rozwoju poszczególnych podtypów histologicznych i dalszej progresji nowotworu. Jedną z dotychczasowych hipotez zakłada, że mutacje *IDH* są wczesnym zdarzeniem w rozwoju ChS, odpowiedzialnym za jego progresję od niskiego do wysokiego stopnia złośliwości histologicznej, zwłaszcza w kierunku DDCS [229,238]. Z drugiej strony, badania epigenetyczne pokazują, że podtypy ChS o mniejszej złośliwości mają inny profil metylacji w porównaniu do bardziej złośliwych ChS (szczególnie w kontekście klasycznego ChS i DDCS). Profile metylacji różnią się także zależnie od występowania mutacji *IDH1* lub *IDH2*, co może wpływać na rozwój *de novo* bardziej złośliwej formy ChS [217,238,239].

Występowanie mutacji *TP53* zaobserwowano głównie w podtypach ChS G3 i DDCS oraz w kilku przypadkach ChS G2. Mutacje *TP53* nie były z kolei obecne w ChS o niższym stopniu złośliwości (G1). Ponadto wszystkie wykryte w tej pracy delecje genu *TP53*, zarówno w formie utraty genu, jak i delecji pojedynczych nukleotydów, wykryto jedynie w ChS G3. Podobnie jak w przypadku mutacji *TP53*, w ChS G1 nie wykryto mutacji w innym genie supresorowym - *RB1*. Utraty genu *RB1* i mutacje zmiany sensu oraz pojedynczą mutację nonsensowną wykryto odpowiednio w przypadkach ChS G2 oraz G3. Mutacja w tym genie była także obecna w jednym przypadku DDCS. Uzyskane wyniki potwierdzają dotychczasowe badania, które sugerują, że mutacje *TP53*, a także *RB1* są późnym zdarzeniem w rozwoju ChS i mogą mieć udział w progresji tych nowotworów [54,57,68,240].

Ocena zależności pomiędzy poszczególnymi genami wykazała istotne współwystępowanie mutacji m.in. we wspomnianych wcześniej genach *IDH1* i *TP53* ($p < 0,01$), ale także w *IDH1* i *UBR5* ($p < 0,01$), *IDH2* i *PTCH1*, *TP53* i *MN1* ($p < 0,01$) oraz *TP53* i *UBR5* lub *TP53* i *EXT2* ($p < 0,05$). Współwystępowanie mutacji *IDH1/2* oraz *TP53* zaobserwowano w podtypach o wyższym stopniu złośliwości (DDCS lub G2/G3) w kilku innych pracach [54,238]. Może to potwierdzać przytoczoną wcześniej hipotezę o udziale mutacji *IDH* w progresji ChS. Istotna korelacja wspomnianych genów z *UBR5* (kodującego białkowy komponent ligazy ubikwityny, biorącej udział w procesie ubikwitynacji białek i bezpośrednio lub pośrednio w kontroli cyklu komórkowego [241]), może sugerować rolę procesu ubikwitynacji w rozwoju ChS.

Z drugiej strony zaobserwowano istotne współwystępowanie mutacji *IDH2* z *PTCH1* ($p < 0,01$). Co ciekawe, mutacje *PTCH1* występowały jedynie w podtypach o wyższym stopniu złośliwości histologicznej, podobnie jak w badaniu przeprowadzonym przez Tarpeya i wsp. [57]. Badania te sugerują możliwy udział szlaku Hedgehog nie tylko we wczesnych fazach rozwoju ChS [65], ale i w progresji ChS.

Analiza funkcjonalna wykrytych genów wykazała, że najczęściej deregulowanymi szlakami sygnałowymi, zidentyfikowanymi na podstawie podziału zaproponowanego w dwóch pracach [211,212], były RTK-RAS, PI3K, NOTCH oraz szlak związany z białkiem p53. Często obserwowano także geny zaangażowane w procesy epigenetyczne (modyfikacje chromatyny przez białka histonowe oraz remodelowanie chromatyny przez kompleks SWI/SNF), a także geny kodujące czynniki transkrypcyjne.

Deregulacja szlaku związanego z RTK została zidentyfikowana w obu wykorzystanych klasyfikacjach u 21-44% pacjentów i występowała we wszystkich podtypach ChS, z przewagą w ChS G2 i DDCS. Badanie przeprowadzone na kohorcie 75 pacjentów z mięsakami kości, w tym 7 z rozpoznaniem ChS i 34 z rozpoznaniem kostniakomięsaka, wykazało że wzbogaceniu uległy geny związane w największym stopniu z procesami pozytywnej regulacji aktywności kinaz oraz ze szlakiem PI3K-AKT [227]. Wyniki te potwierdzają możliwą rolę wspomnianych szlaków w patogenezie ChS. W pracy zaobserwowano także częstsze występowanie zmian genomowych (CNV) w podtypach o wyższym stopniu złośliwości histologicznej np. amplifikacje *BRAF*, *MET*, *NTRK1* w ChS G2, delecja *FLT3* i amplifikacje *MAP2K2*, *AKT2*, *MYC* i *FGFR1* w ChS G3, a także

amplifikacje *KIT*, *FGFR1* i *PGDFRA* w DDCS. Wymienione geny są zaangażowane w szlak RTK/RAS/MAPK/ERK, ale także w dużej części uczestniczą w szlaku PI3K-AKT [242–244], który z kolei, zidentyfikowano nawet w 19% przypadków w badanej grupie pacjentów. Może to sugerować udział wyżej wymienionych szlaków w progresji ChS i przyczyniać się do bardziej agresywnego przebiegu choroby w tych podtypach. Podobny rozkład mutacji zaprezentowano w badaniu na grupie 54 pacjentów z rozpoznaniem ChS. Przeprowadzona tam analiza wykazała obecność mutacji w genach receptorów błonowych odpowiedzialnych za sygnalizację komórkową i zaangażowanych m.in. w szlak RTK-RAS, czy PI3K-AKT (*FGFR1*, *FGFR3*, *IGF1R*, *KIT* oraz *PTEN*) w podtypach o wyższym stopniu złośliwości histologicznej. Dodatkowo w tym samym badaniu mutacja *KIT* była obecna jedynie w podtypie DDCS [54], tak jak w tej pracy. W innym badaniu wykazano, że obecność amplifikacji m.in. genów *MET* lub *MYC* negatywnie wpływała na OS w grupie pacjentów z mięsakami kości [227], co może mieć wpływ na złe rokowania pacjentów z rozpoznaniem ChS G2/G3, u których zidentyfikowano amplifikacje w tych genach.

Poza szlakami związanymi z receptorami wzrostu i proliferacji komórek, 40% pacjentów miała deregulacje związane z procesem metabolizmu komórkowego. Było to jednak związane jedynie z obecnością mutacji w genach *IDH1/2*, które jak już opisano dominowały w badanej grupie pacjentów z rozpoznaniem ChS. Poza zaburzeniami metabolizmu komórkowego, u ponad 20% pacjentów zaobserwowano deregulacje szlaku p53 oraz mutacje w genach związanych z zachowaniem integralności genomowej i systemami naprawy DNA, a także w nawet 15% przypadków deregulacje w procesie regulacji cyklu komórkowego. Zaburzenia szlaków związanych z integralnością genomową oraz szlakiem p53, z uwagi na mutacje *TP53*, występowały głównie u pacjentów z rozpoznaniem ChS G3. Zbliżony udział mutacji *TP53* (w 20% przypadków ChS) zaobserwowano w kilku innych pracach [54,57]. Chociaż geny zaangażowane w regulację cyklu komórkowego, w tym genu *RB1*, dotyczyły już w tych badaniach nawet 32-33% pacjentów. W prezentowanej pracy występowanie mutacji w genach *RB1* oraz *TP53* także było związane z podtypami o wyższych stopniach złośliwości, co potwierdza dotychczasową hipotezę o udziale szlaków p53 i pRb w progresji ChS [65,68,73,245].

Innymi często deregulowanymi na poziomie molekularnym procesami w badanej grupie pacjentów były modyfikacje epigenetyczne, obejmujące przebudowę chromatyny przez białka histonowe (28% przypadków) oraz remodelowanie chromatyny przez kompleks SWI/SNF (18% przypadków). Zmiany w procesach epigenetycznych występowały

w przeważającej części w ChS G2, chociaż obserwowano je we wszystkich podtypach ChS. W badaniu przeprowadzonym na materiale pochodzącym od 41 pacjentów z rozpoznaniem klasycznego ChS i 14 pacjentów z rozpoznaniem DDCS, aberracje szlaków epigenetycznych zaobserwowano ogółem u 43% pacjentów. Co ciekawe, badacze wykazali, że w przypadkach klasycznego ChS zaburzenia te dotyczyły głównie procesów modyfikacji histonów i kompleksu SWI/SNF, a w przypadku DDCS także metylacji DNA (choć u pacjentów z rozpoznaniem DDCS procent genetycznych aberracji był ogółem większy) [4]. Biorąc pod uwagę obserwowaną w ChS metylację, związaną m.in. z mutacjami *IDH* i nadprodukcją 2-HG [45,46,246] oraz w świetle przedstawionych badań, procesy epigenetyczne związane z remodelowaniem chromatyny i modyfikacjami histonów zdają się mieć istotną rolę w patogenezie ChS. Udział procesów epigenetycznych w rozwoju ChS może też potwierdzać zaobserwowana w pracy korelacja pomiędzy występowaniem mutacji w genach *EXT2* lub *AKT2* z mutacjami w genach odpowiedzialnych za procesy epigenetyczne np. *KMT2C*, *SETD2* (kodujących metylotransferazy [247,248]), czy *CREBBP* (kodującego acetylotransferazę [249]).

Często deregulowaną grupą genów były także te kodujące czynniki transkrypcyjne i stanowiące 21% przypadków, na co wpływ miały często obserwowane w badanej grupie pacjentów mutacje genu *TAF1*. We wcześniej wspomnianym badaniu na kohorcie 75 pacjentów z mięsakami kości także wykryto udział genów zaangażowanych w aktywność czynników transkrypcyjnych wiążących DNA [227].

Przeprowadzona na koniec jednoczynnikowa analiza wykazała, że spośród wszystkich analizowanych genów istotny negatywny wpływ na OS pacjentów z rozpoznaniem ChS miała mutacja w tylko 4 genach: *IDH1* i *TP53* (FDR <0,01) oraz *EPHA7* i *PTCH1* (FDR <0,05).

Dla pacjentów z mutacją *IDH1* odsetek 5-letnich przeżyć był prawie 2 razy niższy niż dla pacjentów bez tej mutacji. Chociaż rola mutacji *IDH1* jako czynnika prognostycznego jest wciąż kontrowersyjna [45], część dotychczasowych badań potwierdza otrzymany w tej pracy wynik. Przykładowo w prowadzonym wcześniej w naszym Zespole badaniu wykazano, że 5-letni OS u pacjentów z rozpoznaniem ChS z mutacjami *IDH1/2* był istotnie niższy w porównaniu do pacjentów bez tych mutacji (64% vs. 93%, $p < 0,001$) [55]. Mutacje *IDH1* (obejmujące wariant R132) były też negatywnym czynnikiem prognostycznym w innym badaniu z udziałem 22 pacjentów z rozpoznaniem klasycznego

ChS G1, G2 lub G3 oraz 1 pacjentce z rozpoznaniem DDCS. 2-letni OS był krótszy u pacjentów z mutacją *IDH1* niż bez (75% vs. 100%, $p=0,002$), podobnie jak 2-letni RFS (70% vs. 100%, $p=0,02$), czy 2-letni MFS (33% vs. 100%, $p=0,001$). Ponadto badacze wykazali niższy odsetek OS u pacjentów z rozpoznaniem ChS G2 z wariantem R132 (*IDH1*) ($p=0,04$) [250]. Z kolei w innym badaniu, analiza ponad 240 pacjentów z rozpoznaniem ChS o wyższym stopniu złośliwości wykazała, że częstość występowania przerzutów/nawrotu choroby była znacząco niższa u pacjentów z rozpoznaniem ChS G2/3 z mutacjami *IDH2* w porównaniu do tych z mutacją *IDH1* lub brakiem mutacji [217].

Z drugiej strony, w jednym z badań dotyczącym 79 pacjentów z rozpoznaniem ChS wykazano istotny związek pomiędzy występowaniem mutacji *IDH1/2* u pacjentów z rozpoznaniem ChS G2/G3, a dłuższym RFS ($p < 0,003$) i MFS ($p < 0,013$) [54]. Z kolei w trzech innych badaniach nie wykazano istotnego wpływu mutacji *IDH* na przeżycia pacjentów z rozpoznaniem ChS. W pierwszym z nich, przeprowadzonym na grupie 54 pacjentów, nie wykazano istotnej różnicy zarówno w 5-letnim OS pacjentów z rozpoznaniem ChS G2/G3, ani w innych ocenianych parametrach - RFS i PFS [229]. Drugie z badań dotyczyło grupy 74 pacjentów z rozpoznaniem centralnego ChS i wykazało brak istotnych różnic w przeżyciu swoistym dla choroby (DSS, ang. *disease specific survival*) u pacjentów z mutacjami *IDH1/2* (R132C, R132H, R132G, R132L, R132S, R172S), w porównaniu z pacjentami bez tych mutacji [51]. W ostatniej pracy dotyczącej kohorty 93 pacjentów z rozpoznaniem klasycznego ChS lub DDCS przeprowadzona jednoczynnikowa i wieloczynnikowa analiza nie wykazała istotnego wpływu mutacji *IDH* na przeżycia pacjentów z rozpoznaniem ChS [66]. W tym samym badaniu wykazano natomiast istotny negatywny wpływ mutacji *TP53* na przeżycia pacjentów, zarówno w przypadku OS, jak i MFS (w analizie jednoczynnikowej i wieloczynnikowej). Dodatkowo mutacja *TP53* była związana z wyższym ryzykiem nawrotu po operacji (mającej na celu wyleczenie) oraz gorszym przeżyciem wśród pacjentów, u których wystąpiła choroba z przerzutami *de novo* [66].

Dotychczasowe badania potwierdzają wyniki uzyskane w tej pracy. Odsetki 5-letniego OS dla pacjentów z mutacją *TP53* i bez niej różniły się znacząco i wynosiły odpowiednio 21% i 61%. Z drugiej strony, wpływ na to mogło mieć występowanie mutacji *TP53* głównie u pacjentów z rozpoznaniem ChS G3 lub DDCS, rokujących najgorzej. Pomimo tego, otrzymane wyniki potwierdzają aktualne doniesienia na temat potencjalnego

wpływu mutacji *IDH1* lub *TP53* jako negatywnych czynników prognostycznych u pacjentów z rozpoznaniem ChS.

Przeprowadzona analiza wykazała ponadto, że u pacjentów z mutacjami w genach *EPHA7* lub *PTCH1* nie osiągnięto 3-letniego OS, podczas gdy odsetki 5-letnich OS u pacjentów bez tych zmian wynosiły 57%. Gen *EPHA7* koduje białko należące do RTKs i jest zaangażowany w szlaki związane z procesem nowotworzenia, m.in. PI3K-AKT [251,252]. Co ciekawe, jedna z mutacji *EPHA7* wykryta u pacjenta z rozpoznaniem DDCS dotyczyła kodonu „STOP”, które były nieliczne w przeprowadzonej analizie. Uzyskane wyniki dla genów *PTCH1* i *EPHA7* zdają się być unikatowe dla niniejszej pracy; chociaż wpływ na to ponownie mógł mieć fakt, że mutacje w tych genach związane były z występowaniem podtypów ChS o wyższym stopniu złośliwości (G2/G3 oraz DDCS), podobnie jak zaobserwowano to w innych badaniach [54,57]. Mimo to w pracy udało zidentyfikować się nowe potencjalne czynniki prognostyczne, mogące mieć znaczenie m.in. w diagnostyce ChS lub jako przyszłe cele terapeutyczne. Dodatkowo potwierdzono istniejące doniesienia na temat mutacji *TP53* czy części badań na temat mutacji *IDH1*.

5.3. Ocena profilu immunologicznego chrzęstniakomięsaka

Oceny nacieków komórek immunologicznych dokonano na podstawie barwień IHC. Zastosowanie tej metody zamiast barwień immunofluorescencyjnych, wiązało się jednak z pewnymi ograniczeniami. Praca na kilku skrawkach, osobnych dla poszczególnych barwień, uniemożliwiła ocenę koekspresji poszczególnych markerów na pojedynczych komórkach. W związku z tym charakterystyka komórek immunologicznych w tej pracy została przedstawiona w oparciu o pojedyncze markery na ich powierzchni, co daje uogólniony obraz nacieków immunologicznych.

W prezentowanej analizie komórki CD45+, HLA-DR+, CD14+, CD68[PGM]+, CD163+ oraz Gal-9+ stanowiły najliczniejszą grupę wśród nacieków immunologicznych występujących u pacjentów z rozpoznaniem ChS. Poza makrofagami M2 (CD163+), pozostałe komórki dominowały w obwodowym regionie guza, chociaż nie były to różnice istotne statystycznie (z wyjątkiem komórek CD45+). W mniejszym stopniu obserwowano limfocyty CD3+, CD8+ CD4+ i TIM-3+, które także dominowały na obrzeżach guza (istotne różnice zaobserwowano jedynie dla limfocytów CD4+). Ilość makrofagów M2 CD68[KP1]+ była najmniejsza w stosunku pozostałych grup makrofagów.

Większy udział TAMs w TME w stosunku do limfocytów był obserwowany w wielu mięsakach, w tym także w mięsakach kości [148]. W badaniu Richerta i wsp. [149], z udziałem 27 pacjentów z rozpoznaniem ChS G1-G3 oraz 49 pacjentów z rozpoznaniem DDCS, TAMs o fenotypie M2 (komórki CD163+) stanowiły najliczniejszą grupę, chociaż ich lokalizacja w przypadku klasycznego ChS ograniczała się do obrzeża guza. Z kolei w przypadku DDCS makrofagi lokalizowały się także w centralnej części (zwłaszcza CD68+ TAMs) [149]. Lokalizację TAMs (CD163+) na obwodzie guza zaobserwowano także w innym badaniu z udziałem 26 pacjentów z rozpoznaniem ChS G1-G3 [150]. Z drugiej strony, jedno z badań przeprowadzone na materiale pochodzącym od 21 pacjentów z rozpoznaniem ChS G1-G3 wykazało, że makrofagi i monocyty nie były tak liczne w TME tych nowotworów, a TAMs o fenotypie CD68+ były rzadko obserwowane. Autorzy zasugerowali, że udział TAMs w mikrośrodowisku ChS może być mniejszy w stosunku do kostniakomięsaka [253].

Zaobserwowane w tej pracy zagęszczenie limfocytów (CD3+, CD4+, CD8+) w obwodowym regionie guza była już identyfikowana w badaniach dotyczących ChS G1-G3; w przypadku DDCS autorzy tych samych badań identyfikowali TILs również w centralnym regionie guza [149,150]. W innym badaniu, ChS G2/G3 charakteryzowały się znacznie większą liczbą limfocytów T CD8+ w porównaniu do ChS G1. Ponadto badacze wykazali, że zidentyfikowane limfocyty CD8+ prezentowały fenotyp „wyczerpania”, m.in. poprzez koekspresję markerów TIM-3, czy PD-1 [253]. Pozostałe limfocyty B, czy Tregs ogrywały w prezentowanych wynikach dużą mniejszą rolę, co zaobserwowano także w innych pracach dotyczących ChS [253,254].

Dane na temat innych obserwowanych licznie w tej pracy markerów (HLA-DR, CD14) w ChS są nieliczne. W badaniu Inagaki’ego i wsp., przeprowadzonym na 56 pierwotnych mięsakach kości, poza komórkami CD68+ autorzy zidentyfikowali wśród TAMs także komórki CD14+, które wraz limfocytami T CD3+ były głównymi składowymi odpowiedzi zapalnej [254]. Udział tych komórek oraz komórek immunologicznych ogółem (ocenianych jako komórki CD45+) w ChS był jednak niższy niż np. w kostniakomięsaku [254]. Z drugiej strony, wspomniane wcześniej badanie przeprowadzone na materiale od 21 pacjentów z rozpoznaniem ChS G1-G3 [253], wykazało obecność granulocytarnych mieloidalnych komórek supresorowych (G-MDSC, ang. *granulocytic myeloid-derived suppressor cells*) o fenotypie HLA-DR– CD14– w części próbek.

W niniejszej pracy ekspresja HLA-DR była związana nie tylko z APC, ale także z komórkami nowotworowymi, co mogło wpłynąć na końcowe wyniki. Ekspresja HLA-DR była jednak widoczna licznie także w komórkach immunologicznych (Rycina Z3, Załącznik 7). Obecność dodatniego barwienia HLA-DR na komórkach nowotworowych mogła wynikać z fałszywie dodatniego odczynu i reakcji krzyżowej, gdyż w porównaniu do MHC klasy I, generalnie komórki nowotworowe rzadziej wykazują ekspresję MHC klasy II [255]. Z drugiej strony nie można wykluczyć, że komórki ChS faktycznie wykazują ekspresję HLA-DR, jak zostało to zaobserwowane w jednym z badań; Nota i wsp. wykazali niższą immunogenność ChS G1 poprzez zmniejszoną ekspresję MHC klasy I i II (w tym również HLA-DR) w porównaniu do ChS G2/G3. Dodatkowo komórki DDCS wykazywały większą ekspresję MHC w porównaniu do komórek klasycznego ChS. Z kolei w obrębie DDCS komponent odróżnicowany charakteryzował się większą ekspresją MHC, w porównaniu do komponentu chrzęstnego [256]. Taką samą tendencję wykazano w tej pracy, gdzie HLA-DR wykazywało silniejszą ekspresję na komórkach DDCS w porównaniu do komórek klasycznego ChS, widoczną głównie w komponencie odróżnicowanym (Ryciny Z3 oraz Z5 i Z6, Załącznik 7). Ekspresję MHC klasy II wykazano m.in. w czerniaku, czy raku piersi, ale także w modelu mięsaka *in vitro* [255]. Konieczne są więc dalsze badania w tym zakresie mające na celu potwierdzenie ekspresji tego markera w TME ChS, szczególnie że w przytaczanych badaniach dotyczących ChS G1-G3 komórki immunologiczne wykazywały fenotyp HLA-DR– [253].

Wśród innych istotnych w prezentowanej analizie markerów była ekspresja PD-1 na limfocytach, których było więcej w części obwodowej guza, chociaż ogółem ich ilość w porównaniu do pozostałych limfocytów była niewielka. Ekspresję PD-1+ zaobserwowano dotychczas zarówno w klasycznym ChS, jak i DDCS na obrzeżach guza w postaci agregatów limfatycznych. W przypadku DDCS dodatkowo ekspresja PD-1 korelowała z ekspresją PD-L1 na komórkach ChS [149]. W jednym z badań wykazano także występowanie koekspresji PD-1 z CD8 na limfocytach T cytotoksycznych występujących w TME ChS [253].

Liczba komórek dendrytycznych CD141+, pomimo ogółem niewielkiej liczebności w badanej grupie pacjentów, istotnie częściej występowała na obrzeżach guza. Udział komórek dendrytycznych u pacjentów z rozpoznaniem ChS może też potwierdzać wysoka ekspresja HLA-DR. Chociaż dotąd marker CD141 nie był opisywany w ChS, autorzy kilku prac sugerowali możliwy udział komórek dendrytycznych w TME tych nowotworów. W jednej z prac z udziałem pacjentów z rozpoznanymi pierwotnymi

mięsakami kości (w tym ChS), w grupie o wysokim nacieku TAMs i TILs obserwowano także komórki dendrytyczne DC-SIGN/CD11c+ [254]. Udział komórek CD11c+ potwierdzono także w innym badaniu na grupie 21 pacjentów z rozpoznaniem ChS, gdzie ekspresja komórek dendrytycznych była widoczna zwłaszcza w podtypach G2/G3 [253].

Ostatnim częstym markerem w badanej grupie pacjentów była Gal-9. Ekspresja Gal-9 widoczna była zarówno w komórkach układu odpornościowego, jak i w komórkach nowotworowych. Chociaż obecność Gal-9 nie była dotąd badana w ChS, zwiększona ekspresja tego markera została zidentyfikowana w wielu innych nowotworach np. raku piersi, glejaku, czy białaczce [257]. Gal-9 wpływa na wiele funkcji, takich jak wzrost i różnicowanie komórek, adhezja i komunikacja komórkowa, czy apoptoza. W związku z czym, nieprawidłowa ekspresja Gal-9 może być związana z procesem nowotworzenia [257]. Dodatkowo Gal-9 łączy się z wieloma komórkami immunologicznymi przyczyniając się do immunosupresji np. promując różnicowanie Tregs, redukując liczbę limfocytów T pomocniczych (Th17 i Th1), czy indukując zmianę fenotypu makrofagów z M1 na M2 [258]. Gal-9 specyficznie wiąże się także z receptorem TIM-3, prowadząc do apoptozy limfocytów T CD8+ [257]. Rolę Gal-9 w immunosupresji badano m.in. u pacjentów z rozpoznaniem kostniakomięsaka, gdzie blokada TIM-3/Gal-9 odwróciła supresję komórek efektorowych Th1 wywołaną interakcją między Gal-9, a limfocytami T, monocyty oraz Tregs [259]. Przedstawione wyniki sugerują, że Gal-9 może odgrywać znaczącą rolę również w TME ChS, przez co w przyszłości może stać się potencjalnym celem np. dla immunoterapii. Z uwagi na to, że ekspresja Gal-9 nie była dotąd obserwowana w ChS, konieczne są dalsze badania mogące potwierdzić ekspresję tego markera oraz wyjaśnić jego dokładną rolę w TME tych nowotworów.

W wyniku klastrowania danych immunologicznych, w badanej grupie zidentyfikowano 3 różne immunofenotypy występujące u pacjentów z rozpoznaniem ChS. Immunofenotyp 1 - zbliżony do „zimnego”, który można precyzyjniej określić jako „wykluczony immunologicznie”, ze względu na obecność komórek układu immunologicznych głównie na obrzeżu guza [144]; immunofenotyp 2 - najbardziej odpowiadający „gorącemu”, z największą liczbą nacieków immunologicznych zarówno w centrum, jak i na obwodzie guza oraz ekspresją PD-1+ i CD8+ na limfocytach w centralnym regionie [145]; immunofenotyp 3 - określony jako „pośredni” z ogólnie

mniejszą liczbą komórek immunologicznych, ale komórkami obecnymi także w centrum guza.

Przeprowadzona analiza PCA wykazała, że największe znaczenie w poszczególnych immunofenotypach miała ekspresja HLA-DR, Gal-9, CD14 lub CD45 w centralnej części guza oraz ekspresja Gal-9, CD45 lub TIM-3 na jego obwodzie. Ponadto pomiędzy tymi markerami zaobserwowano istotną korelację. Komórki z ekspresją HLA-DR wykazywały silną korelację ($\rho > 0,7$) z obecnością komórek CD45+, CD14+, Gal-9+ oraz TIM-3+. Z kolei obecność komórek CD14+ silnie korelowała z komórkami Gal-9+ oraz TIM-3+, a na obwodzie dodatkowo z naciekiem limfocytów CD4+ i komórek CD45+. Dodatkowo oba typy komórek (z ekspresją CD14 lub HLA-DR) silnie korelowały z obecnością makrofagów M2 CD163+.

Podobne wyniki uzyskano w badaniu Kostine i wsp., w którym w DDSCS zidentyfikowano CD14+CD163+ makrofagi M2 o fenotypie immunosupresyjnym [151]. Ponadto w kostniakomięsaku wykryto TAMs o podobnym profilu - CD14+HLA-DR+ (określone jako makrofagi M1) oraz CD14+CD163+ (określone jako M2) [260]. Z drugiej strony, w obecnej tu pracy najsilniejszą istotną korelację ($\rho > 0,9$) zidentyfikowano pomiędzy obecnością makrofagów M1 i M2 (dla markerów CD68 i CD163). Pokazuje to, że chociaż TAMs przeważały nad TILs ogółem, to w TME ChS były obecne zarówno makrofagi M1, jak i M2.

Przedstawione wyniki sugerują, że największą rolę w występowaniu immunofenotypu „gorącego” miała ekspresja markerów związanych z makrofagami M1 (komórki CD14+, HLA-DR+), makrofagami M2 (komórki CD14+, CD163+), a także obecność markerów związanych z „wyczerpaniem” limfocytów (Gal-9, związana z APC o ekspresji HLA-DR+ i CD14+ lub produkowana przez komórki nowotworowe, oraz TIM-3). Obecność fenotypu „wyczerpanych” limfocytów może dodatkowo potwierdzać zaobserwowana korelacja ($\rho > 0,6$) pomiędzy ekspresją Gal-9 i TIM-3 zarówno w centralnym, jak i obwodowym regionie guza. Ponadto na obwodzie guza wykazano silną korelację między naciekami komórek TIM-3+ oraz PD-1+, co może sugerować udział limfocytów TIM3+PD-1+, które zostały zidentyfikowane w ChS przez innych badaczy jako charakteryzujące „wyczerpane” limfocyty CD8+ [253].

Obecność poszczególnych immunofenotypów była istotnie różna w podtypach histologicznych ChS. Udział „zimnego” immunofenotypu malał wraz ze wzrostem stopnia

złośliwości guza, a w DDCS był całkiem nieobecny. Wyniki te wskazują, że podtypy o wyższych stopniach złośliwości (szczególnie w przypadkach DDCS) miały więcej nacieków komórek immunologicznych w porównaniu do ChS G1. Większą immunogenność DDCS względem klasycznego ChS zaobserwowano w kilku innych badaniach. W jednym z nich, DDCS wykazywał większą ekspresję markerów CD45, CD68 i CD3 w stosunku do klasycznego ChS. Autorzy badania zaobserwowali ponadto dodatnią ekspresję CD68+ TAMs wyłącznie w odróżnicowanym komponentcie DDCS [254]. Przewagę TAMs w odróżnicowanym komponentcie DDCS wykazali także Richert i wsp. [149], co jest zgodne z wynikami otrzymanymi w tej pracy (co pokazano na przykładzie markera CD163 na Rycinie Z6 w Załączniku 7). Z drugiej strony, w przypadkach klasycznego ChS także opisano w literaturze taką tendencję. Przykładowo w ChS G2/G3 obserwowano większą liczbę limfocytów T i komórek dendrytycznych w centralnym regionie guza w porównaniu do ChS G1 [253]. Z kolei Simard i wsp. zaobserwowali wyższą gęstość limfocytów T w ChS G2/G3 oraz większy udział makrofagów CD163+ w ChS G3 w porównaniu do ChS G1 [150].

W ramach oceny profilu immunologicznego ChS osobno określono także ekspresję PD-L1 na komórkach nowotworowych oraz oceniono obecność TLS. Pozytywną ekspresję PD-L1 wykryto jedynie u 13 z 99 pacjentów, w większości w DDCS (9 przypadków). Co ciekawe, w przypadkach ChS G2 wcale nie wykryto ekspresji PD-L1. Ekspresja PD-L1 w DDCS jest często opisywana w literaturze i występuje u około 50% przypadków, zwłaszcza w komponentcie odróżnicowanym [149,151,239]. Wiele prac sugeruje, że pacjenci z rozpoznaniem DDCS mogą być najlepszymi kandydatami do immunoterapii, szczególnie że w dotychczasowych badaniach to właśnie w tym podtypie ChS obserwowano częściowe odpowiedzi na zastosowanie inhibitorów PD-1 [153,154]. W badaniu przeprowadzonym przez Kostine i wsp., ekspresja PD-L1 była związana z większym naciekiem immunologicznym oraz występowaniem MHC klasy I. Z kolei w dwóch innych badaniach ekspresja PD-L1 występowała w komórkach ChS o wyższym stopniu złośliwości - G2 lub G3 [152,153]. Korelację ekspresji PD-L1 z naciekami immunologicznymi potwierdzono także w niniejszej pracy. Ekspresję PD-L1 wykryto jedynie u pacjentów o immunofenotypie „gorącym” i „pośrednim”, z istotną przewagą w immunofenotypie „gorącym”, co potwierdza hipotezę że u tych pacjentów immunoterapia mogłaby potencjalnie znaleźć zastosowanie.

W przypadku TLS nie zidentyfikowano istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi podtypami histologicznym lub immunofenotypami ChS. Zauważono jednak większą tendencję do występowania TLS w ChS G3 względem pozostałych podtypów ChS; z kolei w przypadkach ChS G1 zupełnie nie zidentyfikowano TLS. Tak jak w przypadku ekspresji PD-L1, obecność TLS wykryto wyłącznie u pacjentów o immunofenotypie „gorącym” i „pośrednim”, ponownie z przewagą u tych o immunofenotypie „gorącym”. Obecność TLS bywa łączona z potencjalnie lepszą odpowiedzią na immunoterapię [145], co mogłoby potwierdzać wcześniejszą hipotezę. Z drugiej strony TLS wykryto jedynie u 7 pacjentów, co stanowi zbyt małą grupę mogącą wiarygodnie ocenić ich rolę w TME ChS. Do tej pory brak jest danych na temat obecności TLS w ChS. Chociaż w przypadku tej pracy TLS nie odgrywały istotnej roli, to nie można wykluczyć ich udziału w TME ChS. Wykorzystane do oceny immunologicznej TMA mogły wpłynąć na zaniżenie wyniku i spowodować że nie u wszystkich pacjentów poprawnie zidentyfikowano brak tych struktur. W związku z tym w przyszłości należałoby przeprowadzić badania z zastosowaniem pełnych skrawków, aby ostatecznie potwierdzić lub wykluczyć udział TLS w ChS oraz ewentualnie ocenić ich potencjalną rolę jako czynnika prognostycznego/predykcyjnego.

Analiza wieloczynnikowa oceniająca wpływ poszczególnych immunofenotypów i podtypów histologicznych ChS na OS pacjentów wykazała, że obecność immunofenotypu „gorącego” jest niezależnym negatywnym czynnikiem prognostycznym. U tych pacjentów obserwowano najniższe 5-letnie OS (na poziomie 29%). Odsetki 5-letnich OS u pacjentów o immunofenotypie „pośrednim” i „zimnym” wynosiły odpowiednio 44% i 86%.

Chociaż najgorsze rokowanie u pacjentów o największej liczbie nacieków komórek immunologicznych mogłoby wydawać się zaskakujące, to tego typu obserwacji dokonano w wielu innych badaniach [239,261,262]. Fan i wsp. wykazali, że u pacjentów z rozpoznaniem mięsaka tkanek miękkich lub kości (w tym kostniakomięsaka lub mięsaka Ewinga) większy naciek immunologiczny związany był z gorszym 5-letnim OS oraz korelował z wystąpieniem przerzutów [261]. W badaniu przeprowadzonym na grupie ponad 500 pacjentów z rozpoznaniem mięsaka tkanek miękkich także wytypowano trzy immunofenotypy - „gorący”, „umiarkowany” i „zimny”, z czego ten określony przez autorów jako „gorący” charakteryzował się najkrótszym PFS [262]. Chociaż pacjenci o tym immunofenotypie mieli dużo nacieków komórek immunologicznych, to TME miało fenotyp przeciwpalny z tendencją do immunosupresji. Z kolei u pacjentów z immunofenotypem

„zimnym” badacze zaobserwowali najmniejszy udział makrofagów M2, co mogło wpłynąć na ich lepsze rokowanie [262].

Wyniki uzyskane w tej pracy także sugerują, że gorsze rokowanie u pacjentów z „gorącym” immunofenotypem może mieć związek ze środowiskiem wykazującym cechy immunosupresji. Chociaż w tej grupie pacjentów zaobserwowano najwięcej komórek immunologicznych, to w przeważającej części były to makrofagi lub limfocyty o prawdopodobnym fenotypie „wyczerpania”. Przeprowadzona analiza nie wykazała przewagi makrofagów M2 nad M1, jednak już sama obecność TAMs może być złym czynnikiem prognostycznym i sprzyjać procesowi nowotworzenia [263]. Z drugiej strony, istotną rolę w TME ChS może odgrywać Gal-9, której ekspresja mogła sprzyjać rozwinięciu się środowiska immunosupresyjnego zarówno z udziałem makrofagów jak i limfocytów [140,258]. Takie komórki ulegając „wyczerpaniu” na obwodzie guza, mogły przestać być funkcjonalne jeszcze zanim znalazły się w jego centralnej części. Hipoteza ta mogłaby wyjaśniać dlaczego pomimo dużej ekspresji HLA-DR (wskazującego na obecność APC) nie zachodziła efektywna prezentacja antygenów i właściwa odpowiedź przeciwnowotworowa. Jednak bardziej szczegółowe badania w tym zakresie są niezbędne dla poznania dokładnego mechanizmu nieefektywnej odpowiedzi immunologicznej u pacjentów z obecnymi naciekami komórek immunologicznych w centralnym regionie guza. Ponadto chociaż ekspresja PD-L1 rzadko występowała w badanej grupie chorych i nie odgrywała znaczącej roli w poszczególnych immunofenotypach, jej obecność u pacjentów z immunofenotypem „gorącym” potwierdza dotychczasowe badania pokazujące, że PD-L1 jest złym czynnikiem prognostycznym u pacjentów z rozpoznaniem ChS [152,264].

Obecność środowiska immunosupresyjnego w ChS G1-G3 została także zasugerowana w dwóch innych pracach. Li i wsp. w swoim badaniu na 21 pacjentach z rozpoznaniem ChS także wykryli trzy immunofenotypy, które określili jako: „zimny” (bez nacieków immunologicznych, tzn. „pustynia immunologiczna”), „wyczerpany” (z obecnością „wyczerpanych” limfocytów CD8⁺ oraz komórek dendrytycznych) oraz „z przewagą G-MDSC” (wykazujących cechy immunosupresyjne) [253]. Z kolei Richert i wsp. wykazali, że obecność immunosupresyjnych CD68⁺ lub CD163⁺ TAMs w DDSCS była związana z chorobą przerzutową. W tym samym badaniu autorzy zaobserwowali, że obecność markerów sugerujących środowisko immunosupresyjne, takich jak ekspresja PD-L1 w DDSCS, występowanie TAMs (CSF1R⁺ lub SIRPA⁺) i TILs (TIM-3⁺ lub LAG-3⁺) oraz ekspresja B7-H3 na komórkach nowotworowych w DDSCS i klasycznym ChS [149].

Przedstawione w tej pracy wyniki potwierdzają więc dotychczasowe doniesienia o prawdopodobnie zachodzącej immunosupresji w TME ChS, jednocześnie wskazując nowe czynniki potencjalnie zaangażowane w ten proces, takie jak Gal-9.

Dodatkowa analiza przeprowadzona na podgrupie 53 pacjentów z rozpoznaniem ChS wykazała, że w TME dochodzi do deregulacji procesów związanych z odpowiedzią immunologiczną (na skutek spadku ekspresji genów) we wszystkich podtypach histologicznych ChS względem tkanek zdrowych.

Zarówno w przypadkach ChS G1, jak i G2 zaobserwowano spadek ekspresji genów związanych z odpowiedzią nabytą, co może potwierdzać mniejszy udział limfocytów w TME ChS. W przypadku ChS G2 występowała dodatkowa obniżona ekspresja genów odpowiadających za zdolność do adhezji komórkowej leukocytów, a w ChS G1 zaburzeniom ulegał proces migracji limfocytów T. W przypadku ChS G3 oraz DDCS również obserwowano spadek ekspresji genów związanych z regulacją odpowiedzi nabytej, jednocześnie ze wzrostem ekspresji genów regulujących odpowiedź wrodzoną, co sugeruje większy udział m.in. makrofagów w tych podtypach. Co ciekawe, tylko w DDCS występował spadek ekspresji genów zaangażowanych w produkcję cytokin komórek linii mieloidalnej, będących prekursorem m.in. komórek dendrytycznych, monocytów, czy makrofagów [265]. We wszystkich podtypach dochodziło natomiast do spadku produkcji molekularnych mediatorów odpowiedzi immunologicznej.

Analiza qPCR wykazała także zmiany w ekspresji genów pomiędzy poszczególnymi podtypami histologicznymi ChS. Geny o istotnie wyższej ekspresji względem innych podtypów dotyczyły jedynie ChS G3, w którym wykazano wzrost ekspresji *VEGFA*, *PTGS2*, *MIF*, *TGFB1* oraz *SPP1* względem ChS G1/G2. Dodatkowo ChS G3 charakteryzował się zwiększoną ekspresją *HIF1A* względem ChS G1 oraz wzrostem ekspresji *ACKR3* względem ChS G2.

Gen *VEGFA*, kodujący VEGFA-A, jest głównym czynnikiem zaangażowanym w angiogenezę i progresję ChS, stąd jego ekspresja jest wyższa w podtypach o bardziej agresywnym przebiegu (G2 i G3) [237,266]. W indukcji VEGF-A uczestniczą m.in. HIF1 α (kodowany przez gen *HIF1A*), chemokina CXCL12 (ang. *C-X-C motif chemokine ligand 12*) oraz enzym cyklooksygenaza-2 (COX-2, ang. *cyclooxygenase-2*, kodowana przez gen *PTGS2*) [237]. Podwyższona ekspresja *HIF1A*, podobnie jak VEGF-A, była dotąd obserwowana zwłaszcza w ChS G2/G3. Ponadto wykazano, że zwiększona produkcja HIF1 α

wpływa negatywnie na przeżycia pacjentów z rozpoznaniem ChS i może uczestniczyć w progresji nowotworu np. poprzez związek z białkami z rodziny Bcl-2, zaangażowanymi w unikanie procesu apoptozy [237,267]. Z kolei w badaniach *in vitro* dotyczącymi komórek ChS wykazano ekspresję COX-2 oraz CXCL12, której jednym z receptorów jest CXCR7 (ang. *C-X-C chemokine receptor type 7*, kodowany przez gen *ACKR3*) [268–270].

Natomiast gen *SPP1*, koduje osteopontynę (OPN, ang. *osteopontin*), która poprzez interakcję z receptorem CD44 jest zaangażowana w procesy adhezji komórkowej, migracji i angiogenezy [271]. W ChS wysoka ekspresja OPN była związana z większą agresywnością i inwazyjnością komórek nowotworowych [237,272].

Z drugiej strony wspomniane wyżej czynniki: VEGF-A, COX-2, czy OPN są również zaangażowane w proces immunosupresji m.in. poprzez hamowanie aktywności limfocytów T i komórek NK, rekrutację Treg i MDSC, czy indukcję zmiany fenotypu TAMs z M1 na M2 [273–275]. Podobną rolę w TME odgrywa TGF- β (kodowany przez gen *TGFB1*), czy czynnik zahamowania migracji makrofagów (MIF, ang. *macrophage migration inhibitory factor*, kodowany przez gen o tej samej nazwie) [276,277]. Dodatkowo w badaniach *in vitro* wykazano, że MIF może wzmacniać migrację komórek ChS poprzez szlak PI3K/AKT/NF kappa B (NF- κ B, ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) [278]. Zidentyfikowane w tym badaniu czynniki ze względu na mnogość ich funkcji, mogą mieć istotne znaczenie w progresji tych nowotworów i wpływać na agresywny przebieg ChS G3.

W grupie pacjentów z rozpoznaniem ChS G3 wykazano także istotny wzrost niektórych genów względem DDSCS. Jednym z nich był wspomniany wcześniej *VEGFA*, co może sugerować jego odmienną rolę w patogenezie ChS G3 względem DDSCS. W jednym z dotychczasowych badań zaobserwowano, że ekspresja *VEGFA* była wyższa w komponentcie chrzęstnym, w porównaniu do odróżnicowanego [278], co pokazuje zróżnicowanie w ekspresji VEGF-A w obrębie nawet tego samego podtypu ChS. Wśród innych genów o podwyższonej ekspresji były *EGFR*, *STAT3* oraz *TP53*. Receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR, ang. *epidermal growth factor receptor*, kodowany przez gen o tej samej nazwie) jako jeden z RTKs jest zaangażowany w kluczowe szlaki dla wzrostu i proliferacji komórek nowotworowych tj. PI3K/AKT i MAPK/ERK [278]. Występowanie aktywności konstytutywnej EGFR w ChS o wyższych stopniach złośliwości (G2/G3) było już opisane i może mieć związek z udziałem mutacji *EGFR* w progresji tych nowotworów [12,279].

Z kolei gen *STAT3* może być aktywowany przez różne cytokiny i czynniki wzrostu np. IL-6, czy czynnik wzrostu naskórka (EGF, ang. *epidermal growth factor*), a także poprzez szlak kinazy Janusowej (JAK, ang. *Janus activated kinases*)/*STAT3* (ang. *signal transducer and activator of transcription 3*). Czynniki *STAT3* (po aktywacji) reguluje ekspresję genów promujących przeżycie, proliferację i migrację komórek nowotworowych [280], może więc stanowić negatywny czynnik prognostyczny dla pacjentów z rozpoznaniem ChS G3. Ponadto *STAT3* ogrywa ważną rolę w immunosupresji, poprzez indukcję ekspresji genów związanych z rekrutowaniem Tregs, TAMs o fenotypie M2 i MDSC, co potwierdza wcześniejsze wyniki z udziałem innych czynników zaangażowanych w ten proces.

Ważną obserwacją zdaje się być nadekspresja *TP53*, która podobnie jak znaczna część mutacji w tym genie (tak jak opisano we wcześniejszym podrozdziale) występowała w przypadku ChS G3. Zgodność tych wyników w obu prezentowanych analizach, potwierdza dotychczasowe badania sugerujące zaangażowanie białka p53 w progresję ChS [67,281].

Uzyskane w analizie qPCR wyniki potwierdzają dotychczasowe doniesienia i sugerują możliwą rolę *HIF1 α* , *VEGF-A*, *COX-2*, *CXCR7*, *MIF*, *OPN*, *EGFR*, czynnika *STAT3*, czy białka p53 w rozwoju ChS G3. Ponadto prezentowane czynniki, poprzez tworzenie środowiska immunosupresyjnego z udziałem TAMs lub MDSC, mogą wyjaśniać gorsze rokowania pacjentów z rozpoznaniem ChS G3, a także potwierdzać wcześniejszą hipotezę o udziale czynników immunosupresyjnych w TME ChS (zwłaszcza w przypadku pacjentów o immunofenotypach charakteryzujących się większymi naciekami komórek immunologicznych). Z kolei różnice w ekspresji niektórych genów sugerują odmienne TME zarówno pomiędzy różnymi podtypami histologicznymi tych nowotworów oraz między stopniami złośliwości histologicznej ChS.

5.4. Korelacja danych immunologiczno-molekularnych

Analiza TMB w poszczególnych immunofenotypach nie wykazała istotnych różnic pomiędzy różnymi grupami pacjentów z rozpoznaniem ChS. Zaobserwowano jednak tendencję do akumulacji mutacji w klastrach o większym nacieku komórek immunologicznych. Najwyższe wartości TMB były obserwowane w grupie pacjentów o immunofenotypie „gorącym” ze średnim TMB równym 5,73 mut/Mb, podczas gdy dla pozostałych średnie TMB wynosiło około 3,5 mut/Mb. Z drugiej strony, w grupie pacjentów

o immunofenotypie „gorącym” występowały przypadki o prawdopodobnie występującej nieprawidłowej deaminacji (z wartościami powyżej 20 mut/Mb), które mogły zawyżyć ten wynik. Mimo to mediana TMB w guzach o immunofenotypie „pośrednim” była wyższa niż w „zimnym”, co potwierdza opisywaną tendencję. Podobne wyniki uzyskali Weng i wsp., gdzie spośród trzech immunofenotypów, wytypowanych u pacjentów z rozpoznaniem mięsaka tkanek miękkich, grupa o immunofenotypie „umiarkowanym” miała istotnie wyższe TMB niż w „zimnym”. Autorzy nie wykazali natomiast istotnych statystycznie różnic pomiędzy immunofenotypem „gorącym” a „umiarkowanym”. Przedstawione tam immunofenotypy miały też odmienne profile molekularne [262].

W prezentowanej tu pracy także zaobserwowano różnice w występowaniu mutacji pomiędzy poszczególnymi immunofenotypami, zwłaszcza na poziomie wariantów strukturalnych (CNV). U pacjentów o immunofenotypie „gorącym” zidentyfikowano największą liczbę delecji/utrat genów i amplifikacji, chociaż były one też obecne w pozostałych klastrach. Przykładowo amplifikacje genów zaangażowanych w szlaki RTK-RAS i PI3K-AKT, takie jak: *AKT2*, *MAP2K2*, *FGFR1*, *MET*, *BRAF*, *PDGFRA*, czy *KIT*, występowały głównie w przypadkach o immunofenotypie „gorącym”. Podobnie w przypadku genów dotyczących czynników transkrypcyjnych (*MYC*, *CIC*, czy *RUNX2*), których amplifikacje wykryto jedynie w tej grupie pacjentów. Z kolei u pacjentów o immunofenotypie „pośrednim” zaobserwowano amplifikacje genów *CSMD3*, *MN1* i *UBR5*, a także utraty genów *PTCH1* i *RB1*. W przypadku pacjentów o immunofenotypie „zimnym” nie zidentyfikowano mutacji w genach *AKT2*, *PTCH1*, *RB1*, czy *UBR5* (zarówno SNV i CNV), a amplifikacje lub delecje dotyczyły ogółem pojedynczych pacjentów. Co ciekawe, nie zaobserwowano w tej grupie także mutacji w genie *EPHA7*, która podobnie jak *PTCH1* była negatywnym czynnikiem prognostycznym (jak opisano w podrozdziale 5.2).

Chociaż dla żadnego z tych genów nie wykryto istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentów z rozpoznaniem ChS, przedstawione wyniki sugerują, że wpływ na gorsze przeżycia u pacjentów o immunofenotypie „gorącym” mogło mieć także podłoże molekularne i występowanie bardziej złożonych zaburzeń molekularnych. Szczególny wpływ na rokowania u tych grup pacjentów mogły mieć deregulacje w szlakach związanych ze wzrostem i proliferacją komórek, takich jak RTK/RAS/MAPK/ERK, czy PI3K-AKT, a także zaburzenia szlaku Hedgehog.

Zmianami genetycznymi, które różniły się najbardziej pomiędzy poszczególnymi immunofenotypami były mutacje *IDH1/2* i *TP53*. Chociaż ponownie nie wykazano tutaj różnic istotnych statycznie, mutacje w tych genach dotyczyły w przeważającej części pacjentów o immunofenotypie „gorącym” (w przypadku genów *IDH1/2* i *TP53*) oraz „pośrednim” (w przypadku genu *IDH1*). Ponadto wszystkie delecje dotyczące genu *TP53* dotyczyły jedynie przypadków o immunofenotypie „gorącym”, a co za tym idzie deregulacje szlaków związanych z integralnością genomową również występowały w przeważającej większości u pacjentów w tej grupie. Wynik ten mógł potencjalnie wpłynąć na złe rokowania tych pacjentów.

Poza pojedynczymi wyjątkami, mutacje *IDH2* występowały głównie u pacjentów o immunofenotypie „gorącym”. Chociaż ostatecznie nie wykazano różnic istotnych statycznie, wyniki te sugerują, że obecność mutacji *IDH1/2* mogła być związana z większym naciekiem komórek immunologicznych. Wyniki te są zgodne z tymi uzyskanymi przez Li i wsp. z udziałem 21 pacjentów z rozpoznaniem ChS G1-G3 [253]. Autorzy badania wykazali, że mutacje *IDH1/IDH2* były pozytywnie skorelowane z limfocytami T, komórkami dendrytycznymi i G-MDSC; dodatkowo pacjenci z mutacjami *IDH* mieli ogółem więcej nacieków immunologicznych w porównaniu do pacjentów bez tych mutacji (u których występowało zjawisko „pustyni immunologicznej”). W tej samej pracy zaobserwowano, że u pacjentów z mutacjami *IDH* występowała dodatnia korelacja między 2-HG a CXCL12, będącej chemoatraktantem dla komórek dendrytycznych, które następnie powodowały napływ limfocytów T [253]. Mogłoby to wyjaśniać dlaczego u pacjentów z mutacjami *IDH1/2* zarówno w tamtej, jak i tej pracy obserwowano więcej komórek immunologicznych.

Przeprowadzona finalnie wieloczynnikowa analiza miała na celu wytypowanie potencjalnych niezależnych czynników prognostycznych istotnych dla pacjentów z rozpoznaniem ChS. Spośród wszystkich zmiennych, przy użyciu metody LASSO, wybrano te najistotniejsze dla badanego modelu. Wykazano, że poza czynnikami klinicznymi - wielkością guza i obecnością podtypu o wyższym stopniu złośliwości (DDCS), istotny negatywny wpływ na OS pacjentów miały zarówno czynniki genetyczne, jak i immunologiczne. Obecność immunofenotypu „gorącego” (HR: 3,3; CI: 1,13-9,8; $p < 0,05$) oraz obecność mutacji *IDH1* (HR: 3,8; CI: 1,75-8,1; $p < 0,001$) okazały się być niezależnymi negatywnymi czynnikami prognostycznymi. Tego typu wieloparametryczna

analiza oceniająca jednoczesny wpływ immunofenotypów oraz czynników genetycznych na przeżycia tak licznej grupy pacjentów z rozpoznaniem ChS nie była dotąd przeprowadzana, co stanowi element innowacyjności tej pracy i jest podstawą do dalszych badań w tym kierunku.

W jednym z dotychczasowych badań Nicolle i wsp. także przeprowadzono multiomiczną analizę, jednak z wykorzystaniem danych na poziomie mRNA, mikroRNA i metylomów. Autorzy ujawnili trzy główne cechy molekularne związane z progresją ChS: mutacje *IDH* powodujące hipermetylację genomu, utratę ekspresji genu kodującego łańcuch ciężki immunoglobuliny (*IGH*, ang. *immunoglobulin heavy locus*) w regionie 14q32, a także wysoki potencjał mitotyczny [239]. Ponadto pacjenci z rozpoznaniem DDCS mieli najgorsze rokowania w stosunku do tych z rozpoznaniem ChS G1-G3, podobnie jak w tej pracy. W tym samym badaniu, negatywnym czynnikiem rokowniczym było także wystąpienie u pacjentów profilu metylacji charakterystycznego dla DDCS, który ponadto charakteryzował się największą ekspresją PD-L1 i największymi naciekami limfocytów T [239]. Obecne badania wskazują więc na znaczący udział podtypów ChS w kształtowaniu się mikrośrodowiska, które wydaje się być bardziej bogate w komórki immunologiczne w ChS o wyższych stopniach złośliwości, szczególnie w DDCS [239,253,254]. Ta tendencja została także zauważona w tej pracy. Może mieć to związek ze zmianami morfologicznymi, które są widoczne w podtypach histologicznych o wyższych stopniach złośliwości tj. zmniejszeniem udziału macierzy chrzęstnej (w ChS G2/G3), czy odróżnicowaniem chondrocytów (w DDCS) [12,21,34], co może prowadzić do łatwiejszej infiltracji tych podtypów ChS przez komórki immunologiczne. Z drugiej strony końcowa analiza wykazała, że nacieki komórek immunologicznych związany z prezentowanym immunofenotypem „gorącym” jest negatywnym czynnikiem prognostycznym niezależnym od podtypu histologicznego, co może wynikać np. z obecnej w TME ChS immunosupresji [149,253].

Spośród ocenianych w końcowej analizie czynników genetycznych, znaczenie miała jedynie obecność mutacji *IDH1*. Chociaż do tej pory badania dotyczące wpływu mutacji *IDH* na przeżycia pacjentów z rozpoznaniem ChS były kontrowersyjne [45], otrzymany w tej pracy wynik wskazuje na istotne znaczenie tych mutacji jako czynnika prognostycznego. Negatywny wpływ mutacji *IDH1/2* potwierdzono także w badaniu przeprowadzonym z udziałem 488 pacjentów z rozpoznaniem ChS. W wieloczynnikowej regresji Coxa skorygowanej o wiek, płeć, podtyp histologiczny (G1-G3, DDCS) i lokalizację guza, autorzy wykazali negatywny wpływ mutacji *IDH1/2* na OS pacjentów (HR: 1,90;

95%CI: 1,06–3,42; $p=0,03$) [282]. Z drugiej strony, w innym badaniu przeprowadzonym z udziałem 93 pacjentów z rozpoznaniem ChS klasycznego lub DDOS nie stwierdzono różnic w OS i MFS u pacjentów z mutacją *IDH* lub bez niej, zarówno w modelu jednoczynnikowym, jak i wieloczynnikowym [66].

Mutacje *IDH1/2* mają wpływ na wiele procesów komórkowych, mogących potencjalnie wpływać na przeżycia pacjentów z rozpoznaniem ChS. Co więcej, sam typ mutacji *IDH* może mieć także odmienne znaczenie i w różnym stopniu wpływać na produkcję 2-HG [283]. Co ciekawe, najliczniej występujący w ChS wariant *IDH1* R132C (co zauważono także w tej pracy) jest związany ze zwiększoną produkcją 2-HG w porównaniu np. do wariantu R132H [284]. Jednym ze skutków działania 2-HG jest wyciszanie genów np. poprzez zwiększoną hipermetylację (zarówno na poziomie DNA, jak i histonów) [45,285]. Przykładowo w jednym z badań, centralne ChS z mutacją w genie *IDH1* wykazywały wyższy stopień globalnej hipermetylacji w porównaniu do ChS z mutacją *IDH2* lub bez tych mutacji [217]. Ponadto 2-HG poprzez hamowanie aktywności KDM4A przyczynia się do zwiększenia aktywności szlaku mTOR niezależnie od PI3K/PTEN, a także prowadzi do deregulacji systemów naprawy DNA np. poprzez upośledzenie systemu rekombinacji homologicznej (HRD, ang. *homologous recombination deficiency*), a w konsekwencji do niestabilności genomowej [286]. Zmutowana IDH ma także zmniejszoną zdolność do produkcji NADPH, co prowadzi zaburzenia równowagi NADP⁺/NADPH w mitochondriach. Przyczynia się to do zwiększenia stresu oksydacyjnego i produkcji ROS, czyniąc takie nowotwory bardziej podatne na uszkodzenia DNA [45]. Nadprodukcja 2-HG jest związana także ze stabilizacją HIF1 α , co wywołuje stan „pseudo-hipoksji” charakteryzujący się zwiększoną angiogenezą i metabolizmem glukozy w komórkach nowotworowych [287].

Wyniki uzyskane w tej pracy zdają się potwierdzać udział mutacji *IDH1* w deregulacji prawie wszystkich powyższych procesów. W badanej grupie pacjentów z rozpoznaniem ChS mutacje *IDH1* były najczęstszym zdarzeniem występującym u prawie 1/3 pacjentów. Wśród najczęściej deregulowanych ścieżek molekularnych (występujących u ponad 20% pacjentów) były te związane z: metabolizmem komórkowym, RTKs i regulacją wzrostu i proliferacji komórek, utrzymaniem integralności genomowej i systemami naprawy DNA oraz modyfikacjami chromatyny poprzez białka histonowe. Ponadto analiza qPCR wykazała, że w ChS G3 (u których jednocześnie zaobserwowano największy udział mutacji *IDH1*) występowała zwiększona ekspresja HIF1 α oraz związanego z nim VEGF-A.

Wszystkie te czynniki wskazują, że mutacje *IDH1* mogą mieć znaczną rolę w rozwoju i progresji ChS.

Z drugiej strony, chociaż wystąpienie samej mutacji *IDH1* stanowiło niezależny negatywny czynnik rokowniczy, ich obecność mogła także przyczynić się do gorszego rokowania u części pacjentów o immunofenotypie „gorącym” i z mutacjami *IDH1*. 2-HG może wpływać m.in. na dojrzewanie kolagenu poprzez hamowanie hydroksylazy prolinowej (P4HA1-3, ang. *prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1-3*) i hydroksylazy lizylowej (PLOD1-3, ang. *procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1-3*), prowadząc do upośledzenia ECM [45]. Z kolei deregulacje w ECM mogą mieć wpływ na modulacje fenotypu komórek immunologicznych i ich migrację. Przykładowo w przypadku rozluźnienia ECM, może wzrastać napływ limfocytów T [288]. Potwierdzają to także wyniki otrzymane z analizy qPCR, gdzie w podtypach ChS o wyższej zawartości macierzy chrzęstnej – G1/G2 dochodziło do spadku ekspresji genów związanych z migracją limfocytów T oraz z adhezją komórek odpornościowych; z kolei w przypadku ChS G3 występowała pozytywna regulacja adhezji komórkowej.

Pomimo zwiększonej infiltracji komórek immunologicznych, ze względu na złe rokowania pacjentów z mutacjami *IDH1*, układ immunologiczny najprawdopodobniej nie działał poprawnie. Taką rolę mutacji *IDH* wykryto m.in. w glejakach, gdzie w przypadku mutacji *IDH1* dochodzi do ucieczki nowotworu spod nadzoru immunologicznego na skutek zmniejszenia funkcji efektorowych komórek odpornościowych [289]. Nie można więc wykluczyć, że w przypadku ChS mutacje *IDH1* także przyczyniają się do hamowania funkcji układu immunologicznego, na co dodatkowy wpływ może mieć samo TME i np. wykryta w tej pracy ekspresja Gal-9 czy obecność TAMs.

Zarówno prezentowane w tej pracy wyniki jak i inne wieloparametryczne analizy prowadzone na ChS [217,239,253] dowodzą, że klasyfikacja pacjentów w oparciu o inne cechy np. molekularne czy reprezentowane TME jest jak najbardziej wskazana i może stanowić ważny czynnik prognostyczny. W tym badaniu, podtyp histologiczny ChS w pewnym stopniu definiował zarówno profil immunologiczny, jak i molekularny. DDCS charakteryzowały się największym zagęszczeniem komórek immunologicznych, a ChS G3 przeważającą obecnością mutacji w genie *IDH1*. Nie był to jednak jedyny czynnik determinujący zarówno przeżycie pacjentów, jak i występowanie poszczególnych immunofenotypów, czy zmian genetycznych. Przykładowo zarówno immunofenotyp „gorący”, jak i „pośredni” występowały także u niektórych pacjentów z rozpoznaniem ChS

G1, podobnie jak mutacje *IDH1*, które są generalnie powszechne w ChS [12]. Właściwym podejściem wydaje się więc indywidualne podejście do pacjenta na podstawie charakterystyki jego TME oraz profilu genetycznego i nie ograniczanie się jedynie do podtypu histologicznego.

Prezentowana praca pozwoliła w oparciu o profil immunologiczno-molekularny wytypować grupę pacjentów, u których immunoterapia mogłaby znaleźć potencjalnie zastosowanie. Pacjenci rokujący najgorzej o immunofenotypie „gorącym” i mutacjach *IDH1* wydają się być najlepszymi kandydatami do leczenia celowanego. Jak wykazano do tej pory inhibitory PD-1/PD-L1 nie były obiecujące w leczeniu pacjentów z rozpoznaniem ChS [154]. Wyniki tej pracy pokazują jednak, że ekspresja tych markerów była obecna tylko u części pacjentów, jednak nie była tak liczna w porównaniu do innych ICPs, takich jak Gal-9 czy TIM-3. Obiecującym podejściem może być więc połączenie immunoterapii z inhibitorami IDH. Skojarzenie inhibitorów ICPs oraz terapii celowanych przeciwko czynnikom modulującym TME jest obecnie testowane w wielu badaniach klinicznych i wydaje się perspektywiczne w leczeniu guzów litych. [290]. Przedstawione w pracy wyniki sugerują, że inhibitory Gal-9/TIM-3 oraz *IDH1* mogą stanowić obiecującą terapię w ChS. Generalnie stworzone w trakcie realizacji tego projektu klasyfikowanie immunologiczno-molekularne ChS daje szansę na indywidualizację strategii terapeutycznych w tych nowotworach.

Uzyskane w trakcie realizacji tej pracy wyniki stanowią obiecujący wstęp do dalszych badań w zakresie immunologii i biologii molekularnej ChS. Ze względu na ograniczoną w tym badaniu możliwość dokładnej oceny fenotypu komórek immunologicznych, kolejnym etapem powinno być dokładne zdefiniowanie fenotypu poszczególnych grup komórek biorących udział w TME ChS i określenie ich roli w kształtowaniu się odpowiedzi przeciwnowotworowej. Pomimo wskazania w badaniu istotnej roli mutacji *IDH1* jako czynnika prognostycznego u pacjentów z rozpoznaniem ChS, wciąż nieznana jest ich dokładna rola w patogenezie i progresji ChS, a także potencjalny mechanizm w kształtowaniu TME. Przyszłe prace powinny więc skupić się na poznaniu dokładnego mechanizmu działania mutacji *IDH1* zarówno na poziomie immunologicznym jak i molekularnym (obejmującym nie tylko genetyczne, ale i epigenetyczne aspekty). Finalnie, stworzenie odpowiednich modeli *in vitro* celem zbadania potencjału zastosowania zaproponowanej skojarzonej terapii, może stanowić interesujący kierunek dalszych badań.

6. Podsumowanie i wnioski

- 1) Uzyskane w pracy wyniki pozwoliły na stworzenie klasyfikacji immunologiczno-molekularnej ChS.
- 2) Pośród czynników klinicznych niezależny negatywny wpływ na OS pacjentów ma większy rozmiar guza oraz obecność podtypu DDCS.
- 3) ChS mają ogółem niskie TMB, niezależnie od podtypu histologicznego oraz nie wykazują MSI.
- 4) W ChS o wyższych stopniach złośliwości (G2/G3 i DDCS) występowała ogółem większa liczba złożonych zmian molekularnych (aberracji chromosomowych).
- 5) Szlaki molekularne związane z metabolizmem komórkowym, RTKs, białkiem p53, czy modyfikacjami chromatyny z udziałem białek histonowych mogą odgrywać znaczącą rolę w rozwoju i progresji ChS (szczególnie w przypadku ChS G3).
- 6) Obecność mutacji *IDH1* stanowi niezależny od podtypu histologicznego negatywny czynnik prognostyczny u pacjentów z rozpoznaniem ChS i może stanowić obiecujący cel terapeutyczny.
- 7) Występowanie mutacji *TP53*, *EPHA7* lub *PTCH1* może być negatywnym czynnikiem prognostycznym związanym z podtypami ChS o wyższych stopniach złośliwości histologicznej (G2/G3 i DDCS), co może sugerować udział mutacji w tych genach w progresji ChS.
- 8) Obecność określonych nacieków komórek immunologicznych w centrum i na obwodzie guza determinuje wystąpienie określonego immunofenotypu („gorącego”, „zimnego” lub „pośredniego”) u pacjentów z ChS, który ma wpływ na OS.
- 9) W podtypach ChS o wyższym stopniu złośliwości histologicznej występuje generalnie więcej komórek immunologicznych w centralnym regionie guza (zwłaszcza w przypadku DDCS).
- 10) Mikrośrodowisko ChS wykazuje cechy sugerujące występowanie immunosupresji, w którym największą rolę mogą odgrywać TAMs oraz markery związane z „wyczerpaniem” limfocytów, takie jak ekspresja Gal-9; może to mieć związek ze złym rokowaniem pacjentów wykazujących większą liczbę komórek immunologicznych w centralnym regionie guza (o immunofenotypie „gorącym”).

- 11) Występowanie mutacji *IDH1* lub obecność immunofenotypu „gorącego”, związanego z większymi naciekami komórek immunologicznych wewnątrz guza jest negatywnym i niezależnym czynnikiem prognostycznym.
- 12) W oparciu o profil immunologiczno-molekularny możliwe jest wytypowanie grupy pacjentów z mutacją w genie *IDH1* oraz o „gorącym” immunofenotypie, u których skojarzona immunoterapia z inhibitorami *IDH1* może przynieść potencjalne korzyści kliniczne.

Bibliografia

1. Główny Urząd Statystyczny *Umieralność w 2021 roku. Zgony według przyczyn - dane wstępne.*; Warszawa, Polska, **2021**.
2. Christyani, G.; Carswell, M.; Qin, S.; Kim, W. An Overview of Advances in Rare Cancer Diagnosis and Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 1201.
3. Greenlee, R.T.; Goodman, M.T.; Lynch, C.F.; Platz, C.E.; Havener, L.A.; Howe, H.L. The Occurrence of Rare Cancers in U.S. Adults, 1995–2004. *Public Health Rep.* **2010**, *125*, 28–43.
4. Nacev, B.A.; Sanchez-Vega, F.; Smith, S.A.; Antonescu, C.R.; Rosenbaum, E.; Shi, H.; Tang, C.; Socci, N.D.; Rana, S.; Gualarte-Mérida, R.; i in. Clinical sequencing of soft tissue and bone sarcomas delineates diverse genomic landscapes and potential therapeutic targets. *Nat. Commun.* **2022**, *13*.
5. Gounder, M.M.; Agaram, N.P.; Trabucco, S.E.; Robinson, V.; Ferraro, R.A.; Millis, S.Z.; Krishnan, A.; Lee, J.; Attia, S.; Abida, W.; i in. Clinical genomic profiling in the management of patients with soft tissue and bone sarcoma. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 3406.
6. Pillai, R.; Jayasree, K. Rare cancers: Challenges & issues. *Indian J. Med. Res.* **2017**, *145*, 17.
7. Gambardella, V.; Tarazona, N.; Cejalvo, J.M.; Lombardi, P.; Huerta, M.; Roselló, S.; Fleitas, T.; Roda, D.; Cervantes, A. Personalized Medicine: Recent Progress in Cancer Therapy. *Cancers (Basel)*. **2020**, *12*, 1009.
8. Palmerini, E.; Frega, G.; Gambarotti, M.; Frisoni, T.; Cesari, M.; Bazzocchi, A.; Miceli, M.; Donati, D.M.; Fanti, S.; Nanni, C.; i in. NTRK rearranged sarcoma of the bone. Role for larotrectinib in the neoadjuvant setting of an ultra-rare tumor: a case report. *Front. Oncol.* **2023**, *13*.
9. Assi, T.; Rassy, E.; Nassereddine, H.; Farhat, F.; Karak, F. El; Kattan, J.; Ghosn, M. TRK inhibition in soft tissue sarcomas: A comprehensive review. *Semin. Oncol.* **2020**, *47*, 73–84.
10. Fuchs, J.W.; Schulte, B.C.; Fuchs, J.R.; Agulnik, M. Targeted therapies for the treatment of soft tissue sarcoma. *Front. Oncol.* **2023**, *13*.
11. Rutkowski, P.; Świtaj, T.; Koseła-Paterczyk, H.; Kotrych, D.; Goryń, T.; Mazurkiewicz, T.; Fijuth, J.; Grzesiakowska, U.; Borkowska, A.; Spalek, M.; i in. Postępowanie diagnostyczno-terapeutyczne u chorych na mięsaki kości — zalecenia

ekspertów. *Onkol. w Prakt. Klin. - Eduk.* **2023**, 9, 181–200.

12. Bovée, J.V.M.G.; Bloem, J.L.; Flanagan, A.M.; Nielsen, G.P.; A., Y. *WHO Classification of Tumours: Soft Tissue and Bone Tumour*; 5th wyd.; WHO: Genewa, Szwajcaria, 2020; ISBN 978-92-832-4502-5.
13. Giuffrida, A.Y.; Burgueno, J.E.; Koniaris, L.G.; Gutierrez, J.C.; Duncan, R.; Scully, S.P. Chondrosarcoma in the United States (1973 to 2003): An Analysis of 2890 Cases from the SEER Database. *J. Bone Jt. Surgery-American Vol.* **2009**, 91, 1063–1072.
14. Valery, P.C.; Laversanne, M.; Bray, F. Bone cancer incidence by morphological subtype: a global assessment. *Cancer Causes Control* **2015**, 26, 1127–1139.
15. van Praag, V.M.; Rueten-Budde, A.J.; Ho, V.; Dijkstra, P.D.S.; Fiocco, M.; van de Sande, M.A.J.; van der Geest, I.C.; Bramer, J.A.; Schaap, G.R.; Jutte, P.C.; i in. Incidence, outcomes and prognostic factors during 25 years of treatment of chondrosarcomas. *Surg. Oncol.* **2018**, 27, 402–408.
16. Didkowska, Joanna A. Wojciechowska, Urszula Barańska, K.; Miklewska, M.; Michałek, I.; Olasek, P. *Nowotwory złośliwe w Polsce w 2021 roku*; Krajowy Rejestr Nowotworów: Warszawa, Polska, **2023**.
17. Damron, T.A.; Ward, W.G.; Stewart, A. Osteosarcoma, Chondrosarcoma, and Ewing's Sarcoma. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2007**, 459, 40–47.
18. Arora, R.S.; Alston, R.D.; Eden, T.O.B.; Geraci, M.; Birch, J.M. The contrasting age-incidence patterns of bone tumours in teenagers and young adults: Implications for aetiology. *Int. J. Cancer* **2012**, 131, 1678–1685.
19. Thorkildsen, J.; Taksdal, I.; Bjerkehagen, B.; Haugland, H.K.; Børge Johannesen, T.; Viset, T.; Norum, O.-J.; Bruland, Ø.; Zaikova, O. Chondrosarcoma in Norway 1990–2013; an epidemiological and prognostic observational study of a complete national cohort. *Acta Oncol. (Madr).* **2019**, 58, 273–282.
20. Verdegaal, S.H.M.; Bovée, J.V.M.G.; Pansuriya, T.C.; Grimer, R.J.; Ozger, H.; Jutte, P.C.; San Julian, M.; Biau, D.J.; Geest, I.C.M.; Leithner, A.; i in. Incidence, Predictive Factors, and Prognosis of Chondrosarcoma in Patients with Ollier Disease and Maffucci Syndrome: An International Multicenter Study of 161 Patients. *Oncologist* **2011**, 16, 1771–1779.
21. Murphey, M.D.; Walker, E.A.; Wilson, A.J.; Kransdorf, M.J.; Temple, H.T.; Gannon, F.H. From the Archives of the AFIP. *RadioGraphics* **2003**, 23, 1245–1278.

22. Leddy, L.R.; Holmes, R.E. Chondrosarcoma of Bone. W *Orthopaedic Oncology Primary and Metastatic Tumors of the Skeletal System*; Peabody, T.D., Attar, S., Red.; Springer International Publishing: Szwajcaria, **2014**; ss. 117–130; ISBN 978-3-319-07323-1.
23. Limaïem, F.; Davis, D.D.; Sticco, K.L. *Chondrosarcoma*; StatPearls Publishing LLC: Treasure Island, FL, USA, **2021**.
24. Rougraff, B.T.; Davis, K.; Lawrence, J. Does Length of Symptoms Before Diagnosis of Sarcoma Affect Patient Survival? *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2007**, *462*, 181–189.
25. Grimer, R.J.; Gosheger, G.; Taminiau, A.; Biau, D.; Matejovsky, Z.; Kollender, Y.; San-Julian, M.; Gherlinzoni, F.; Ferrari, C. Dedifferentiated chondrosarcoma: Prognostic factors and outcome from a European group. *Eur. J. Cancer* **2007**, *43*, 2060–2065.
26. Amer, K.M.; Munn, M.; Congiusta, D.; Abraham, J.A.; Basu Mallick, A. Survival and Prognosis of Chondrosarcoma Subtypes: SEER Database Analysis. *J. Orthop. Res.* **2020**, *38*, 311–319.
27. Wągrodzki, M.; Zając, A. Chrzęstniakomięsak cechy patomorfologiczne. W *Biblioteka Chirurga Onkologa. Tom 6. Mięsaki kości*; Jeziorski, A., Rutkowski, P., Red.; Via Medica: Gdańsk, Polska, **2022**; ss. 194–206.
28. Nazeri, E.; Gouran Savadkoohi, M.; Majidzadeh-A, K.; Esmaeili, R. Chondrosarcoma: An overview of clinical behavior, molecular mechanisms mediated drug resistance and potential therapeutic targets. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2018**, *131*, 102–109.
29. Italiano, A.; Mir, O.; Cioffi, A.; Palmerini, E.; Piperno-Neumann, S.; Perrin, C.; Chaigneau, L.; Penel, N.; Duffaud, F.; Kurtz, J.E.; i in. Advanced chondrosarcomas: role of chemotherapy and survival. *Ann. Oncol.* **2013**, *24*, 2916–2922.
30. Ozaki, T.; Hillmann, A.; Lindner, N.; Blasius, S.; Winkelmann, W. Metastasis of chondrosarcoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1996**, *122*, 625–8.
31. Funk, Z.; Sharma, P.; Carter, C. Hereditary Multiple Osteochondromas. *Consultant* **2021**, *61*(12), e42-e46.
32. Fei, L.; Ngoh, C.; Porter, D.E. Chondrosarcoma transformation in hereditary multiple exostoses: A systematic review and clinical and cost-effectiveness of a proposed screening model. *J. Bone Oncol.* **2018**, *13*, 114–122.

33. Kim, M.-J.; Cho, K.-J.; Ayala, A.G.; Ro, J.Y. Chondrosarcoma: with updates on molecular genetics. *Sarcoma* **2011**, *2011*, 405437.
34. Evans, H.L.; Ayala, A.G.; Romsdahl, M.M. Prognostic factors in chondrosarcoma of bone. A clinicopathologic analysis with emphasis on histologic grading. *Cancer* **1977**, *40*, 818–831.
35. Zając, A.E.; Kopeć, S.; Szostakowski, B.; Spalek, M.J.; Fiedorowicz, M.; Bylina, E.; Filipowicz, P.; Szumera-Ciećkiewicz, A.; Tysarowski, A.; Czarnecka, A.M.; i in. Chondrosarcoma-from Molecular Pathology to Novel Therapies. *Cancers (Basel)*. **2021**, *13*, 2390.
36. Chow, W.A. Chondrosarcoma: biology, genetics, and epigenetics. *F1000Research* **2018**, *7*, 1826.
37. Dahlin, D.C.; Beabout, J.W. Dedifferentiation of low-grade chondrosarcomas. *Cancer* **1971**, *28*, 461–466.
38. Wang, Y.; Meng, X.; Liu, W.; Wang, H.; Xin, T. Rare malignant primary spinal intradural extramedullary mesenchymal chondrosarcoma: a case report and literature review. *Transl. Cancer Res.* **2022**, *11*, 3371–3378.
39. Fiedorowicz, M.; Bartnik, E.; Sobczuk, P.; Teterycz, P.; Czarnecka, A.M. Molecular biology of sarcoma. *Oncol. Clin. Pract.* **2019**, *14*, 307–330.
40. Chebib, I.; Hornicek, F.J.; Bredella, M.A.; Deshpande, V.; Nielsen, G.P. Histologic variants of chondrosarcoma. *Diagnostic Histopathol.* **2014**, *20*, 172–180.
41. Amary, M.F.; Damato, S.; Halai, D.; Eskandarpour, M.; Berisha, F.; Bonar, F.; McCarthy, S.; Fantin, V.R.; Straley, K.S.; Lobo, S.; i in. Ollier disease and Maffucci syndrome are caused by somatic mosaic mutations of IDH1 and IDH2. *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 1262–1265.
42. Amary, M.F.; Bacsi, K.; Maggiani, F.; Damato, S.; Halai, D.; Berisha, F.; Pollock, R.; O'Donnell, P.; Grigoriadis, A.; Diss, T.; i in. IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours. *J. Pathol.* **2011**, *224*, 334–343.
43. Dang, L.; White, D.W.; Gross, S.; Bennett, B.D.; Bittinger, M.A.; Driggers, E.M.; Fantin, V.R.; Jang, H.G.; Jin, S.; Keenan, M.C.; i in. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* **2009**, *462*, 739–744.

44. Chesnelong, C. Isocitrate Dehydrogenase (IDH) Mutation in Gliomas. W *Next Generation Sequencing in Cancer Research, Volume 2*; Springer International Publishing: Cham, 2015; ss. 441–458.
45. Venneker, S.; Bovée, J.V.M.G. IDH Mutations in Chondrosarcoma: Case Closed or Not? *Cancers (Basel)*. **2023**, *15*, 3603.
46. Han, S.; Liu, Y.; Cai, S.J.; Qian, M.; Ding, J.; Larion, M.; Gilbert, M.R.; Yang, C. IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Br. J. Cancer* **2020**, *122*, 1580–1589.
47. Shenoy, S. CDH1 (E-Cadherin) Mutation and Gastric Cancer: Genetics, Molecular Mechanisms and Guidelines for Management. *Cancer Manag. Res.* **2019**, *Volume 11*, 10477–10486.
48. Bellon, M.; Bialuk, I.; Galli, V.; Bai, X.-T.; Farre, L.; Bittencourt, A.; Marçais, A.; Petrus, M.N.; Ratner, L.; Waldmann, T.A.; i in. Germinal epimutation of Fragile Histidine Triad (FHIT) gene is associated with progression to acute and chronic adult T-cell leukemia diseases. *Mol. Cancer* **2021**, *20*, 86.
49. Lee, J.-W.; Kim, D.-M.; Jang, J.-W.; Park, T.-G.; Song, S.-H.; Lee, Y.-S.; Chi, X.-Z.; Park, I.Y.; Hyun, J.-W.; Ito, Y.; i in. RUNX3 regulates cell cycle-dependent chromatin dynamics by functioning as a pioneer factor of the restriction-point. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1897.
50. Witkiewicz, A.K.; Knudsen, K.E.; Dicker, A.P.; Knudsen, E.S. The meaning of p16 ink4a expression in tumors. *Cell Cycle* **2011**, *10*, 2497–2503.
51. Cleven, A.H.G.; Suijker, J.; Agrogiannis, G.; Briaire-de Bruijn, I.H.; Frizzell, N.; Hoekstra, A.S.; Wijers-Koster, P.M.; Cleton-Jansen, A.-M.; Bovée, J.V.M.G. IDH1 or -2 mutations do not predict outcome and do not cause loss of 5-hydroxymethylcytosine or altered histone modifications in central chondrosarcomas. *Clin. Sarcoma Res.* **2017**, *7*, 8.
52. Suijker, J.; Oosting, J.; Koornneef, A.; Struys, E.A.; Salomons, G.S.; Schaap, F.G.; Waaijer, C.J.F.; Wijers-Koster, P.M.; Briaire-de Bruijn, I.H.; Haazen, L.; i in. Inhibition of mutant IDH1 decreases D-2-HG levels without affecting tumorigenic properties of chondrosarcoma cell lines. *Oncotarget* **2015**, *6*, 12505–12519.
53. TeSlaa, T.; Ralser, M.; Fan, J.; Rabinowitz, J.D. The pentose phosphate pathway in health and disease. *Nat. Metab.* **2023**, *5*, 1275–1289.

54. Zhu, G.G.; Nafa, K.; Agaram, N.; Zehir, A.; Benayed, R.; Sadowska, J.; Borsu, L.; Kelly, C.; Tap, W.D.; Fabbri, N.; i in. Genomic Profiling Identifies Association of IDH1/IDH2 Mutation with Longer Relapse-Free and Metastasis-Free Survival in High-Grade Chondrosarcoma. *Clin. Cancer Res.* **2020**, *26*, 419–427.
55. Lugowska, I.; Teterycz, P.; Mikula, M.; Kulecka, M.; Kluska, A.; Balabas, A.; Piatkowska, M.; Wagrodzki, M.; Pienkowski, A.; Rutkowski, P.; i in. IDH1/2 Mutations Predict Shorter Survival in Chondrosarcoma. *J. Cancer* **2018**, *9*, 998–1005.
56. Gao, L.; Hong, X.; Guo, X.; Cao, D.; Gao, X.; DeLaney, T.F.; Gong, X.; Chen, R.; Ni, J.; Yao, Y.; i in. Targeted next-generation sequencing of dedifferentiated chondrosarcoma in the skull base reveals combined TP53 and PTEN mutations with increased proliferation index, an implication for pathogenesis. *Oncotarget* **2016**, *7*, 43557–43569.
57. Tarpey, P.S.; Behjati, S.; Cooke, S.L.; Van Loo, P.; Wedge, D.C.; Pillay, N.; Marshall, J.; O'Meara, S.; Davies, H.; Nik-Zainal, S.; i in. Frequent mutation of the major cartilage collagen gene COL2A1 in chondrosarcoma. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 923–926.
58. Aubrey, B.J.; Strasser, A.; Kelly, G.L. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6*, a026062.
59. Lam, S.W.; Langevelde, K.; Suurmeijer, A.J.H.; Cleven, A.H.G.; Bovée, J.V.M.G. Conventional chondrosarcoma with focal clear cell change: a clinicopathological and molecular analysis. *Histopathology* **2019**, *75*, 843–852.
60. Park, Y.K.; Park, H.R.; Chi, S.G.; Kim, C.W.J.; Sohn, K.R.; Koh, J.S.; Kim, C.W.J.; Yang, W.I.; Ro, J.Y.; Ahn, K.W.; i in. Overexpression of p53 and rare genetic mutation in mesenchymal chondrosarcoma. *Oncol. Rep.* **2000**.
61. Knaus, B.J.; Grünwald, N.J. Inferring variation in copy number using high throughput sequencing data in R. *Front. Genet.* **2018**, *9*, doi:10.3389/fgene.2018.00123.
62. Cho, K.; Wang, X.; Nie, S.; Chen, Z.; Shin, D.M. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 1310–1316.
63. Campbell, V.T.; Nadesan, P.; Ali, S.A.; Wang, C.Y.Y.; Whetstone, H.; Poon, R.; Wei, Q.; Keilty, J.; Proctor, J.; Wang, L.W.; i in. Hedgehog Pathway Inhibition in Chondrosarcoma Using the Smoothed Inhibitor IPI-926 Directly Inhibits Sarcoma Cell Growth. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, *13*, 1259–1269.
64. Dobashi, Y.; Sugimura, H.; Sato, A.; Hirabayashi, T.; Kanda, H.; Kitagawa, T.; Kawaguchi, N.; Imamura, T.; Machinami, R. Possible association of p53

- overexpression and mutation with high-grade chondrosarcoma. *Diagn. Mol. Pathol.* **1993**, *2*, 257–63.
65. Bovée, J.V.M.G.; Hogendoorn, P.C.W.; Wunder, J.S.; Alman, B.A. Cartilage tumours and bone development: molecular pathology and possible therapeutic targets. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 481–488.
 66. Denu, R.A.; Yang, R.K.; Lazar, A.J.; Patel, S.S.; Lewis, V.O.; Roszik, J.; Livingston, J.A.; Wang, W.-L.; Shaw, K.R.; Ratan, R.; i in. Clinico-genomic profiling of conventional and dedifferentiated chondrosarcomas reveals TP53 mutation to be associated with worse outcomes. *Clin. Cancer Res.* **2023**.
 67. Oshiro, Y.; Chaturvedi, V.; Hayden, D.; Nazeer, T.; Johnson, M.; Johnston, D.A.; Ordóñez, N.G.; Ayala, A.G.; Czerniak, B. Altered p53 is associated with aggressive behavior of chondrosarcoma. *Cancer* **1998**, *83*, 2324–2334.
 68. Schrage, Y.M.; Lam, S.; Jochemsen, A.G.; Cleton-Jansen, A.; Taminiau, A.H.M.; Hogendoorn, P.C.W.; Bovée, J.V.M.G. Central chondrosarcoma progression is associated with pRb pathway alterations: CDK4 down-regulation and p16 overexpression inhibit cell growth in vitro. *J. Cell. Mol. Med.* **2009**, *13*, 2843–2852.
 69. Meijer, D.; de Jong, D.; Pansuriya, T.C.; van den Akker, B.E.; Picci, P.; Szuhai, K.; Bovée, J.V.G.M. Genetic characterization of mesenchymal, clear cell, and dedifferentiated chondrosarcoma. *Genes, Chromosom. Cancer* **2012**, *51*, 899–909.
 70. Cleven, A.H.G.; Zwartkruis, E.; Hogendoorn, P.C.W.; Kroon, H.M.; Briaire-de Bruijn, I.; Bovée, J.V.M.G. Periosteal chondrosarcoma: a histopathological and molecular analysis of a rare chondrosarcoma subtype. *Histopathology* **2015**, *67*, 483–490.
 71. Xia, Y.; Liu, Y.; Yang, C.; Simeone, D.M.; Sun, T.-T.; DeGraff, D.J.; Tang, M.; Zhang, Y.; Wu, X.-R. Dominant role of CDKN2B/p15INK4B of 9p21.3 tumor suppressor hub in inhibition of cell-cycle and glycolysis. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 2047.
 72. Tlemsani, C.; Larousserie, F.; De Percin, S.; Audard, V.; Hadjadj, D.; Chen, J.; Biau, D.; Anract, P.; Terris, B.; Goldwasser, F.; i in. Biology and Management of High-Grade Chondrosarcoma: An Update on Targets and Treatment Options. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 1361.

73. Amary, M.F.; Ye, H.; Forbes, G.; Damato, S.; Maggiani, F.; Pollock, R.; Tirabosco, R.; Flanagan, A.M. Isocitrate dehydrogenase 1 mutations (IDH1) and p16/CDKN2A copy number change in conventional chondrosarcomas. *Virchows Arch.* **2015**, *466*, 217–222.
74. Aigner, T.; Dertinger, S.; Belke, J.; Kirchner, T. Chondrocytic cell differentiation in clear cell chondrosarcoma. *Hum. Pathol.* **1996**, *27*, 1301–1305.
75. Schwab, J.H.; Boland, P.J.; Agaram, N.P.; Socci, N.D.; Guo, T.; O'Toole, G.C.; Wang, X.; Ostroumov, E.; Hunter, C.J.; Block, J.A.; et al. Chordoma and chondrosarcoma gene profile: implications for immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **2009**, *58*, 339–349.
76. Jia, Y.; Wang, Y.; Xie, J. The Hedgehog pathway: role in cell differentiation, polarity and proliferation. *Arch. Toxicol.* **2015**, *89*, 179–191.
77. Tiet, T.D.; Hopyan, S.; Nadesan, P.; Gokgoz, N.; Poon, R.; Lin, A.C.; Yan, T.; Andrulis, I.L.; Alman, B.A.; Wunder, J.S. Constitutive Hedgehog Signaling in Chondrosarcoma Up-Regulates Tumor Cell Proliferation. *Am. J. Pathol.* **2006**, *168*, 321–330.
78. Cannonier, S.; Sterling, J. The Role of Hedgehog Signaling in Tumor Induced Bone Disease. *Cancers (Basel)*. **2015**, *7*, 1658–1683.
79. Sakamoto, A. The molecular pathogenesis of dedifferentiated chondrosarcoma. *Indian J. Orthop.* **2014**, *48*, 262.
80. Polychronidou, G.; Karavasilis, V.; Pollack, S.M.; Huang, P.H.; Lee, A.; Jones, R.L. Novel therapeutic approaches in chondrosarcoma. *Futur. Oncol.* **2017**, *13*, 637–648.
81. Yan, T.; Angelini, M.; Alman, B.A.; Andrulis, I.L.; Wunder, J.S. PATCHED-ONE or SMOOTHENED Gene Mutations Are Infrequent in Chondrosarcoma. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2008**, *466*, 2184–2189.
82. Xiang, W.; Jiang, T.; Guo, F.; Gong, C.; Yang, K.; Wu, Y.; Huang, X.; Cheng, W.; Xu, K. Hedgehog pathway inhibitor-4 suppresses malignant properties of chondrosarcoma cells by disturbing tumor ciliogenesis. *Oncol. Rep.* **2014**, *32*, 1622–1630.
83. Sun, Y.; Guo, W.; Ren, T.; Liang, W.; Zhou, W.; Lu, Q.; Jiao, G.; Yan, T. Gli1 inhibition suppressed cell growth and cell cycle progression and induced apoptosis as well as autophagy depending on ERK1/2 activity in human chondrosarcoma cells. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e979–e979.

84. Italiano, A.; Le Cesne, A.; Bellera, C.; Piperno-Neumann, S.; Duffaud, F.; Penel, N.; Cassier, P.; Domont, J.; Takebe, N.; Kind, M.; i in. GDC-0449 in patients with advanced chondrosarcomas: a French Sarcoma Group/US and French National Cancer Institute Single-Arm Phase II Collaborative Study. *Ann. Oncol.* **2013**, *24*, 2922–2926.
85. Zhang, Y.-X.; van Oosterwijk, J.G.; Sicinska, E.; Moss, S.; Remillard, S.P.; van Wezel, T.; Bühnemann, C.; Hassan, A.B.; Demetri, G.D.; Bovée, J.V.M.G.; i in. Functional Profiling of Receptor Tyrosine Kinases and Downstream Signaling in Human Chondrosarcomas Identifies Pathways for Rational Targeted Therapy. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 3796–3807.
86. Jang, J.-H.; Chung, C.-P. Tenascin-C promotes cell survival by activation of Akt in human chondrosarcoma cell. *Cancer Lett.* **2005**, *229*, 101–105.
87. Schrage, Y.M.; Briaire-de Bruijn, I.H.; de Miranda, N.F.C.C.; van Oosterwijk, J.; Taminiau, A.H.M.; van Wezel, T.; Hogendoorn, P.C.W.; Bovée, J.V.M.G. Kinome Profiling of Chondrosarcoma Reveals Src-Pathway Activity and Dasatinib as Option for Treatment. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 6216–6222.
88. Van Oosterwijk, J.G.; van Ruler, M.A.J.H.; Briaire-de Bruijn, I.H.; Herpers, B.; Gelderblom, H.; van de Water, B.; Bovée, J.V.M.G. Src kinases in chondrosarcoma chemoresistance and migration: dasatinib sensitises to doxorubicin in TP53 mutant cells. *Br. J. Cancer* **2013**, *109*, 1214–1222.
89. Cote, G.M.; He, J.; Choy, E. Next-Generation Sequencing for Patients with Sarcoma: A Single Center Experience. *Oncologist* **2018**, *23*, 234–242.
90. Carnero, A.; Blanco-Aparicio, C.; Renner, O.; Link, W.; Leal, J. The PTEN/PI3K/AKT Signalling Pathway in Cancer, Therapeutic Implications. *Curr. Cancer Drug Targets* **2008**, *8*, 187–198.
91. Zhang, H.; Cicchetti, G.; Onda, H.; Koon, H.B.; Asrican, K.; Bajraszewski, N.; Vazquez, F.; Carpenter, C.L.; Kwiatkowski, D.J. Loss of Tsc1/Tsc2 activates mTOR and disrupts PI3K-Akt signaling through downregulation of PDGFR. *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 1223–1233.
92. Zhang, Y.; Chen, Y.; Yang, C.; Seger, N.; Hesla, A.C.; Tsagkozis, P.; Larsson, O.; Lin, Y.; Haglund, F. TERT promoter mutation is an objective clinical marker for disease progression in chondrosarcoma. *Mod. Pathol.* **2021**, *34*, 2020–2027.

93. Totoki, Y.; Yoshida, A.; Hosoda, F.; Nakamura, H.; Hama, N.; Ogura, K.; Yoshida, A.; Fujiwara, T.; Arai, Y.; Toguchida, J.; i in. Unique mutation portraits and frequent COL2A1 gene alteration in chondrosarcoma. *Genome Res.* **2014**, *24*, 1411–1420.
94. Morrison, C.; Radmacher, M.; Mohammed, N.; Suster, D.; Auer, H.; Jones, S.; Rigganbach, J.; Kelbick, N.; Bos, G.; Mayerson, J. MYC Amplification and Polysomy 8 in Chondrosarcoma: Array Comparative Genomic Hybridization, Fluorescent In Situ Hybridization, and Association With Outcome. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 9369–9376.
95. Hallor, K.H.; Staaf, J.; Bovée, J.V.M.G.; Hogendoorn, P.C.W.; Cleton-Jansen, A.-M.; Knuutila, S.; Savola, S.; Niini, T.; Brosjö, O.; Bauer, H.C.F.; i in. Genomic Profiling of Chondrosarcoma: Chromosomal Patterns in Central and Peripheral Tumors. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 2685–2694.
96. Sandberg, A.A.; Bridge, J.A. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.* **2003**, *143*, 1–31.
97. Qi, W.; Rosikiewicz, W.; Yin, Z.; Xu, B.; Jiang, H.; Wan, S.; Fan, Y.; Wu, G.; Wang, L. Genomic profiling identifies genes and pathways dysregulated by HEY1–NCOA2 fusion and shines a light on mesenchymal chondrosarcoma tumorigenesis. *J. Pathol.* **2022**, *257*, 579–592.
98. Nyquist, K.B.; Panagopoulos, I.; Thorsen, J.; Haugom, L.; Gorunova, L.; Bjerkehagen, B.; Fosså, A.; Guriby, M.; Nome, T.; Lothe, R.A.; i in. Whole-Transcriptome Sequencing Identifies Novel IRF2BP2-CDX1 Fusion Gene Brought about by Translocation t(1;5)(q42;q32) in Mesenchymal Chondrosarcoma. *PLoS One* **2012**, *7*, e49705.
99. Laitinen, M.K.; Parry, M.C.; Le Nail, L.-R.; Wigley, C.H.; Stevenson, J.D.; Jeys, L.M. Locally recurrent chondrosarcoma of the pelvis and limbs can only be controlled by wide local excision. *Bone Joint J.* **2019**, *101-B*, 266–271.
100. Donati, D.; Ghoneimy, A. El; Bertoni, F.; Di Bella, C.; Mercuri, M. Surgical treatment and outcome of conventional pelvic chondrosarcoma. *J. Bone Joint Surg. Br.* **2005**, *87-B*, 1527–1530.
101. Fiorenza, F.; Abudu, A.; Grimer, R.J.; Carter, S.R.; Tillman, R.M.; Ayoub, K.; Mangham, D.C.; Davies, A.M. Risk factors for survival and local control in chondrosarcoma of bone. *J. Bone Jt. Surg.* **2002**, *84*, 93–99.
102. Stevenson, J.D.; Laitinen, M.K.; Parry, M.C.; Sumathi, V.; Grimer, R.J.; Jeys, L.M.

- The role of surgical margins in chondrosarcoma. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2018**, *44*, 1412–1418.
103. Damron, T.A. Endoprosthetic replacement following limb-sparing resection for bone sarcoma. *Semin. Surg. Oncol.* **1997**, *13*, 3–10.
 104. Sina Coşkun, H.; Erdoğan, F.; Büyükceran, İ.; Dabak, N. Evaluation of prognostic factors affecting survival in chondrosarcoma treatment and comparison with literature. *Jt. Dis. Relat. Surg.* **2022**, *33*, 440–448.
 105. Kawaguchi, S.; Weiss, I.; Lin, P.P.; Huh, W.W.; Lewis, V.O. Radiation Therapy Is Associated With Fewer Recurrences in Mesenchymal Chondrosarcoma. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2014**, *472*, 856–864.
 106. Hompland, I.; Ferrari, S.; Bielack, S.; Palmerini, E.; Hall, K.S.; Picci, P.; Hecker-Nolting, S.; Donati, D.M.; Blattmann, C.; Bjerkehagen, B.; i in. Outcome in dedifferentiated chondrosarcoma for patients treated with multimodal therapy: Results from the EUROpean Bone Over 40 Sarcoma Study. *Eur. J. Cancer* **2021**, *151*, 150–158.
 107. Jamil, N.; Howie, S.; Salter, D.M. Therapeutic molecular targets in human chondrosarcoma. *Int. J. Exp. Pathol.* **2010**, *91*, 387–393.
 108. Wyman, J.J.; Hornstein, A.M.; Meitner, P.A.; Mak, S.; Verdier, P.; Block, J.A.; Pan, J.; Terek, R.M. Multidrug resistance-1 and p-glycoprotein in human chondrosarcoma cell lines: Expression correlates with decreased intracellular doxorubicin and in vitro chemoresistance. *J. Orthop. Res.* **1999**, *17*, 935–940.
 109. Lechler, P.; Renkawitz, T.; Campean, V.; Balakrishnan, S.; Tingart, M.; Grifka, J.; Schaumburger, J. The antiapoptotic gene survivin is highly expressed in human chondrosarcoma and promotes drug resistance in chondrosarcoma cells in vitro. *BMC Cancer* **2011**, *11*, 120.
 110. de Jong, Y.; Ingola, M.; Briaire-de Bruijn, I.H.; Kruisselbrink, A.B.; Venneker, S.; Palubeckaite, I.; Heijts, B.P.A.M.; Cleton-Jansen, A.-M.; Haas, R.L.M.; Bovée, J.V.M.G. Radiotherapy resistance in chondrosarcoma cells; a possible correlation with alterations in cell cycle related genes. *Clin. Sarcoma Res.* **2019**, *9*, 9.
 111. National Comprehensive Cancer Network® NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Bone Cancer. **2024**. Dostępne na: <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1418> [16 maja 2024].

112. Monga, V.; Mani, H.; Hirbe, A.; Milhem, M. Non-Conventional Treatments for Conventional Chondrosarcoma. *Cancers (Basel)*. **2020**, *12*, 1962.
113. Scandinavian Sarcoma Group. SSG XXIV Recommendations for Radiotherapy in Bone- and Soft Tissue Sarcoma. **2015**. Dostępne na: <https://www.ssg-org.net/wp-content/uploads/2011/05/SSG-RT-Guidelines-December-2015.pdf> [16 maja 2024].
114. DeLaney, T.F.; Liebsch, N.J.; Pedlow, F.X.; Adams, J.; Weyman, E.A.; Yeap, B.Y.; Depauw, N.; Nielsen, G.P.; Harmon, D.C.; Yoon, S.S.; i in. Long-term results of Phase II study of high dose photon/proton radiotherapy in the management of spine chordomas, chondrosarcomas, and other sarcomas. *J. Surg. Oncol.* **2014**, *110*, 115–122.
115. Ares, C.; Hug, E.B.; Lomax, A.J.; Bolsi, A.; Timmermann, B.; Rutz, H.P.; Schuller, J.C.; Pedroni, E.; Goitein, G. Effectiveness and Safety of Spot Scanning Proton Radiation Therapy for Chordomas and Chondrosarcomas of the Skull Base: First Long-Term Report. *Int. J. Radiat. Oncol.* **2009**, *75*, 1111–1118.
116. Kalinski, T.; Krueger, S.; Sel, S.; Werner, K.; Ropke, M.; Roessner, A. Differential expression of VEGF-A and angiopoietins in cartilage tumors and regulation by interleukin-1 β . *Cancer* **2006**, *106*, 2028–2038.
117. Morioka, H.; Weissbach, L.; Vogel, T.; Nielsen, G.P.; Faircloth, G.T.; Shao, L.; Hornicek, F.J. Antiangiogenesis treatment combined with chemotherapy produces chondrosarcoma necrosis. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 1211–7.
118. Furumatsu, T.; Nishida, K.; Kawai, A.; Namba, M.; Inoue, H.; Ninomiya, Y. Human chondrosarcoma secretes vascular endothelial growth factor to induce tumor angiogenesis and stores basic fibroblast growth factor for regulation of its own growth. *Int. J. Cancer* **2002**, *97*, 313–322.
119. Jones, R.L.; Katz, D.; Loggers, E.T.; Davidson, D.; Rodler, E.T.; Pollack, S.M. Clinical benefit of antiangiogenic therapy in advanced and metastatic chondrosarcoma. *Med. Oncol.* **2017**, *34*, 167.
120. Chow, W.; Frankel, P.; Ruel, C.; Araujo, D.M.; Milhem, M.; Okuno, S.; Hartner, L.; Undevia, S.; Staddon, A. Results of a prospective phase 2 study of pazopanib in patients with surgically unresectable or metastatic chondrosarcoma. *Cancer* **2020**, *126*, 105–111.
121. Tap, W.D.; Villalobos, V.M.; Cote, G.M.; Burris, H.; Janku, F.; Mir, O.; Beeram, M.; Wagner, A.J.; Jiang, L.; Wu, B.; i in. Phase I Study of the Mutant IDH1 Inhibitor

- Ivosidenib: Safety and Clinical Activity in Patients With Advanced Chondrosarcoma. *J. Clin. Oncol.* **2020**, *38*, 1693–1701.
122. Bernstein-Molho, R.; Kollender, Y.; Issakov, J.; Bickels, J.; Dadia, S.; Flusser, G.; Meller, I.; Sagi-Eisenberg, R.; Merimsky, O. Clinical activity of mTOR inhibition in combination with cyclophosphamide in the treatment of recurrent unresectable chondrosarcomas. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2012**, *70*, 855–860.
 123. Schwartz, G.K.; Tap, W.D.; Qin, L.-X.; Livingston, M.B.; Undevia, S.D.; Chmielowski, B.; Agulnik, M.; Schuetze, S.M.; Reed, D.R.; Okuno, S.H.; i in. Cixutumumab and temsirolimus for patients with bone and soft-tissue sarcoma: a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **2013**, *14*, 371–382.
 124. Sheikh, T.; Patwardhan, P.; Schwartz, G.K. Abstract 5066: Combination treatment with SAHA and 5-Azacytidine (Decitabine) induces apoptosis and suppresses tumor growth in preclinical models of chondrosarcoma. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 5066–5066.
 125. Sakimura, R.; Tanaka, K.; Yamamoto, S.; Matsunobu, T.; Li, X.; Hanada, M.; Okada, T.; Nakamura, T.; Li, Y.; Iwamoto, Y. The Effects of Histone Deacetylase Inhibitors on the Induction of Differentiation in Chondrosarcoma Cells. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 275–282.
 126. Grignani, G.; Palmerini, E.; Stacchiotti, S.; Boglione, A.; Ferraresi, V.; Frustaci, S.; Comandone, A.; Casali, P.G.; Ferrari, S.; Aglietta, M. A phase 2 trial of imatinib mesylate in patients with recurrent nonresectable chondrosarcomas expressing platelet-derived growth factor receptor- α or - β . *Cancer* **2011**, *117*, 826–831.
 127. Schuetze, S.M.; Bolejack, V.; Choy, E.; Ganjoo, K.N.; Staddon, A.P.; Chow, W.A.; Tawbi, H.A.; Samuels, B.L.; Patel, S.R.; von Mehren, M.; i in. Phase 2 study of dasatinib in patients with alveolar soft part sarcoma, chondrosarcoma, chordoma, epithelioid sarcoma, or solitary fibrous tumor. *Cancer* **2017**, *123*, 90–97.
 128. Otero, J.E.; Stevens, J.W.; Malandra, A.E.; Fredericks, D.C.; Odgren, P.R.; Buckwalter, J.A.; Morcuende, J. Osteoclast inhibition impairs chondrosarcoma growth and bone destruction. *J. Orthop. Res.* **2014**, *32*, 1562–1571.
 129. Chawla, S.P.; Conley, A.P.; Lieu, C.; Wilky, B.A.; Tolcher, A.; Chao, J.; Lakhani, N.J.; Diab, M.; Berz, D.; Senne, L.; i in. Updated efficacy and safety of the tetravalent death receptor 5 agonist inbrx-109 in patients with chondrosarcoma: data from the phase 1 expansion cohorts.; CTOS Annual Meeting: Vancouver, Kanada, **2022**.

130. Dunn, G.P.; Bruce, A.T.; Ikeda, H.; Old, L.J.; Schreiber, R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 991–998.
131. Anderson, N.M.; Simon, M.C. The tumor microenvironment. *Curr. Biol.* **2020**, *30*, R921–R925.
132. Frankowska, K.; Zarobkiewicz, M.; Dąbrowska, I.; Bojarska-Junak, A. Tumor infiltrating lymphocytes and radiological picture of the tumor. *Med. Oncol.* **2023**, *40*, 1–14.
133. Caner, A. Immune Escape Mechanism of Cancer. *Curr. Mol. Biol. Reports* **2023**, *10*, 9–19.
134. Sautès-Fridman, C.; Petitprez, F.; Calderaro, J.; Fridman, W.H. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2019**, *19*, 307–325.
135. Zhang, Q.; Wu, S. Tertiary lymphoid structures are critical for cancer prognosis and therapeutic response. *Front. Immunol.* **2023**, *13*, 1–18.
136. Pan, Y.; Yu, Y.; Wang, X.; Zhang, T. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 583084.
137. Chen, D.S.; Mellman, I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* **2013**, *39*, 1–10.
138. Pardoll, D.M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 252–264.
139. Thanindrarn, P.; Dean, D.C.; Nelson, S.D.; Hornicek, F.J.; Duan, Z. Advances in immune checkpoint inhibitors for bone sarcoma therapy. *J. Bone Oncol.* **2019**, *15*, 100221.
140. Yang, R.; Sun, L.; Li, C.F.; Wang, Y.H.; Yao, J.; Li, H.; Yan, M.; Chang, W.C.; Hsu, J.M.; Cha, J.H.; i in. Galectin-9 interacts with PD-1 and TIM-3 to regulate T cell death and is a target for cancer immunotherapy. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 832.
141. Reck, M.; Rodríguez-Abreu, D.; Robinson, A.G.; Hui, R.; Csősz, T.; Fülöp, A.; Gottfried, M.; Peled, N.; Tafreshi, A.; Cuffe, S.; i in. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 1823–1833.
142. Motzer, R.J.; Escudier, B.; McDermott, D.F.; George, S.; Hammers, H.J.; Srinivas, S.; Tykodi, S.S.; Sosman, J.A.; Procopio, G.; Plimack, E.R.; i in. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 1803–1813.

143. Wolchok, J.D.; Chiarion-Sileni, V.; Gonzalez, R.; Rutkowski, P.; Grob, J.-J.; Cowey, C.L.; Lao, C.D.; Wagstaff, J.; Schadendorf, D.; Ferrucci, P.F.; et al. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 1345–1356.
144. Liu, Y.-T.; Sun, Z.-J. Turning cold tumors into hot tumors by improving T-cell infiltration. *Theranostics* **2021**, *11*, 5365–5386.
145. Wang, L.; Geng, H.; Liu, Y.; Liu, L.; Chen, Y.; Wu, F.; Liu, Z.; Ling, S.; Wang, Y.; Zhou, L. Hot and cold tumors: Immunological features and the therapeutic strategies. *MedComm* **2023**, *4*, e343.
146. Rytlewski, J.; Milhem, M.M.; Monga, V. Turning ‘Cold’ tumors ‘Hot’: immunotherapies in sarcoma. *Ann. Transl. Med.* **2021**, *9*, 1039–1039.
147. Koseła-Paterczyk, H. Immunotherapy in sarcoma. *Nowotwory. J. Oncol.* **2020**, *70*, 296–302.
148. Dancsok, A.R.; Gao, D.; Lee, A.F.; Steigen, S.E.; Blay, J.-Y.Y.; Thomas, D.M.; Maki, R.G.; Nielsen, T.O.; Demicco, E.G. Tumor-associated macrophages and macrophage-related immune checkpoint expression in sarcomas. *Oncoimmunology* **2020**, *9*, 1747340.
149. Richert, I.; Gomez-Brouchet, A.; Bouvier, C.; Du Bouexic De Pinieux, G.; Karanian, M.; Blay, J.-Y.; Dutour, A. The immune landscape of chondrosarcoma - potential for therapeutic targeting of CSFR1+ macrophages. *J. Bone Oncol.* **2020**, *20*, 100271.
150. Simard, F.A.; Richert, I.; Vandermoeten, A.; Decouvelaere, A.-V.; Michot, J.-P.; Caux, C.; Blay, J.-Y.; Dutour, A. Description of the immune microenvironment of chondrosarcoma and contribution to progression. *Oncoimmunology* **2017**, *6*, e1265716.
151. Kostine, M.; Cleven, A.H.; de Miranda, N.F.C.C.; Italiano, A.; Cleton-Jansen, A.-M.; Bovée, J.V.M.G. Analysis of PD-L1, T-cell infiltrate and HLA expression in chondrosarcoma indicates potential for response to immunotherapy specifically in the dedifferentiated subtype. *Mod. Pathol.* **2016**, *29*, 1028–1037.
152. Yang, X.; Zhu, G.; Yang, Z.; Zeng, K.; Liu, F.; Sun, J. Expression of PD-L1/PD-L2 is associated with high proliferation index of Ki-67 but not with TP53 overexpression in chondrosarcoma. *Int. J. Biol. Markers* **2018**, *33*, 507–513.
153. Zhang, Y.; Chen, Y.; Papakonstantinou, A.; Tsagkozis, P.; Linder-Stragliotto, C.;

- Haglund, F. Evaluation of PD-L1 Expression in Undifferentiated Pleomorphic Sarcomas, Liposarcomas and Chondrosarcomas. *Biomolecules* **2022**, *12*, 292.
154. Cohen-Nowak, A.J.; Dressler, D.B.; Rock, A.; Mojica, K.; Woo, D.; Zuckerman, L.M.; Chow, W.; Agulnik, M. Role of immunotherapy in chondrosarcoma: A case report and review of the literature. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2023**, *15*.
 155. Tawbi, H.A.; Burgess, M.; Bolejack, V.; Van Tine, B.A.; Schuetze, S.M.; Hu, J.; D'Angelo, S.; Attia, S.; Riedel, R.F.; Priebat, D.A.; i in. Pembrolizumab in advanced soft-tissue sarcoma and bone sarcoma (SARC028): a multicentre, two-cohort, single-arm, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **2017**, *18*, 1493–1501.
 156. Paoluzzi, L.; Cacavio, A.; Ghesani, M.; Karambelkar, A.; Rapkiewicz, A.; Weber, J.; Rosen, G. Response to anti-PD1 therapy with nivolumab in metastatic sarcomas. *Clin. Sarcoma Res.* **2016**, *6*, 24.
 157. Wagner, M.J.; Ricciotti, R.W.; Mantilla, J.; Loggers, E.T.; Pollack, S.M.; Cranmer, L.D. Response to PD1 inhibition in conventional chondrosarcoma. *J. Immunother. Cancer* **2018**, *6*, 94.
 158. Pollack, S.M.; Redman, M.W.; Baker, K.K.; Wagner, M.J.; Schroeder, B.A.; Loggers, E.T.; Trieselmann, K.; Copeland, V.C.; Zhang, S.; Black, G.; i in. Assessment of Doxorubicin and Pembrolizumab in Patients With Advanced Anthracycline-Naive Sarcoma. *JAMA Oncol.* **2020**, *6*, 1778.
 159. Sha, D.; Jin, Z.; Budczies, J.; Kluck, K.; Stenzinger, A.; Sinicrope, F.A. Tumor Mutational Burden as a Predictive Biomarker in Solid Tumors. *Cancer Discov.* **2020**, *10*, 1808–1825.
 160. Büttner, R.; Longshore, J.W.; López-Ríos, F.; Merkelbach-Bruse, S.; Normanno, N.; Rouleau, E.; Penault-Llorca, F. Implementing TMB measurement in clinical practice: Considerations on assay requirements. *ESMO Open* **2019**, *4*, 1–12.
 161. Palmeri, M.; Mehnert, J.; Silk, A.W.; Jabbour, S.K.; Ganesan, S.; Popli, P.; Riedlinger, G.; Stephenson, R.; de Meritens, A.B.; Leiser, A.; i in. Real-world application of tumor mutational burden-high (TMB-high) and microsatellite instability (MSI) confirms their utility as immunotherapy biomarkers. *ESMO Open* **2022**, *7*, 100336.
 162. Wang, P.; Chen, Y.; Wang, C. Beyond Tumor Mutation Burden: Tumor Neoantigen Burden as a Biomarker for Immunotherapy and Other Types of Therapy. *Front. Oncol.* **2021**, *11*.

163. Ward, J.P.; Gubin, M.M.; Schreiber, R.D. The Role of Neoantigens in Naturally Occurring and Therapeutically Induced Immune Responses to Cancer. W *Advances in Immunology*; Schreiber, R.D., Red.; Academic Press, 2016; ss. 25–74; ISBN 9780128051566.
164. Strickler, J.H.; Hanks, B.A.; Khasraw, M. Tumor Mutational Burden as a Predictor of Immunotherapy Response: Is More Always Better? *Clin. Cancer Res.* **2021**, *27*, 1236–1241.
165. Li, K.; Luo, H.; Huang, L.; Luo, H.; Zhu, X. Microsatellite instability: A review of what the oncologist should know. *Cancer Cell Int.* **2020**, *20*.
166. van Maldegem, F.; de Wit, M.; Morsink, F.; Musler, A.; Weegenaar, J.; van Noesel, C.J.M. Effects of Processing Delay, Formalin Fixation, and Immunohistochemistry on RNA Recovery From Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissue Sections. *Diagnostic Mol. Pathol.* **2008**, *17*, 51–58.
167. Goodman, A.M.; Sokol, E.S.; Frampton, G.M.; Lippman, S.M.; Kurzrock, R. Microsatellite-Stable Tumors with High Mutational Burden Benefit from Immunotherapy. *Cancer Immunol. Res.* **2019**, *7*, 1570–1573.
168. Lam, S.W.; Kostine, M.; de Miranda, N.F.C.C.; Schöffski, P.; Lee, C.-J.; Morreau, H.; Bovée, J.V.M.G. Mismatch repair deficiency is rare in bone and soft tissue tumors. *Histopathology* **2021**, *79*, 509–520.
169. Cappello, F.; Angerilli, V.; Munari, G.; Ceccon, C.; Sabbadin, M.; Pagni, F.; Fusco, N.; Malapelle, U.; Fassan, M. FFPE-Based NGS Approaches into Clinical Practice: The Limits of Glory from a Pathologist Viewpoint. *J. Pers. Med.* **2022**, *12*, 750.
170. Thermo Fisher Scientific Inc. Ion Reporter Software 5.20 Help. **2023**. Dostępne na: <https://ionreporter.thermofisher.com/ionreporter/help/GUID-7355C2DB-5AC9-4EF6-B166-1F55ABE0F1BA.html> [16 maja 2024].
171. Thermo Fisher Scientific Inc. Flyer: Oncomine Tumor Mutation Load Assay. **2019**. Dostępne na: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FCSD%2FFlyers%2Foncomine-tumor-mutation-load-assay-flyer.pdf> [16 maja 2024].
172. Kim, S.; Park, C.; Ji, Y.; Kim, D.G.; Bae, H.; van Vrancken, M.; Kim, D.-H.; Kim, K.-M. Deamination Effects in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Samples

in the Era of Precision Medicine. *J. Mol. Diagnostics* **2017**, *19*, 137–146.

173. Berra, C.M.; Torrezan, G.T.; de Paula, C.A.; Hsieh, R.; Lourenço, S. V.; Carraro, D.M. Use of uracil-DNA glycosylase enzyme to reduce DNA-related artifacts from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues in diagnostic routine. *Appl. Cancer Res.* **2019**, *39*, 1–6.
174. Do, H.; Dobrovic, A. Dramatic reduction of sequence artefacts from DNA isolated from formalin-fixed cancer biopsies by treatment with uracil-DNA glycosylase. *Oncotarget* **2012**, *3*, 546–558.
175. Thermo Fisher Scientific Inc. User Guide: Oncomine™ Tumor Mutation Load Assay. **2018**. Dostępne na: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A37909> [16 maja 2024].
176. Thermo Fisher Scientific Inc. Ion Torrent Next-Generation Sequencing Technology. **2020**. Dostępne na: <https://www.thermofisher.com/pl/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-technology.html> [16 maja 2024].
177. Kanagal-Shamanna, R. Emulsion PCR: Techniques and Applications. W *Clinical Applications of PCR. Methods in Molecular Biology*; Luthra, R., Singh, R., Patel, K., Red.; Humana Press: New York, Nowy Jork, USA, **2016**; ss. 33–42.
178. Nakano, M.; Komatsu, J.; Matsuura, S.; Takashima, K.; Katsura, S.; Mizuno, A. Single-molecule PCR using water-in-oil emulsion. *J. Biotechnol.* **2003**, *102*, 117–124.
179. Thermo Fisher Scientific Inc. Ion PI™ Hi-Q™ OT2 200 Kit Quick Reference. **2017**. Dostępne na: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0010858_Ion_PI_HiQ_OT2_200_Kit_QR.pdf [16 maja 2024].
180. McKenna, A.; Hanna, M.; Banks, E.; Sivachenko, A.; Cibulskis, K.; Kernytsky, A.; Garimella, K.; Altshuler, D.; Gabriel, S.; Daly, M.; i in. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **2010**, *20*, 1297–1303.
181. Li, H.; Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1754–60.
182. Ellrott, K.; Bailey, M.H.; Saksena, G.; Covington, K.R.; Kandath, C.; Stewart, C.; Hess, J.; Ma, S.; Chiotti, K.E.; McLellan, M.; i in. Scalable Open Science Approach

- for Mutation Calling of Tumor Exomes Using Multiple Genomic Pipelines. *Cell Syst.* **2018**, *6*, 271-281.e7.
183. Chen, Z.; Yuan, Y.; Chen, X.; Chen, J.; Lin, S.; Li, X.; Du, H. Systematic comparison of somatic variant calling performance among different sequencing depth and mutation frequency. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–9.
 184. Tan, A.; Abecasis, G.R.; Kang, H.M. Unified representation of genetic variants. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 2202–2204.
 185. Schnidrig, D.; Garofoli, A.; Benjak, A.; Räscher, G.; Rubin, M.A.; Piscuoglio, S.; Ng, C.K.Y. PipeIT2: A tumor-only somatic variant calling workflow for molecular diagnostic Ion Torrent sequencing data. *Genomics* **2023**, *115*, 110587.
 186. Yeo, Z.X.; Wong, J.C.L.; Rozen, S.G.; Lee, A.S.G. Evaluation and optimisation of indel detection workflows for ion torrent sequencing of the BRCA1 and BRCA2 genes. *BMC Genomics* **2014**, *15*, 516.
 187. Bragg, L.M.; Stone, G.; Butler, M.K.; Hugenholtz, P.; Tyson, G.W. Shining a Light on Dark Sequencing: Characterising Errors in Ion Torrent PGM Data. *PLoS Comput. Biol.* **2013**, *9*, e1003031.
 188. Wang, Q.; Kotoula, V.; Hsu, P.C.; Papadopoulou, K.; Ho, J.W.K.; Fountzilas, G.; Giannoulidou, E. Comparison of somatic variant detection algorithms using Ion Torrent targeted deep sequencing data. *BMC Med. Genomics* **2019**, *12*, 1–11.
 189. Raymond, V.M.; Gray, S.W.; Roychowdhury, S.; Joffe, S.; Chinnaiyan, A.M.; Parsons, D.W.; Plon, S.E.; Clinical Sequencing Exploratory Research Consortium Tumor Working Group Germline Findings in Tumor-Only Sequencing: Points to Consider for Clinicians and Laboratories. *J. Natl. Cancer Inst.* **2016**, *108*.
 190. Deshpande, A.; Lang, W.; McDowell, T.; Sivakumar, S.; Zhang, J.; Wang, J.; Anthony San Lucas, F.; Fowler, J.; Kadara, H.; Scheet, P. Strategies for identification of somatic variants using the Ion Torrent deep targeted sequencing platform. *BMC Bioinformatics* **2018**, *19*, 1–10.
 191. da Costa, L.T.; Dos Anjos, L.G.; Kagohara, L.T.; Torrezan, G.T.; De Paula, C.A.A.; Baracat, E.C.; Carraro, D.M.; Carvalho, K.C. The mutational repertoire of uterine sarcomas and carcinosarcomas in a Brazilian cohort: A preliminary study. *Clinics (Sao Paulo)*. **2021**, *76*, e2324.

192. McLaren, W.; Gil, L.; Hunt, S.E.; Riat, H.S.; Ritchie, G.R.S.; Thormann, A.; Flicek, P.; Cunningham, F. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol.* **2016**, *17*, 122.
193. Ng, P.C.; Henikoff, S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3812–4.
194. Adzhubei, I.; Jordan, D.M.; Sunyaev, S.R. Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* **2013**, 76.
195. Cheng, J.; Novati, G.; Pan, J.; Bycroft, C.; Žemgulytė, A.; Applebaum, T.; Pritzel, A.; Wong, L.H.; Zielinski, M.; Sargeant, T.; i in. Accurate proteome-wide missense variant effect prediction with AlphaMissense. *Science (80-.).* **2023**, *381*, eadg7492.
196. Landrum, M.J.; Lee, J.M.; Riley, G.R.; Jang, W.; Rubinstein, W.S.; Church, D.M.; Maglott, D.R. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D980–D985.
197. Riester, M.; Singh, A.P.; Brannon, A.R.; Yu, K.; Campbell, C.D.; Chiang, D.Y.; Morrissey, M.P. PureCN: copy number calling and SNV classification using targeted short read sequencing. *Source Code Biol. Med.* **2016**, *11*, 13.
198. De Cario, R.; Kura, A.; Suraci, S.; Magi, A.; Volta, A.; Marcucci, R.; Gori, A.M.; Pepe, G.; Giusti, B.; Sticchi, E. Sanger Validation of High-Throughput Sequencing in Genetic Diagnosis: Still the Best Practice? *Front. Genet.* **2020**, *11*.
199. Koboldt, D.C. Best practices for variant calling in clinical sequencing. *Genome Med.* **2020**, *12*, 1–13.
200. Ukkola, I.; Nummela, P.; Pasanen, A.; Kero, M.; Lepistö, A.; Kytölä, S.; Bützow, R.; Ristimäki, A. Detection of microsatellite instability with Idylla MSI assay in colorectal and endometrial cancer. *Virchows Arch.* **2021**, *479*, 471–479.
201. Bankhead, P.; Loughrey, M.B.; Fernández, J.A.; Dombrowski, Y.; McArt, D.G.; Dunne, P.D.; McQuaid, S.; Gray, R.T.; Murray, L.J.; Coleman, H.G.; i in. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 16878.
202. D’Angelo, S.P.; Shoushtari, A.N.; Agaram, N.P.; Kuk, D.; Qin, L.-X.; Carvajal, R.D.; Dickson, M.A.; Gounder, M.; Keohan, M.L.; Schwartz, G.K.; i in. Prevalence of tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in the soft tissue sarcoma microenvironment. *Hum. Pathol.* **2015**, *46*, 357–365.
203. Kijima, T.; Kubo, T.; Nishihara, D.; Nukui, A.; Hirohashi, Y.; Torigoe, T.; Kamai, T. Cancer immunohistogram representing cancer-immunity cycle by

- immunohistochemistry predicts the efficacy of immune checkpoint inhibitors in urological cancer patients. *Sci. Rep.* **2022**, *12*.
204. Dymond, J.S. Explanatory Chapter: Quantitative PCR. W *Methods in Enzymology*; Lorsch, J., Red.; **2013**; ss. 279–289; ISBN 9780124186873.
 205. QIAGEN® RT² Profiler PCR Array (96-Well Format and 384-Well [4 x 96] Format). Human Cancer Inflammation & Immunity Crosstalk. **2019**. Dostępne na: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/pcr-qpcr-dpcr/qpcr-assays-and-instruments/mrna-incrna-qpcr-assays-panels/rt2-profiler-pcr-arrays> [16 maja 2024].
 206. QIAGEN® RT2 Profiler PCR Array Handbook. **2019**. Dostępne na: <https://www.qiagen.com/us/knowledge-and-support/resources> [16 maja 2024].
 207. Wittwer, C.T.; Gutekunst, M.; Lohmann, S. Method for quantification of an analyte **1999**.
 208. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408.
 209. QIAGEN® RT2 Profiler PCR Arrays & Assays Data Analysis Handbook. **2019**. Dostępne na: <https://www.qiagen.com/us/knowledge-and-support/resources> [16 maja 2024].
 210. Mayakonda, A.; Lin, D.-C.; Assenov, Y.; Plass, C.; Koeffler, H.P. Maftools: efficient and comprehensive analysis of somatic variants in cancer. *Genome Res.* **2018**, *28*, 1747–1756.
 211. Sanchez-Vega, F.; Mina, M.; Armenia, J.; Chatila, W.K.; Luna, A.; La, K.C.; Dimitriadou, S.; Liu, D.L.; Kantheti, H.S.; Saghafeina, S.; i in. Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell* **2018**, *173*, 321–337.e10.
 212. Bailey, M.H.; Tokheim, C.; Porta-Pardo, E.; Sengupta, S.; Bertrand, D.; Weerasinghe, A.; Colaprico, A.; Wendl, M.C.; Kim, J.; Reardon, B.; i in. Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. *Cell* **2018**, *173*, 371–385.e18.
 213. Charrad, M.; Ghazzali, N.; Boiteau, V.; Niknafs, A. NbClust: An R Package for Determining the Relevant Number of Clusters in a Data Set. *J. Stat. Softw.* **2014**, *61*.
 214. Fromm, J.; Klein, A.; Baur-Melnyk, A.; Knösel, T.; Lindner, L.; Birkenmaier, C.; Roeder, F.; Jansson, V.; Dürr, H.R. Survival and prognostic factors in conventional G1 chondrosarcoma. *World J. Surg. Oncol.* **2019**, *17*, 1–10.

215. Gao, H.; Zhou, Y.; Wang, Z.; Zhao, R.; Qian, S. Clinical features and prognostic analysis of patients with chest wall chondrosarcoma. *Medicine (Baltimore)*. **2019**, *98*, e17025.
216. Brown, J.M.; Rakoczy, K.; Hart, J.; Jones, K.B.; Groundland, J.S. Presenting features and overall survival of chondrosarcoma of the pelvis. *Cancer Treat. Res. Commun.* **2022**, *30*, 100510.
217. Cross, W.; Lyskjær, I.; Lesluyes, T.; Hargreaves, S.; Strobl, A.C.; Davies, C.; Waise, S.; Hames-Fathi, S.; Oukrif, D.; Ye, H.; i in. A genetic model for central chondrosarcoma evolution correlates with patient outcome. *Genome Med.* **2022**, *14*, 1–12.
218. Liu, L.; Li, Y.; Li, S.; Hu, N.; He, Y.; Pong, R.; Lin, D.; Lu, L.; Law, M. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *2012*, 1–11.
219. Li, M.M.; Datto, M.; Duncavage, E.J.; Kulkarni, S.; Lindeman, N.I.; Roy, S.; Tsimberidou, A.M.; Vnencak-Jones, C.L.; Wolff, D.J.; Younes, A.; i in. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer. *J. Mol. Diagnostics* **2017**, *19*, 4–23.
220. Suwa, K.; Ohmori, M.; Miki, H. Microsatellite alterations in various sarcomas in Japanese patients. *J. Orthop. Sci.* **1999**, *4*, 223–230, doi:10.1007/s007760050097.
221. Monument, M.J.; Lessnick, S.L.; Schiffman, J.D.; Randall, R.T. Microsatellite Instability in Sarcoma: Fact or Fiction? *ISRN Oncol.* **2012**, *2012*, 1–9.
222. Wagner, Michael J. Sweeney, Nathan W. Loggers, Elizabeth T. Roberts, J.; Elyse, B.; Chen, E.; Ricciotti, R.; Berg, R.; Stoppler, M.; Cranmer, L.D. Genomic Characterization of Chondrosarcoma: A Rare Sarcoma With Clinical Responses to Immune Checkpoint Inhibition.; CTOS 2023: Dublin, Ireland, **2023**.
223. Shi, C.; Qin, K.; Lin, A.; Jiang, A.; Cheng, Q.; Liu, Z.; Zhang, J.; Luo, P. The role of DNA damage repair (DDR) system in response to immune checkpoint inhibitor (ICI) therapy. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2022**, *41*, 268.
224. Jagodzińska-Mucha, P.; Sobczuk, P.; Mikuła, M.; Raciborska, A.; Dawidowska, A.; Kulecka, M.; Bilska, K.; Szumera-Ciećkiewicz, A.; Kluska, A.; Piątkowska, M.; i in. Mutational landscape of primary and recurrent Ewing sarcoma. *Współczesna Onkol.* **2021**, *25*, 241–248.
225. Zehir, A.; Benayed, R.; Shah, R.H.; Syed, A.; Middha, S.; Kim, H.R.; Srinivasan, P.; Gao, J.; Chakravarty, D.; Devlin, S.M.; i in. Mutational landscape of metastatic cancer

- revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 703–713.
226. Zheng, S.; Wang, F.; Huang, J.; Zhou, Y.; Yang, Q.; Qian, G.; Zhou, C.; Min, D.; Song, L.; Shen, Z. Case Report: Sequential Chemotherapy and Immunotherapy Produce Sustained Response in Osteosarcoma With High Tumor Mutational Burden. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2021**, *12*, 625226.
 227. Zhang, Q.; Yang, Y.; You, X.; Ju, Y.; Zhang, Q.; Sun, T.; Liu, W. Comprehensive genomic analysis of primary bone sarcomas reveals different genetic patterns compared with soft tissue sarcomas. *Front. Oncol.* **2023**, *13*, 1173275.
 228. Alexandrov, L.B.; Kim, J.; Haradhvala, N.J.; Huang, M.N.; Tian Ng, A.W.; Wu, Y.; Boot, A.; Covington, K.R.; Gordenin, D.A.; Bergstrom, E.N.; i in. The repertoire of mutational signatures in human cancer. *Nature* **2020**, *578*, 94–101.
 229. Setola, E.; Benini, S.; Righi, A.; Gamberi, G.; Carretta, E.; Ferrari, C.; Avnet, S.; Palmerini, E.; Magagnoli, G.; Gambarotti, M.; i in. IDH mutations in G2-3 conventional central bone chondrosarcoma: a mono institutional experience. *BMC Cancer* **2023**, *23*, 907.
 230. Hirata, M.; Sasaki, M.; Cairns, R.A.; Inoue, S.; Puvindran, V.; Li, W.Y.; Snow, B.E.; Jones, L.D.; Wei, Q.; Sato, S.; i in. Mutant IDH is sufficient to initiate enchondromatosis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, 2829–2834.
 231. The TP53 Database Dostępne na: <https://tp53.isb-cgc.org/> [5 maja 2024].
 232. Scholz, B.; Korn, C.; Wojtarowicz, J.; Mogler, C.; Augustin, I.; Boutros, M.; Niehrs, C.; Augustin, H.G. Endothelial RSPO3 Controls Vascular Stability and Pruning through Non-canonical WNT/Ca²⁺/NFAT Signaling. *Dev. Cell* **2016**, *36*, 79–93.
 233. Martin-Orozco, E.; Sanchez-Fernandez, A.; Ortiz-Parra, I.; Ayala-San Nicolas, M. WNT Signaling in Tumors: The Way to Evade Drugs and Immunity. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2854.
 234. Chen, H.; Pugh, B.F. What do Transcription Factors Interact With? *J. Mol. Biol.* **2021**, *433*, 166883.
 235. Meester-Smoor, M.A.; Vermeij, M.; van Helmond, M.J.L.; Molijn, A.C.; van Wely, K.H.M.; Hekman, A.C.P.; Vermey-Keers, C.; Riegman, P.H.J.; Zwarthoff, E.C. Targeted Disruption of the Mn1 Oncogene Results in Severe Defects in Development of Membranous Bones of the Cranial Skeleton. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 4229–4236.
 236. Zhang, X.; Dowd, D.R.; Moore, M.C.; Kranenburg, T.A.; Meester-Smoor, M.A.;

- Zwarthoff, E.C.; MacDonald, P.N. Meningioma 1 Is Required for Appropriate Osteoblast Proliferation, Motility, Differentiation, and Function. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 18174–18183.
237. Boehme, K.; Schleicher, S.; Traub, F.; Rolauffs, B. Chondrosarcoma: A Rare Misfortune in Aging Human Cartilage? The Role of Stem and Progenitor Cells in Proliferation, Malignant Degeneration and Therapeutic Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 311.
 238. Dermawan, J.K.T.; Nafa, K.; Mohanty, A.; Xu, Y.; Rijo, I.; Casanova, J.; Villafania, L.; Benhamida, J.; Kelly, C.M.; Tap, W.D.; i in. Distinct IDH1/2-associated Methylation Profile and Enrichment of TP53 and TERT Mutations Distinguish Dedifferentiated Chondrosarcoma from Conventional Chondrosarcoma. *Cancer Res. Commun.* **2023**, *3*, 431–443.
 239. Nicolle, R.; Ayadi, M.; Gomez-Bouchet, A.; Armenoult, L.; Banneau, G.; Elarouci, N.; Tallegas, M.; Decouvelaere, A.V.; Aubert, S.; Rédini, F.; i in. Integrated molecular characterization of chondrosarcoma reveals critical determinants of disease progression. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–11.
 240. Rozeman, L.B.; Hogendoorn, P.C.; Bovée, J.V. Diagnosis and prognosis of chondrosarcoma of bone. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2002**, *2*, 461–472.
 241. Hu, B.; Chen, S. The role of UBR5 in tumor proliferation and oncotherapy. *Gene* **2024**, *906*, 148258.
 242. Sudhesh Dev, S.; Zainal Abidin, S.A.; Farghadani, R.; Othman, I.; Naidu, R. Receptor Tyrosine Kinases and Their Signaling Pathways as Therapeutic Targets of Curcumin in Cancer. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 772510.
 243. Liu, F.; Wei, Y.; Zhang, H.; Jiang, J.; Zhang, P.; Chu, Q. NTRK Fusion in Non-Small Cell Lung Cancer: Diagnosis, Therapy, and TRK Inhibitor Resistance. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 864666.
 244. Kennedy, V.E.; Smith, C.C. FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Key Concepts and Emerging Controversies. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 612880.
 245. Lucas, C.-H.G.; Grenert, J.P.; Horvai, A. Targeted Next-Generation Sequencing Identifies Molecular and Genetic Events in Dedifferentiated Chondrosarcoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2021**, *145*, 1009–1017.
 246. Bereza, M.; Dembiński, M.; Zając, A.E.; Piątkowski, J.; Dudzisz-Śledź, M.; Rutkowski, P.; Czarnecka, A.M. Epigenetic Abnormalities in Chondrosarcoma. *Int.*

- J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 4539.
247. Bhattacharya, S.; Levy, M.J.; Zhang, N.; Li, H.; Florens, L.; Washburn, M.P.; Workman, J.L. The methyltransferase SETD2 couples transcription and splicing by engaging mRNA processing factors through its SHI domain. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1–16.
 248. Limberger, T.; Schleder, M.; Trachtová, K.; Garces de los Fayos Alonso, I.; Yang, J.; Högl, S.; Sternberg, C.; Bystry, V.; Oppelt, J.; Tichý, B.; i in. KMT2C methyltransferase domain regulated INK4A expression suppresses prostate cancer metastasis. *Mol. Cancer* **2022**, *21*, 1–19.
 249. Vlasevska, S.; Garcia-Ibanez, L.; Duval, R.; Holmes, A.B.; Jahan, R.; Cai, B.; Kim, A.; Mo, T.; Basso, K.; Soni, R.K.; i in. KMT2D acetylation by CREBBP reveals a cooperative functional interaction at enhancers in normal and malignant germinal center B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2023**, *120*, e2218330120.
 250. Trovarelli, G.; Sbaraglia, M.; Angelini, A.; Bellan, E.; Pala, E.; Belluzzi, E.; Pozzuoli, A.; Borga, C.; Dei Tos, A.P.; Ruggieri, P. Are IDH1 R132 Mutations Associated With Poor Prognosis in Patients With Chondrosarcoma of the Bone? *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2024**, *482*, 947–956.
 251. Wang, J.; Zheng, X.; Peng, Q.; Zhang, X.; Qin, Z. Eph receptors: the bridge linking host and virus. *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**, *77*, 2355–2365.
 252. Beuter, S.; Ardi, Z.; Horovitz, O.; Wuchter, J.; Keller, S.; Saha, R.; Tripathi, K.; Anunu, R.; Kehat, O.; Kriebel, M.; i in. Receptor tyrosine kinase EphA7 is required for interneuron connectivity at specific subcellular compartments of granule cells. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–15.
 253. Li, B.; Li, G.; Yan, X.; Zhu, D.; Lin, P.P.; Wang, Z.; Qu, H.; He, X.; Fu, Y.; Zhu, X.; i in. Fresh Tissue Multi-omics Profiling Reveals Immune Classification and Suggests Immunotherapy Candidates for Conventional Chondrosarcoma. *Clin. Cancer Res.* **2021**, *27*, 6543–6558.
 254. Inagaki, Y.; Hookway, E.; Williams, K.A.; Hassan, A.B.; Oppermann, U.; Tanaka, Y.; Soilleux, E.; Athanasou, N.A. Dendritic and mast cell involvement in the inflammatory response to primary malignant bone tumours. *Clin. Sarcoma Res.* **2016**, *6*, 13.

255. Axelrod, M.L.; Cook, R.S.; Johnson, D.B.; Balko, J.M. Biological Consequences of MHC-II Expression by Tumor Cells in Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 2392–2402.
256. Nota, S.P.F.T.; Al-Sukaini, A.; Patel, S.S.; Sabbatino, F.; Nielsen, G.P.; Deshpande, V.; Yearley, J.H.; Ferrone, S.; Wang, X.; Schwab, J.H. High TIL, HLA, and Immune Checkpoint Expression in Conventional High-Grade and Dedifferentiated Chondrosarcoma and Poor Clinical Course of the Disease. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 598001.
257. Lv, Y.; Ma, X.; Ma, Y.; Du, Y.; Feng, J. A new emerging target in cancer immunotherapy: Galectin-9 (LGALS9). *Genes Dis.* **2023**, *10*, 2366–2382.
258. Mansour, A.A.; Krautter, F.; Zhi, Z.; Iqbal, A.J.; Recio, C. The interplay of galectins-1, -3, and -9 in the immune-inflammatory response underlying cardiovascular and metabolic disease. *Cardiovasc. Diabetol.* **2022**, *21*, 253.
259. Li, X.; Chen, Y.; Liu, X.; Zhang, J.; He, X.; Teng, G.; Yu, D. Tim3/Gal9 interactions between T cells and monocytes result in an immunosuppressive feedback loop that inhibits Th1 responses in osteosarcoma patients. *Int. Immunopharmacol.* **2017**, *44*, 153–159.
260. Buddingh, E.P.; Kuijjer, M.L.; Duim, R.A.J.; Bürger, H.; Agelopoulos, K.; Myklebost, O.; Serra, M.; Mertens, F.; Hogendoorn, P.C.W.; Lankester, A.C.; i in. Tumor-Infiltrating Macrophages Are Associated with Metastasis Suppression in High-Grade Osteosarcoma: A Rationale for Treatment with Macrophage Activating Agents. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 2110–2119.
261. Fan, J.; Qin, X.; He, R.; Ma, J.; Wei, Q. Gene expression profiles for an immunoscore model in bone and soft tissue sarcoma. *Aging (Albany. NY).* **2021**, *13*, 13708–13725.
262. Weng, W.; Yu, L.; Li, Z.; Tan, C.; Lv, J.; Lao, I.W.; Hu, W.; Deng, Z.; Liu, Z.; Wang, J.; i in. The immune subtypes and landscape of sarcomas. *BMC Immunol.* **2022**, *23*, 46.
263. Helm, O.; Held-Feindt, J.; Schäfer, H.; Sebens, S. M1 and M2: there is no “good” and “bad”—How macrophages promote malignancy-associated features in tumorigenesis. *Oncoimmunology* **2014**, *3*, e946818.
264. Zhu, Z.; Jin, Z.; Zhang, M.; Tang, Y.; Yang, G.; Yuan, X.; Yao, J.; Sun, D. Prognostic value of programmed death-ligand 1 in sarcoma: a meta-analysis. *Oncotarget* **2017**, *8*, 59570–59580.

265. Kawamoto, H.; Minato, N. Myeloid cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 1374–1379.
266. Cintra, F.F.; Etchebehere, M.; Gonçalves, J.C.B.; Cassone, A.E.; Amstalden, E.M.I. Vascular Pattern in Enchondroma and Chondrosarcoma. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **2014**, *22*, 600–605.
267. Chen, C.; Zhou, H.; Wei, F.; Jiang, L.; Liu, X.; Liu, Z.; Ma, Q. Increased levels of hypoxia-inducible factor-1 α are associated with Bcl-xL expression, tumor apoptosis, and clinical outcome in chondrosarcoma. *J. Orthop. Res.* **2011**, *29*, 143–151.
268. Schrage, Y.M.; Machado, I.; Meijer, D.; Briaire-de Bruijn, I.; van den Akker, B.E.; Taminiau, A.H.M.; Kalinski, T.; Llombart-Bosch, A.; Bovée, J.V.M.G. COX-2 expression in chondrosarcoma: A role for celecoxib treatment? *Eur. J. Cancer* **2010**, *46*, 616–624.
269. Bai, S.; Wang, D.; Klein, M.J.; Siegal, G.P. Characterization of CXCR4 Expression in Chondrosarcoma of Bone. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2011**, *135*, 753–758.
270. Liao, Y.-X.; Zhou, C.-H.; Zeng, H.; Zuo, D.-Q.; Wang, Z.-Y.; Yin, F.; Hua, Y.-Q.; Cai, Z.-D. The role of the CXCL12-CXCR4/CXCR7 axis in the progression and metastasis of bone sarcomas (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2013**, *32*, 1239–46.
271. Rangaswami, H.; Bulbule, A.; Kundu, G.C. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol.* **2006**, *16*, 79–87.
272. Chen, Y.; Wei, Y.; Chen, H.; Fong, Y.; Hsu, C.; Tsai, C.; Hsu, H.; Liu, S.; Tang, C. Osteopontin increases migration and MMP-9 up-regulation via $\alpha v \beta 3$ integrin, FAK, ERK, and NF- κ B-dependent pathway in human chondrosarcoma cells. *J. Cell. Physiol.* **2009**, *221*, 98–108.
273. Lee, W.S.; Yang, H.; Chon, H.J.; Kim, C. Combination of anti-angiogenic therapy and immune checkpoint blockade normalizes vascular-immune crosstalk to potentiate cancer immunity. *Exp. Mol. Med.* **2020**, *52*, 1475–1485.
274. Shurin, M.R. Osteopontin controls immunosuppression in the tumor microenvironment. *J. Clin. Invest.* **2018**, *128*, 5209–5212.
275. Pu, D.; Yin, L.; Huang, L.; Qin, C.; Zhou, Y.; Wu, Q.; Li, Y.; Zhou, Q.; Li, L. Cyclooxygenase-2 Inhibitor: A Potential Combination Strategy With Immunotherapy in Cancer. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 1–7.

276. Chen, B.; Mu, C.; Zhang, Z.; He, X.; Liu, X. The Love-Hate Relationship Between TGF- β Signaling and the Immune System During Development and Tumorigenesis. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 1–17.
277. Noe, J.T.; Mitchell, R.A. MIF-Dependent Control of Tumor Immunity. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1–16.
278. Lee, C.; Su, M.; Huang, C.; Chen, M.; Hsu, H.; Lin, C.; Tang, C. Macrophage migration inhibitory factor increases cell motility and up-regulates $\alpha\beta 3$ integrin in human chondrosarcoma cells. *J. Cell. Biochem.* **2012**, *113*, 1590–1598.
279. Qin, J.; Shaukat, I.; Mainard, D.; Netter, P.; Barré, L.; Ouzzine, M. Constitutive activation of EGFR is associated with tumor progression and plays a prominent role in malignant phenotype of chondrosarcoma. *Oncotarget* **2019**, *10*, 3166–3182.
280. Yu, H.; Pardoll, D.; Jove, R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 798–809.
281. Terek, R.M.; Healey, J.H.; Garin-Chesa, P.; Mak, S.; Albino, A.P.; Huvos, A. p53 Mutations in Chondrosarcoma. *Diagnostic Mol. Pathol.* **1998**, *7*, 51–56.
282. Vuong, H.G.; Ngo, T.N.M.; Dunn, I.F. Prognostic importance of IDH mutations in chondrosarcoma: An individual patient data meta-analysis. *Cancer Med.* **2021**, *10*, 4415–4423, doi:10.1002/cam4.4019.
283. Ward, P.S.; Lu, C.; Cross, J.R.; Abdel-Wahab, O.; Levine, R.L.; Schwartz, G.K.; Thompson, C.B. The Potential for Isocitrate Dehydrogenase Mutations to Produce 2-Hydroxyglutarate Depends on Allele Specificity and Subcellular Compartmentalization. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 3804–3815.
284. Adam, M.A.A.; Robinson, M.; Schwartz, A. V; Wells, G.; Hoang, A.; Albekioni, E.; Chao, G.; Weeks, J.; George, U.Z.; House, C.D.; i in. Catalytically distinct IDH1 mutants tune phenotype severity in tumor models. *bioRxiv Prepr. Serv. Biol.* **2024**.
285. Cheng, Y.; He, C.; Wang, M.; Ma, X.; Mo, F.; Yang, S.; Han, J.; Wei, X. Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: Mechanisms and advances in clinical trials. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2019**, *4*.
286. Gagné, L.M.; Boulay, K.; Topisirovic, I.; Huot, M.-É.; Mallette, F.A. Oncogenic Activities of IDH1/2 Mutations: From Epigenetics to Cellular Signaling. *Trends Cell Biol.* **2017**, *27*, 738–752.

- 287. Di Gregorio, E.; Miolo, G.; Saorin, A.; Steffan, A.; Corona, G. From metabolism to genetics and Vice Versa: The rising role of oncometabolites in cancer development and therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*.
- 288. Gordon-Weeks, A.; Yuzhalin, A. Cancer Extracellular Matrix Proteins Regulate Tumour Immunity. *Cancers (Basel)*. **2020**, *12*, 3331.
- 289. Yan, D.; Li, W.; Liu, Q.; Yang, K. Advances in Immune Microenvironment and Immunotherapy of Isocitrate Dehydrogenase Mutated Glioma. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 1–9.
- 290. Tang, T.; Huang, X.; Zhang, G.; Hong, Z.; Bai, X.; Liang, T. Advantages of targeting the tumor immune microenvironment over blocking immune checkpoint in cancer immunotherapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, doi:10.1038/s41392-020-00449-4.

Spis tabel

Tabela 1. Charakterystyka podtypów histologicznych chłoniaka.	31
Tabela 2. Wykaz genów zawartych w panelu Oncomine™ Tumor Mutation Load Assay.	61
Tabela 3. Lista genów z panelu Human Cancer Inflammation & Immunity Crosstalk RT ² Profiler PCR Array.	78
Tabela 4. Charakterystyka pacjentów włączonych do analizy.	84
Tabela 5. Analiza jedno- i wieloczynnikowa wpływu wybranych czynników klinicznych na przeżycia pacjentów.	87
Tabela 6. Wyniki modelu proporcjonalnego hazardu Coxa dla przeżycia całkowitego pacjentów z rozpoznaniem chłoniaka z uwzględnieniem mutacji w wybranych genach.	105
Tabela 7. Charakterystyka markerów immunologicznych w obrębie centralnej i obwodowej części guza.	107
Tabela 8. Korelacja ekspresji poszczególnych markerów w centralnej i obwodowej części guza.	109
Tabela 9. Charakterystyka liczbowa poszczególnych immunofenotypów w obrębie podtypów chłoniaka.	116
Tabela 10. Wyniki modelu proporcjonalnego hazardu Coxa dla przeżycia całkowitego pacjentów z rozpoznaniem chłoniaka z uwzględnieniem poszczególnych immunofenotypów i podtypów histologicznych.	120

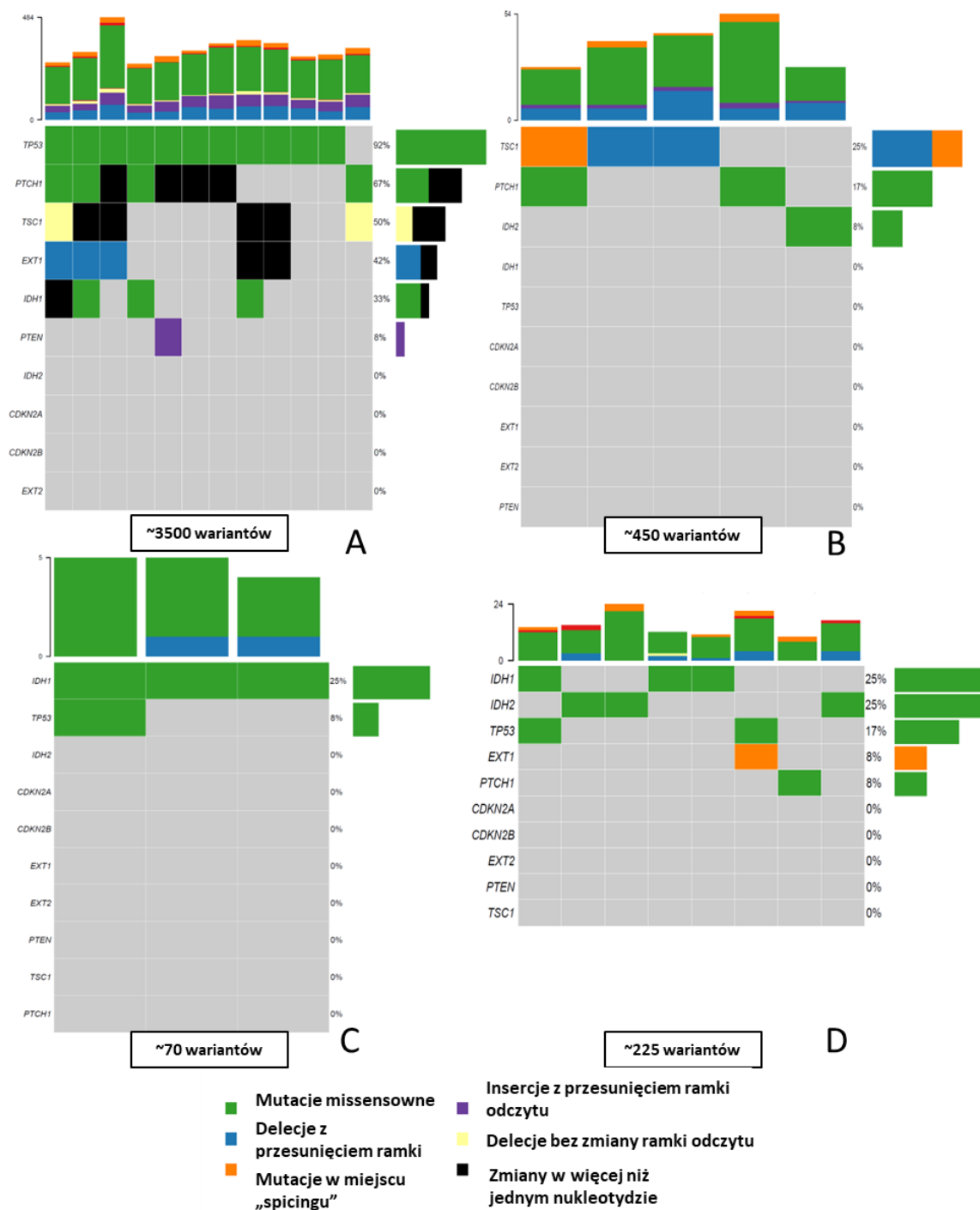
Spis rycin

Rycina 1. Histologiczny stopień złośliwości chrzęstniakomięśaka wraz z podsumowaniem różnic morfologicznych.	33
Rycina 2. Charakterystyka mezenchymalnego i odróżnicowanego chrzęstniakomięśaka. .	34
Rycina 3. Charakterystyka deregulowanych ścieżek molekularnych i genów w chrzęstniakomięsakach.	35
Rycina 4. Podział nowotworów na „zimne” i „gorące” w zależności od mikrośrodowiska guzów.	50
Rycina 5. Charakterystyka mikrośrodowiska chrzęstniakomięśaka.	52
Rycina 6. Schemat pacjentów włączonych do poszczególnych analiz.	58
Rycina 7. Schemat przeprowadzonych doświadczeń.	59
Rycina 8. Schemat przygotowywania bibliotek DNA.	61
Rycina 9. Przykładowe wyniki pomiaru bibliotek DNA na Bioanalyzerze 2100.	63
Rycina 10. Przykładowy raport z oprogramowania Torrent Suite™ przedstawiający poprawnie wykonane sekwencjonowania.	65
Rycina 11. Przykładowe wyniki z analizy pokrycia z oprogramowania Torrent Suite™ .	66
Rycina 12. Przykładowy raport z oprogramowania Ion Reporter™.	69
Rycina 13. Przykładowy widok z programu Golden Helix GenomeBrowse®.	72
Rycina 14. Schemat bioinformatycznej analizy danych z sekwencjonowania następnej generacji.	73
Rycina 15. Przykładowy raport z Idylla™ system.	76
Rycina 16. Schemat płytki 384-dołkowej dołączonej do zestawu RT ² Profiler PCR Array Format E 384 (4 x 96).	80
Rycina 17. Przeżycie całkowite 99 pacjentów z rozpoznaniem chrzęstniakomięśaka.	85
Rycina 18. Czas przeżycia wolnego od choroby 99 pacjentów z rozpoznaniem chrzęstniakomięśaka.	85
Rycina 19. Przeżycie całkowite pacjentów w zależności od podtypu histologicznego ChS.	88
Rycina 20. Fluorogramy przedstawiające sekwencje wybranych do walidacji genów - <i>HNF1A</i> , <i>CSMD3</i> , <i>THBS1</i> , <i>NOTCH4</i> , <i>EPHB1</i> oraz <i>RNF213</i>	90
Rycina 21. Fluorogramy przedstawiające sekwencje potwierdzonych wariantów genetycznych w genach <i>IDH1</i> oraz <i>IDH2</i>	91

Rycina 22. Wartości TMB dla poszczególnych pacjentów z rozpoznaniem chrzęstniakomięśaka wraz z medianą badanej populacji.	92
Rycina 23. Wykresy pudełkowe dla wartości TMB w zależności od podtypu histologicznego chrzęstniakomięśaka.	93
Rycina 24. Podsumowanie wariantów wyrytych u 99 pacjentów z rozpoznaniem chrzęstniakomięśaka.	94
Rycina 25. Rozkład liczbowy zmienności liczby kopii w zależności od podtypu histologicznego chrzęstniakomięśaka.	95
Rycina 26. Charakterystyka 50 najczęściej występujących mutacji w genach u 99 pacjentów z rozpoznaniem chrzęstniakomięśaka.	96
Rycina 27. Zestawienie 40 najczęstszych mutacji w genach występujących w poszczególnych podtypach histologicznych chrzęstniakomięśaka.	97
Rycina 28. Charakterystyka wariantów w wybranych genach wraz z ich lokalizacją.	98
Rycina 29. Macierz korelacji 30 najczęściej występujących mutacji w genach w badanej grupie chrzęstniakomięśaków.	100
Rycina 30. Charakterystyka deregulowanych ścieżek sygnałowych w grupie 99 pacjentów z rozpoznaniem chrzęstniakomięśaka wraz z częstością ich występowania.	101
Rycina 31. Charakterystyka deregulowanych ścieżek sygnałowych w grupie 99 pacjentów z rozpoznaniem chrzęstniakomięśaka wraz z częstością ich występowania.	102
Rycina 32. Charakterystyka trzech najczęściej deregulowanych ścieżek sygnałowych i zaangażowanych w nie genów z podziałem na podtyp histologiczny chrzęstniakomięśaka.	103
Rycina 33. Charakterystyka pięciu najczęściej deregulowanych ścieżek sygnałowych i zaangażowanych w nie genów z podziałem na podtyp histologiczny chrzęstniakomięśaka.	104
Rycina 34. Przeżycia całkowite pacjentów z obecną mutacją lub jej brakiem w wybranych genach.	106
Rycina 35. Rozkład poszczególnych markerów immunologicznych w centralnej i obwodowej części guza.	108
Rycina 36. Macierz korelacji pomiędzy ekspresją poszczególnych markerów immunologicznych z różnych obszarów guza.	110
Rycina 37. Graficzny schemat korelacji pomiędzy poszczególnymi markerami immunologicznymi w centralnym i obwodowym regionie guza.	111

Rycina 38. Liczba przypadków z ekspresją PD-L1 zależnie od podtypu histologicznego chrzęstniakomięsa.	112
Rycina 39. Liczba przypadków z obecnymi 3-rzędowymi strukturami limfoidalnymi zależnie od podtypu histologicznego chrzęstniakomięsa.	113
Rycina 40. Mapa cieplna obrazująca pogrupowane na immunofenotypy dane immunologiczne.	114
Rycina 41. Analiza głównych składowych przeprowadzona dla danych immunologicznych.	115
Rycina 42. Charakterystyka immunofenotypów w obrębie podtypu histologicznego chrzęstniakomięsa.	117
Rycina 43. Liczba przypadków z ekspresją PD-L1 zależnie od prezentowanego immunofenotypu.	118
Rycina 44. Liczba przypadków z obecnymi 3-rzędowymi strukturami limfoidalnymi zależnie od prezentowanego immunofenotypu.	119
Rycina 45. Przeżycia całkowite pacjentów w zależności od obecnego immunofenotypu.	120
Rycina 46. Mapa cieplna przedstawiająca różnice w ekspresji genów, zawartych w panelu Human Cancer Inflammation & Immunity Crosstalk RT ² Profiler PCR Array, pomiędzy podtypami histologicznymi chrzęstniakomięsa.....	122
Rycina 47. Wykresy przedstawiające osiem najczęściej deregulowanych procesów w GO dla poszczególnych podtypów chrzęstniakomięsa względem tkanek zdrowych.	123
Rycina 48. Wykresy pudełkowe dla wartości TMB w zależności od immunofenotypu chrzęstniakomięsa.	124
Rycina 49. Zestawienie 40 najczęstszych mutacji w genach występujących w poszczególnych immunofenotypach chrzęstniakomięsa.	125
Rycina 50. Charakterystyka trzech najczęściej deregulowanych ścieżek sygnałowych i zaangażowanych w nie genów z podziałem na immunofenotyp chrzęstniakomięsa. .	126
Rycina 51. Charakterystyka pięciu najczęściej deregulowanych ścieżek sygnałowych i zaangażowanych w nie genów z podziałem na immunofenotyp chrzęstniakomięsa. .	127
Rycina 52. Wieloczynnikowa analiza wpływu czynników klinicznych, molekularnych i immunologicznych na przeżycia całkowite pacjentów z rozpoznaniem chrzęstniakomięsa.	128

Załącznik 1. Porównanie różnych metod analizy bioinformatycznych danych z sekwencjonowania następnej generacji



Rycina Z1. Porównanie różnych parametrów filtracji i oprogramowań wraz z liczbą uzyskanych wariantów na przykładzie 12 próbek. A - warianty bezpośrednio z Torrent Suite™ (TS), B - warianty z pakietu GATK (ang. *Genome Analysis Toolkit*) z filtracją domyślną, C - warianty wspólne dla GATK i TS oraz oprogramowania Ion Reporter™ (IR) (filtracja domyślna GATK), D - warianty wspólne dla GATK i TS oraz IR (filtracja głównie pod kątem wariantów germinalnych).

W rzędach przedstawiono procentowy udział mutacji w genach wśród badanych próbek. W kolumnach przedstawiono poszczególne próbki wraz z podsumowaniem wszystkich wariantów w danej próbce na górnym wykresie słupkowym.

Załącznik 2. Sekwencje starterów użyte do sekwencjonowania metodą Sangera

Tabela Z1. Sekwencje starterów zaprojektowane do wybranych mutacji w genach.

Gen wraz z miejscem mutacji na sekwencji aminokwasowej	Sekwencje starterów wykorzystane do sekwencjonowania wybranych regionów genów
<i>HNF1A</i> (p.P291)	F: 5'-CCTGCACCCTGGACACCAAGC-3' R: 5'-GAATGGATGAATGAACAGAGTG-3' Starter do sekwencjonowania 5'-CATGGATGCTCACCCAATTTCG-3'
<i>NOTCH4</i> (p.G349)	F: 5'-CTATAGTGAGTCGTATTAC CCACTTGAAGCTCCTAGCAGTCC-3' R: 5'-GGACAGGTGAGTTGTTTAAGCC-3'
<i>EPHB1</i> (p.R865)	F: 5'-CTATAGTGAGTCGTATTAC CCCACACTGCAACTAGATACTC-3' R: 5'-GGATAATTTGTGAGTGAAGGCTGG-3'
<i>RNF213</i> (p.L4649)	F: 5'-CTATAGTGAGTCGTATTACCTCTACCAGGCTCACCATCTTC-3' R: 5'-TCTTTCCAGCAACAGCACAGAC-3'
<i>CSMD3</i> (p.Y1575)	F: 5'-CTATAGTGAGTCGTATTAC GCGGAGGTAAATAATCCTCTG-3' R: 5'-GTCCCCATGAATGGGACTCG-3'
<i>THBS1</i> (p.Q882)	F: 5'-CTATAGTGAGTCGTATTAC CCTGTCAAATGCTTTGAGCC-3' R: 5'-GCTGGACTCTGACTCAGACC-3'
<i>IDH1</i> (p.R132)	F: 5'-AATGAGCTCTATATGCCATCACTG-3' R: 5'-TTCATACCTTGCTTAATGGGTGT-3' Starter do sekwencjonowania 5'-GCCATCACTGCAGTTGTAGGTTA-3'
<i>IDH2</i> (p. R172)	F: 5'-CTATAGTGAGTCGTATTACGGAAGTTGTACACTTCCCAC-3' R: 5'-CCGTCTGGCTGTGTTGTTGC-3'

F – starter „forward”, R – starter “reverse”.

Załącznik 3. Wykaz przeciwciał użytych do immunohistochemii

Tabela Z2. Charakterystyka przeciwciał i systemów detekcji użytych do barwień immunohistochemicznych.

Lp.	Opis przeciwciała pierwotnego; nr.kat.	Firma, kraj	System detekcyjny (nazwa; nr kat.; firma)
1	Monoklonalne mysie anti-CD45, klon 2B11+PD7/26; IR751	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Kalifornia, USA	System detekcyjny EnVision Flex +, Mouse High ph (link); K8002; Agilent Technologies, Inc.
2	Monoklonalne mysie anti-CD3, klon F7.2.38; M7254	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Kalifornia, USA	System detekcyjny EnVision Flex +, Mouse High ph (link); K8002; Agilent Technologies, Inc.
3	Monoklonalne mysie anti-CD4, klon 4B12; IR649	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Kalifornia, USA	System detekcyjny EnVision Flex +, Mouse High ph (link); K8002; Agilent Technologies, Inc.
4	Monoklonalne mysie anti-CD8, klon C8/144B; IR623	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Kalifornia, USA	System detekcyjny EnVision Flex +, Mouse High ph (link); K8002; Agilent
5	Monoklonalne mysie anti-CD68, klon PG-M1; IR613	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Kalifornia, USA	System detekcyjny EnVision Flex +, Mouse High ph (link); K8002; Agilent Technologies, Inc.
6	Monoklonalne mysie anti-CD68, klon KP1; IR609	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Kalifornia, USA	System detekcyjny EnVision Flex +, Mouse High ph (link); K8002; Agilent Technologies, Inc.
7	Monoklonalne mysie anti-CD163, klon MRQ-26; 163M-16	Roche Diagnostics International Ltd., Rotkreuz, Szwajcaria	UltraView Universal DAB* Detection Kit; 760-500; Roche Diagnostics International Ltd.
8	Monoklonalne mysie anti-PD-1, klon NAT105; 315M-96	Roche Diagnostics International Ltd., Rotkreuz, Szwajcaria	UltraView Universal DAB Detection Kit; 760-500; Roche Diagnostics International Ltd.
9	Monoklonalne mysie anti-PD-L1, klon 22C3; M3653	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Kalifornia, USA	System detekcyjny EnVision Flex +, Mouse High ph (link); K8002; Agilent Technologies, Inc.
10	Monoklonalne królicze anti-FoxP3, klon EP340; AC-0304RUOC	Cell Marque™, Rocklin, Kalifornia, Stany Zjednoczone	UltraView Universal DAB Detection Kit; 760-500; Roche Diagnostics International Ltd.
11	Monoklonalne królicze anti-CD14, klon EPR3653; 114R-16	Roche Diagnostics International Ltd., Rotkreuz, Szwajcaria	UltraView Universal DAB Detection Kit; 760-500; Roche Diagnostics International Ltd.
12	Monoklonalne mysie anti-CD1a, klon 010; IR069	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Kalifornia, USA	System detekcyjny EnVision Flex +, Mouse High ph (link); K8002; Agilent Technologies, Inc.
13	Monoklonalne mysie anti-CD141, klon 141C01; LS-B8509-250	LifeSpan BioSciences, Inc., Lynnwood, Waszyngton, Stany Zjednoczone	System detekcyjny EnVision Flex +, Mouse High ph (link); K8002; Agilent Technologies, Inc.
14	Monoklonalne mysie anti-CD80, klon OTI2E5; LS-C115529-100	LifeSpan BioSciences, Inc., Lynnwood, Waszyngton, Stany Zjednoczone	System detekcyjny EnVision Flex +, Mouse High ph (link); K8002; Agilent Technologies, Inc.
15	Monoklonalne królicze anti-LAG-3, klon D2G4O; 15372s	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, Stany Zjednoczone	System detekcyjny EnVision Flex +, Mouse High ph (link); K8002; Agilent Dako
16	Monoklonalne królicze anti-TIM3, klon D5D5R; 45208s	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, Stany Zjednoczone	System detekcyjny EnVision Flex +, Mouse High ph (link); K8002; Agilent Dako
17	Monoklonalne królicze anti-Galectin 9, klon D9R4A; 54330s	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, Stany Zjednoczone	System detekcyjny EnVision Flex +, Mouse High ph (link); K8002; Agilent Dako

Tabela Z2 (cd.). Charakterystyka przeciwciał i systemów detekcji użytych do barwień immunohistochemicznych.

Lp.	Opis przeciwciała pierwotnego; nr.kat.	Firma, kraj	System detekcyjny (nazwa; nr kat.; firma)
18	Monoklonalne mysie anti-HLA-DR, klon TAL1B5; sc-53319	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Teksas, Stany Zjednoczone	System detekcyjny EnVision Flex +, Mouse High ph (link); K8002; Agilent Dako
19	Monoklonalne mysie anti-CD20, klon L26; IR-60461-2	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Kalifornia, USA	System detekcyjny EnVision Flex +, Mouse High ph (link); K8002; Agilent Technologies, Inc.
20	Poliklonalne anti-LAMP3; PA5-84069	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Stany Zjednoczone	System detekcyjny EnVision Flex +, Mouse High ph (link); K8002; Agilent Technologies, Inc.

*DAB - 3,3'-diaminobenzzydina (ang. 3,3'-Diaminobenzidine).

Załącznik 4. Szczegółowy opis genów użytych do oceny ekspresji genów

Tabela Z3. Opis genów użytych do analizy qPCR z panelu Human Cancer Inflammation & Immunity Crosstalk RT² Profiler PCR Array.

Pozycja	Gen	Opis (ang.)
A01	<i>ACKR3</i>	Chemokine (C-X-C motif) receptor 7
A02	<i>AICDA</i>	Activation-induced cytidine deaminase
A03	<i>BCL2</i>	B-cell CLL/lymphoma 2
A04	<i>BCL2L1</i>	BCL2-like 1
A05	<i>CCL18</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)
A06	<i>CCL2</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 2
A07	<i>CCL20</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 20
A08	<i>CCL21</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 21
A09	<i>CCL22</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 22
A10	<i>CCL28</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 28
A11	<i>CCL4</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 4
A12	<i>CCL5</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 5
B01	<i>CCR1</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 1
B02	<i>CCR10</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 10
B03	<i>CCR2</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 2
B04	<i>CCR4</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 4
B05	<i>CCR7</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 7
B06	<i>CCR9</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 9
B07	<i>CD274</i>	CD274 molecule
B08	<i>CSF1</i>	Colony stimulating factor 1 (macrophage)
B09	<i>CSF2</i>	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
B10	<i>CSF3</i>	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)
B11	<i>CTLA4</i>	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
B12	<i>CXCL1</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)
C01	<i>CXCL10</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
C02	<i>CXCL11</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11
C03	<i>CXCL12</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12
C04	<i>CXCL2</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2
C05	<i>CXCL5</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5
C06	<i>CXCL9</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
C07	<i>CXCR1</i>	Chemokine (C-X-C motif) receptor 1
C08	<i>CXCR2</i>	Chemokine (C-X-C motif) receptor 2
C09	<i>CXCR3</i>	Chemokine (C-X-C motif) receptor 3

Tabela Z3 (cd.). Opis genów użytych do analizy qPCR z panelu Human Cancer Inflammation & Immunity Crosstalk RT² Profiler PCR Array.

Pozycja	Gen	Opis (ang.)
C10	<i>CXCR4</i>	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4
C11	<i>CXCR5</i>	Chemokine (C-X-C motif) receptor 5
C12	<i>EGF</i>	Epidermal growth factor
D01	<i>EGFR</i>	Epidermal growth factor receptor
D02	<i>FASLG</i>	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
D03	<i>FOXP3</i>	Forkhead box P3
D04	<i>GBP1</i>	Guanylate binding protein 1, interferon-inducible
D05	<i>GZMA</i>	Granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)
D06	<i>GZMB</i>	Granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)
D07	<i>HIF1A</i>	Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)
D08	<i>HLA-A</i>	Major histocompatibility complex, class I, A
D09	<i>HLA-B</i>	Major histocompatibility complex, class I, B
D10	<i>HLA-C</i>	Major histocompatibility complex, class I, C
D11	<i>IDO1</i>	Indoleamine 2,3-dioxygenase 1
D12	<i>IFNG</i>	Interferon, gamma
E01	<i>IGF1</i>	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
E02	<i>IL10</i>	Interleukin 10
E03	<i>IL12A</i>	Interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)
E04	<i>IL12B</i>	Interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)
E05	<i>IL13</i>	Interleukin 13
E06	<i>IL15</i>	Interleukin 15
E07	<i>IL17A</i>	Interleukin 17A
E08	<i>IL1A</i>	Interleukin 1, alpha
E09	<i>IL1B</i>	Interleukin 1, beta
E10	<i>IL2</i>	Interleukin 2
E11	<i>IL23A</i>	Interleukin 23, alpha subunit p19
E12	<i>IL4</i>	Interleukin 4
F01	<i>IL6</i>	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
F02	<i>CXCL8</i>	Interleukin 8
F03	<i>IRF1</i>	Interferon regulatory factor 1
F04	<i>KITLG</i>	KIT ligand
F05	<i>MICA</i>	MHC class I polypeptide-related sequence A
F06	<i>MICB</i>	MHC class I polypeptide-related sequence B
F07	<i>MIF</i>	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)
F08	<i>MYC</i>	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
F09	<i>MYD88</i>	Myeloid differentiation primary response gene (88)

Tabela Z3 (cd.). Opis genów użytych do analizy qPCR z panelu Human Cancer Inflammation & Immunity Crosstalk RT² Profiler PCR Array.

Pozycja	Gen	Opis (ang.)
F10	<i>NFKB1</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
F11	<i>NOS2</i>	Nitric oxide synthase 2, inducible
F12	<i>PDCD1</i>	Programmed cell death 1
G01	<i>PTGS2</i>	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
G02	<i>SPP1</i>	Secreted phosphoprotein 1
G03	<i>STAT1</i>	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
G04	<i>STAT3</i>	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
G05	<i>TGFB1</i>	Transforming growth factor, beta 1
G06	<i>TLR2</i>	Toll-like receptor 2
G07	<i>TLR3</i>	Toll-like receptor 3
G08	<i>TLR4</i>	Toll-like receptor 4
G09	<i>TNF</i>	Tumor necrosis factor
G10	<i>TNFSF10</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
G11	<i>TP53</i>	Tumor protein p53
G12	<i>VEGFA</i>	Vascular endothelial growth factor A
H01	<i>ACTB</i>	Actin, beta
H02	<i>B2M</i>	Beta-2-microglobulin
H03	<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	<i>HPRT1</i>	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H05	<i>RPLP0</i>	Ribosomal protein, large, P0
H06	<i>HGDC</i>	Human Genomic DNA Contamination
H07	RTC	Reverse Transcription Control
H08	RTC	Reverse Transcription Control
H09	RTC	Reverse Transcription Control
H10	PPC	Positive PCR Control
H11	PPC	Positive PCR Control
H12	PPC	Positive PCR Control

Zmodyfikowano w oparciu o [205].

Załącznik 5. Wyniki testów Fishera dla danych genetycznych

Tabela Z4. Wyniki dokładnego testu Fishera oceniającego występowanie różnic poszczególnych mutacji w genach zależnie od podtypu histologicznego chrzestniakomięsa.

Gen	p-wartość	FDR
<i>TP53</i>	0,0000	0,0011
<i>IDH2</i>	0,0001	0,0046
<i>IDH1</i>	0,0004	0,0138
<i>PTCH1</i>	0,0098	0,3439
<i>AKT2</i>	0,0255	0,8673
<i>RET</i>	0,7706	1,0000
<i>SYNE1</i>	0,3798	1,0000
<i>USP9X</i>	0,3299	1,0000
<i>BCL11B</i>	1,0000	1,0000
<i>KDM5C</i>	0,6543	1,0000
<i>MN1</i>	0,1124	1,0000
<i>MYH9</i>	0,7080	1,0000
<i>ADGRA2</i>	1,0000	1,0000
<i>ARID1A</i>	0,3299	1,0000
<i>ATRX</i>	0,9455	1,0000
<i>BCR</i>	1,0000	1,0000
<i>CREBBP</i>	0,7208	1,0000
<i>CSMD3</i>	0,1618	1,0000
<i>DNMT3A</i>	0,9455	1,0000
<i>EPHA7</i>	0,1075	1,0000
<i>EXT2</i>	0,1944	1,0000
<i>FGFR3</i>	0,7080	1,0000
<i>KMT2A</i>	0,2930	1,0000
<i>KMT2C</i>	0,3110	1,0000
<i>LRP1B</i>	0,5006	1,0000
<i>MYH11</i>	0,6540	1,0000
<i>NOTCH1</i>	0,5660	1,0000
<i>NOTCH2</i>	0,4179	1,0000
<i>NUP214</i>	0,7700	1,0000
<i>PTPRT</i>	0,2516	1,0000
<i>RB1</i>	0,3488	1,0000
<i>RNF213</i>	0,8779	1,0000
<i>SETD2</i>	0,6742	1,0000
<i>STK11</i>	0,6071	1,0000
<i>TAF1L</i>	0,4613	1,0000
<i>TRRAP</i>	0,2930	1,0000
<i>UBR5</i>	0,1022	1,0000
<i>TAF1</i>	0,8779	1,0000

FDR – wskaźnik fałszywych odkryć (ang. *false discovery rate*). Pogrubioną czcionką oznaczono wyniki istotne statystycznie (FDR <0.05). W tabeli przedstawiono wyniki dla mutacji w genach występujących u co najmniej 5 pacjentów.

Tabela Z5. Wyniki dokładnego testu Fishera oceniającego występowanie różnic poszczególnych mutacji w genach zależnie prezentowanego immunofenotypu.

Gen	p-wartość	FDR
<i>IDH2</i>	0,0030	0,1143
<i>IDH1</i>	0,0162	0,6000
<i>PTCH1</i>	0,0217	0,7812
<i>RET</i>	0,0988	1,0000
<i>SYNE1</i>	0,8976	1,0000
<i>USP9X</i>	0,5034	1,0000
<i>BCL11B</i>	0,8105	1,0000
<i>KDM5C</i>	0,6675	1,0000
<i>MN1</i>	0,2193	1,0000
<i>MYH9</i>	0,1522	1,0000
<i>ADGRA2</i>	0,4332	1,0000
<i>AKT2</i>	0,0949	1,0000
<i>ARID1A</i>	0,3789	1,0000
<i>ATRX</i>	0,4842	1,0000
<i>BCR</i>	1,0000	1,0000
<i>CREBBP</i>	1,0000	1,0000
<i>CSMD3</i>	0,1843	1,0000
<i>DNMT3A</i>	0,5018	1,0000
<i>EPHA7</i>	0,0484	1,0000
<i>EXT2</i>	1,0000	1,0000
<i>FGFR3</i>	0,6219	1,0000
<i>KMT2A</i>	0,6219	1,0000
<i>KMT2C</i>	0,6219	1,0000
<i>LRP1B</i>	0,5848	1,0000
<i>MYH11</i>	0,2172	1,0000
<i>NOTCH1</i>	1,0000	1,0000
<i>NOTCH2</i>	0,1515	1,0000
<i>NUP214</i>	0,0865	1,0000
<i>PTPRT</i>	0,7630	1,0000
<i>RB1</i>	0,5148	1,0000
<i>RNF213</i>	0,5137	1,0000
<i>SETD2</i>	0,1522	1,0000
<i>STK11</i>	0,6219	1,0000
<i>TAF1L</i>	0,3696	1,0000
<i>TP53</i>	0,0364	1,0000
<i>TRRAP</i>	1,0000	1,0000
<i>UBR5</i>	0,2487	1,0000
<i>TAF1</i>	0,3956	1,0000

FDR – wskaźnik fałszywych odkryć (ang. *false discovery rate*). W tabeli przedstawiono wyniki dla mutacji w genach występujących u co najmniej 5 pacjentów.

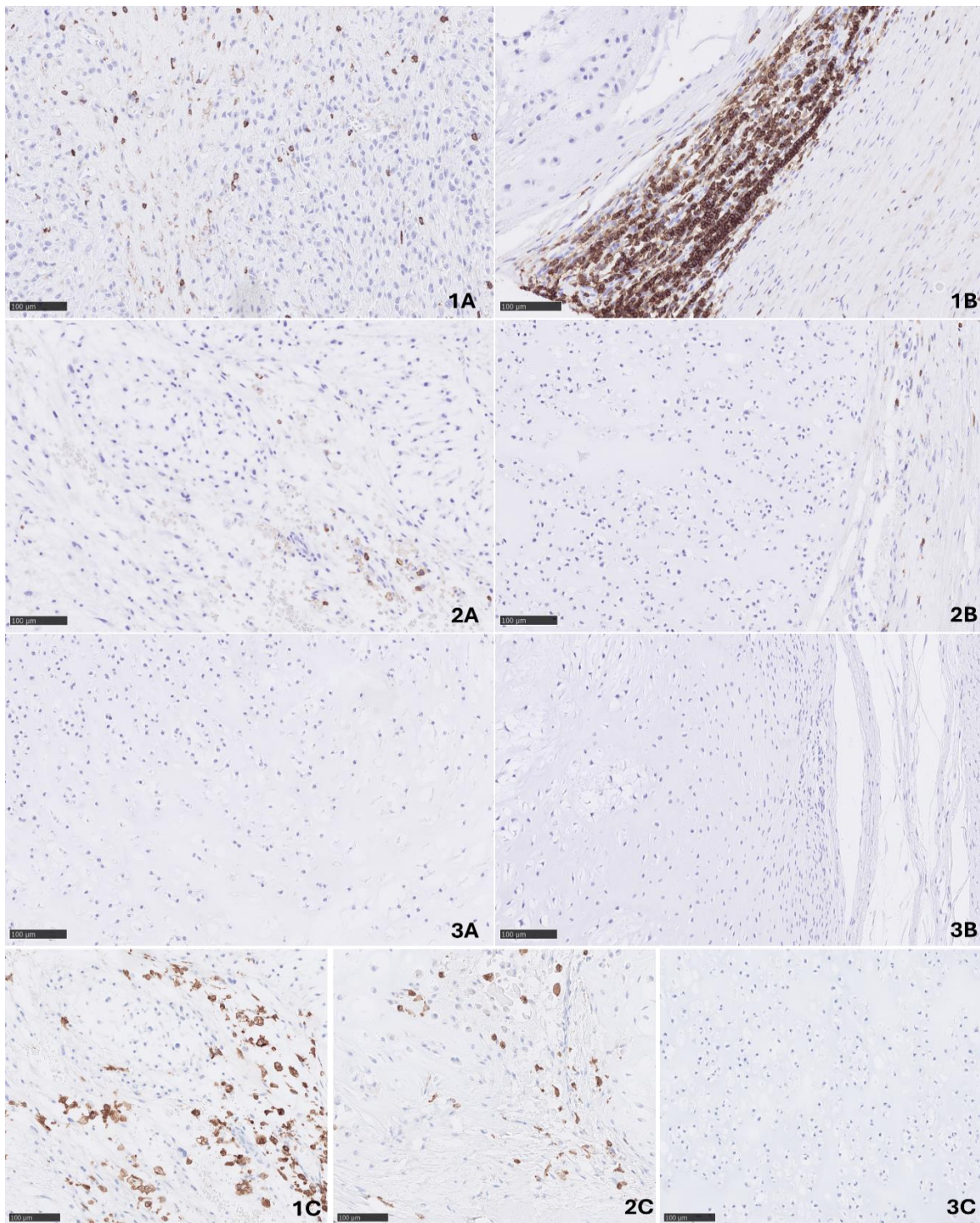
Załącznik 6. Szczegółowe wyniki analizy Coxa danych molekularnych

Tabela Z6. Wyniki modelu proporcjonalnego hazardu Coxa dla przeżycia całkowitego pacjentów z rozpoznaniem chrzęstniakomięsa z uwzględnieniem mutacji w wybranych genach.

Gen	HR	95% CI	p-wartość	FDR
<i>IDH1</i>	1,2528	0,6239 - 1,8817	0,0001	0,0036
<i>TP53</i>	1,3545	0,6416 - 2,0676	0,0002	0,0037
<i>EPHA7</i>	1,8074	0,7244 - 2,8904	0,0011	0,0136
<i>PTCH1</i>	1,7093	0,6271 - 2,7913	0,0020	0,0186
<i>UBR5</i>	1,3201	0,2660 - 2,3742	0,0141	0,1072
<i>IDH2</i>	0,9229	0,1367 - 1,7092	0,0214	0,1356
<i>RET</i>	1,0525	0,0161 - 2,0890	0,0466	0,2243
<i>MN1</i>	0,9645	0,0119 - 1,9172	0,0472	0,2243
<i>ARID1A</i>	1,0134	-0,0233 - 2,0501	0,0554	0,2339
<i>RNF213</i>	-1,8397	-3,8247 - 0,1453	0,0693	0,2633
<i>EXT2</i>	1,2738	-0,1862 - 2,7338	0,0873	0,2815
<i>MYH9</i>	1,0421	-0,1585 - 2,2427	0,0889	0,2815
<i>AKT2</i>	0,8529	-0,1817 - 1,8874	0,1061	0,3103
<i>STK11</i>	-1,1362	-3,1232 - 0,8508	0,2624	0,6108
<i>CREBBP</i>	0,6785	-0,5112 - 1,8682	0,2637	0,6108
<i>PTPRT</i>	-1,1260	-3,1113 - 0,8593	0,2663	0,6108
<i>KDM5C</i>	0,4977	-0,4408 - 1,4362	0,2986	0,6108
<i>ADGRA2</i>	-1,0503	-3,0371 - 0,9365	0,3001	0,6108
<i>KMT2A</i>	-1,0340	-3,0212 - 0,9532	0,3078	0,6108
<i>RB1</i>	0,6010	-0,5871 - 1,7892	0,3215	0,6108
<i>LRP1B</i>	-0,5785	-1,7660 - 0,6089	0,3396	0,6146
<i>NOTCH1</i>	-0,9278	-2,9132 - 1,0576	0,3597	0,6193
<i>TAF1L</i>	0,4648	-0,5702 - 1,4999	0,3788	0,6193
<i>SYNE1</i>	0,4098	-0,5269 - 1,3465	0,3912	0,6193
<i>USP9X</i>	-0,7795	-2,7658 - 1,2069	0,4418	0,6716
<i>KMT2C</i>	0,4072	-0,7698 - 1,5843	0,4977	0,7274
<i>ATRX</i>	-0,4381	-1,8599 - 0,9836	0,5458	0,7682
<i>BCR</i>	0,3098	-0,8701 - 1,4898	0,6068	0,7986
<i>TAF1</i>	-0,2691	-1,3016 - 0,7634	0,6095	0,7986
<i>BCL11B</i>	-0,2066	-1,2416 - 0,8285	0,6957	0,8644
<i>MYH11</i>	0,2754	-1,1513 - 1,7021	0,7052	0,8644
<i>NUP214</i>	-0,2209	-1,6444 - 1,2026	0,7610	0,8656
<i>DNMT3A</i>	0,1587	-0,8737 - 1,1911	0,7633	0,8656
<i>TRRAP</i>	-0,2081	-1,6314 - 1,2153	0,7745	0,8656
<i>SETD2</i>	0,1309	-1,0468 - 1,3087	0,8275	0,8985
<i>NOTCH2</i>	0,0605	-1,1161 - 1,2370	0,9198	0,9622
<i>FGFR3</i>	-0,0576	-1,4833 - 1,3681	0,9369	0,9622

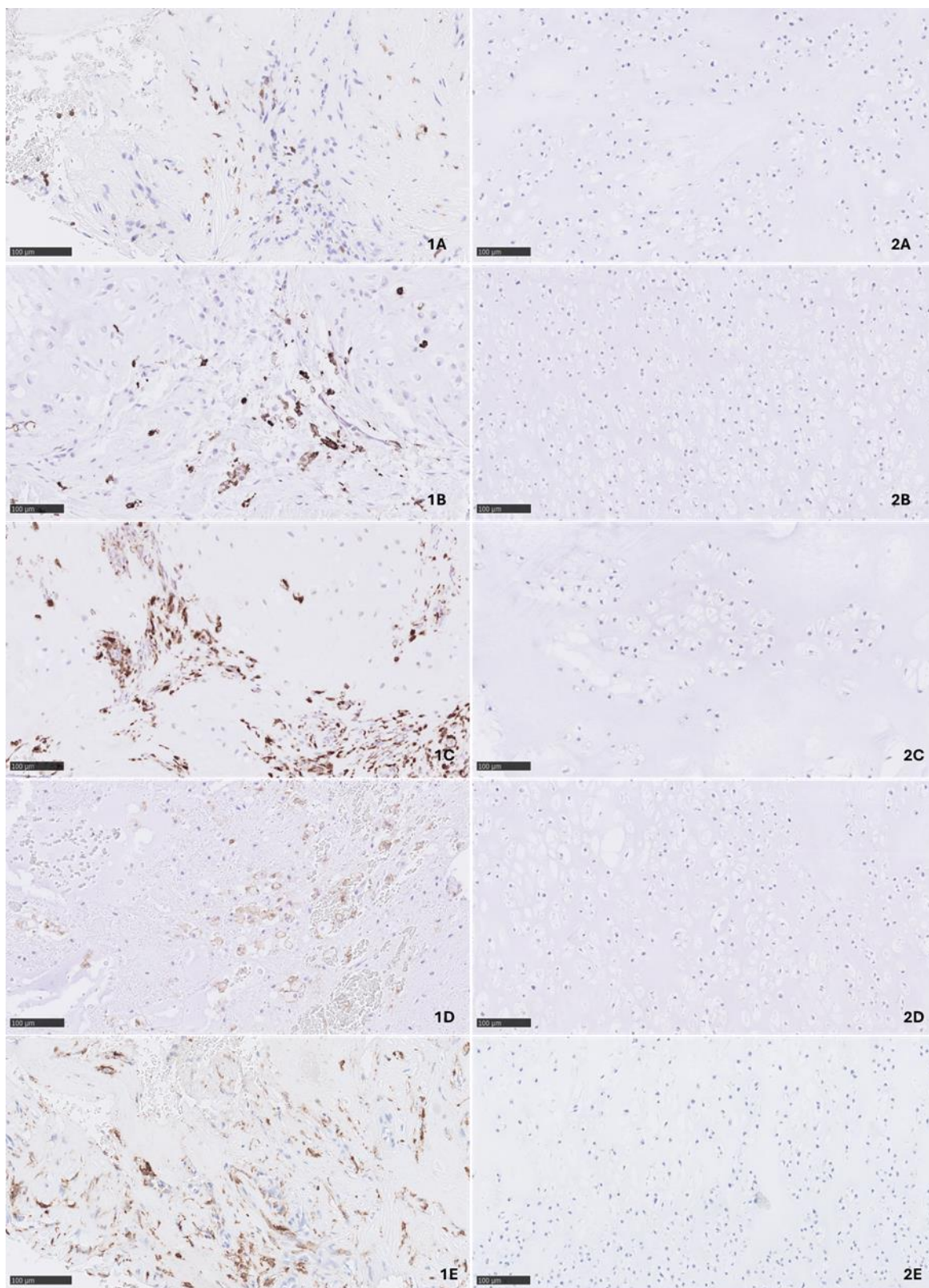
FDR - wskaźnik fałszywych odkryć (ang. *false discovery rate*), HR - współczynnik ryzyka (ang. *hazard ratio*), CI - przedział ufności (ang. *confidence interval*). Pogrubioną czcionką oznaczono wyniki istotne statystycznie (FDR <0.05). W tabeli przedstawiono wyniki dla mutacji w genach występujących u co najmniej 5 pacjentów.

Załącznik 7. Barwienia immunohistochemiczne



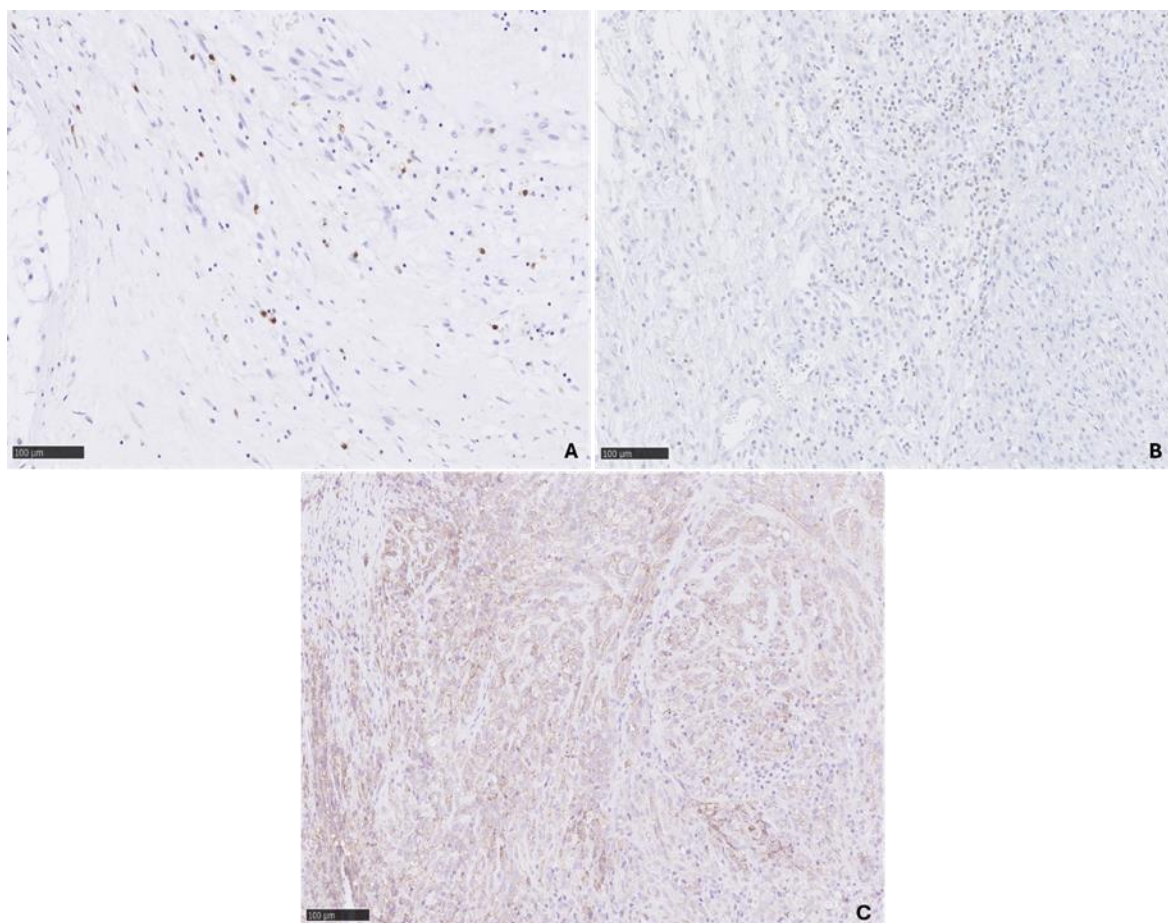
Rycina Z2. Barwienia immunohistochemiczne (IHC) dla markerów CD45 oraz CD163 różniące się w obrębie poszczególnych immunofenotypów: 1 - „gorący”, 2 - „pośredni”, 3 - „zimny”. Zagęszczenie komórek o dodatnim odczynie IHC maleje wraz z kolejnym immunofenotypem. Zdjęcia oznaczone jako A i B przedstawiają barwienia dla CD45 odpowiednio w regionie centralnym i obwodowym guza; C – barwienia dla CD163 w regionie centralnym. Zdjęcia przedstawiono na przykładzie klasycznego chłoniaka.

Powiększenia zdjęć: 200x. Zdjęcia zostały udostępnione przez prof. Annę Szumerę-Ciećkiewicz.



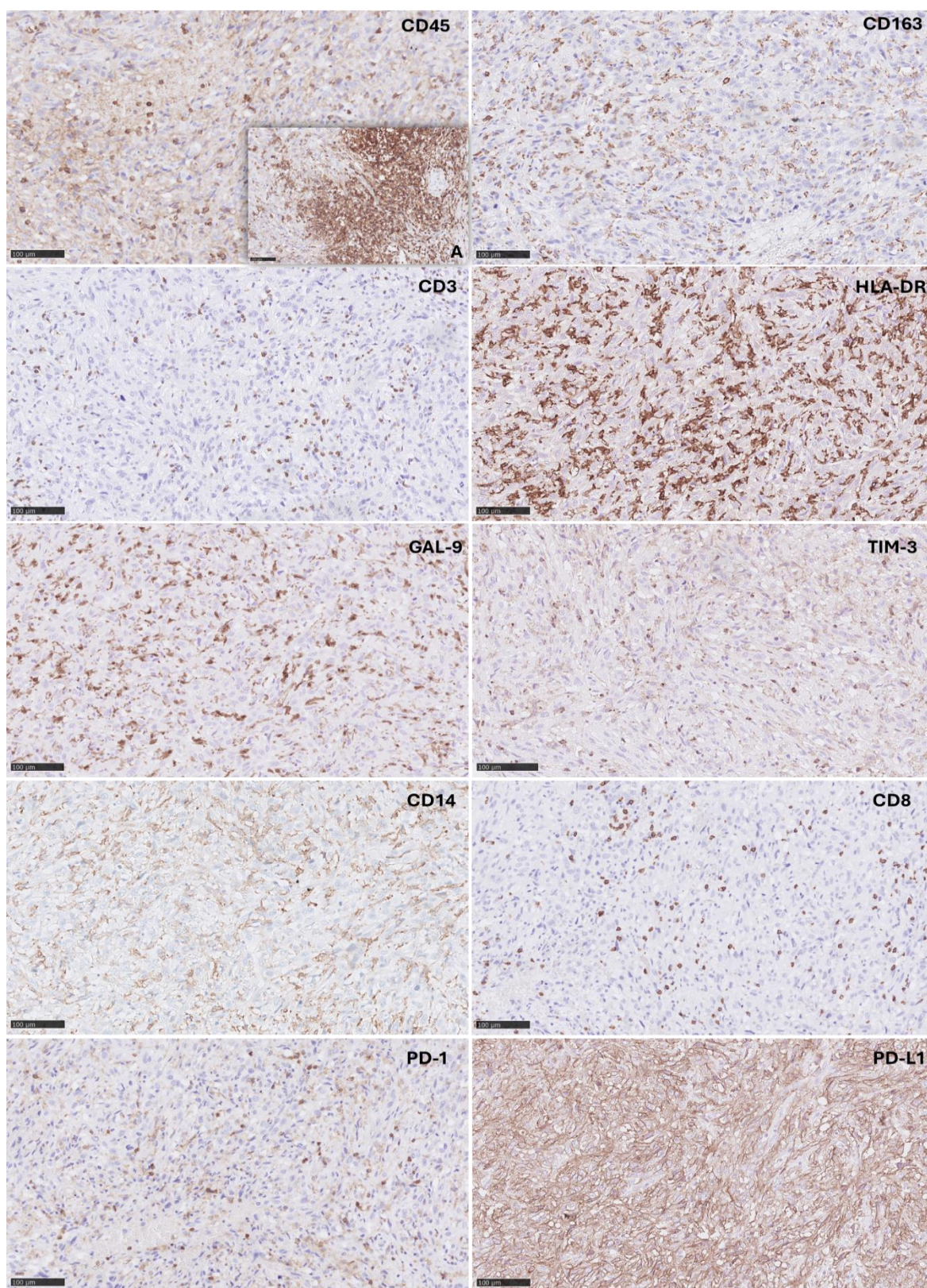
Rycina Z3. Barwienia immunohistochemiczne (IHC) wybranych markerów różniących się w obrębie pacjentów o immunofenotypach „gorących” o dodatnich odczynach IHC (1) oraz „zimnych” o ujemnych odczynach (2). Wszystkie barwienia dotyczą centralnego regionu guza na przykładzie klasycznego chrzęstniakomięsaka: A - CD3; B – HLA-DR; C – Gal-9; D – TIM-3; E – CD14.

Powiększenia zdjęć: 200x. Zdjęcia zostały udostępnione przez prof. Annę Szumerę-Ciećkiewicz.



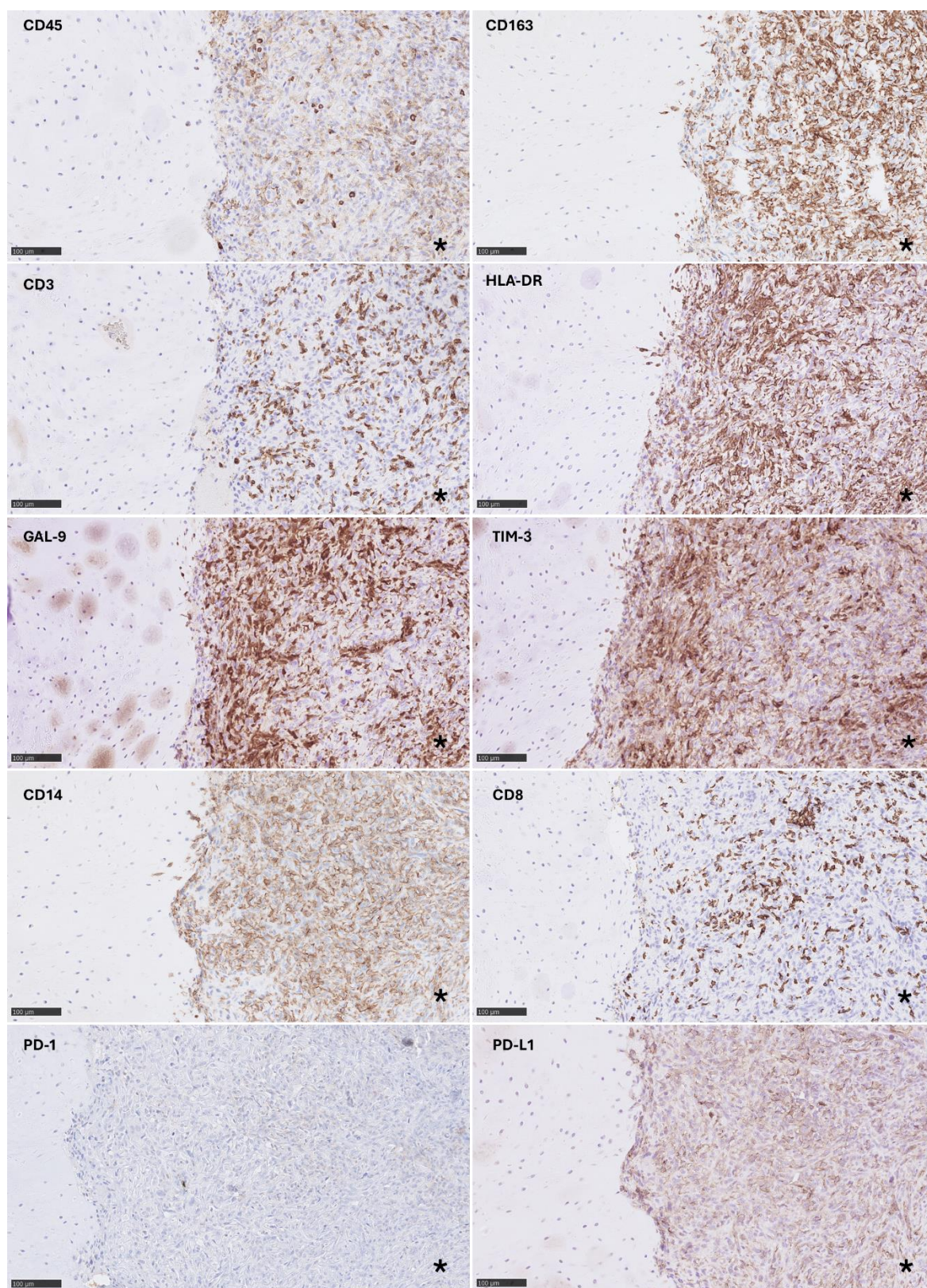
Rycina Z4. Barwienia immunohistochemiczne (IHC) dla wybranych markerów istotnych dla pacjentów z rozpoznaniem chrzęstniakomięsaka o immunofenotypie „gorącym” wykazujących pozytywny odczyn IHC. A - CD8; B - PD-1; C - PD-L1. Zdjęcia zostały przedstawione na przykładzie klasycznego chrzęstniakomięsaka.

Powiększenia zdjęć: 200x. Zdjęcia zostały udostępnione przez prof. Annę Szumerę-Ciećkiewicz.



Rycina Z5. Barwienia immunohistochemiczne dla wybranych markerów w odróżnicowanym chrzęstniakomięsaku z dużą liczbą nacieków komórek immunologicznych oraz z wysoką ekspresją PD-L1, będącego jednocześnie przykładem pacjenta o immunofenotypie „gorącym”. Zdjęcia przedstawiają region centralny guza. Zdjęcie A - przedstawia dodatkowo ekspresję CD45 na obwodzie guza.

Powiększenia zdjęć: 200x. Zdjęcia zostały udostępnione przez prof. Annę Szumerę-Ciećkiewicz.



Rycina Z6. Barwienia immunohistochemiczne dla wybranych markerów w odróżnicowanym chrzęstniakomięsaku z widocznym przejściem pomiędzy komponentami o niskim i wysokim stopniu złośliwości, wykazującym większe zagęszczenie nacieków komórek immunologicznych (*) oraz przykładem niskiej ekspresji PD-L1. Zdjęcia przedstawiają region centralny guza. Powiększenia zdjęć: 200x. Zdjęcia zostały udostępnione przez prof. Annę Szumerę-Ciećkiewicz.

Załącznik 8. Wykaz publikacji i monografii opublikowanych w trakcie realizacji pracy doktorskiej

1. **Zajac, A.E.**; Czarnecka, A.M.; Rutkowski, P. The Role of Macrophages in Sarcoma Tumor Microenvironment and Treatment. *Cancers* 2023, 15, 5294. <https://doi.org/10.3390/cancers15215294>;
2. Dudzisz-Śledź, M.; Kondracka, M.; Rudzińska, M.; **Zajac, A.E.**; Firlej, W.; Sulejczak, D.; Borkowska, A.; Szostakowski, B.; Szumera-Ciećkiewicz, A.; Piątkowski, J.; Rutkowski, P.; Czarnecka, A.M. Mesenchymal Chondrosarcoma from Diagnosis to Clinical Trials. *Cancers* 2023, 15, 4581. <https://doi.org/10.3390/cancers15184581>;
3. Zajac, W.; Drózdź, J.; Kisielewska, W.; Karwowska, W.; Dudzisz-Śledź, M.; **Zajac, A.E.**; Borkowska, A.; Szumera-Ciećkiewicz, A.; Szostakowski, B.; Rutkowski, P.; Czarnecka, A.M. Dedifferentiated Chondrosarcoma from Molecular Pathology to Current Treatment and Clinical Trials. *Cancers* 2023, 15, 3924. <https://doi.org/10.3390/cancers15153924>;
4. Bereza, M.; Dembiński, M.; **Zajac, A.E.**; Piątkowski, J.; Dudzisz-Śledź, M.; Rutkowski, P.; Czarnecka, A.M. Epigenetic Abnormalities in Chondrosarcoma. *Int J Mol Sci.* 2023, 24 (5), 4539. <https://doi.org/10.3390/ijms24054539>;
5. **Zajac, A.E.**; Kopeć, S.; Szostakowski, B.; Spałek, M.J.; Fiedorowicz, M.; Bylina, E.; Filipowicz, P.; Szumera-Ciećkiewicz, A.; Tysarowski, A.; Czarnecka, A.M.; Rutkowski, P. Chondrosarcoma-from Molecular Pathology to Novel Therapies. *Cancers* 2021, 13, 2390. <https://doi.org/10.3390/cancers13102390>;
6. **Zajac, A.**; Król, S.K.; Rutkowski, P.; Czarnecka, A.M. Biological Heterogeneity of Chondrosarcoma: From (Epi) Genetics through Stemness and Deregulated Signaling to Immunophenotype. *Cancers* 2021, 13, 1317. <https://doi.org/10.3390/cancers13061317>;
7. Wągrodzki M., **Zajac A.**, *Chrzęstniakomięsak*, w: P. Rutkowski, A. Jezierski (red.), *Biblioteka chirurga onkologa. Mięsaki kości*. Via Medica, Gdańsk 2022, 6 (2), 194–206.

Załącznik 9. Wykaz prac prezentowanych podczas konferencji związanych z realizacją pracy doktorskiej

1. **Zajac A. E.**, Piątkowski J., Golik P., Szumera-Ciećkiewicz A., Teterycz P., Tysarowski A., Czarnecka A. M., Rutkowski P. Profil mutacyjny chrzęstniakomięsaków na podstawie celowanego sekwencjonowania następnej generacji. V Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Biologii Medycznej „Biologia-Medycyna-Terapia”, 15-17 września 2022, Centrum Transferu Wiedzy Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego Jana Pawła II, Lublin, Polska. *Wystąpienie ustne*;
2. **Zajac A. E.**, Piątkowski J., Golik P., Teterycz P., Szumera-Ciećkiewicz A., Tysarowski A., Palmerini E., Gambarotti M., Frega G., Pierini M., Righi A., Magagnoli G., Dutour A., Jean-Denis M., Ibrahim T., Blay J. Y., Czarnecka A. M., Rutkowski P. Mutational status of chondrosarcoma based on targeted next-generation sequencing analysis. 2022 CTOS Annual Meeting, 16-19 listopada 2022, Vancouver Convention Centre, Vancouver, Kanada. *Poster*;
3. **Zajac A. E.**, Piątkowski J., Golik P., Teterycz P., Szumera-Ciećkiewicz A., Czarnecka A. M., Rutkowski P. Polymorphism or mutation in chondrosarcoma? – Tumor-only mutation detection pipeline with non-paired control, based on next-generation sequencing. 26th Gliwice Scientific Meetings, 18-19 listopada 2022, Centrum Edukacyjno-Kongresowe Politechniki Śląskiej, Gliwice, Polska. *Poster*;
4. **Zajac A. E.**, Piątkowski J., Golik P., Szumera-Ciećkiewicz A., Teterycz P., Tysarowski A., Czarnecka A. M., Rutkowski P. Mutational signatures of chondrosarcoma using next-generation sequencing. 18th Warsaw International Medical Congress, 21-23 kwietnia 2023, Centrum Dydaktyczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Warszawa, Polska. *Wystąpienie ustne*;
5. **Zajac A. E.**, Piątkowski J., Golik P., Teterycz P., Szumera-Ciećkiewicz A., Czarnecka A. M., Rutkowski P. Tumor-only mutation detection pipeline optimization – based on data from sequencing of chondrosarcoma. 14th International Conference Of Contemporary Oncology, 19-22 kwietnia 2023, ONLINE. *Poster oraz wyróżnione wystąpienie ustne*;

6. **Zajac A. E.**, Piatkowski J., Golik P., Szumera-Ciećkiewicz A., Teterycz P., Tysarowski A., Czarnecka A. M., Rutkowski P. Evaluation of genetic alterations in chondrosarcoma assessed by a targeted genetic panel. IX Warszawska Konferencja Onkologiczna, 24 Maja 2023, Centrum Edukacyjno-Konferencyjnym Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie - Państwowego Instytutu Badawczego, Warszawa, Polska. *Poster*;
7. Rutkowski P., Szumera-Ciećkiewicz A., **Zajac A. E.**, Tuziak J., Wągradzki M., Michalak P., Teterycz P., Palmerini E., Gambarotti M., Frega G., Pierini M., Righi A., Magagnoli G., Dutour A., Jean-Denis M., Ibrahim T., Blay J. Y., Czarnecka A. M. 1969P Intratumoral immune infiltrates in chondrosarcoma (ChS). *J.annonc.* 2023, 34 (S2), S1052. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2023.09.1198>. *Poster*;
8. Rutkowski P., **Zajac A.E.**, Szumera-Ciećkiewicz A., Piatkowski J., Teterycz P., Palmerini E., Dutour A., Tuziak J., Wągradzki M., Tysarowski A., Gambarotti M., Frega G., Pierini M., Righi A., Magagnoli G., Jean-Denis M., Ibrahim T., Blay J-Y., Golik P., Czarnecka A.M. 1774P Immunological-molecular profiling of chondrosarcoma (ChS). *J.annonc.* 2024, 35 (S2), S1056. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2024.08.1865>. *Poster*;
9. **Zajac A.**, Szumera-Ciećkiewicz A., Piatkowski J., Teterycz P., Palmerini E., Dutour A., Tuziak J., Wągradzki M., Tysarowski A., Gambarotti M., Frega G., Pierini M., Righi A., Magagnoli G., Jean-Denis M., Ibrahim T., Blay J-Y., Golik P., Czarnecka A., Rutkowski P. Immunologiczno-molekularne profilowanie chrzestniakomięsaka (ChS). Kongres Onkologii Polskiej, 17-19 października 2024, Warszawa. *Wystąpienie ustne*;
10. **Zajac A.E.**, Szumera-Ciećkiewicz A., Piatkowski J., Teterycz P., Palmerini E., Dutour A., Tuziak J., Wągradzki M., Tysarowski A., Gambarotti M., Frega G., Pierini M., Righi A., Magagnoli G., Jean-Denis M., Ibrahim T., Blay J-Y., Golik P., Czarnecka A.M. Rutkowski P. Multi-parametrical profiling of chondrosarcoma. 2024 CTOS Annual Meeting, 13-16 listopada 2024, San Diego, CA, USA. *Poster*.