

A Wnt útvonal szerepe a glioblastoma biológiájában

Doktori (PhD) – értekezés



Tompa Márton

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Klinikai Idegtudományi Doktori Iskola (D221)**

Témavezető:

Prof. Dr. Kálmán Bernadette, MD, PhD, DSc, FAAN

Programvezető:

Prof. Dr. Komoly Sámuel, MD, PhD, DSc

Doktori Iskola vezetője:

Prof. Dr. Komoly Sámuel, MD, PhD, DSc

Pécs, 2021

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés.....	7
1.1. A GBM általános jellemzése.....	7
1.2. A GBM leggyakoribb molekuláris mutációi.....	8
1.3. A GBM epigenetikai változásai.....	11
1.4. A Wnt útvonal és szerepe a GBM patogenezisében.....	12
1.4.1. Kanonikus vagy béta-katenin függő útvonal.....	13
1.4.2. Non-Kanonikus vagy béta-katenin független útvonal.....	14
1.4.2.1. Planar cell polarity/PCP útvonal.....	14
1.4.2.2. Wnt/Ca ²⁺ útvonal.....	15
2. Hipotézisek és célkitűzések.....	18
2.1. Hipotézisek.....	18
2.2. Célkitűzések.....	18
3. Anyag és módszer.....	19
3.1. Etikai nyilatkozat.....	19
3.2. Beteganyag.....	19
3.2.1. Általános leírás.....	19
3.2.2. A Wnt markerek expressziós mintázatának vizsgálata a gliomák grádusa, eredete és molekuláris markerei szerint.....	20
3.2.3. A Wnt markerek expressziós mintázatának vizsgálata a GBM molekuláris alcsoportjaiban.....	20
3.2.4. A Wnt markerek expressziós és DNS metilációs mintázatának vizsgálata a szekvenciális GBM mintapárokbán.....	22
3.3. Immunhisztokémia.....	24
3.4. DNS izolálás.....	28
3.5. Piroszekvenálás.....	29
3.6. Epigenomika.....	29
3.7. Bioinformatika.....	31
3.8. Statisztika.....	32
4. Eredmények.....	33
4.1. A Wnt markerek expressziós mintázatának vizsgálata a gliomák grádusa, eredete és molekuláris markerei szerint.....	33
4.1.1. A Wnt markerek expressziós szintje a II-IV grádusú gliomákban és a normál agyszövetben.....	34
4.1.2. Wnt markerek expressziós mintázata a gliomák eredete szerint.....	36
4.1.3. Wnt markerek kifejeződése a gliomákban az IDH-1 R132H/C mutáció szerint.....	37
4.1.4. Wnt markerek megjelenése a p53 és az ATRX pozitív és negatív festődésű II-III grádusú gliomákban.....	38

4.2. A Wnt markerek protein kifejeződése a GBM molekuláris alcsoportjaiban	40
4.2.1. Kohort 1 tanulmányok.....	40
4.2.1.1. A GBM molekuláris alcsoportjai	40
4.2.1.2. A betegek teljes túlélése.....	41
4.2.1.3. A Wnt markerek kifejeződése a molekuláris alcsoportokban	43
4.2.1.4. A Wnt markerek kifejeződése az IDH-1 R132H/C mutáció szerint.....	47
4.2.1.5. A Wnt markerek kifejeződése a „gazdagított” molekuláris alcsoportokban	47
4.2.1.6. Korreláció az alcsoport meghatározó CS és a Wnt markerek CS értékei között a molekuláris alcsoportokban	49
4.2.1.7. A Wnt markerek közötti korreláció.....	49
4.2.1.8. A Wnt markerek korrelációja a teljes túléléssel	50
4.2.2. Kohort 2 tanulmányok.....	50
4.2.3. Kohort 3 tanulmányok.....	50
4.3. A Wnt markerek protein expressziós és DNS metilációs mintázata a szekvenciális GBM mintapárokban	52
4.3.1. A Wnt markerek protein expressziós szintje a GBM mintapárokban és a kontroll mintákban.....	56
4.3.2. A Wnt markerek DNS CpG metilációs mintázata a promoter és gén régiókban a GBM mintapárokban és a kontroll mintákban	58
4.3.3. A Wnt markerek CpG metilációs szintje a promoter és gén régiókban az adatbázis szekvenciális GBM kohort egyéni mintáiban.....	59
4.3.4. A Wnt markerek CpG metilációs szintje a gén enhancer régiókban a tanulmány és az adatbázis szekvenciális GBM kohort egyéni mintáiban.....	60
5. Megbeszélés	62
5.1. A Wnt markerek expressziós mintázata a gliomák grádusa, eredete és molekuláris markerei szerint	62
5.2. A Wnt markerek kifejeződése az IDH-1 R132H/C mutáns és a vad típusú gliomákban.....	63
5.3. A Wnt markerek protein kifejeződése a GBM molekuláris alcsoportjaiban	65
5.4. A Wnt markerek protein expressziós és DNS metilációs mintázata a szekvenciális GBM mintapárokban	71
6. Következtetések	75
7. Új megállapítások	77
8. Saját publikációk jegyzéke	78
8.1. Az értekezés alapjául szolgáló publikációk jegyzéke.....	78
8.2. Egyéb publikációk jegyzéke.....	78
8.3. Prezentációk	79
9. Köszönetnyilvánítás.....	80
10. Referenciák	81

Rövidítések jegyzéke

AP-1 – Activator protein-1

APC – Adenomatous Polyposis Coli Protein

ATRX – Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked

AXIN – Axis inhibitor protein

ASPM – Assembly Factor For Spindle Microtubules

CaMKII – Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II

Cdc42 – Cell division control protein 42 homolog

CDK/cyclin – Cyclin-dependent kinase-cyclin

CDKN – Cyclin-dependent kinase inhibitor

CK1 – Casein kinase 1

CNV – Copy number variation

CS – „Complex Score”

CSC – Cancer stem cell

CT – Threshold cycle

CTCF – CCCTC-binding factor

D2HG – D-2-hydroxyglutarate

DAAM1 – Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1

DAB – 3, 3'-diaminobenzidine

DNS – Deoxiribonukleinsav

DKK – Dickkopf

DVL-1 – Dishevelled segment polarity protein 1

EGFR – Epidermal growth factor receptor

EMT – Epithelial–mesenchymal transition

FFPE – Formalin-Fixed Paraffin-Embedded

FISH – Fluorescent *in situ* hybridization

FoxM1 – Forkhead box protein M1

Fzd – Frizzled

GBM – Glioblastoma

G-CIMP – Glioma-CpG island methylator phenotype

GFAP – Glial fibrillary acidic protein
GO – Gene Ontology
GSC – Glioma stem cell
GSK-3 β – Glycogen synthase kinase 3 β
Gy – Gray
HE – Hematoxilin-eozin
IDH-1/2 – Isocitrate dehydrogenase 1 and 2
IHC – Immunohisztokémia
JNK – c-Jun N-terminal kinase
KREMEN – Kringle Containing Transmembrane Protein
LEF1 – Lymphoid enhancer factor 1
LRP5/6 – Low density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6
MEOK – Markusovszky Egyetemi Oktatókórház
MGMT – O⁶-methylguanine-DNA methyl-transferase
NEMO – NF κ -B essential modulator
NF-1 – Neurofibromin 1
NFAT – Nuclear factor of activated T-cells
NF κ B – Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NGS – Next generation sequencing
NLK – Nemo Like Kinase
PCP – Planar cell polarity
PCR – Polymerase chain reaction
PDE – Phosphodiesterase
PDGFRA – Platelet-derived growth factor receptor A
PI3K – Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PLAGL-2 – Pleomorphic adenoma gene-like 2
PLC – Phospholipase C
PTE ÁOK – Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar
PTEN – Phosphatase and tensin homolog
RAC1 – Rho- and Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RB – Retinoblastoma

ROCK – Rho-associated kinase
ROI – „Region of Interest”
ROR – Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor
RRBS – Reduced representation bisulfite sequencing
RTK – Receptor tyrosine kinase
Ryk – Receptor-like tyrosine kinase
sFRP – Soluble frizzled-related protein family
SNP – Single-nucleotide polymorphism
TAK1 – TGF β -activated kinase-1
TBS – Tris-buffered-saline
TCF4 – T-cell factor 4
TCGA – The Cancer Genome Atlas
TF – Transcription factor
TMZ – Temozolomid
UBAC2 – Ubiquitin-associated domain-containing protein 2
WHO – Egészségügyi Világszervezet
WIF1 – Wnt inhibitor factor 1
 β -TrCP – β -transducin repeating protein

1. Bevezetés

1.1. A GBM általános jellemzése

A glioblastoma (GBM) a központi idegrendszer leggyakoribb és legmalignusabb primer agydaganata. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) kategorizálása szerinti legsúlyosabb, IV-es grádusú glioma. Évente hozzávetőlegesen 240 000 agydaganatot regisztrálnak világszerte, melyeknek jelentős része GBM [1]. Az Egyesült Államokban az incidenciája 3.19/100 000 [2]. Magyarországon az agydaganatok a rákos megbetegedések 2-3%-át teszik ki, évente az 1000 agyszövetből kiinduló daganatból körülbelül 400 GBM [3]. A GBM ritkán gyermekkorban is kialakulhat, de az életkor előrehaladtával és főként az idős korban fokozódik az előfordulása. A daganat leggyakrabban a hemiszfériumokban található, leginkább a frontális, ritkább esetekben, a temporális lebenyben [4]. A betegség medián túlélési ideje 14-20 hónap között mozog [1, 5]. Mai napig redkívvül rossz prognózis jellemzi annak ellenére, hogy számos kutatócsoport innovatív diagnosztikus stratégiák és új terápiák kialakításán dolgozik [6, 7]. A jelenleg is alkalmazott standard terápiás eljárást Stupp et al. [1] dolgozta ki, amely TMZ (temozolomid) alapú kemo- és sugárterápián alapult. A Stupp protokoll széles margójú tumor rezekciót, majd 6 héten keresztül 75 mg/m² dózisú TMZ-t és 60 (30 x 2) Gy (Gray) sugárterápiát foglal magába. Ezt egy 4 hetes szünet követ, majd újabb 6 ciklus TMZ-monoterápia, ahol 150-200 mg/m² dózisban 5 napon keresztül kapják a betegek a gyógyszert [1].

A GBM más agresszív tumorokkal szemben (melyek gyakran képeznek áttétet), szinte kizárólag az agyra lokalizálódik és nagyon ritkán metasztatizál. A tumorra jellemző, hogy az idegpályák mentén a normál agyszövetbe kúszik, ami rendkívvül megnehezíti a teljes műtéti eltávolítását. A daganat, progressziója során fokozatosan növekszik és roncsolja a normális agyállományt. Tértfoglaló expansziójának következtében számos patológiai és neurológiai elváltozást okoz, mint például összenyomhatja és károsíthatja az agyi ereket, aminek következtében fokális hypoxia alakul ki. Továbbá agyi ödémát és epilepsziás rohamokat idézhet elő. Késői stádiumban a tumor növekedése intrakraniális nyomásfokozódáshoz és ezzel járó fejfájáshoz, szédüléshez, hányingerhez, eszméletvesztéshez és végső esetben beékelődéshez vezethet [8].

A GBM-ek többsége (90-95%) előzmény nélkül, *de novo* alakul ki. Ezek a primer GBM tumorok agresszív és erősen invazív tulajdonságokat mutatnak, idősebb korra (medián életkor 62 év) jellemzőek. A másodlagos GBM ritkább (5-10%), fiatalabb korban (medián életkor 45 év) alakul ki alacsonyabb grádusú asztrocitomák progressziójának

eredményeként. Az utóbbi daganat típus prognózisa jobb, mint a primer GBM-nek [9, 2] (**1. Táblázat**). A primer és másodlagos GBM hisztológiailag megkülönböztethetetlen, valamint klinikailag is hasonló tüneteket eredményez. Elkülönítésük elsődlegesen molekuláris tulajdonságaikon alapszik, mivel eltérő mutációkat halmoznak fel, valamint különböző molekuláris útvonalak aktiválódnak a kialakulásuk során. A primer GBM-re jellemző az EGFR (epidermal growth factor receptor) amplifikációja vagy mutációja, a PTEN (phosphatase and tensin homolog) deléciója vagy mutációja, míg a másodlagos típusra jellemzőbb a p53 fehérje és az IDH-1/2 (isocitrate dehydrogenase 1 and 2) mutációja. Az IDH mutáció korai esemény a gliomagenézis során [10, 11], így az IDH-1 státusz meghatározása a leggyakrabban és legmegbízhatóbban alkalmazott marker a primer és másodlagos GBM elkülönítésére [11, 12].

	IDH vad típus GBM	IDH mutáns GBM
Név	Primer GBM	Másodlagos GBM
Prekurzor	<i>de novo</i>	Diffúz asztrocitoma, anaplasztikus asztrocitoma
Gyakorisága GBM-en belül	~90%	~10%
Medián életkor a diagnóziskor	~62 év	~45 év
Medián túlélés természetes lefolyással	4 hónap	15 hónap
Medián túlélés műtét+sugárterápia kezeléssel	~9.9 hónap	~24 hónap
Medián túlélés műtét+sugárterápia+kemoterápia kezeléssel	~15 hónap	~32 hónap
Tipikus agyi lokalizációja	Supratentoriális	Frontális
Nekrózis	Kiterjedt	Limitált

1. Táblázat: Legfontosabb klinikai különbségek a primer és másodlagos GBM között (Forrás: [2]).

1.2. A GBM leggyakoribb molekuláris mutációi

Mint minden tumor esetében, a GBM kialakulása is szomatikus mutációk és epigenomikai változások felhalmozódásának következménye. A genetikai instabilitás és az emelkedett mutációs ráta klonális diverzitáshoz és a tumoron belüli molekuláris heterogenitáshoz vezet. Néhány daganat típusnak, mint például a vastagbélráknak jól meghatározott és ismert fejlődési stádiumai vannak, definiált szomatikus mutációkkal, melyek általában meghatározott sorrendben követik egymást. Ezzel szemben a GBM-re a komplex és nehezen előrelátható molekuláris elváltozások jellemzőek, amelyek módosítják a jelátvivő útvonalakat [13]. A GBM-ben felhalmozódott mutációk első és átfogó meghatározása a

„The Cancer Genome Atlas” (TCGA) együttműködési hálózat munkájának köszönhető [14]. Ez a tanulmány rámutatott, hogy a GBM-ben a mutációk leggyakrabban a RTK/RAS/PI3K (receptor tyrosine kinase/RAS/ phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase) a RB (retinoblastoma) és a p53 útvonalat érintik [14]. Az EGFR egy biológiailag fontos RTK, amely számos tumorban, így a GBM-ben is szerepet játszik a sejt proliferáció, migráció, differenciálódás és túlélés szabályozásában. A GBM-ben az EGFR jelátvivő útvonal fokozott működését lehet tapasztalni, melyet leggyakrabban a receptor konstitutív aktivációs mutációja, az EGFRvIII (a gén 2-7 exonjának deléciónja), vagy az EGFR gén régió amplifikációja okozza [15]. A RAS útvonal negatív szabályozó eleme a PTEN és az NF-1 (neurofibromin 1) is. E két fehérje mutációja tumor szupresszor funkcióvesztéssel jár, melynek következtében a tumor agresszivitása és terjedése is fokozódik. Az RB útvonal a sejtciklus szabályozásában játszik kulcsszerepet. A nem osztódó sejtekben az RB hipofoszforilált állapotban van és aktívan kötődik az E2F transzkripció faktorhoz (TF), így a mitózishoz szükséges gének transzkripciója gátolt. Osztódó sejtekben a növekedési faktorok aktiválják a CDK/cyclin (cyclin-dependent kinase-cyclin) komplexeket, melyek foszforilálják az RB-t, az E2F gátlása megszűnik és indukálódik a DNS szintézise és a sejtek proliferációja. Az RB útvonal negatív gátlása során a CDKN (cyclin-dependent kinase inhibitor) fehérjék a ciklinnel kompetícióban kötődnek a CDK-hoz, ezáltal megakadályozva az RB foszforilációját. A GBM-ben a sejtciklus felborulása figyelhető meg az RB negatív regulátoros egységeinek inaktívációjára (promoter metiláció, géncsendesítés) következtében [16]. Végül a p53 egészséges sejtekben a DNS károsodás helyreállításában, a sejthalál és sejt differenciálódás szabályozásában vesz részt, míg gliomákban és a GBM-ben a fehérje exonjában történő misszenz mutációk következtében egy fontos DNS kötő doménje hibásan íródik át, így a p53 affinitása a DNS egyes szakaszaihoz lecsökken vagy teljesen gátlódik [17].

A korábban jelzett nagyfokú intra- és intertumor molekuláris heterogenitást különböző mechanizmusokkal magyarázták GBM-ben [18], melyek közül két lehetséges feltételezés látszik legvalószínűbbnek. Az egyik elmélet kiemeli a CSC-k (cancer stem cell) random módon jelentkező mutációinak szerepét a GSC-k (glioma stem cell) többpontú megjelenésében és az ezekből származó daganatos sejtklónok kialakulásában. A másik elmélet szerint a heterogenitás a klonális evolúció következménye, melynek során a rákos sejtek folyamatosan osztódnak különböző mutációk halmozódása és klonális elágazódások közepette, melyek különböző sejt szubpopulációk kialakulásához vezetnek [19, 20].

A TCGA konzorcium nemcsak a SNP (single-nucleotide polymorphism), CNV (copy number variation) és kromoszóma struktúra variánsokat határozta meg elsőként GBM-ben [14], hanem a genomikai és transzkriptomikai adatok integrált elemzésével megállapította a GBM molekuláris alcsoportjainak elkülönülését is, melyeket klasszikus, mesenchymalis, proneurális és neurális alcsoportnak neveztek el [21]. Később a neurális alcsoportot (normál agyszöveti kontamináció gyanúja miatt) elvetették [22]. A klasszikus és mesenchymalis alcsoport tipikusan agresszívebb, szemben a proneurális alcsoporttal magas grádusú gliomákban. A klasszikus alcsoportra jellemző a magas szintű sejt proliferációs ráta, az EGFR amplifikáció és az EGFRvIII mutáció, valamint a 10-es kromoszóma deléciója. Szövettanilag asztrocitoid eredet és markerek jellemzik. A mesenchymalis alcsoportban jellemző az NF-1 gén deléciója vagy mutációja, továbbá gyakori a mesenchymalis és asztrocitikus markerek túlzott kifejeződése. A mesenchymalis alkategória általában idősebb betegekben alakul ki. Szövettanilag ebben a csoportban a legmagasabb a nekrozis és a gyulladásos folyamatok mértéke. Végül a proneurális alcsoportban gyakran mutálódik a p53, a PDGFRA (platelet-derived growth factor receptor A) és az IDH-1 vagy az IDH-2 gén. Ebben az alcsoportban tapasztalhatjuk viszonylag a legjobb prognózist, jellegzetesen a fiatalabb betegekben fordul elő. Szövettanilag oligodendroid eredet és markerek jellemzik [21, 23].

Kiterjedt omikai vizsgálatok rámutattak arra, hogy a gliomák molekuláris jegyei fölülírhatják a hisztológiai grádust a prognózis meghatározásában. A WHO az agydaganatok osztályozásának 2016-os revíziójában ezért integrálta a molekuláris és hisztopatológiai adatokat és javasolta az IDH-1 mutációs státusz vizsgálatát, mint elsődleges molekuláris tesztet a gliomák rutin hisztopatológiai meghatározása során [24]. Ugyancsak a TCGA konzorcium genom-szinten meghatározta a GBM DNS CpG metilációs mintázatait és javasolta a G-CIMP (glioma-CpG island methylator phenotype) alcsoport elkülönítését [21, 25]. A G-CIMP alcsoport elkülönül a nem-G-CIMP alcsoportoktól, a CNV-k, a DNS metilációs mintázata, a fehérje expressziós jellegzetességei, valamint jobb túlélési mutatói alapján (**2. Táblázat**).

	Klasszikus	Mesenchymalis	Proneurális /G-CIMP
Életkor	Idős	Idős	Fiatalabb
Prognózis	Rossz	Rossz	Viszonylag jobb
Sejt marker	Őssejt	Őssejt	Neuroblaszt
Kromoszóma változás	7-es kromoszóma amplifikáció, 10-es kromoszóma vesztés	7-es kromoszóma amplifikáció, 10-es kromoszóma vesztés	Proneurális: Normális 7-es és 10-s kromoszóma G-CIMP: 8-as és 10-es kromoszóma amplifikáció
Jellemző fehérje mutáció	EGF és EGFR amplifikáció, EGFRvIII mutáció	NF-1 deléció vagy mutáció	p53 mutáció, IDH-1/2 mutáció
Módosult szignálútvonalak	RTK (EGFR) AKT, CDKN2A,	RAS (NF-1) Met	Notch, p53, PDGFRA, IDH, MYC

2. Táblázat: A táblázat összefoglalja az alcsoportokra legjellemzőbb tulajdonságokat (Forrás: [2]).

A TCGA adatok szoros összefüggést mutattak a G-CIMP státusz és az IDH génmutációk között a proneurális alcsoportban. A mutáns IDH enzim α -ketoglutarátból D2HG (D-2-hydroxyglutarate) onkometabolitot képez, amely jelentős mértékben képes megváltoztatni a CpG szigetek metilációs mintázatát, ezáltal befolyásolva a tumor transzkripció mintázatát is [25, 26].

1.3. A GBM epigenetikai változásai

A tumorok kialakulása és progressziója során a sejtek DNS metilációs mintázata a legtöbb esetben megváltozik [27]. A rákos sejtekben egy általános citozin metilációs szint csökkenés (hipometiláció) figyelhető meg lokális lókus-specifikus hipermetiláció mellett [28, 29]. A daganatban kialakuló genom szintű hipometiláció genetikai instabilitáshoz, valamint a normális körülmények között represszált onkogének expressziójához vezet [30]. Ezzel szemben a DNS lánc citozin nukleotidjainak túlzott metiláltsága, vagyis a hipermetiláció, a tumor szupresszor és DNS javító gének inaktivációját eredményezi. Mind a génspecifikus hipometiláció, mind a hipermetiláció a daganatok kialakulását és progresszióját segíti elő [31, 32]. A GBM-ben az egyik legtöbbet vizsgált és a klinikai gyakorlatban is jelentőssé vált epigenomikai változás, az MGMT (O^6 -methylguanine-DNA methyl-transferase) gén promoterének hipermetilációja. Az MGMT enzim kijavítja az alkiláló kemoterápia (mint pl. a TMZ) által okozott DNS károsodást, ezzel segíti a tumor túlélését és rontja a kezelés hatékonyságát. A gén promoterének hipometilációja rossz prognózissal társul, míg hipermetilációja elcsendesíti az enzimet, ezzel javítva a kezelés kimenetelét. Következésképpen a gén potenciális terápiás célpontként is szolgálhat [33].

A genom szintű DNS CpG metilációs elemzések közül kiemelést érdemel Zhang et al. [34] tanulmánya, melyben 40 GBM mintában a normál agyhoz képest 104 hipometilált és 524 hipermetilált régiót talált. Ebből 70 hipometilált és 361 hipermetilált régió CpG szigetre térképeződött. A hipometilált régiók 81,1%-a és a hipermetilált régiók 66,5%-a promoterekben volt található. A legtöbb gén terméke, amely érintett volt a metilációs változás által, valamilyen jelátvivő folyamatban, sejt adhézióban, apoptózisban és a tumor fejlődés szabályozásában játszott szerepet [34]. Klinikai formalin-fixált, paraffinba-ágyazott (FFPE) GBM minták epigenomikai vizsgálata a közelmúltban vált lehetővé az RRBS (reduced representation bisulfite sequencing) könyvtárkészítésre alkalmas kit és NGS (next generation sequencing) technológia elérhetőségével. Ennek a módszernek az alkalmazásával nemrég Klughammer et al. [35] végzett DNS CpG metilációs elemzéseket FFPE GBM kohortokban. Számos eredménye között rámutatott a Wnt útvonal differenciált metiláltságára a primer és recidív tumorok összehasonlításában [35]. Egyidejűleg saját kutatócsoportunk is végzett egy RRBS és NGS technológiára épülő genom-szintű DNS CpG metilációs elemzést 24 pár FFPE primer és recidív GBM mintában [36]. A GO (Gene Ontology) elemzéseink rámutattak a Wnt útvonal differenciált metiláltságára progresszív GBM-ben, számos más differenciáltan metilált útvonal mellett. A Wnt útvonal szerepe viszonylag jól meghatározott a különböző tumorok biológiájának, evolúciójának és progressziójának a kialakulásában, azonban kevés információ áll rendelkezésre milyen befolyással bír a gliomákban. Ezért a hipotézis mentes, epigenomikai elemzések Wnt-re utaló eredménye különösen fontosnak látszott, és meghatározta további kutatásaink irányát.

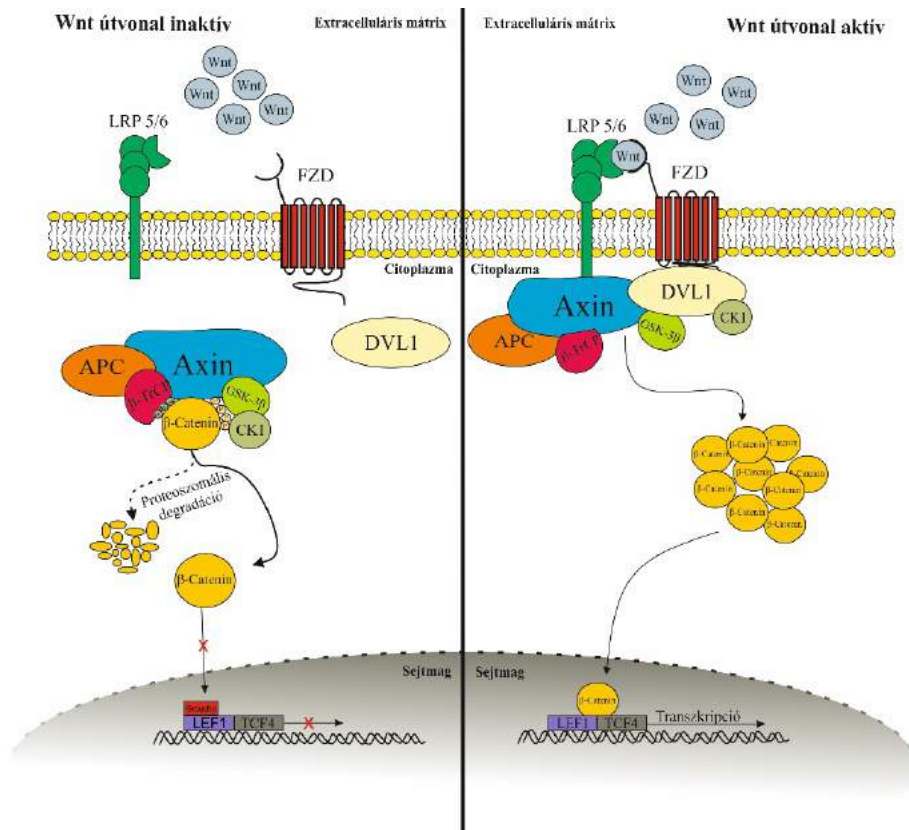
1.4. A Wnt útvonal és szerepe a GBM patogenezisében

A gliomákban a Wnt útvonal rendellenes működésének fő hajtóerői általában nem a mutációk, hanem az epigenetikai változások. A Wnt számos egyéb jelátvivő útvonallal áll kapcsolatban, mint például a Notch, Hedgehog és RTK/EGFR [37]. Az első Wnt gént emlősökben 1982-ben írták le [38]. Jelenleg 19 Wnt ligand és 15 receptor/co-receptor ismert. A Wnt molekulák ciszteinben gazdag, 350-400 aminosav hosszúságú szekretált glikoproteinek [39]. Két fő alútvonalát különíthetjük el, a kanonikus vagy béta-katenin függő és a non-kanonikus vagy béta-katenin független útvonalat. Mindkét útvonal erősen konzerválódott az evolúció során. Normális emberi fejlődés során kulcsszerepet játszik az embriogenezis korai szakaszában, meghatározza a sejtalakot és sejtsorsot. Továbbá fontos szerepet játszik bizonyos szövetek és szervek kialakulásában, valamint hozzájárul a

testforma meghatározásához [40, 41]. Az embriogenezist követően az útvonal kifejeződése jelentős mértékben lecsökken, de bizonyos fokig aktív marad a felnőtt emberi szervezetben, különösképpen az agyban [42]. Patológias körülmények között, mint például a neurodegeneratív és a tumoros betegségek esetében (beleértve a GBM-et is), ismét megemelkedik az aktivitása [20, 43, 44].

1.4.1. Kanonikus vagy béta-katenin függő útvonal

A Wnt kanonikus útvonalának főbb komponensei a Fzd (Frizzled) receptor és ko-receptora az LRP5/6 (low density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6), valamint a DVL-1 (dishevelled segment polarity protein 1), és az AXIN (axis inhibitor protein) fehérje. Az AXIN egy váz („scaffold”) protein, amelyhez számos egyéb molekula kapcsolódik, ezzel egy degradációs komplexet létrehozva. Ha Wnt ligand nem kapcsolódik a receptorához/ko-receptorához, akkor a béta-katenin proteozomális degradációra lesz kijelölve a CK1 (casein kinase 1) és a GSK-3 β (glycogen synthase kinase 3 β) mediált foszforiláció és a β -TrCP (β -transducin repeating protein) mediált ubikvitináció által. Ennek következtében a citoplazmában alacsony marad a béta-katenin koncentrációja, és nem képes elég mennyiségben transzlokálódni a sejtmagba, hogy a transzkripciós ko-represszort (Gorucho) eltávolítsa a LEF1 (lymphoid enhancer faktor 1) és a TCF4 (T-cell factor 4) TF-ről, vagyis gátlődik a Wnt jelátvitel által aktiválható célgének kifejeződése [45]. Ha a Wnt ligand kapcsolódik a receptorához, az LRP 5/6 ko-receptor citoplazmatikus része foszforilálódik, amelynek következtében az AXIN és a DVL-1 csatlakozik az Fzd intracelluláris részéhez. A DVL-1 foszforiláció hatására aktiválódik és gátolja a CK1 és a GSK-3 β kináz aktivitását, illetve a β -TrCP-t, melynek következtében a béta-katenin nem foszforilálódik és ubikvitinálódik, ezáltal nem bomlik le, és nő citoplazmatikus koncentrációja. Ha a béta-katenin szintje elér egy bizonyos koncentrációt, a sejtmagba transzlokálódik. A magban a béta-katenin egy transzkripciós komplexben vesz részt a LEF1 és a TCF4 együttműködésével. A kanonikus útvonal célgénjei közé tartozik a c-myc és Ciklin D1, amelyek szabályozzák a sejt proliferációját és differenciálódását [20, 45-47] (**1. Ábra**). Az útvonalra legjellemzőbb ligandok a Wnt1, Wnt3a és Wnt7b, valamint az Fzd1, Fzd4 és Fzd9 receptorok.



1. Ábra: A kanonikus, vagy béta-katenin függő útvonal legfontosabb molekuláris eleme [20].

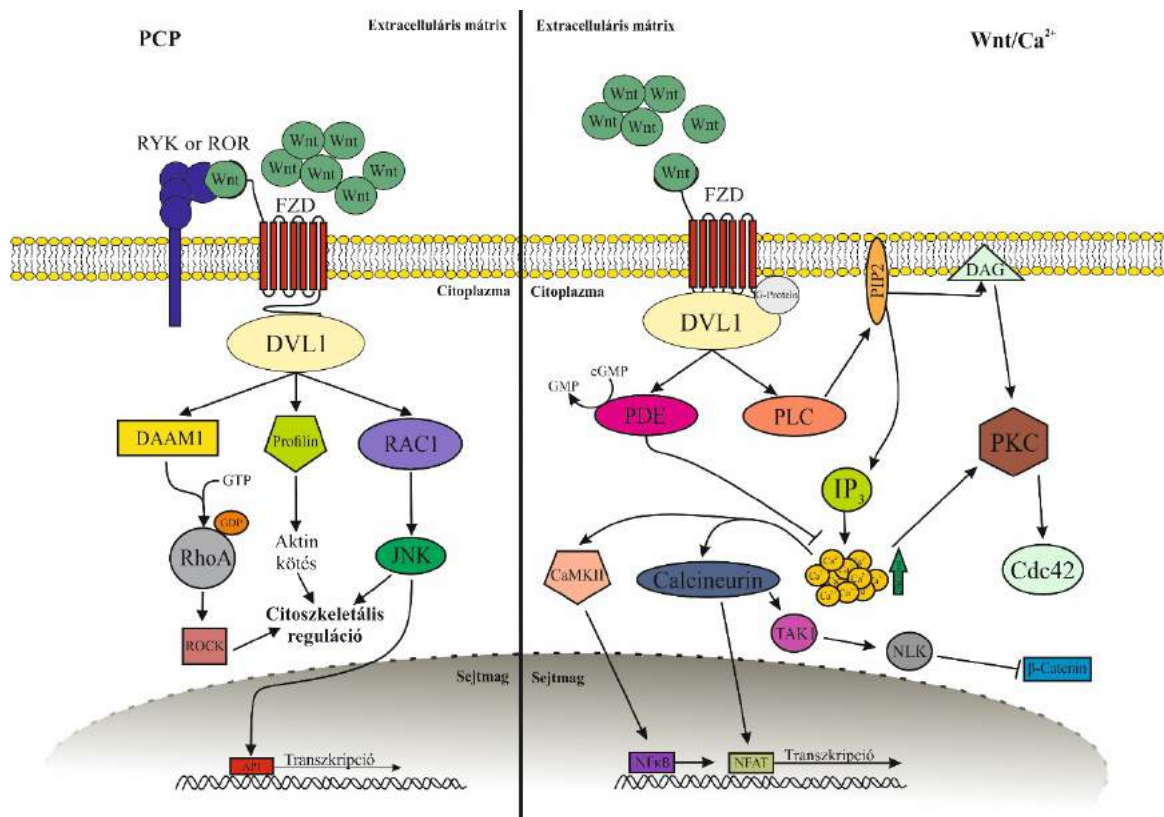
1.4.2. Non-kanonikus vagy béta-katenin független útvonal

1.4.2.1. Planar cell polarity/PCP útvonal

A Wnt protein kötődik az Fzd receptorhoz és a Ryk (receptor-like tyrosine kinase) vagy ROR (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor) ko-receptorokhoz, ezáltal a DVL-en keresztül aktiválja a DAAM1 (dishevelled-associated activator of morphogenesis 1), Profilin és a RAC1 (Rho- and Ras-related C3 botulinum toxinsubstrate 1) fehérjéket. A DAAM1 aktiválja a RhoA-t, amely a ROCK-on (Rho-associated kinase) keresztül szabályozza a citoszkeletális fehérjéket. A RAC1 aktiválja a JNK-t (c-Jun N-terminal kinase) és közvetlenül, vagy az AP-1 (activator protein-1) családon keresztül indirekt módon idéz elő citoszkeletális változásokat [20, 48]. A PCP útvonal a citoszkeletális axin fő szabályozó eleme és meghatározza a sejtek apikális, valamint bazolaterális polaritását [48]. Fontos szerepet játszik a sejtalk meghatározásban és a migrációban, valamint a sejtorganellek mozgásában [49]. (2. Ábra).

1.4.2.2. Wnt/Ca²⁺ útvonal

A Wnt ligand kapcsolódásakor a kaszkád a DVL-en keresztül aktiválja a cGMP specifikus PDE-t (phosphodiesterase) és PLC-t (Phospholipase C). Az aktív PLC növeli a citoplazmatikus Ca²⁺-ion koncentrációt, amelynek következtében aktiválódik két Ca²⁺ dependens fehérje, a CaMKII (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II) és a calcineurin, valamint két TF, az NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) és az NFκB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), amelyek fontosak a sejtülés szempontjából. Emellett a Cdc42 (cell division controll protein 42 homolog) is aktiválódhat a Ca²⁺ által, amely a sejtciklus szabályozásában vesz részt. Bizonyos Wnt ligandok esetében a calcineurin a TF-ok aktiválása mellett egy másik útvonalon gátolja a béta-katenint, ezzel szabályozva a kanonikus útvonalat [20, 49]. A Wnt/ Ca²⁺ útvonal a dorzális embrionális tengely kialakítását szabályozza, továbbá sejtors meghatározó, valamint gasztruláció és szövetképző folyamatokban is szerepet játszik. Az útvonalra legjellemzőbb ligandok a Wnt4, Wnt5a, és Wnt11, valamint az Fzd2, Fzd3, Fzd6 és Fzd10 receptorok (2. Ábra).



2. Ábra: A non-kanonikus, vagy béta-katenin független útvonal legfontosabb molekuláris elemei [20].

Az aberránsan működő és expresszálandó Wnt kanonikus és non-kanonikus útvonala egyaránt hozzájárul a GBM növekedéséhez, terjedéséhez és agresszivitásához. A két alútvonal között nincs éles dichotómia, egyes elemek átfedhetnek egymással a szignálkaszkádban, valamint egyes Wnt ligandok képesek egymás receptorához kötődni, jelátvitelét aktiválni vagy inaktíválni (pl. Wnt7) [50]. Fontos megemlíteni, hogy az útvonal aktiválása vagy gátlása nem csak ligand-receptor kapcsolódáson alapul, hanem egyéb szabályozó molekulák is befolyást gyakorolnak. Ilyen molekulák például a WIF1 (Wnt inhibitor factor 1), sFRP-k (soluble frizzled-related protein family) és a Cerberus, melyek megakadályozzák a szolubilis Wnt ligand kapcsolódását a receptorához. A DKK (Dickkopf) a Wnt receptorok egyik alegységéhez kötődik [51]. A WIF1 és az sFRP-k a kanonikus és a non-kanonikus Wnt/ Ca^{2+} útvonalat is, a DKK csak a béta-katenin útvonalat, míg a Cerberus mind a kanonikus, mind a non-kanonikus PCP és Wnt/ Ca^{2+} útvonalat is képes gátolni [52]. A GBM-ben gyakran ezek a negatív inhibitorok epigenetikai csendesítésen esnek át. A WIF1 egy erős tumor szupresszor fehérje és expressziója gyakran gátolva van mutáció vagy metiláció révén gliómákban [53]. Az sFRP1 és sFRP2 promotere hipermetilált a primer GBM-ek több mint 40%-ában [54], míg a DKK1 nagyjából 50%-ban hipermetilált promoterral rendelkezik a másodlagos GBM-ben [55]. Egyes adatok arra utalnak, hogy a béta-katenin függő útvonal hibás működése hozzájárul a GSC kialakulásához és fenntartásához [56], míg a béta-katenin független útvonal funkció zavara növeli a tumor invazív potenciálját [57]. Wnt/béta-katenin aktivitás szükséges a sejt de-differenciálódásához és CSC/GSC kialakításához [20, 58]. Immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatok azt mutatták, hogy a kanonikus és non-kanonikus útvonal a GBM marginális vagy úgynevezett inváziós zónájában a legaktívabb a tumor középpontjához és a normál agyszövethez képest. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a Wnt útvonal hozzájárul a tumorsejtek inváziójához, és elősegíti a tumor növekedését, progresszióját és a recidívák képződését [43, 59, 60]. Mindemellett számos egyéb fehérje hatással van az útvonal kifejeződésére, ezzel pedig a tumor biológiájára. Ilyen például a PLAGL-2 (pleomorphic adenoma gene-like 2) fehérje, melynek expressziós szintje hatással van az Fzd4 receptor kifejeződésére, részt vesz a GSC-k képzésében. A GSC-k növelik a tumor ellenállóságát a besugárzással szemben, illetve fokozzák a VEGF (vascular endothelial growth factor) expressziós szintjét, ezzel elősegítve az angiogenezist. A TCGA adatok alapján a Wnt3a (kanonikus útvonal ligand) és a Wnt5a (non-kanonikus ligand) fokozott expressziója figyelhető meg a GBM-ben, de a II-es és III-as grádusú gliómákban is [14, 61, 62], de a fokozott expresszió jellemző a Fzd2, Fzd6 és Fzd7 receptorokra is [57].

Összességében a legtöbb Wnt gén mRNS szintje szignifikánsan magasabb a GBM-ben a normál agyszövethez viszonyítva [63], valamint a béta-katenin expressziós szintje korrelál a glioma grádussal [64]. Kvantitatív real-time PCR (polymerase chain reaction) elemzések kimutatták, hogy Wnt5a túlműködés figyelhető meg a legagresszívebb és leginvazívabb GBM-ben, ezen belül is a mesenchymalis alcsoportban [21, 43, 60]. Mint fentebb jeleztem, a proneurális alcsoportban nagyon gyakori az IDH-1/IDH-2 mutációk előfordulása, azonban viszonylag kevés és ellentmondó adat van az IDH-1/2 státusz és a Wnt útvonal közötti kapcsolatról [43, 65-67]. Annak tükrében, hogy az IDH-1/2 gén mutációk jelentősen befolyásolják a DNS CpG metilációs mintázatok genomikai megoszlását, és a Wnt gének expressziója erős epigenomikai szabályozás alatt áll, az IDH-1/2 mutációs státusz és Wnt marker expresszió kapcsolatának vizsgálata egy különösen fontos, új iránynak látszik.

Összefoglalva elmondható, hogy mind a kanonikus, mind a non-kanonikus Wnt útvonal kiemelkedő szerepet játszik a GBM kialakulásában, fejlődésében, terjedésében és kiújulásában, illetve hogy számos jelátvivő útvonallal és molekulával áll szoros kapcsolatban. A Wnt szignálkaskád meghatározza a tumor biológiai folyamatait, valamint hozzájárul a kemo- és sugárterápia elleni rezisztencia kialakulásához. Működésének jobb megértése kulcs fontosságú lehet a GBM kezelésében, valamint egyes elemei esetleg potenciális terápiás célpontokként is szolgálhatnak. Ezért kutatásaim során a Wnt útvonal elemeinek a gliomákban történő kifejeződését, a GBM molekuláris alcsoportjai közötti különbségeit, és a DNS CpG metiláció, valamint a génexpresszió közötti összefüggéseit vizsgáltam.

2. Hipotézisek és célkitűzések

2.1. Hipotézisek

A Wnt kanonikus és non-kanonikus útvonala:

- Fontos szerepet játszik a gliomák kialakulásában grádustól, hisztológiai altípustól és molekuláris jellegzetességektől függően.
- Eltérően expresszálódik a GBM molekuláris alcsoportjaiban és progressziója során.
- Elemeinek differenciált expressziója összefüggésben áll a DNS CpG metilációs mintázataival a tumor progressziója során.

2.2. Célkitűzések

- A Wnt expressziós mintázatának összehasonlítása a gliomák grádusa, szövettani eredete és molekuláris markerei szerint kvantitatív IHC alkalmazásával.
- A Wnt útvonal kifejeződésének és mintázatának vizsgálata a GBM klasszikus, mesenchymalis és proneurális molekuláris alcsoportjaiban kvantitatív IHC alkalmazásával.
- Összefüggések elemzése a Wnt útvonal egyes elemeinek DNS CpG metilációs, valamint fehérje expressziós mintázatai között RRBS, NGS és kvantitatív IHC módszerek felhasználásával szekvenciális (primer és recidív) GBM mintákban.

3. Anyag és módszer

3.1. Etikai nyilatkozat

Az értekezés az 1964-es Helsinkai Nyilatkozat 2008-as szövege és 2014-es magyarországi törvénykezése szerint, a Markusovszky Egyetemi Oktatókórház (MEOK) helyi Etikai Bizottságának (EB) és a Pécsi Tudományegyetem (PTE) Regionális Tudományos Etikai Bizottságának (RKEB) a jóváhagyásával történt a MEOK Molekuláris Patológiai és a Szentágotthai János Kutatóközpont laborjaiban (Szombathely és Pécs, Magyarország). Etikai döntések dokumentációja: az MEOK EB 56/2012, 21/2014 és 28/2014 számú jóváhagyása, továbbá a 025782-003/2014/ számú dokumentuma, valamint az PTE RKEB 7517-2018 és 2019 jóváhagyása. A kutatáshoz felhasznált minták a betegek műtétje során szerzett, rutin patológiai vizsgálatokból visszamaradt FFPE blokkok. A minták nagyrészt retrospektíven nyerték, és csak egy kisebb részénél történt prospektíven a gyűjtés, amikor részletes felvilágosítás után a betegektől beleegyező nyilatkozatot kértünk. A tanulmány Prof. Dr. Kálmán Bernadette molekuláris GBM irányultságú kutatóprogramjának a része.

3.2. Beteganyag

3.2.1. Általános leírás

A II, III és IV grádusú GBM minták 1999 és 2018 között a szombathelyi MEOK Patológiai Osztályán, míg a szekvenciális GBM párok 1997 és 2017 között a PTE Általános Orvostudományi Kar (PTE ÁOK) Patológiai Intézetében kerültek összegyűjtésre. A II és III grádusú gliomák mintáit sugár- és/vagy kemoterápia előtti mintákból kaptuk. A IV grádusú GBM párok esetében a primer minták mindegyike sugár-és kemoterápiás kezelés előttről, míg a recidív minták kezelés utánról származtak. A gliomák diagnózisának és grádusának meghatározása klinikai, képalkotó, szövettani és molekuláris módszerek alapján történt [24]. A tanulmányunk előtti minőségellenőrzéshez és mintaválasztáshoz HE (hematoxylin-eosin) és a GFAP (glial fibrillary acidic protein) festést használtunk.

3.2.2. A Wnt markerek expressziós mintázatának vizsgálata a gliomák grádusa, eredete és molekuláris markerei szerint

Összesen 72 IV-es grádusú FFPE gliomát 69 betegtől, és 19 II-es és III-as grádusú FFPE gliomát 19 betegtől elemeztünk. Az esetek jelentős részében (67 beteg) 1 blokk állt rendelkezésre, míg kisebb részben (2 beteg) egynél több blokk állt rendelkezésre a multifokális (2 és 3 gócú) GBM tumorból (3. Táblázat).

Tumor típus	Grade II		Grade III			Grade IV
	Diffúz asztrocitoma	Oligodendro-glioma	Anaplasztikus asztrocitoma	Anaplasztikus oligodendro-glioma	Anaplasztikus oligoasztrocitoma	GBM
Betegszám	5	4	3	6	1	69
Nem (Nő)	3	2	1	5	-	40
Nem (Férfi)	2	2	2	1	1	29
Életkor a betegség megjelenésekor (Átlag)	46	52	49	56	56	64
Életkor a betegség megjelenésekor (Medián)	46	53	45	57	56	65
Életkor a betegség megjelenésekor (Megoszlás)	37-55	40-62	31-70	37-74	-	33-82

3. Táblázat: A glioma grádus, eredet és molekuláris markerek szerinti a tanulmányba tartozó betegeket demográfiai paraméterei.

3.2.3. A Wnt markerek expressziós mintázatának vizsgálata a GBM molekuláris alcsoportjaiban

Három kohorttal dolgoztunk. A kohort 1-ben 78 betegtől 62 retrospektíven, míg 19 prospektíven gyűjtött blokk volt. A vizsgálat lezárásakor 5 beteg még élt. Az esetek jelentős részében (76 beteg) 1 blokk állt rendelkezésre, míg kisebb részben (2 beteg) egynél több blokk állt rendelkezésre a multifokális (2 és 3 gócú) GBM tumorból. A molekuláris alcsoport meghatározás mellett, a klinikai korrelációkhoz a beteg életkorát, nemét és teljes túlélését (műtét és halál között eltelt idő hetekben) használtuk (4. Táblázat).

Nem	Betegszám	Életkor a betegség megjelenésekor (Átlag)	Életkor a betegség megjelenésekor (Medián)	Életkor a betegség megjelenésekor (Tartomány)
Nő	46	64	67	33-82
Férfi	32	63	62	40-78
Összes	78	64	65	33-82

4. Táblázat: A kohort 1 betegek demográfiai adatai.

A kohort 2 szekvenciális FFPE GBM mintákat tartalmazott. A primer blokkokat a betegek sugár-és kemoterápiája előtti, míg a recidív (második és harmadik minta) blokkokat a betegek sugár- és temozolomid alapú kemoterápiája utáni műtéti anyagából nyertük. A kohort eredetileg 9 betegről származó 21 blokkot tartalmazott, de a HE és a GFAP minőségellenőrzés után ez 8 beteg 19 mintájára csökkent a vizsgálatokhoz (**5. Táblázat**).

Nem	A primer tumor hisztológiai kódja	A recidív tumor hisztológiai kódja	A beteg kora a primer tumor diagnózisakor	A beteg kora a recidíva diagnózisakor	Eltel idő az első és második műtét között (hetekben)
Férfi	7255/03	11880/05	51	53	114
Nő	18769/04	1a_1567/06	49	50	57
		1b_1568/06		51	86
		12371/06			
Nő	8626/05	16804/05	56	56	21
Férfi	11396/05	12314/05	53	53	3
Férfi	11424/05	1350/06	51	52	27
Nő	13602/05	5700/06	64	65	31
Nő	5641/13	1465/18	45	50	249
Férfi	16945/15	1a_1500/17	66	67	70
		1b_1500/17			

5. Táblázat: A kohort 2 betegek demográfiai adatai.

A kohort 3 eredetileg 10 FFPE post mortem GBM+normál agyszövetet tartalmazó mintából állt 10 betegről. A szövettani minőség ellenőrzés után 8 beteg blokkjából készítettünk metszetet, ahol elkülönült a normál agyszövet, az inváziós zóna és tumor központi régiója (**6. Táblázat**).

Nem	Blokk kód	Halálkor a beteg életkora (években)
Nő	194/05	83
Férfi	157/03	25
Nő	197/09	40
Férfi	148/10	74
Nő	177/N	85
Nő	201/16	61
Férfi	40035/15	37
Nő	167/12	64

6. Táblázat: A kohort 3 betegek demográfiai adatai.

3.2.4. A Wnt markerek expressziós és DNS metilációs mintázatának vizsgálata a szekvenciális GBM mintapárokban

Két kohorttal dolgoztunk. Kohort 1 esetében 24 betegből származó 48 FFPE blokk állt a rendelkezésünkre (24 primer és 24 recidív tumor). Minőségi szelektálás során 3 beteget kivettünk, így 21 betegből 42 blokk került be a tanulmányba. A 21 betegből 7 nő és 14 férfi volt (**7. Táblázat**), 17 beteg részesült besugárzásban és temozolomid alapú kemoterápiában az első műtét után, míg 4 esetben nincs adat a beteg kezeléséről (**8. Táblázat**).

Primer tumor						
Nem	Betegszám	Életkor a primer tumor megjelenésekor (Átlag)	Szórás (\pm SD)	Életkor a primer tumor megjelenésekor (Medián)	Kvartilis 1-Kvartilis 3 (Q1-Q3)	Életkor a primer tumor megjelenésekor (Megoszlás)
Nő	7	55	6	56	52-59	45-63
Férfi	14	50	10	47	42-60	32-66
Összes	21	52	10	52	43-61	32-66
Recidíva						
Nem	Betegszám	Életkor a primer tumor megjelenésekor (Átlag)	Szórás (\pm SD)	Életkor a primer tumor megjelenésekor (Medián)	Kvartilis 1-Kvartilis 3 (Q1-Q3)	Életkor a primer tumor megjelenésekor (Megoszlás)
Nő	7	57	5	58	53-61	48-64
Férfi	14	51	10	48	43-61	36-68
Összes	21	53	9	53	45-61	36-68

7. Táblázat: A kohort 1 betegek összesített demográfiai adatai.

Primer tumor	Recidíva	Nem	Életkor a primer tumor megjelenésekor (Évek)	Életkor a recidíva megjelenésekor (Évek)	Halálkor a beteg életkora (Évek)	Az első és második műtét között eltelt idő (Hetek)	Teljes túlélés (Hetek)	Kezelés
15043/1999	9849/2000	Férfi	50	50	50	31	41	Nincs információ
9501/2001	3624/2002	Férfi	52	53	53	33	59	Nincs információ
15916/2003	9527/2004	Nő	63	64	64	30	43	Műtét + besugárzás
9886/2004	15289/2004	Férfi	41	42	43	17	70	Nincs információ
3094/2006	15302/2006	Férfi	59	60	60	35	65	Műtét + besugárzás + TMZ
5526/2007	13808/2008/1	Nő	50	52	52	77	88	Műtét + besugárzás + TMZ
13501/2007/C1	9614/2008/1	Férfi	39	39	-	40	-	Műtét + besugárzás + TMZ
12732/2008	17440/2010/1	Férfi	41	43	43	117	149	Primer tumor: Műtét + besugárzás + TMZ; Recidíva: Bevacizumab + radio
17578/2008	7779/2010/B	Férfi	63	65	-	77	-	Nincs információ
15466/09	16534/10	Férfi	66	68	-	56	-	Műtét + besugárzás + TMZ
10379/2010A	7536/2014	Nő	56	60	61	199	287	AVAGLIO klinikai tanulmány (STUPP + Bevacizumab/placebo)
14561/2010/1	2315/2012/A	Férfi	45	46	-	70	-	AVAGLIO klinikai tanulmány (STUPP + Bevacizumab/placebo)
2525/2011/B	1365/2013/1	Férfi	32	36	36	177	203	Műtét+TMZ és Bevacizumab, besugárzás, BCNU
14642/2011/1	7990/2014/1	Férfi	43	45	46	135	192	Műtét + besugárzás + TMZ
5693/2012/1	612/2015/1	Nő	45	48	48	143	169	Műtét + besugárzás + TMZ
7183/2012/1	11956/2012	Nő	57	58	59	51	95	Műtét + besugárzás + TMZ
6795/2013/1	17545/2013	Nő	61	62	62	31	54	Műtét + besugárzás + TMZ
16189/2014	16742/2015	Nő	53	54	55	55	69	Műtét + besugárzás + TMZ
3997/2016	5120/2017	Férfi	62	63	63	58	62	Műtét + besugárzás + TMZ
10776/2016	2168/2017	Férfi	43	43	44	29	46	Műtét + besugárzás + TMZ
13956/16/1	12107/17/1	Férfi	60	61	62	49	60	Műtét + besugárzás + TMZ

8. Táblázat: *A kohort 1 betegek egyéni demográfiai és klinikai adatai.*

Metilációs adataink validációjához a kohort 2-ben egy nyilvános adatbázisban elérhető 112 szekvenciális GBM mintapár RRBS adatait használtuk (<https://www.ebi.ac.uk/ena>, hozzáférési szám: EGAS00001002538) [35]. Kontrollként az IHC tanulmány során 6 FFPE post mortem agyi mintát vizsgáltunk, mivel műtétilag eltávolított normál agyszövet nem állt rendelkezésünkre, míg a DNS CpG metilációs elemzéseinkhez 5 epilepszia műtéti minta RRBS adatait használtunk az European Nucleotide Archive adatbázisból [35].

3.3. Immunhisztokémia

Az elsődleges antitesteket egy pilot IHC tanulmány keretében állítottuk be. Ezek eredményei alapján pontosan meg tudtuk határozni az optimális feltárást és hígítást illetve, az adott antitest kötődésének specificitását (9. Táblázat).

A grádus szerinti glioma és a GBM molekuláris alcsoport vizsgálatok során használt antitestek						
Gyártó	Származási hely	Katalógus szám	Elsődleges Antitest	Klonalitás	Immunogén szekvencia	Hígítás
Dako	Egyesült Államok, Santa Clara	M7239	EGFR	Monoklonális (egér)	Tisztított, denaturált epidermális növekedés faktor receptor	1:35
Bioss	Egyesült Államok, Massachusetts	bs-2558R	EGFRvIII	Poliklonális (nyúl)	Humán EGFRvIII aminosav szekvenciából származtatott KLH konjugált szintetikus peptid	1:200
Abcam	Egyesült Királyság, Cambridge	ab30325	NF-1	Poliklonális (nyúl)	Szintetikus peptid, aminosav szekvencia: QQNTHTKVSTEHNKE	1:300
Dianova	Németország, Hamburg	DIA-H09	IDH-1 R132H	Monoklonális (egér)	Szintetikus peptid, aminosav szekvencia: CKPIIGHHAYGD	1:40
Biorbyt	Egyesült Királyság, Cambridge	orb69157	Wnt5a	Monoklonális (egér)	E. Coli-ban expresszált, tisztított rekombináns Wnt5a fragmens	1:200
Abcam	Egyesült Királyság, Cambridge	ab81614	Wnt3a	Monoklonális (egér)	Teljes hosszúságú rekombináns Wnt3a (aa19-352)	1:200
Abcam	Egyesült Királyság, Cambridge	ab6302	béta-katenin	Poliklonális (nyúl)	Szintetikus peptid, aminosav szekvencia: PGDSNQLAWFDTDL	1:500
Everest Biotech	Egyesült Királyság, Oxfordshire	EB08353	Fzd2	Monoklonális (kecske)	Peptid szekvencia: RYATLEHPFHCP, a protein szekvencia középső részéből	1:250
Abcam	Egyesült Királyság, Cambridge	ab6741	anti-kecske	Poliklonális (nyúl)	Kecske IgG teljes molekula	1:200
Dako	Egyesült Államok, Santa Clara	M7001	p53	Monoklonális (egér)	Rekombináns humán vad típusú p53 protein.	1:40
Sigma-Aldrich	Egyesült Államok, Missouri	HPA001906	ATRX	Poliklonális (nyúl)	Rekombináns ATRX protein	1:500
Dako	Egyesült Államok, Santa Clara	M0761	GFAP	Monoklonális (egér)	Agyi GFAP	1:100
A szekvenciális Wnt - GBM tanulmány során használt antitestek						
Gyártó	Származási hely	Katalógus szám	Elsődleges Antitest	Klonalitás	Immunogén szekvencia	Hígítás
Abcam	Egyesült Királyság, Cambridge	ab224803	béta-katenin	Monoklonális (nyúl)	Humán béta-katenin-ra reagáló szintetikus peptid	1:500
Abcam	Egyesült Királyság, Cambridge	ab219412	Wnt3a	Monoklonális (nyúl)	Humán Wnt3a-ban található szintetikus peptid szekvencia 250-350	1:300
Biorbyt	Egyesült Királyság, Cambridge	orb69157	Wnt5a	Monoklonális (egér)	E. Coli-ban expresszált, tisztított rekombináns Wnt5a fragmens	1:2000
Biorbyt	Egyesült Királyság, Cambridge	orb100745	Fzd2	Poliklonális (nyúl)	Humán Frizzled 2 71-150 aminosav szekvenciából származtatott KLH konjugált szintetikus peptid	1:500
Biorbyt	Egyesült Királyság, Cambridge	orb100915	Wnt7b	Poliklonális (nyúl)	WNT7B 71-150 251-290 aminosavból származtatott KLH konjugált szintetikus peptid	1:200
Sigma-Aldrich	Egyesült Államok, Missouri	HPA014485	Fzd10	Poliklonális (nyúl)	Rekombináns protein epitóp antigén szekvencia: KTLQSWQVCSRRLLKKSRRKPA SVITSGGIYKKAQHPQKTHHGKY EIPAQSPTCV	1:100

9. Táblázat: A tanulmány során használt antitestek klonalitása és hígítása.

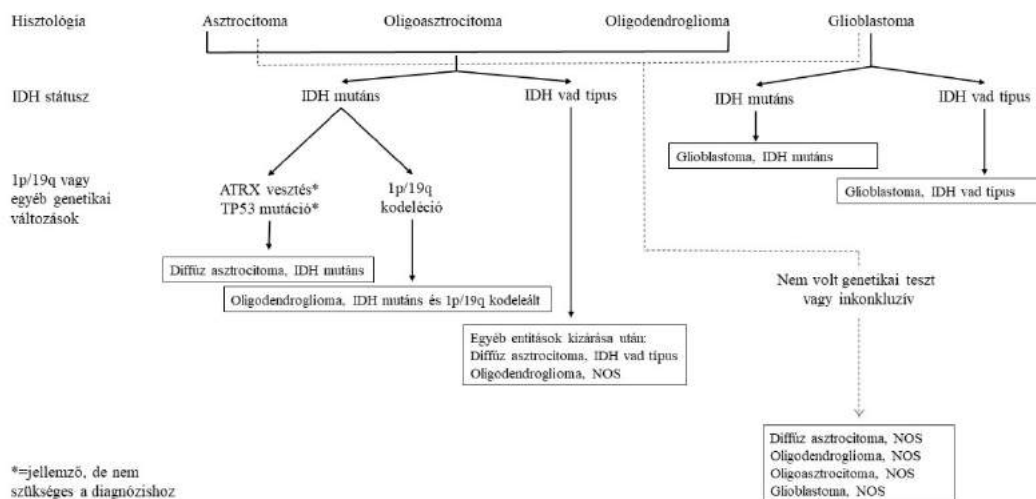
A pilot kísérlet során a specificitás ellenőrzésére olyan különböző szövettani eredetű tumorokban határoztuk meg primer antitestjeink kötődését, melyekről ismert a vizsgált antigének expressziója az irodalomban (pozitív kontroll), összevetve olyan normál szövetekkel, ahol ezek a molekulák ismertén nem expresszálódnak (negatív kontroll). Negatív technikai kontrollként, csak a Novolink másodlagos antitestet és kémiai reakciót alkalmaztuk a primer antitest elhagyásával minden kísérlet során. A primer antitestek GBM szövetben történő kötődésének és expressziójának a validálására olyan mintákat használtunk, amelyek nem szerepeltek a fő tanulmányban. Mind a pilot kísérletekben, mind a fő tanulmányban manuális mikrotómmal és Microtome Blade A35 (Feather®, Osaka, Japán) pengékkel 3-5 µm vastagságú metszeteket készítettünk az FFPE blokkokból, melyeket Superfrost Ultra Plus J3800AMNZ (Thermo Scientific®, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok) tárgylemezekre vittünk fel és hagytuk megszáradni egy napon keresztül.

Az IHC teszt első lépéseként a szövetmintákat a tárgylemezen PAP PEN-nel (Biotium Inc. Fremont, Egyesült Államok és San Francisco, Egyesült Államok) körberajzoltuk, amivel egy hidrofób gyűrűt képeztünk, ezáltal megakadályoztuk, hogy a hígított antitest lefolyjon a szövetről. Az antitesteket Tween20-tól mentes TBS (tris-buffered-saline) pufferrel hígítottuk a pilot kísérletben beállított koncentrációra. A szövetminták feltárását 95°C-os 0.01M citrát-pufferbe merítve mikrohullámú sütőben, vagy proteináz K kezeléssel végeztük. A mosási lépéseket Tween-20 detergenst tartalmazó TBS pufferrel végeztük. A primer antitesteket 100 µl térfogatban vittük fel a tárgylemezekre. Az elsődleges antitestek kötődésének a detektálását a Novolink Polymer Detection Systems RE-7140-K és RE-7150-K kit (Leica Biosystems, Newcastle, Egyesült Királyság) segítségével végeztük. Egér primer antitest esetén a kit másodlagos antitestjét is alkalmaztuk (anti-egér nyúl univerzális antitest), nyúl eredetű primer antitest esetén erre nem volt szükség. A másodlagos antitesthez a kit-ben található polymert kötöttük és a specifikusan kötődött antitesteket DAB-bal (diamino-benzidin) hívtuk elő tormaperoxidáz reakció révén. A kész, festett mintákra pertexet (Mitsui&Co. Ltd. Osaka, Japán) vittünk fel, amit Menzel-Gläser (Thermo Scientific®, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok) tárgylemezfedővel fedtünk le és hagytunk megszáradni.

Mindegyik metszet esetében a HE és GFAP festett lemezek alapján egy patológus szakorvos meghatározta a „region of interest”-et (ROI), ahol a tumor a legmalignusabbnak látszott. A ROI-n belül magas cellularitás, intenzív mitotikus aktivitás és polimorf sejtmag

megjelenés volt megfigyelhető, de nem, vagy csak minimális volt a nekrozis és a vaszkularitás mértéke. A ROI területén belül kijelöltünk három látóteret, ahol körül-belül 100-100 sejtet olvastunk le. Meghatároztuk a festődött sejtek számát százalékos formában és a festődés intenzitását 0, +, ++ és +++ (numerikus skálán: 0, 1, 2 és 3) jelöléssel. Ezekből az értékekből egy „Complex Score”-t (CS) számoltunk úgy, hogy megszoroztuk a festődött sejtek százalékos értékét az intenzitás mértékével. Az IHC festés eredményeit három független leolvasó is kiértékelte, 20 illetve 40-szeres nagyítású objektív lencsék alkalmazásával, mely képek a digitalizálás nagyításával együtt 200x és 400x nagyítású ábrákat eredményeztek. A glioma grádus szerinti és a GBM molekuláris alcsoport szerinti tanulmánya során egy Olympus BX51 (Olympus Corp. Japan), míg az epigenomikai tanulmány szekvenciális mintapárjainak Wnt tanulmánya során egy Nikon Optiphot-2 (Nikon Corp. Japan) mikroszkópot használtunk. A manuális kiértékelés mellett digitalizált leolvasást is végeztünk a szekvenciális minták esetében. A digitalizálás a PTE ÁOK Patológiai Osztályán található MIDI II Scanner-rel végeztük. A digitalizált lemezeket a 3DHisTech Panoramic Viewer 1.15 programmal, valamint a bővítményként hozzáadható QuantCenter modullal (3D HisTech Kft. Budapest, Magyarország) értékeltük ki.

A II-es és III-as grádusú gliomák oligodendroglialis és asztroglialis eredetének elkülönítésére az agydaganatokra vonatkozó WHO 2016-os útmutatóját követő hisztológiai és molekuláris vizsgálatokat végeztünk [24] (**3. Ábra**). Az asztroglialis tumorok IHC meghatározásához p53-at és ATRX-et (alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked) specifikus antitesteket használtunk. Az oligodendroglia jellemező 1p19q kodeléciót FISH (fluorescent *in situ* hybridization) módszerrel teszteltük a Vysis 1p36/1q25 és 19q13/19p13 próbák alkalmazásával, a gyártó kézikönyvének utasításait követve (Abbott Laboratories, Abbott Park, Egyesült Államok). A GBM molekuláris alcsoportjait az IDH-1 R132H, EGFR/EGFRvIII, és az NF-1 IHC markerekkel határoztuk meg a TCGA eredmények [21] és saját csoportunk korábbi munkái nyomán [23]. Az IDH-1 R132H és az EGFRvIII esetében a mutáns molekula jelenlétét vagy hiányát regisztráltuk, míg az EGFR és NF-1 esetében CS qIHC értéket számoltunk.



3. Ábra: A diffúz gliomák szövettani és molekuláris felosztásának jelen gyakorlata az agydaganatok osztályozásának 2016-os WHO revíziója alapján (eredeti ábra magyar verziója a publikációból [24]).

Az anti-p53 és az anti-ATR-X antitest sejtmagi festődést mutat, ezért elsősorban a magban vártuk a jelet (vagy annak elvesztését), míg az anti-GFAP festés citoplazmatikus festést mutat az asztroglialis eredetű gliomákban.

A mutáció specifikus anti-IDH-1 R132H antitest festődési mintázatára citoplazmatikus festődés jellemző. Előzetesen piroszekvenálással megállapítottuk, hogy az IHC-ban „+” festődésű minták mutáció negatívnak, míg a „++” és „+++” festődésű minták mutánsnak tekinthetők.

Az anti-NF-1 festődését citoplazmatikus és sejtmagi kompartmentekben is vizsgáltuk. Fiziológias körülmények között a protein csak a citoplazmában expresszálódik. Malignus malformációk esetében azonban a tumor szuppresszor protein teljes vagy részleges sejtmagi transzlokációja és deléciója is tapasztalható, így négyféle mintázat leolvasása történt GBM-ben: csak citoplazmatikus (c+/m-), csak sejtmagi (c-/m+), kettős negatív (c-/m-), kettős pozitív (c+/m+).

Az anti-EGFR antitest festődés elsősorban sejtmembránban várható. A protein azonban gyakran jelen van citoplazmatikusan is az éppen kifejeződés alatt álló EGFR molekulák endoplazmatikus retikulumhoz vagy más intracitoplazmatikus membránokhoz kötődése miatt.

Az általunk használt anti-EGFRvIII antitest csak az EGFRvIII-as variánst ismeri fel, normál EGFR molekulákhoz nem kötődik. Az EGFRvIII festődésre is igaz, hogy nemcsak

membrán, hanem citoplazmatikus vagy perinukleáris jelet is adhat. Akárcsak az IDH-1 R132H festődése estén, itt is csak a ++ és +++ festődési intenzitású lemezeket tekintettük pozitívnak.

A kanonikus útvonal vizsgálatára a Wnt3a, Fzd10 és béta-katenin, míg non-kanonikusra a Wnt5a, Wnt7b és az Fzd2 marker fehérjéket használtuk fel. A grádus szerinti glioma és a GBM molekuláris alcsoport vizsgálat során használt Fzd2 antitest kecske eredetű volt, ezért, hogy kompatibilis legyen a Novolink Polymer Detection Systems rendszerünkkel, intermedier antitestként egy nyúl eredetű anti-kecske antitestet használtunk.

Az anti-Wnt3a, anti-Wnt5a és az anti-Wnt7b antitest festődési mintázat részben a citoplazmában (a ligand internalizációja miatt) és részben az extracelluláris mátrixban figyelhető meg. A béta-katenin fiziológias körülmények között csak a citoplazmában expresszálódik, azonban tumoros sejtekben megjelenhet a sejtmagban is. Végül az anti-Fzd2 és anti-Fzd10 által megfestett receptor elsősorban a sejtmembránban található, de az internalizáció következtében megjelenhet a citoplazmában is (**9. Táblázat**).

3.4. DNS izolálás

Az FFPE blokkokból 4-5 darab 5 µm vastagságú metszetet készítettünk, amelyeket Eppendorf csőbe helyeztünk. Ezt követően a QiaGen® Deparaffinization Solution for FFPE samples kit (Qiagen®, Hilden, Németország) segítségével a mintákat deparaffinizáltuk. A QiaGen® QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen®, Hilden, Németország) felhasználásával DNS-t tisztítottunk. A DNS koncentrációját, a tumor grádus szerinti glioma és a GBM molekuláris alcsoport tanulmány során egy Thermo Scientific® NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok) készülékkel mértük meg a hozzá tartozó NanoDrop 2000/2000c szoftvercsomag segítségével. Az epigenomikai tanulmány szekvenciális mintapárjainak DNS mennyiségi meghatározásához a Qubit™ 1X dsDNA CS Assay Kit-et használtuk, Qubit 3 Fluorimeteren (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Az epigenomikai tanulmányhoz szükséges DNS fragmentanalízist az Agilent Genomic DNA ScreenTape Assay kit-tel egy Agilent 4200 TapeStation System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) készüléken végeztük.

3.5. Piroszekvenálás

Az anti-IDH-1 R132H antitest működését és a mutáció jelenlétét piroszekvenálással erősítettük meg. Az előzőekben ismertetett eljárással a blokkokból DNS-t izoláltunk. A DNS anyagokat PCR eljárással amplifikáltuk egy BOECO Thermal Cycler SQ BOE8085240 (Boeco GmbH, Hamburg, Németország) készüléken. Az IDH-1 PCR és szekvenáló primereket egy korábbi publikáció alapján szintetizáltattuk a BioScience Kft közvetítésével. A reverz PCR primer biotin konjugált volt [68]. A PCR primerek végkoncentrációját 25 pmol/μl-re állítottuk be, szekvenáló tisztaságú desztillált vízzel (Invitrogen® Paisley, Egyesült Királyság).

A PCR primerek szekvenciája:

IDH-1 forward primer: 5'-CACCATACGAAATATTCTGG-3'

IDH-1 reverse primer: 5'-BIOTIN-CAACATGACTTACTTGATCC-3'.

A PCR ciklusok az alábbiak szerint kerültek beállításra: I. ciklus: 95°C 10 percig; 2-39 ciklus: 95°C 3 másodpercig, 50°C 30 másodpercig, 72°C 30 másodpercig; 40 ciklus: 72°C 10 percig, majd tárolás 4°C-on.

A szekvenáló primer szekvenciája: 5'-GTGAGTGGATGGATGGGTAAAACC-3' [68].

A biotinilált PCR amplikont egy avidin-biotin alapú (Streptavidin) immobilizálással tisztítottuk meg. A biotin-avidin kapcsolódás által a felsokszorozott, szekvenálandó DNS szegmentumokat egy vákuum állomás segítségével emeltük ki. Ezt követően a DNS terméket annealing pufferbe mostuk, mely tartalmazta a szekvenáló primert is. A piroszekvenálás során a fent jelzett publikált szekvenáló primert használtuk a PyroMark Q24 (Qiagen®, Hilden, Németország) készüléken, melynek a szoftvere képes többféle szekvencia változatot is azonosítani, ez esetben az IDH-1 R132H/C mutációk vagy a vad típusú szekvencia jelenlétét.

3.6. Epigenomika

Az izolált DNS-ekből biszulfít konvertált könyvtárakat készítettünk a gyártó által javasolt protokollt követve az RRBS kit 24x (Diagenode SA, Seraing, Belgium) felhasználásával. Az FFPE szövetminták DNS-e a postmortem biológiai folyamatok, de főként a formalin kezelés következtében különböző mértékben fragmentálódik. A könyvtárkészítéshez általánosságban 200 ng DNS input ajánlott, ha a 2000bp feletti fragmentek százalékos aránya magas az adott mintában. Azon mintáink esetében, amikor a 2000bp feletti DNS

fragmentek százalékos aránya csak 20-35% között mozgott, a DNS bevitelt 350 ng-ra, míg 10-20% között 400 ng-ra emeltük.

Az RRBS könyvtárkészítés három napot vett igénybe:

Első nap: Egy CCGG felismerőhellyel rendelkező MspI restrikciós endonukleázzal minimum 300 ng DNS-t emésztettük meg egy „enzymatic digestion mix” felhasználásával, amely egy CCGG felismerőhellyel rendelkező MspI restrikciós endonukleázt tartalmazott egy GeneAmp PCR Systems 9700 (Applied Biosystems, Foster City, Egyesült Államok) készüléken, melyet a következő ciklusra állítottunk be: 37°C 12 órán keresztül → 8°C-on tárolással. Az emésztés következtében minden DNS fragmentum CpG dinukleotidokkal végződött.

Második nap: A fargmentumok végét az „ends preparation mix” segítségével kezeltük a következő thermocycler ciklus alkalmazásával: 30°C 20 perc → 37°C 20 perc → 75°C 20 perc → tárolás 8°C-on. Ezt követően a DNS fragmentek adapterekkel történő ligálását végeztük a „ligation mix” alkalmazásával a következő thermocycler ciklust használva: 25°C 20 perc → 65°C 10 perc → tárolás 8°C-on. A CpG gazdag méret szelekció, mágneses tartón, AMPure XP Bead-ekkel (Beckman Coulter, Washington D.C., Egyesült Államok) történt. A fragmentek minőségét a Kapa Sybr Fast qPCR kit-et (Kapabiosystems, Cape Town, South Africa) alkalmazva meghatároztuk a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) készüléken a következő protokoll szerint: első denaturáció 98°C 3 perc (1x), majd denaturáció: 95°C 15 másodperc → kapcsolódás: 60°C 30 másodperc → lánchosszabítás: 72°C 30 másodperc (25x) → tárolás 4°C-on. A könyvtárak minősége az egyes mintáink fragment megoszlásán alapult. Azon 8-8 könyvtárat, melyeknek hasonló kvantitativ (q)PCR CT (threshold cycle) értéke volt, egy-egy pool-ba tettük. Egy-egy kísérlet során 2-3 pool-lal dolgoztunk. A pool-ok biszulfít konverziója során a metilálatlan citozin uracillá deaminálódott, míg a metilált citozinok esetében nem történik változás, mivel a metilcsoport megvédi a citozint a kémiai konverziótól. A konverziót a GeneAmp készüléken végeztük: denaturáció: 95°C 1 perc → konverzió 60°C 10 perc (20x) → tárolás 4°C-on.

Harmadik nap: A konvertált könyvtárak egy második qPCR reakción estek át. A protokoll a következő volt: első denaturáció 98°C 3 perc (1x), majd denaturáció: 95°C 15 másodperc → kapcsolódás: 60°C 30 másodperc → lánchosszabítás: 72°C 30 másodperc (30x) → tárolás 4°C-on. A qPCR lépéssel meghatároztuk a végső PCR reakció

amplifikációs ciklusának a számát. Ezt követően elvégeztük a végső PCR-t, aminek a lényege a konvertált DNS fragmentek felsokszorozása volt: első denaturáció 95°C 5 perc (1x), majd denaturáció: 98°C 20 másodperc → kapcsolódás: 60°C 15 másodperc → lánchosszabítás: 72°C 45 másodperc (CT érték a második qPCR-ből mínusz egy) → végső lánchosszabítás: 72°C 7 perc (1x) → tárolás 4°C-on. Ezt egy tisztítási folyamat követte, amelyet az AMPure XP Bead-ekkel végeztünk mágneses tartón. Végül a könyvtár DNS-ek fragmentumainak minőségét a 4200 TapeStation System és High Sensitivity D5000 ScreenTape rendszerrel, míg a koncentrációját a Qubit 3 Fluorometer alkalmazásával ellenőriztük. Ezt követően az amplifikált könyvtárakat megszekvenáltuk a NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 ciklus) és a NextSeq 550 (Illumina, San Diego, CA, USA) szekvenáló készülék alkalmazásával. A nyers szekvenálási adatokat az European Nucleotide Archive-ba töltöttük fel (<https://www.ebi.ac.uk/ena>, Primary Accession: PRJEB38380, Secondary Accession: ERP121800).

3.7. Bioinformatika

A bioinformatikai elemzéseket, bioinformatikus kollégák segítségével végeztük. A NextSeq 550 szekvenálókészülék által adott nyers adatok minőségét FastQC programmal ellenőriztük. Az alacsony minőségű szekvenciákat és az adaptereket a TrimGalore programmal kiszűrtük. Az RRBS szekvenciákat a hg19 (GRCh37) referencia genommal vetettük össze. A Bismark programot használva értékeltük ki a biszulfid konvertált read-eket és a lehetséges metilációs pontokat. Az RnBeads programmal kohort szinten elkülönítettük a differenciáltan metilált CpG helyeket, gén régiókat, a GO analízissel az útvonalakat, összehasonlítva a primer és recidív GBM mintapárokat egymással és a kontrollal. Ezután a metiláció szintjét és megoszlását a GO elemzés szerint kohort szinten differenciáltan metilált Wnt útvonal markereinek promoter+gén régiójában megvizsgáltuk egyéni mintákban egy bioinformatikus kolléga által, a tanulmányhoz írt script segítségével, mely a BioMethyl R csomagon alapul:

A parancssor részletes leírása (<https://github.com/galikbence/MethylPatternViz>):

```
“Rscript methylation_patterns.R --chr ? --start ? --end ? --gene TEST -- all_samples T --paired F”.
```

Az így kialakított formulába illesztettük be az általunk elemezni kívánt Wnt markerek genomon belüli kezdő és végpontjának a helyét:

Wnt5a: 3-as kromoszóma --starthely 55499743 --végpont 55525473

Wnt3a: 1-es kromoszóma -- starthely 228193252 -- végpont 228248961

Fzd2: 17-es kromoszóma -- starthely 42633425 -- végpont 42636907

Béta-katenin: 3-as kromoszóma -- starthely 41234828 -- végpont 41301587

Wnt7b: 22-es kromoszóma -- starthely 46316242 -- végpont 46374509

Fzd10: 12-es kromoszóma -- starthely 130645504 -- végpont 130650285

Ezt követően az program referencia genomhoz viszonyítva mind a primer, mind a recidív egyedi mintákban megadta a régió metilációs mennyiségét és megoszlását százalékos formában. Az adott egyedi metilációt a program úgy számolta ki, hogy meghatározta a metilációs helyeket a megadott régióon belül az összes mintában. Majd ezeknek a helyeknek egyedi szinten meghatározta a számszerű metiláltságát és annak relatív fokát 0 és 100% között, végül a metilációs helyek számát elosztotta az összes lehetséges metilációs hely számával és megszorozta 100-zal.

$$\left(\frac{\text{Metilációs helyek}}{\text{Összes lehetséges metilációs hely}} \right) \times 100$$

Kiegészítésként megvizsgáltuk a script felhasználásával a hat Wnt marker génregulációjában szerepet játszó enhancerek metilációs mintázatát a saját és az adatbázisból nyert szekvenciális GBM mintákban. A GeneCards adatbázisból nyertük ki a vizsgálandó enhancer régiókat és pozíciójukat a génhez képest (<https://www.genecards.org/Search/Keyword?queryString=Wnt>).

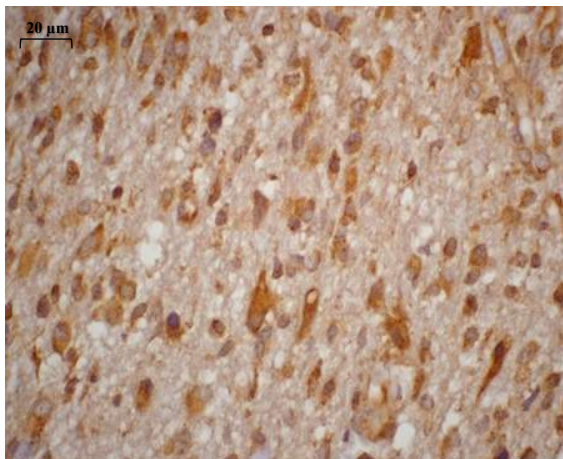
3.8. Statisztika

A Wnt markerek IHC értékeléséből adódó CS értékek medián és interkvartilis tartományát határoztuk meg és hasonlítottuk össze a különböző statisztikai próbák során. Az adataink minden esetben nem parametrikus eloszlást követtek. Két független minta összehasonlítása esetén Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk, míg egymástól függő mintapárok esetén Wilcoxon signed rank tesztet. Több minta egyidejű összehasonlításakor Kruskal-Wallis próbát futtatunk le. A Wnt és az al csoport meghatározó markerek, valamint a teljes túlélés közötti kapcsolatot Kendall's τ korreláció analízissel vizsgáltuk. A teljes túlélést a GBM különböző alcsoportjaiban Kaplan-Meier vizsgálattal, még az alcsoportok és a nem közötti összefüggést Pearson Khi négyzet próbával elemeztük. Minden statisztikai próbát az SPSS v.23.0 csomagú szoftvert felhasználásával viteleztünk ki (SAGE, IBM® SPSS® Statistics v23.0).

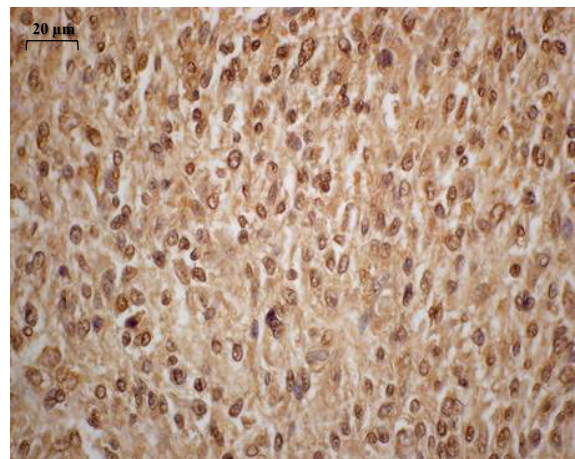
4. Eredmények

4.1. A Wnt markerek expressziós mintázatának a vizsgálata a gliomák grádusa, eredete és molekuláris markerei szerint

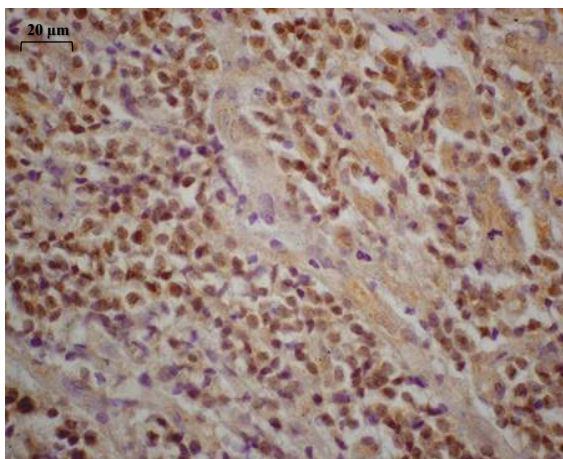
A Wnt kanonikus alútvonal vizsgálatára a Wnt3a ligandot és a béta-katenin jelátvivő fehérjét, míg a non-kanonikus alútvonal vizsgálatára a Wnt5a ligandot és az Fzd2 receptort választottuk ki. Ezen markerek expresszióját grádus, szövettani eredet és molekuláris jellemzők szerint vizsgáltuk a különböző glioma alcsoportokban (4. **Ábra**).



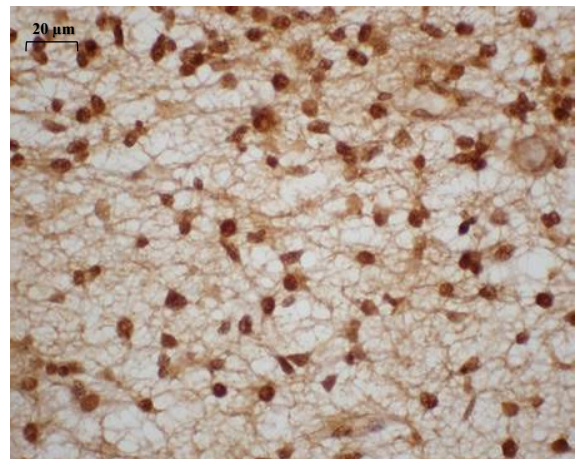
Wnt5a



Fzd2



Wnt3a

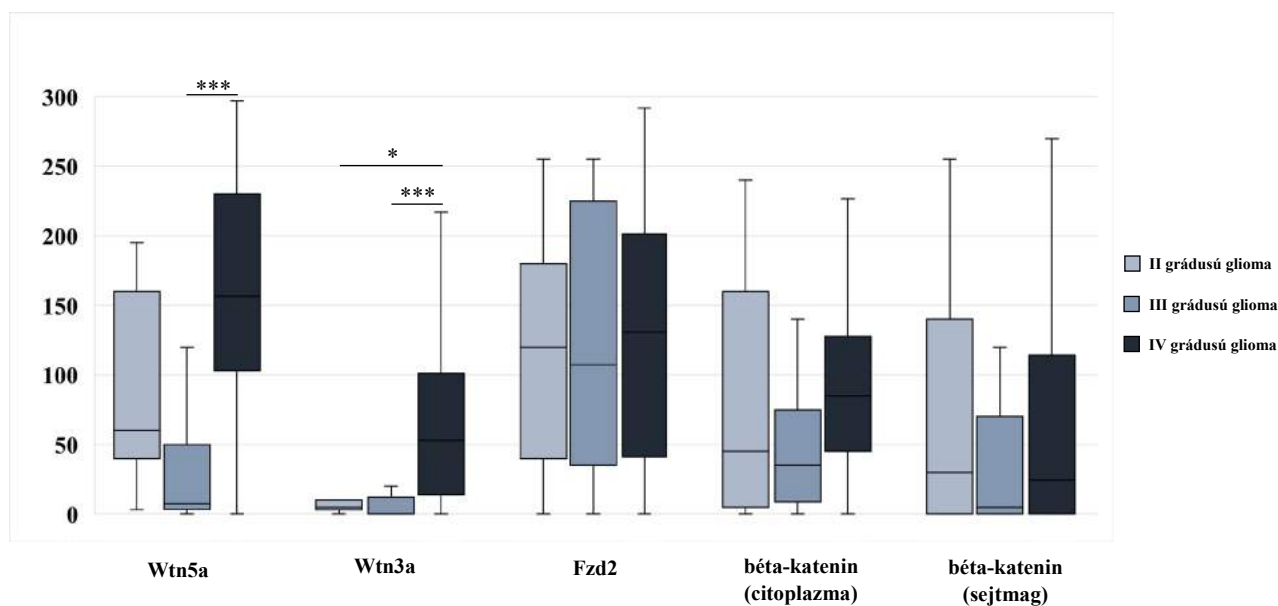


béta-katenin

4. Ábra: Reprezentatív IHC képek a Wnt markerek festődési megjelenéséről és mintázatáról. A Wnt5a citoplazmás, az Fzd2 membrán, a Wnt3a citoplazmás, míg a béta-katenin citoplazmás és a sejtmagi lokalizáció jellemzi.

4.1.1. A Wnt markerek expressziós szintje a II-IV grádusú gliomákban és a normál agyszövetben

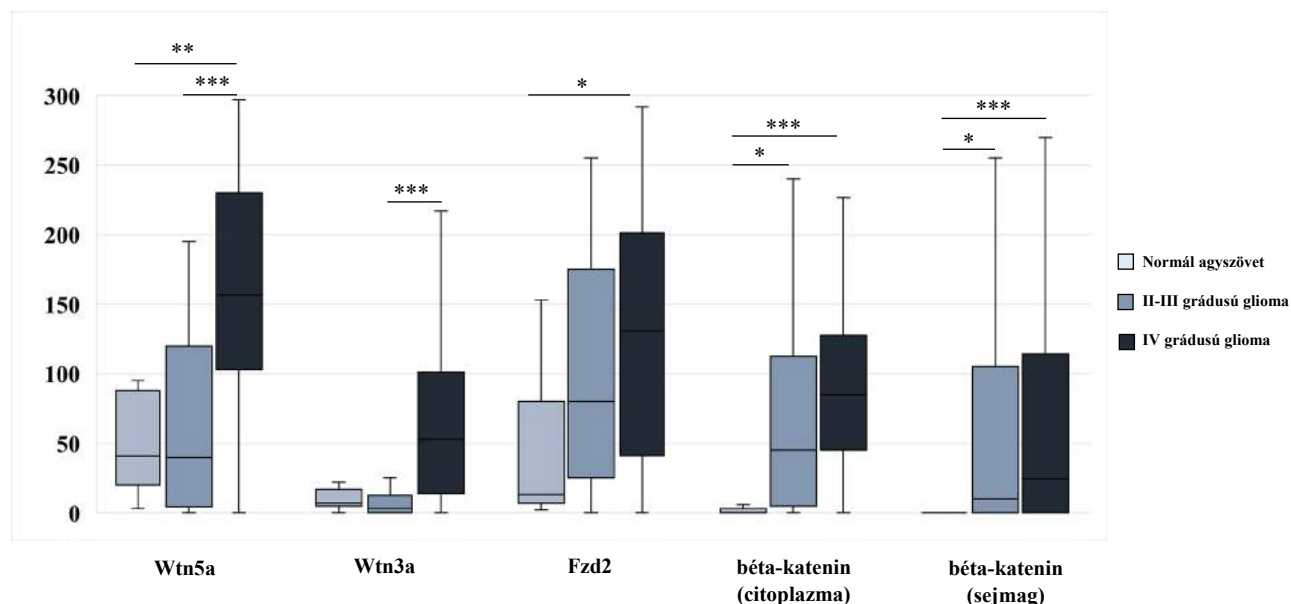
Kutatásunk során arra kerestük a választ, hogy a Wnt útvonal expressziós kifejeződése milyen mértékben változik meg a gliomákban a normál agyhoz képest, valamint az útvonal aktivitása fokozatosan emelkedik-e a grádus előrehaladtával. Tanulmányunkban 8 darab normál agyszövetet, 9 darab II-es, 10 darab III-as és 72 darab IV-es grádusú (GBM) gliomát hasonlítottunk össze (3. Táblázat). A csak grádus vizsgálatok során a GBM mintákban szignifikánsan magasabb expressziót tapasztaltunk a Wnt5a (III grádus vs. IV grádus $p < 0.001$) és Wnt3a (II grádus vs. IV grádus $p = 0.036$; és III grádus vs. IV grádus $p = 0.001$) esetében a II és III-as grádusú gliomákhoz képest (5. Ábra). A béta-katenin magasabb citoplazmás megjelenése tekintetében grádus IV esetében egy határozott trendet tapasztaltunk (III grádus vs. IV grádus $p = 0.070$). A béta-katenin sejtmagi, illetve az Fzd2 festődése nem mutatott különbséget a grádus emelkedésével. A Wnt markerek CS értékei nem mutattak különbséget az II-es és III-as grádusú tumorok összehasonlításában, ezért a következő elemzésben összevontuk ezt a két csoportot.



5. Ábra: A Wnt marker expresszió összehasonlítása különböző tumor grádusok között II, III és IV. Az ábrán a Wnt5a, Wnt3a, Fzd2 és a béta-katenin plazmás és sejtmagi CS medián értéke van feltüntetve, valamint az interkvartilis tartomány (Kruskal-Wallis teszt: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

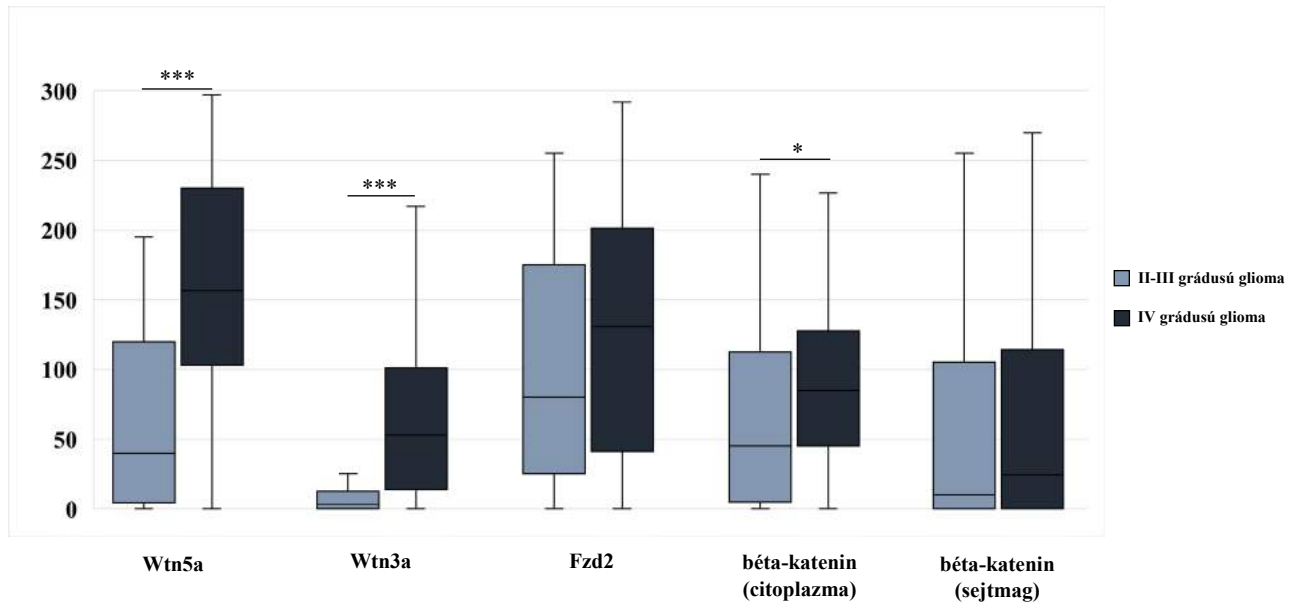
A 8 darab normál agy, 19 darab II-III grádus és a 72 darab GBM összehasonlítása során a Wnt markerek fokozatosan emelkedő expresszióját tapasztaltunk a tumor grádus növekedésével. A normál agyi régióhoz képest a Wnt3a kivételével, mindegyik marker emelkedett expressziót mutatott a GBM-ben (Wnt5a $p = 0.004$; Fzd2 $p = 0.015$; citoplazmás

béta-katenin $p < 0.001$; sejtmagi béta-katenin $p = 0.001$). A normál agyi régió és a II-III grádusú tumor között csak a béta-katenin plazmás ($p = 0.016$) és sejtmagi ($p = 0.030$) kifejeződésében találtunk különbséget (6. Ábra). Felvethető, hogy kontrollként post mortem mintából származó normál agyi régiót vizsgáltunk, míg a tumorok műtéten eltávolított minták voltak. Azonban fenti megállapításunkkal összhangban, egy elővizsgálat során a nyolc post mortem normál – GBM mintapárban is hasonlóan emelkedő tendenciát figyeltünk meg: A Fzd2 és a béta-katenin markerek csak tendenciálisan, míg a Wnt5a ($p = 0.003$) és a Wnt3a ($p = 0.029$) szignifikánsan emelkedett a tumoros régiókban a nem tumoros régióhoz képest. Ez alapján hitelesnek tekinthetjük a Wnt markerek expressziós növekedését a (műtéti) tumoros vs. a normál (postmortem) agyi régió összehasonlításakor is.



6. Ábra: A Wnt marker expresszió összehasonlítása a normál agyszövet és a különböző tumor grádusok között (II-IV). Az ábrán a Wnt5a, Wnt3a, Fzd2 és a béta-katenin plazmás és sejtmagi CS medián értéke van feltüntetve, valamint az interkvartilis tartomány (Kruskal-Wallis teszt: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

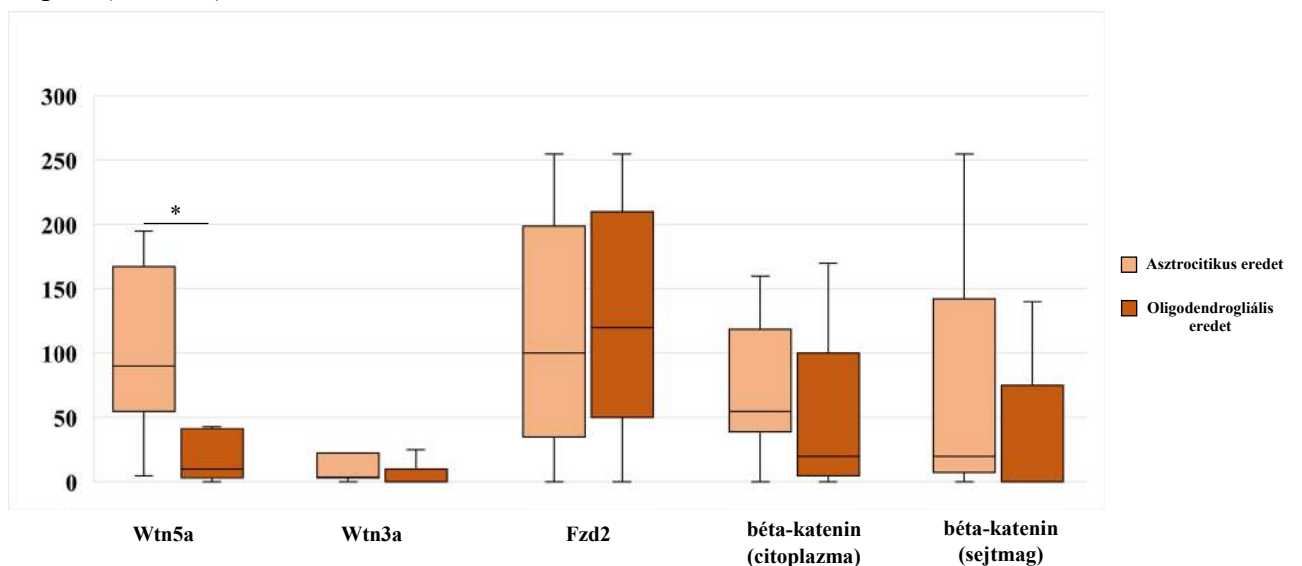
Abban az esetben, amikor csak a 19 darab II-III grádusú gliomákat hasonlítottuk a 72 darab IV-es grádusú GBM-hez, a Wnt5a ($p < 0.001$), a Wnt3a ($p < 0.001$) és a béta-katenin citoplazmatikus expressziója ($p = 0.039$) is szignifikánsan emelkedett volt a GBM-ben, míg az Fzd2 és a béta-katenin sejtmagi megjelenése csak kis mértékben változott (7. Ábra).



7. Ábra: A Wnt marker expresszió összehasonlítása az II-III és a IV tumor grádus között. Az ábrán a Wtn5a, Wtn3a, Fzd2 és a béta-katenin plazmás és sejtmagi CS medián értéke van feltüntetve, valamint az interkvartilis tartomány (Mann-Whitney U teszt: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

4.1.2. Wnt markerek expressziós mintázata a gliomák eredete szerint

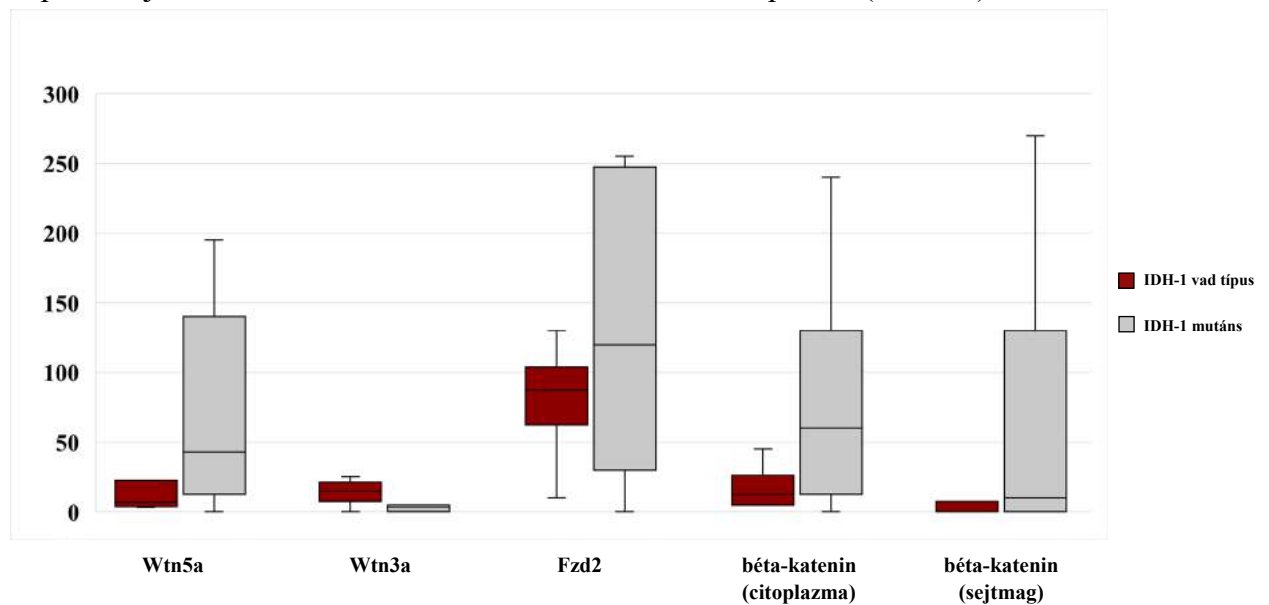
A 19 II-III grádusú gliomából 8 asztroglialis és 11 oligodendroglialis tumort különítettünk el a WHO 2016-os útmutatóját követő hisztológiai és molekuláris vizsgálatokkal [24]. A 8 asztrogliomából 7 rendelkezett IDH-1 R132H/C mutációval, míg 1 IDH-1 R132H/C vad típusú volt. A 11 oligodendrogliomából 8 IDH-1 mutációval és 1p19q kodelációval rendelkezett, 3 hisztológiai alapon oligodendrogliomának ítélt tumor IDH-1 vad típusú, nem kodeleált volt. A két csoport összehasonlításakor csak a Wnt5a expressziója volt szignifikánsan magasabb az asztroglialis csoportban ($p=0.02$) az oligodendroglialiséhoz képest (**8. Ábra**).



8 Ábra: A Wnt marker expresszió összehasonlítása két eltérő eredetű gliális csoportokban. Az ábrán a Wnt5a, Wnt3a, Fzd2 és a béta-katenin plazmás és sejtmagi CS medián értéke van feltüntetve, valamint az interkvartilis tartomány (Mann-Whitney U teszt: * $p < 0.05$)

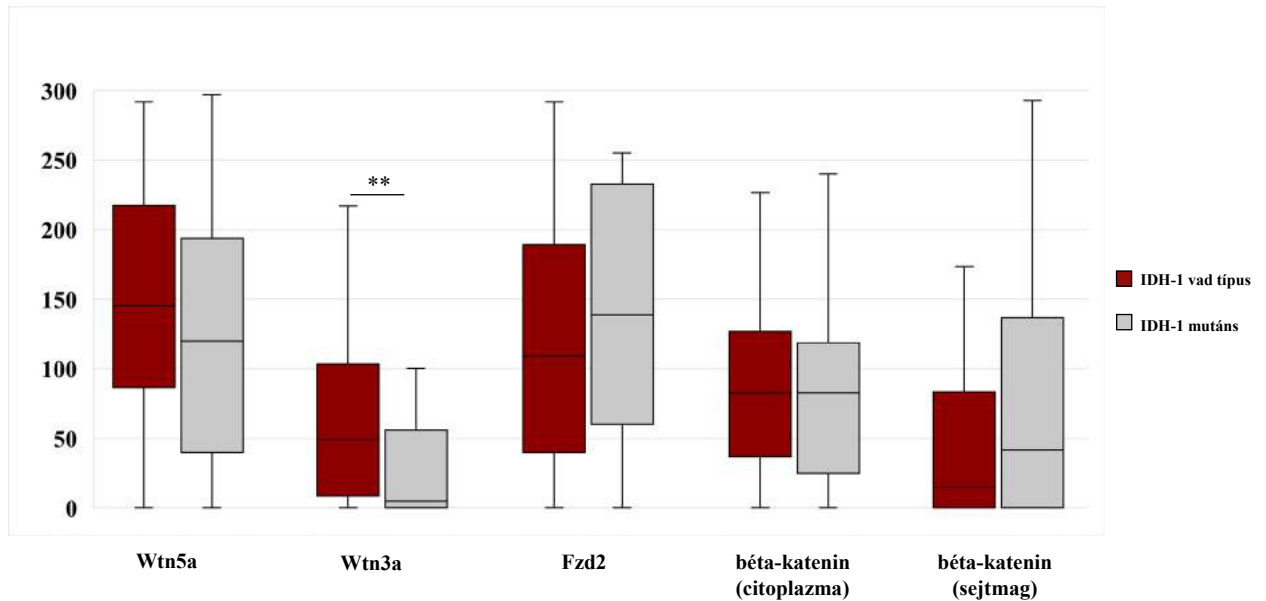
4.1.3. Wnt markerek kifejeződése a gliomákban az IDH-1 R132H/C mutáció szerint.

A 19 II-III grádusú gliomából 15 minta IDH-1 R132H/C mutáns, míg 4 vad típusú volt. A Wnt marker expresszió összehasonlításakor a két csoport között nem találtunk szignifikáns különbséget a CS érték tekintetében. Bár a Wnt3a kivételével valamennyi marker expressziója tendenciózus növekedést mutatott a mutáns csoportban (9. Ábra).



9. Ábra: A Wnt markerek expressziós mintázatának összehasonlítása a II-es és III-as grádusú IDH-1 R132H/C mutációval rendelkező és a vad típusú minták között. Az ábrán a Wnt5a, Wnt3a, Fzd2 és a béta-katenin plazmás és sejtmagi CS medián értéke van feltüntetve, valamint az interkvartilis tartomány (Mann-Whitney U teszt).

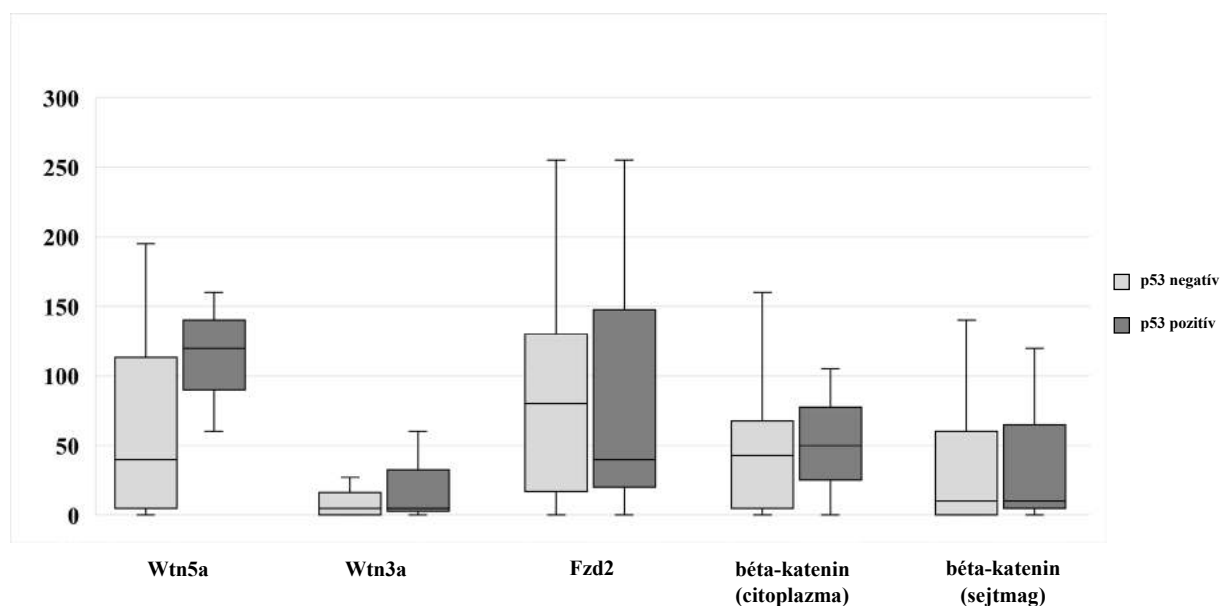
Az összes (II-IV grádusú) glioma minta közül 22 rendelkezett IDH-1 R132H/C mutációval, míg 69 vad típusú volt. A két csoport közötti Wnt markerek CS értékének összevetése során csak a Wnt3a esetében tapasztaltunk szignifikánsan magasabb kifejeződést ($p=0.006$) a vad típusú csoportban (10. Ábra).



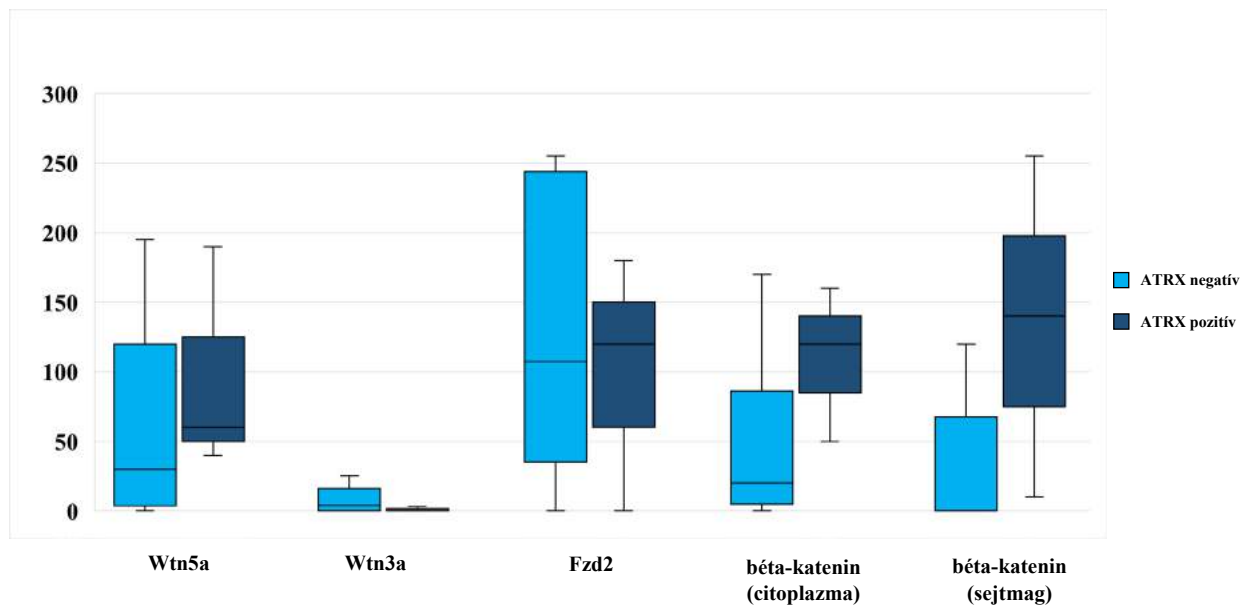
10. Ábra: A Wnt markerek expressziós mintázatának összehasonlítása az összes (II-IV) grádusú IDH-1 R132H/C mutációval rendelkező és a vad típusú minták között. Az ábrán a Wtn5a, Wtn3a, Fzd2 és a béta-katenin plazmás és sejtmagi CS medián értéke van feltüntetve, valamint az interkvartilis tartomány (Mann-Whitney U teszt: * $p < 0.01$).

4.1.4. Wnt markerek megjelenése a p53 és az ATRX pozitív és negatív festődésű II-III grádusú gliómákban.

A különböző Wnt markerek expressziós szintjében nem találtunk statisztikai különbséget p53 és ATRX pozitív és negatív státuszú 19 minta között, bár határozott trend mutatkozott (a Wtn3a kivételével) valamennyi Wnt marker esetében a magasabb expresszióra az ATRX mutáns csoportban (11. Ábra; 12. Ábra).



11. Ábra: A Wnt markerek expressziós mintázatának összehasonlítása az p53 negatív és pozitív II-III grádusú minták között. Az ábrán a Wnt5a, Wnt3a, Fzd2 és a béta-katenin plazmás és sejtmagi CS medián értéke van feltüntetve, valamint az interkvartilis tartomány (Mann-Whitney U teszt)



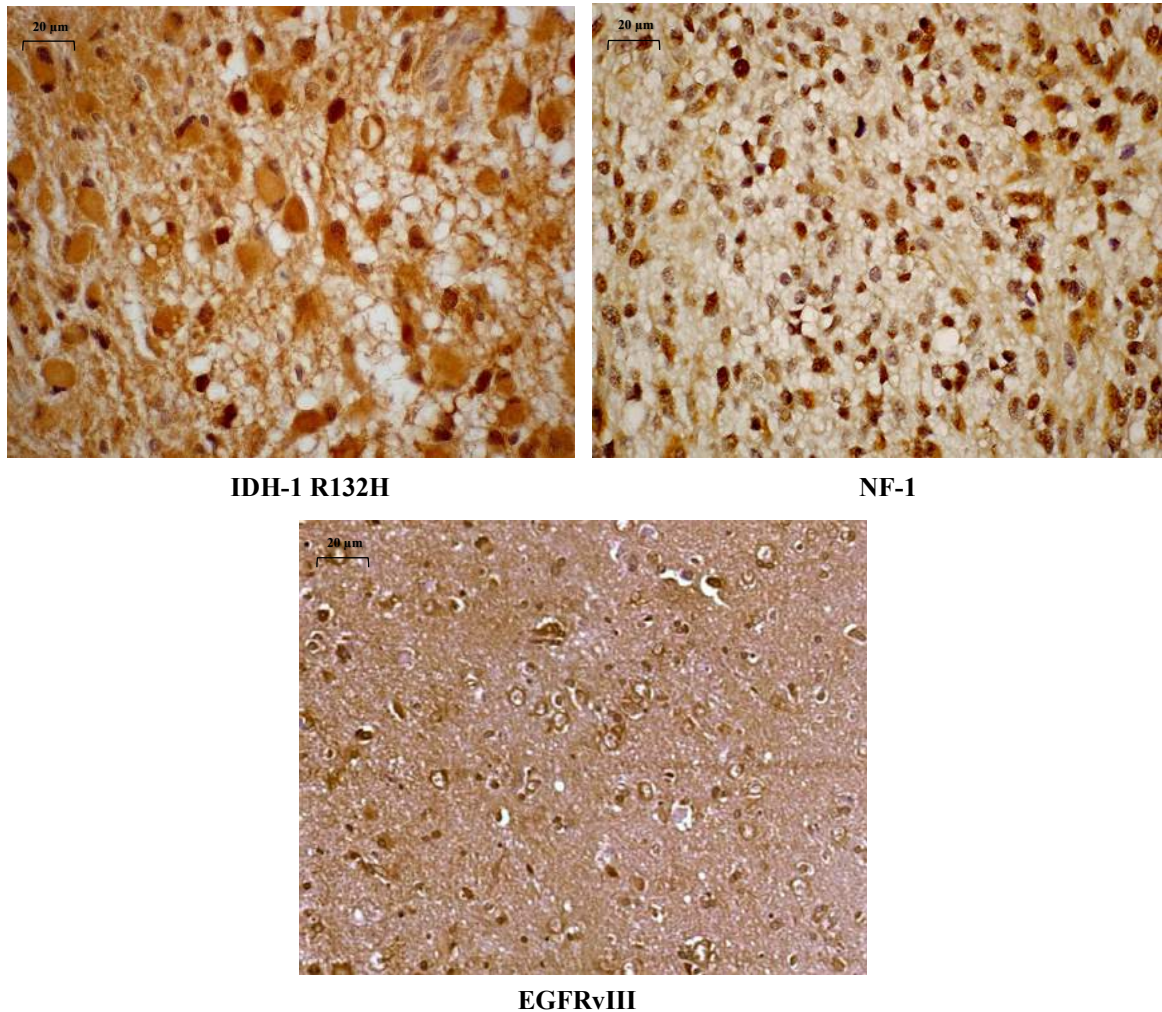
12. Ábra: A Wnt markerek expressziós mintázatának összehasonlítása az ATRX negatív és pozitív II-III grádusú minták között. Az ábrán a Wnt5a, Wnt3a, Fzd2 és a béta-katenin plazmás és sejtmagi CS medián értéke van feltüntetve, valamint az interkvartilis tartomány (Mann-Whitney U teszt).

4.2. A Wnt markerek protein kifejeződése a GBM molekuláris alcsoportjaiban

4.2.1. Kohort 1 tanulmányok

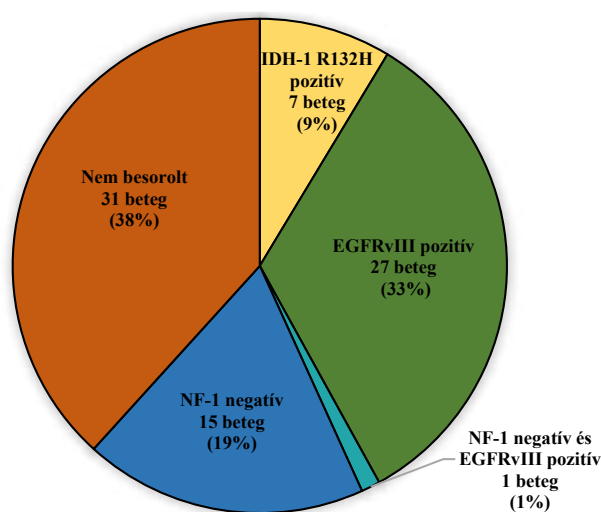
4.2.1.1. A GBM molekuláris alcsoportjai

A TCGA 2010-ben transzkriptomikai alapon különített el négy alcsoportot a GBM-en belül [21]. Csoportunk korábbi vizsgálatait során az ezen alcsoportokat meghatározó legfontosabb markerek IHC vizsgálatával sikeresen reprodukálta a TCGA alcsoportokkal átfedő alcsoportok elkülönülését klinikai FFPE mintákban (az egyszerűség kedvéért, az alcsoportok megnevezéséhez mi is a TCGA nomenklaturát használjuk) [23]. A GBM négy molekuláris alcsoportja a következő: IDH-1 R132H mutáns (proneurális); EGFRvIII mutáns és EGFR túlexpresszált (klasszikus) és a NF-1 sejtmagi és citoplazmás (c-/m-) expressziót elvesztő (mesenchymalis) és jellemző molekuláris fenotípussal nem rendelkező (nem besorolt) alcsoport (**13. Ábra**).



13. Ábra: Molekuláris alcsoportokra legjellemzőbb markerek reprezentatív IHC festődése.

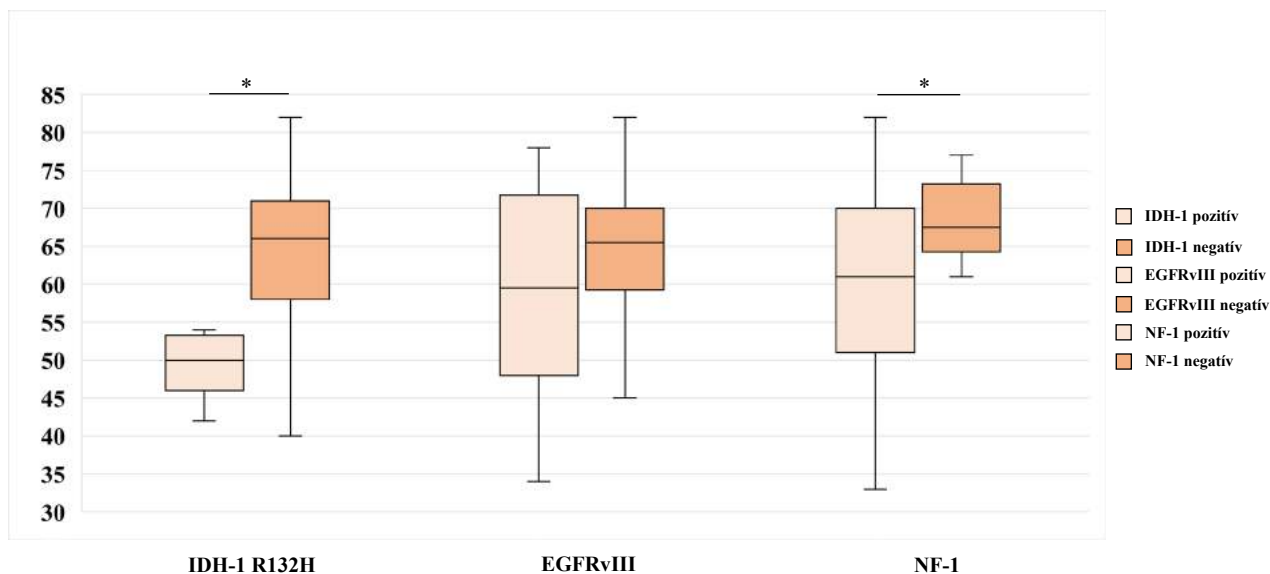
Jelen vizsgálat során is ugyanazt a módszert és stratégiát követtük, mint a megelőző tanulmányban [23], azonban „manuálisan” különítettük el a GBM molekuláris alcsoportokat a fent jelzett IHC markerek (IDH-1 R132H; EGFRvIII; NF-1) expressziója alapján. A vizsgálat során 78 betegtől 81 FFPE blokk állt a rendelkezésünkre (**4. Táblázat**). A proneurális csoport (sárga) teljesen elszeparálódik a klasszikus (zöld) és mesenchymalis (kék) és nem besorolt (narancssárga) alcsoporttól, míg 1 beteg esetében a klasszikus és a mesenchymalis klaszter átfed egymással. (A TCGA által közölt publikációban is találtak részlegest átfedést az előbb említett két csoport között). A betegek 61,7%-át (50/81) sikerült valamelyik alcsoportba besorolnunk (**14. Ábra**).



14. Ábra: A GBM minták szegregálódása a kulcs markerek alapján.

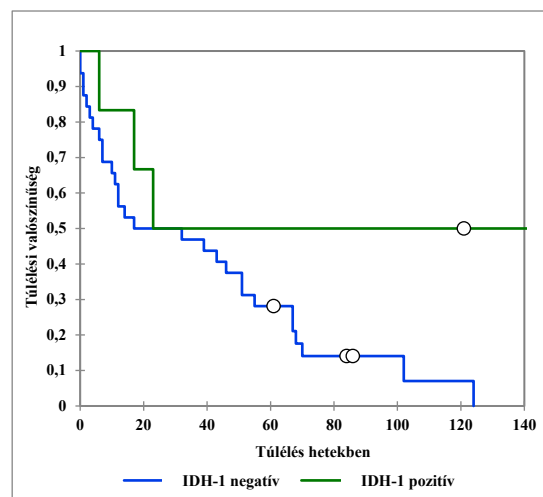
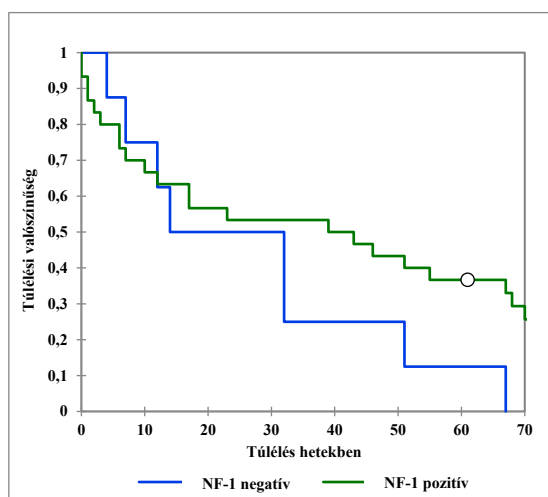
4.2.1.2. A betegek teljes túlélése

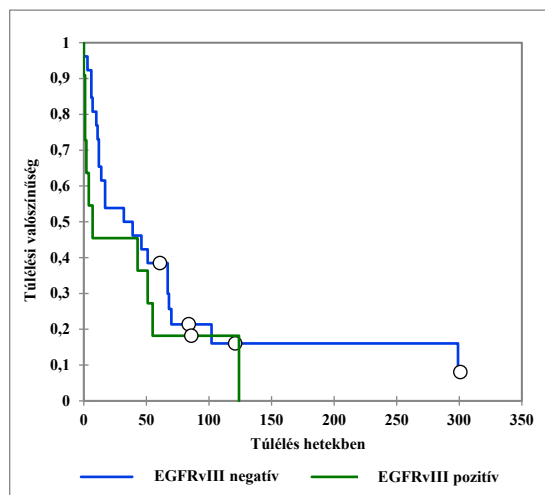
A betegek életkorának elemzése során jelentős eltéréseket tapasztaltunk a molekuláris alcsoportok között: Az IDH-1 R132H mutációt (proneurális) hordozó 7 beteg fiatalabb volt ($p=0.05$), mint a 74 vad típusú tumort hordozó beteg. Ezzel szemben, a 15 beteg, akik a dupla NF-1 negatív (c-/m-) (mesenchymalis) fenotípusú tumort hordozták, idősebbek voltak, mint az NF-1 protein expressziót mutató tumorú (akár c+, m+ vagy c+/m+), 66 főből álló betegek csoportja ($p=0.039$). A 27 EGFRvIII mutáns és 54 nem mutáns daganatú betegeknél nem volt különbség (**15. Ábra**).



15. Ábra: A betegek medián életkora és az interkvartilis tartomány az egyes alcsoportokkal átfedő markerek jelenléte vagy hiánya alapján (Mann-Whitney U teszt: * $p < 0.05$).

Amikor a GBM-es betegeket az alcsoport meghatározó mutációk alapján különítettük el (stratifikáltuk) nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a túlélésben. Egyedül az IDH-1 R132H mutáns daganattal rendelkező betegeknél ($p=0.052$) tapasztaltunk trendet a hosszabb túlélésre az IDH-1 vad típusos tumorú csoporttal szemben. Feltehető, hogy a mintaelemszám növelésével szignifikáns különbség lenne e két alcsoport között (16. Ábra).

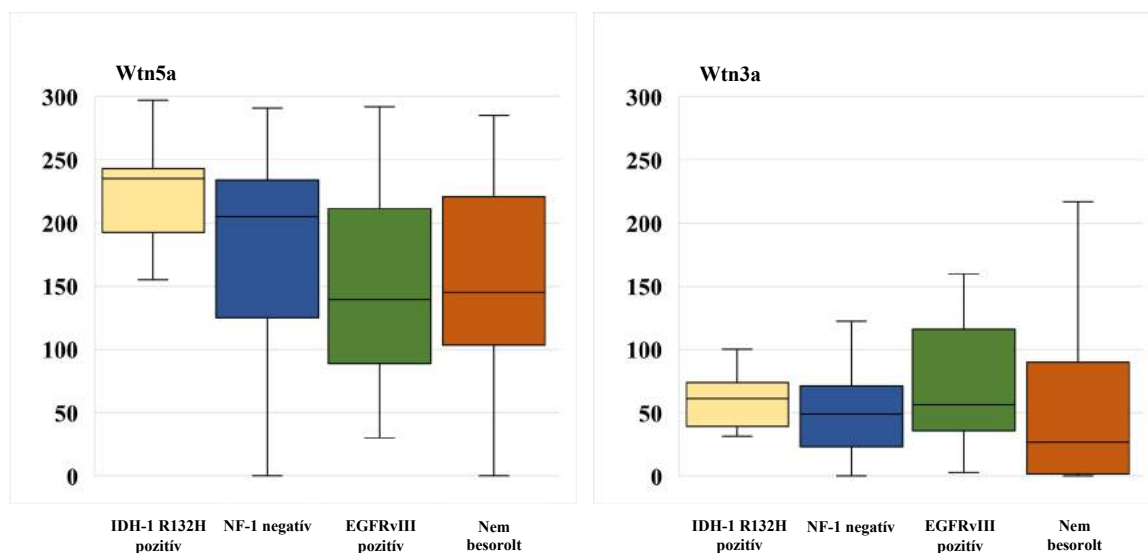


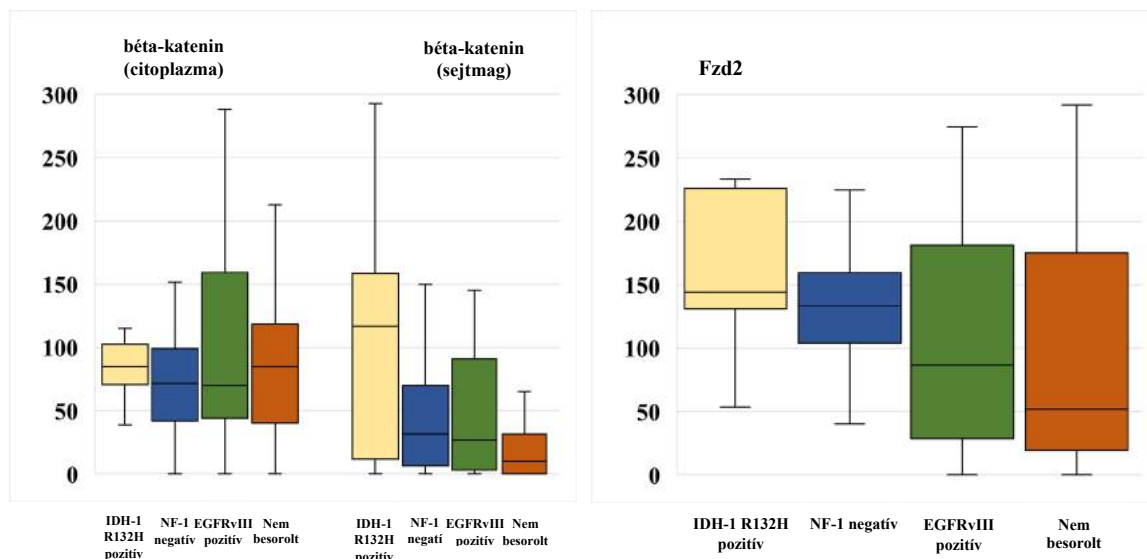


16. Ábra: A betegek teljes túlélése az adott marker expressziójának vagy hiányának tükrében. A fehér pontok azokat betegeket reprezentálják, akik a vizsgálat befejeztével még életben voltak. (Kaplan-Meier féle túlélési teszt).

4.2.1.3. A Wnt markerek kifejeződése a molekuláris alcsoportokban

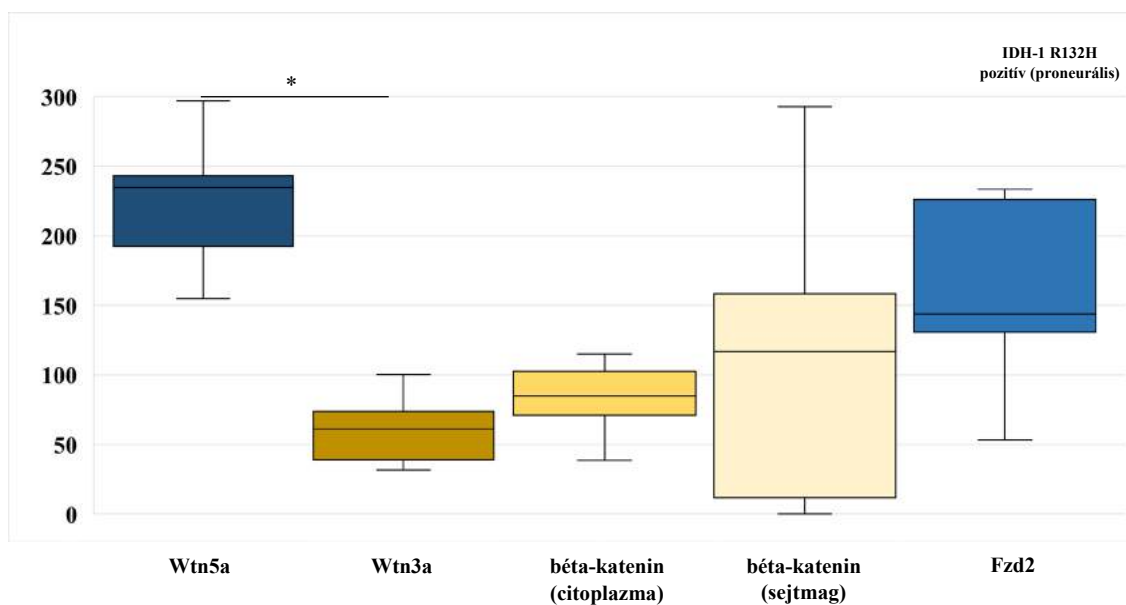
Tanulmányunk fő célja az volt, hogy megvizsgáljuk a Wnt két (kanonikus és non-kanonikus) alútvonal markereinek expressziós mintázatát a GBM molekuláris alcsoportjaiban. Kutatásunk során azonban nem találtunk szignifikáns eltéréseket, csak trendet tapasztaltunk a Wnt3a ($p=0.059$) és a Wnt5a ($p=0.077$) esetében, amikor az egyes markerek kifejeződését vizsgáltuk a GBM molekuláris alcsoportjai között (**17. Ábra**).





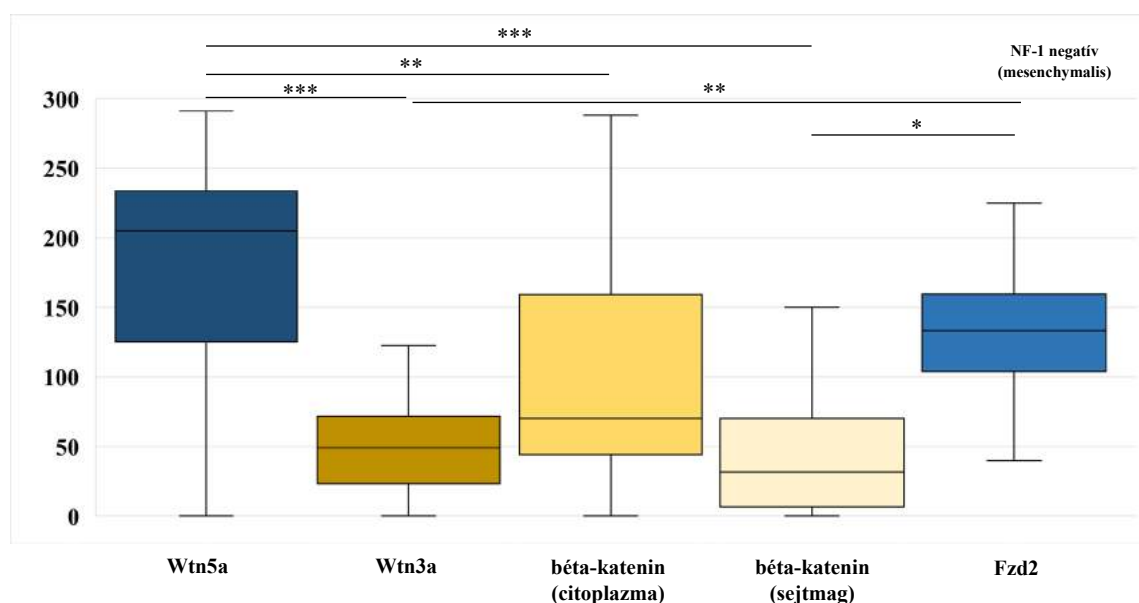
17. Ábra: A Wnt markerek expressziós mintázata az alcsoportok között. A markerek CS értékének mediánja és interkvartilis tartománya van feltüntetve az ábrán (Kruskal-Wallis teszt).

Következő lépésként Wnt markerek CS értékeinek megoszlását hasonlítottuk össze az egyes GBM alcsoportokon belül. A vizsgálat során jelentős expressziós szintbeli eltéréseket tapasztaltunk a kanonikus és non-kanonikus útvonal markerei között. A 7 beteget magába foglaló proneurális IDH-1 R132H mutáns alcsoportban szignifikáns eltérést figyeltünk meg a Wnt5a és a Wnt3a között ($p=0.012$) (18. Ábra)



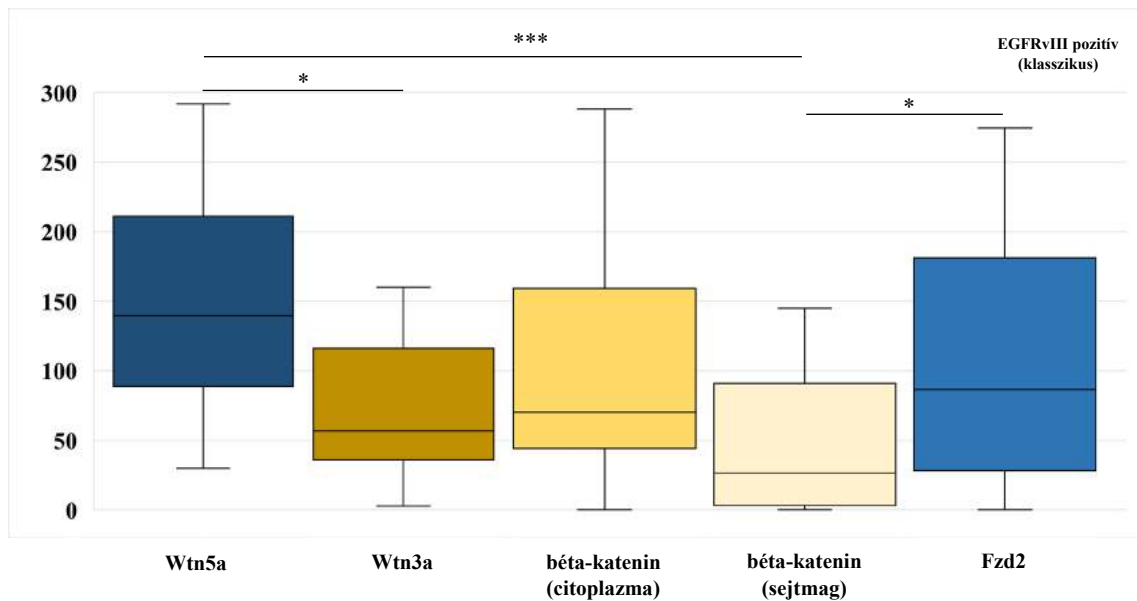
18. Ábra: A Wnt markerek expressziós mintázata a proneurális alcsoportban. A markerek CS értékének mediánja és interkvartilis tartománya van feltüntetve az ábrán (Kruskal-Wallis teszt: * $p<0.05$)

A leglátványosabb különbség a kanonikus és non-kanonikus markerek között a 15 betegből álló NF-1 citoplazma és sejtmag expressziót vesztett, vagyis dupla negatív (c-/m-), mesenchymalis csoportban találtuk. A Wnt5a expressziója szignifikánsan magasabb volt (Wnt5a vs. Wnt3a $p < 0.001$; Wnt5a vs. béta-katenin (citoplazma) $p = 0.002$; Wnt5a vs. béta-katenin (sejtmag) $p < 0.001$) mindegyik kanonikus útvonal markerrel összehasonlítva. Továbbá a non-kanonikus útvonal másik általunk vizsgált markere, az Fzd2 is emelkedett expressziót mutatott a Wnt3a-val ($p = 0.009$) és a sejtmagi béta-kateninnel ($p = 0.04$) szemben (19. Ábra).



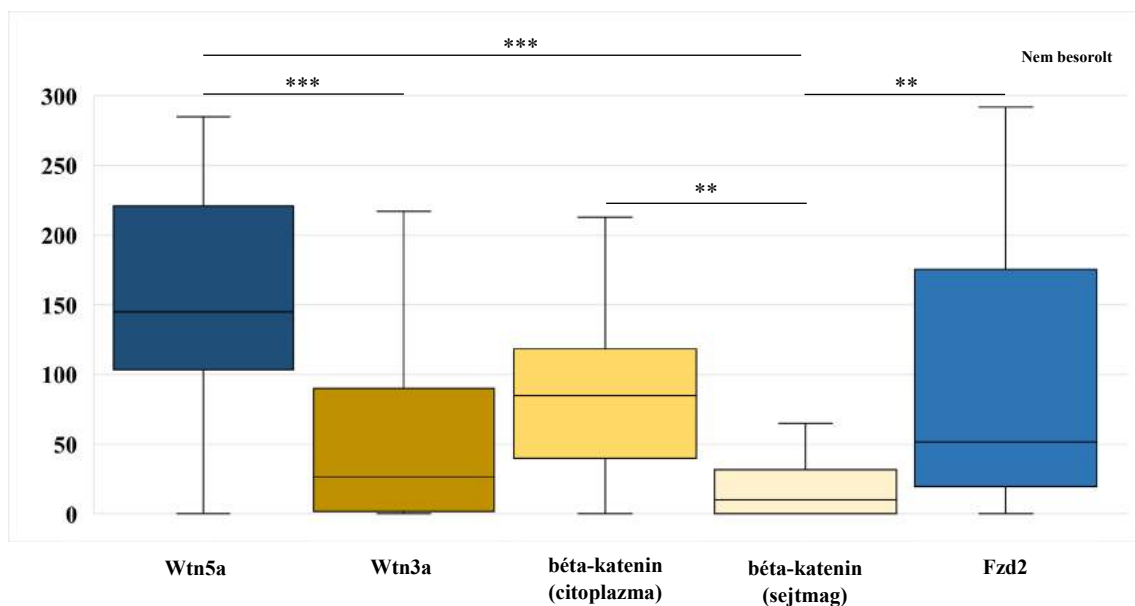
19. Ábra: A Wnt markerek expressziós mintázata a mesenchymalis alcsoportban. A markerek CS értékének mediánja és interkvartilis tartománya van feltüntetve az ábrán (Kruskal-Wallis teszt: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

A 27 mintából álló klasszikus EGFRvIII mutáns alcsoportban a Wnt5a erősebben expresszáldott a Wnt3a-nál ($p = 0.021$) és a sejtmagi megjelenésű béta-kateninnél ($p < 0.001$), továbbá a Fzd2-nek is magasabb CS értéke volt a sejtmagi béta-kateninnel szemben ($p = 0.046$) (20. Ábra).



20. Ábra: A Wnt markerek expressziós mintázata a klasszikus alcsoportban. A markerek CS értékének mediánja és interkvartilis tartománya van feltüntetve az ábrán (Kruskal-Wallis teszt: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$)

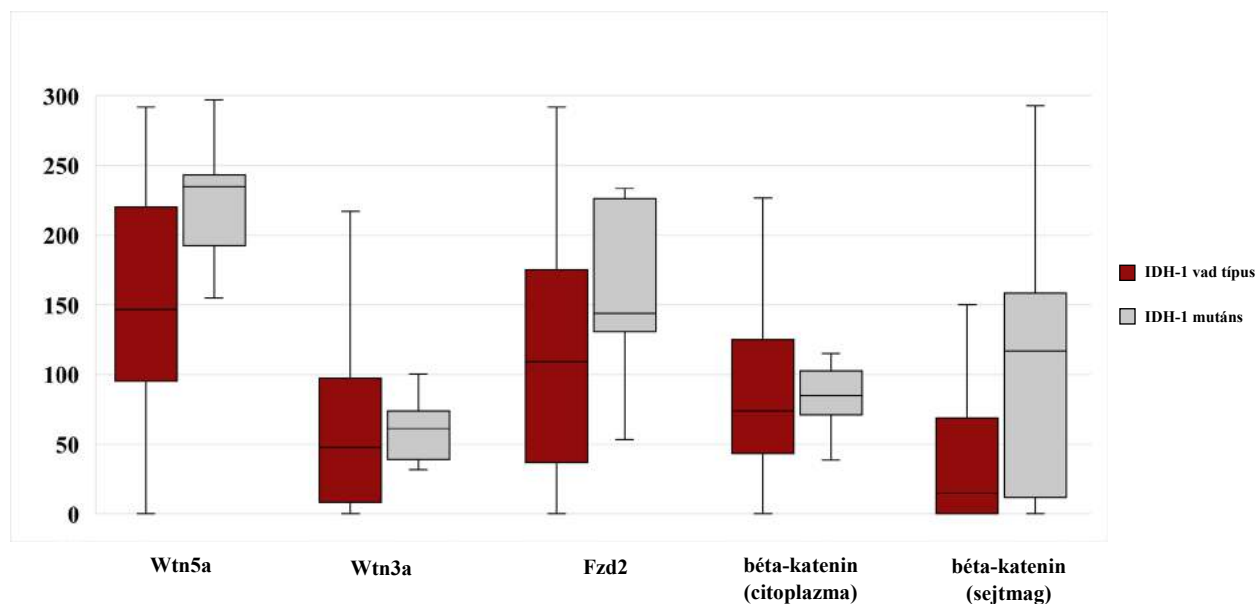
A 31 beteget magába foglaló Nem besorolt alcsoportban a kanonikus és non-kanonikus markerek hasonló mértékben expresszálódtak, mint a klasszikus alcsoportban. Itt is a Wnt5a jelentősen magasabban fejeződött ki a Wnt3a-nál ($p < 0.001$) és a sejtmagi béta-kateninnél ($p < 0.001$), továbbá az Fzd2 itt is magasabb CS értékkel szerepelt a sejtmagi béta-katenin-nél ($p = 0.01$). Egyedül a nem besorolt alcsoportban kaptunk szignifikánsan magasabb citoplazmatikus mint sejtmagi béta-katenin expressziót ($p = 0.005$) (**21. Ábra**).



21. Ábra: A Wnt markerek expressziós mintázata a nem besorolt alcsoportban. A Wnt markerek CS értékének mediánja és interkvartilis tartománya van feltüntetve az ábrán. (Kruskal-Wallis teszt ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

4.2.1.4. A Wnt markerek kifejeződése az IDH-1 R132H/C mutáció szerint

A 81 db IV-es grádusú GBM-ben 7 minta rendelkezett IDH-1 R132H/C mutációval, míg 74 vad típusú volt. Egyedül a Wnt5a esetében tapasztaltunk tendenciális expresszió emelkedést ($p=0.071$) a mutáns csoportban (22. Ábra)

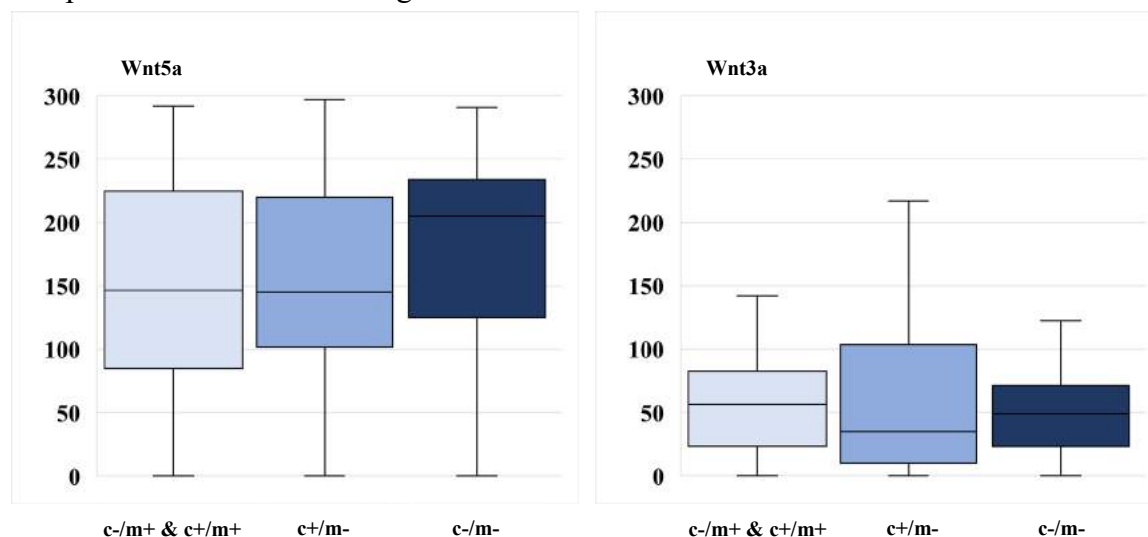


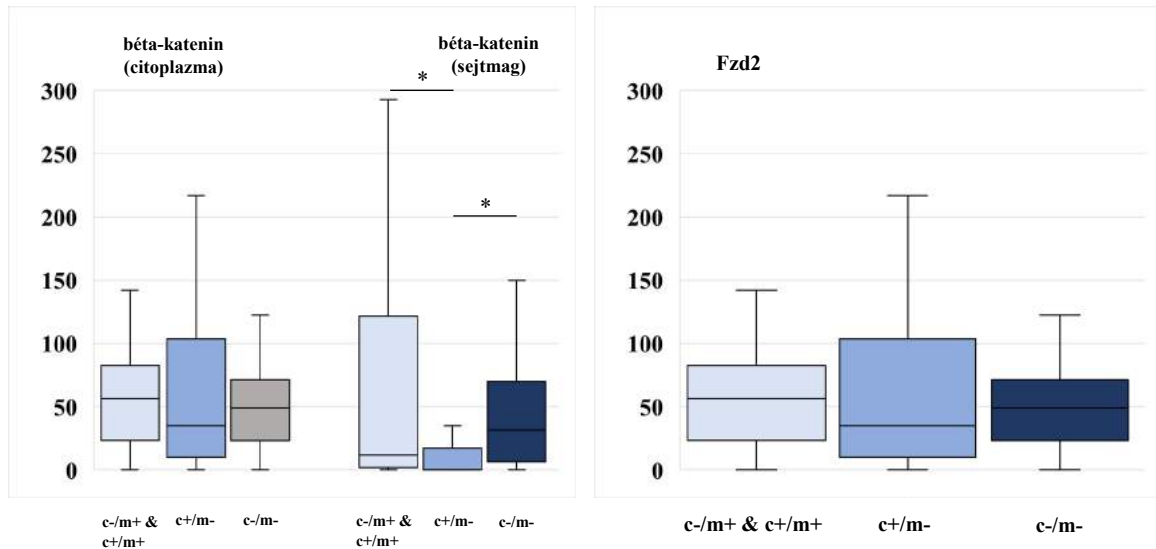
22. Ábra: A Wnt markerek expressziós mintázatának összehasonlítása a magas grádusú (IV) IDH-1 R132H/C mutációval rendelkező és IDH vad típusú minták között. Az ábrán a Wnt5a, Wnt3a, Fzd2 és a béta-katenin plazmás és sejtmagi CS medián értéke van feltüntetve, valamint az interkvartilis tartomány (Mann-Whitney U teszt).

4.2.1.5. A Wnt markerek kifejeződése a „gazdagított” molekuláris alcsoportokban

A molekuláris markerek egyik esetben sem voltak minden sejtben, vagyis 100%-osan jelen a ROI területén belül. Annak érdekében, hogy még mélyrehatóbban meg tudjuk vizsgálni a molekuláris markerek és Wnt útvonal kapcsolatát, végeztünk egy olyan vizsgálatot, ahol kritériumként felállítottunk egy minimum 50%-os expressziós szintet a molekuláris markerekre a ROI-n belül. A „gazdagítás” jelentős mértékben nem javította a statisztikai különbségeket az alcsoportokon belül a Wnt markerek összehasonlítása során, feltehetőleg a lecsökkent mintaelemszám miatt. A legnagyobb különbséget itt is a kanonikus és non-kanonikus útvonal között az NF-1 (c-/m-) mesenchymalis alcsoportba tapasztaltuk.

Az NF-1 c-/m- csoportban tapasztalt erős Wnt marker különbségek miatt egy újabb szempontból is megvizsgáltuk az NF-1 és a Wnt útvonal elemeinek kapcsolatát (23. Ábra). Normál esetben az NF-1 és a béta-katenin protein is csak a citoplazmában van jelen. Mindkét fehérje sejtmagi megjelenése tumoros átalakulással társul. Az NF-1 expresszió alapján négy alcsoportot képeztünk: 19 „normál” megjelenésű (c+/m-) minta, 4 csak sejtmagi expressziójú (c-/m+) minta, 19 citoplazmatikus és sejtmagi expressziójú (c+/m+) minta és 15 kettős negatív (c-/m-) minta. Az alacsony mintaelemszám miatt a c-/m+ és c+/m+ csoportot összevontuk, hogy növeljük a statisztikai erőt. A „normál” megjelenésű (c+/m-) NF-1 expresszió esetében tapasztaltuk a legalacsonyabb magi béta-katenin kifejeződést, azonban a tumorra jellegzetes c-/m+ & c+/m+ és c-/m- NF-1 festődés esetében a sejtmagi béta-katenin kifejeződése szignifikánsan nagyobb volt. A magi béta-katenin expressziója különbözött a „normál” (c+/m-) és a tumorra jellemző magi NF-1 festődésű alcsoportban (c-/m+ & c+/m+) ($p=0.021$); és szintén különbözött a „normál” megjelenésű (c+/m-) és a tumorra jellemző negatív NF-1 festődésű (c-/m-) alcsoportban ($p=0.03$). A különbség még tovább növekedett, amikor a „normál” megjelenésű (c+/m-) és a patológiás (c-/m+ & c+/m+ és c-/m-) NF-1 festődésű csoportokban hasonlítottuk össze a béta-katenin expresszióját ($p=0.009$) (23. Ábra). A többi marker esetében nem láttunk NF-1 expresszió szerinti különbséget.





23. Ábra: A Wnt markerek expressziós mintázata az egyes NF-1 festődési mintázat szerint. A Wnt markerek CS értékének mediánja és interkvartilis tartománya van feltüntetve az ábrán. (Mann-Whitney U teszt: * $p < 0.05$).

4.2.1.6. Korreláció az alcsoport meghatározó CS és a Wnt markerek CS értékei között a molekuláris alcsoportokban

Annak érdekében, hogy összefüggéseket találjunk, miként hathatnak az alcsoport meghatározó markerek a Wnt útvonal markereinek expressziójára vagy éppen fordítva, számos megközelítésből végeztünk elemzéseket. A klasszikus csoportban az EGFRvIII mind a citoplazmatikus (Kendall's τ korreláció $p=0.01$), mind a membrános (Kendall's τ korreláció $p=0.035$) CS értéke szignifikánsan korrelált a Fzd2 CS értékével. Továbbá ugyanebben a csoportban a Wnt5a szignifikáns összefüggésben állt a citoplazmatikus béta-katenin (Kendall's τ korreláció $p=0.047$) és a sejtmagi béta-katenin (Kendall's τ korreláció $p=0.005$) CS értékével, illetve tendenciális korrelációban az Fzd2-vel (Kendall's τ korreláció $p=0.059$). Nem találtunk semmilyen összefüggést az IDH-1 R132H (proneurális) és az NF-1 (mesenchymalis) alcsoport meghatározó fehérje és a Wnt markerek CS értékei között.

4.2.1.7. A Wnt markerek közötti korreláció

A Wnt és az alcsoport meghatározó markerek CS értékek közötti összefüggések elemzése után megvizsgáltuk, hogy a kohort 1-ben szereplő 78 beteg 81 GBM mintájában expresszálódó Wnt marker fehérjék, milyen korrelációban állnak egymással. A Wnt5a korrelált a sejtmagi béta-kateninnel (Kendall's τ korreláció $p=0.003$) és az Fzd2-vel (Kendall's τ korreláció $p=0.036$). A Wnt3a csupán csak tendenciálisan összefüggésben volt

a citoplazmatikus béta-kateninnel (Kendall's τ korreláció $p=0.051$), azonban az Fzd2 CS értékével szignifikáns asszociációt tapasztaltunk (Kendall's τ korreláció $p=0.015$). A citoplazmatikus béta-katenin és a sejtmagi béta-katenin egymással jelentős mértékben (Kendall's τ korreláció $p=0.0001$), illetve a sejtmagi béta-katenin a Fzd2-vel korrelált (Kendall's τ korreláció $p=0.032$).

4.2.1.8. A Wnt markerek korrelációja a teljes túléléssel

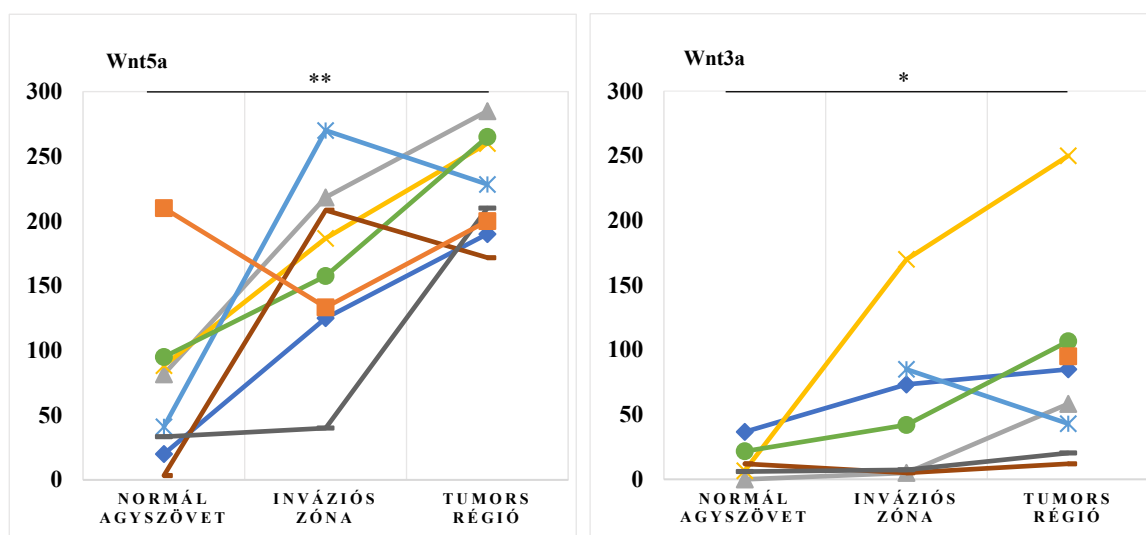
Nem találtunk semmilyen szignifikáns összefüggést a Wnt marker expressziós aktivitása és a betegek teljes túlélése között (Kendall's τ korreláció).

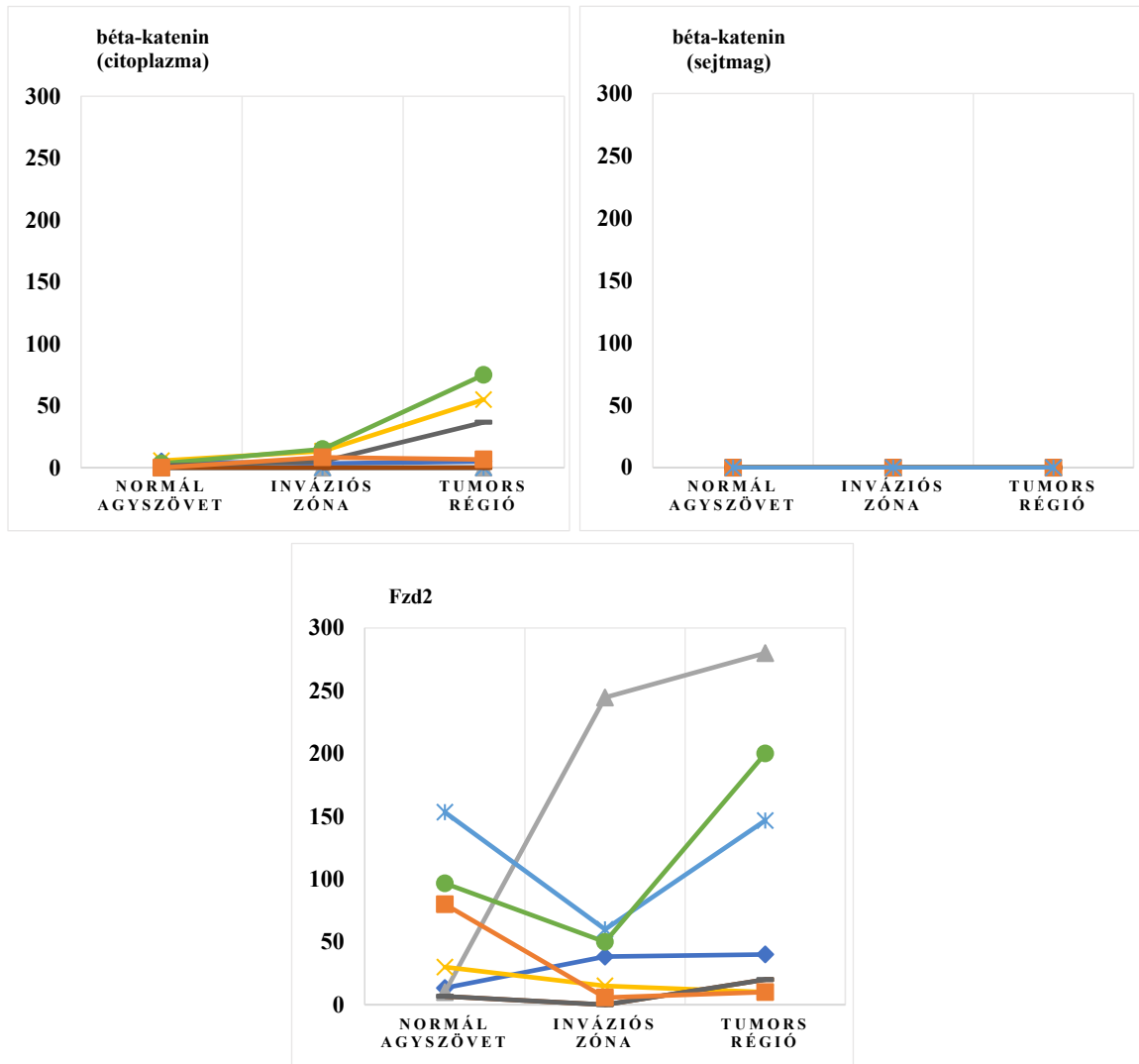
4.2.2. Kohort 2 tanulmányok

Ebben a csoportban 8 betegről származó szekvenciális GBM tumorokat vizsgáltunk (**5. Táblázat**), de nem találtunk szignifikáns eltérést egyik Wnt marker CS értéke között a primer és recidív mintapárokból. Egyedül Wnt5a expressziója emelkedett meg, míg az Fzd2 expressziója csökkent tendenciálisan a recidívában a primer GBM-hez képest.

4.2.3. Kohort 3 tanulmányok

A kohort 3 tanulmány során 8 beteg post mortem mintáját felhasználva megvizsgáltuk, hogy a Wnt útvonal marker expressziója miként változik egy olyan blokkban, ahol a normál agyszöveti, inváziós zóna és GBM régió is megtalálható (**6. Táblázat**). Mindegyik Wnt marker estében megfigyelhető volt egy fokozatos emelkedés a normál agyszövet – inváziós zóna – tumoros régió összehasonlításban. A Wnt markerek CS értéke a normál agyszövetben volt a legalacsonyabb és a tumor régióban a legmagasabb, azonban csak a Wnt5a ($p=0.003$) és a Wnt3a ($p=0.029$) esetében tapasztaltunk csak szignifikáns különbséget a két régió között (**24. Ábra**).





24. Ábra: A Wnt markerek CS értéke a post mortem minták normál agyszöveti, inváziós és tumoros régiójában (Kruskal-Wallis teszt * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.3. A Wnt markerek protein expressziós és DNS metilációs mintázata a szekvenciális GBM mintapárokban

Ez a tanulmány a korábbi DNS CpG metilációs elemzéseink eredményének [36] folytatását képezi. Az eredeti [36] tanulmány GO elemzései ugyanis rámutattak arra, hogy a Wnt útvonal differenciáltan metilált primer és recidív GBM mintákban kohort szinten [36]. Ezért ebben a követő munkában megvizsgáltuk egyedi szinten hat szelektált Wnt marker promoter+gén régiójának metilációját, összevetve ezen markerek fehérje expressziójával, ugyanazon primer (GBM-P) és recidív (GBM-R) GBM blokkokban. Mind az IHC, mind a DNS CpG metilációs vizsgálatok során három csoportot hasonlítottunk össze: kontroll (6 postmortem C-PM az IHC-ban, adatbázis 5 C-DB az epigenomikában), 21 GBM-P és 21 GBM-R (7 és 8. Táblázat).

A korábbi [36] genom-szintű metiláció elemzésünk során meghatároztuk a GBM-P és GBM-R minták DNS fragmentációjának mértékét, RRBS könyvtárakat készítettük, illetve meghatároztuk a nem metilált citozin uracillá való konvertálásának a mértékét, vagyis a biszulfid konverziós ráta átlagát [36]. A kohort szintű GO elemzésnél számos jelátviteli útvonal differenciált metiláltságát találtuk, melyek közül jelen tanulmányunkban a Wnt útvonalra fókuszáltunk. A Wnt útvonal egyes elemét és funkcionális aspektusát közelebbről megvizsgálva számos metilációs mintázatkülönbség fedezhető fel a CD-B, GBM-P és GBM-R csoportokban [36] (10. Táblázat).

C-DB vs. GBM-P		
GO azonosító	p érték	Útvonal szerepe
Gén hipometiláció		
GO:0198738	0,0081	Wnt általi sejt-sejt szignalizáció
GO:0060070	0,0085	Kanonikus Wnt útvonal
GO:0030111	7,60E-03	Wnt útvonal szabályozása
Promoter hipometiláció		
GO:0060070	0,009	Kanonikus Wnt útvonal
GO:0030111	9,00E-04	Wnt útvonal szabályozása
GO:0198738	0,0012	Wnt általi sejt-sejt szignalizáció
Promoter hipermetiláció		
GO:0090244	0,009	Wnt útvonal hozzájárulása a szomitogenezishez
C-DB vs. GBM-R		
GO azonosító	p érték	Útvonal szerepe
Gén hipometiláció		
GO:0007223	0,0075	Wnt útvonal szerepe a kalcium koncentrációjának a szabályozásában
GO:0090263	0,0039	Kanonikus Wnt útvonal pozitív szabályozása
GO:0198738	0,0054	Wnt általi sejt-sejt szignalizáció
GO:0035567	0,0056	Non-kanonikus Wnt útvonal
Gén hipermetiláció		
GO:0030111	2,00E-04	Wnt útvonal szabályozása
GO:0090090	4,00E-04	Kanonikus Wnt útvonal negatív szabályozása
GO:0016055	0,0016	Wnt útvonal szabályozása
Promoter hipermetiláció		
GO:0090244	0,009	Wnt útvonal hozzájárulása a szomitogenezishez

GBM-P vs. GBM-R		
GO azonosító	p érték	Útvonal szerepe
Gén hipermetiláció		
GO:0030111	8,00E-04	Wnt útvonal szabályozása
GO:0016055	9,00E-04	Wnt útvonal
Promoter hipometiláció		
GO:0044328	3,40E-03	Kanonikus Wnt útvonal szerepe az endoteliális sejt migráció pozitív szabályozásában
GO:0044329	3,40E-03	Kanonikus Wnt útvonal szerepe a sejt-sejt adhézió pozitív szabályozásában
GO:0044330	3,40E-03	Kanonikus Wnt útvonal szerepe a sebgyógyulás pozitív szabályozásában
Promoter hipermetiláció		
GO:0198738	0,0012	Wnt általi sejt-sejt szignalizáció
GO:0030111	2,20E-03	Wnt útvonal szabályozása

10. Táblázat: A Wnt útvonal szerepe és metiláltsági státusza a C-DB, GBM-P és GBM-R minták GO összehasonlítás alapján.

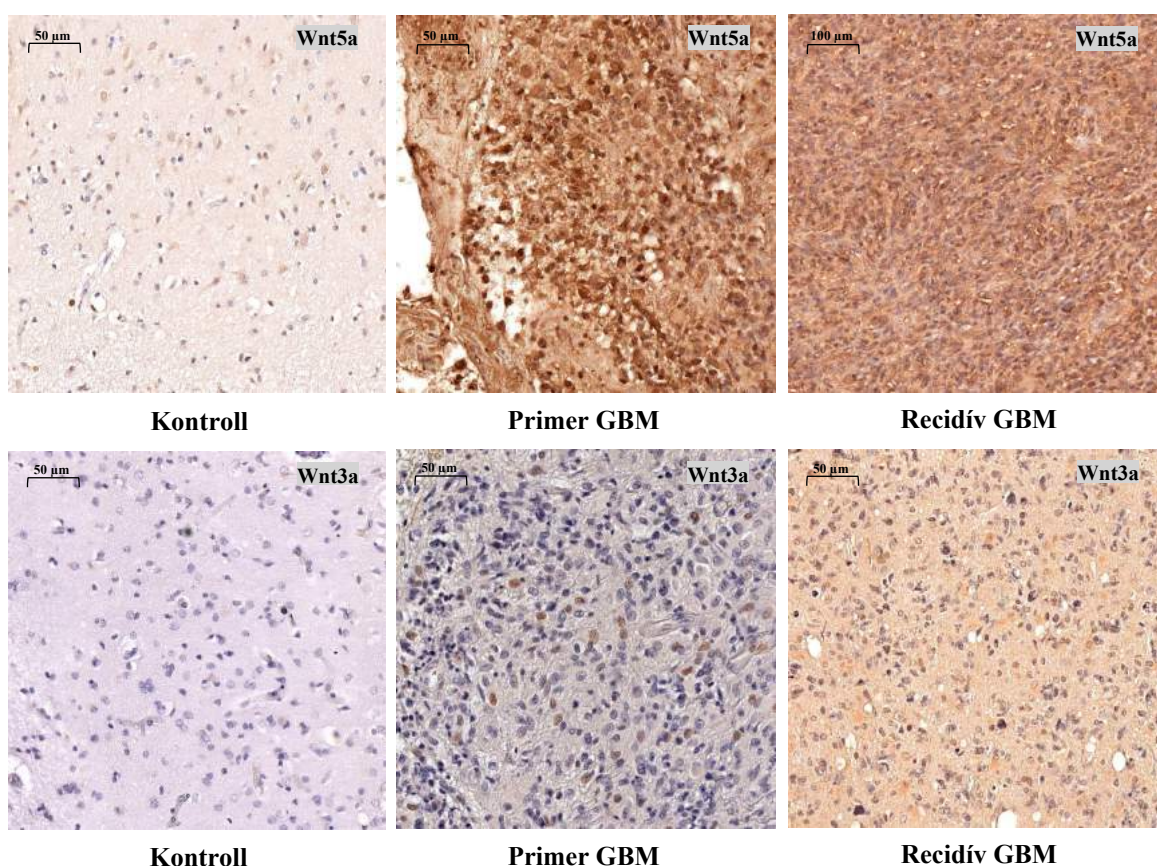
A különbségeket tovább vizsgálva megnéztük, hogy a kanonikus és non-kanonikus útvonal egyes elemei és az útvonalat szabályozó gének milyen mértékben metiláltak a GBM-P és GBM-R mintapárokban. A kanonikus Wnt útvonal regulációjában résztvevő gének promotere, mint például az ASPM (Assembly Factor For Spindle Microtubules), UBAC2 (Ubiquitin-associated domain-containing protein 2), KREMEN (Kringle Containing Transmembrane Protein) hipometilált a GBM-P mintákban a GBM-R mintákhoz képest. A Wnt7b, Wnt11 hipermetilált, míg a Wnt6 hipometilált volt a GBM-P-ben a GBM-R kohorthoz képest. A receptorok és ko-receptorok esetében az Fzd1, Fzd3, Fzd10, LRP6 és a ROR2 hipermetilált volt, Ryk pedig hipometilált szintén a GBM-P vs. GBM-R kohort összehasonlításban. A kanonikus útvonal intermedier molekulái közül az AXIN2 hipermetilált volt, az APC (Adenomatous Polyposis Coli Protein), DVL1, GSK-3 β , LEF1 esetében hipometiláltságot tapasztaltunk, míg a non-kanonikus útvonal intermedier molekulái közül a DAAM1 hipermetilált, az NLK (Nemo Like Kinase) hipometilált volt a GBM-P vs. GBM-R összehasonlításban (**11. Táblázat**).

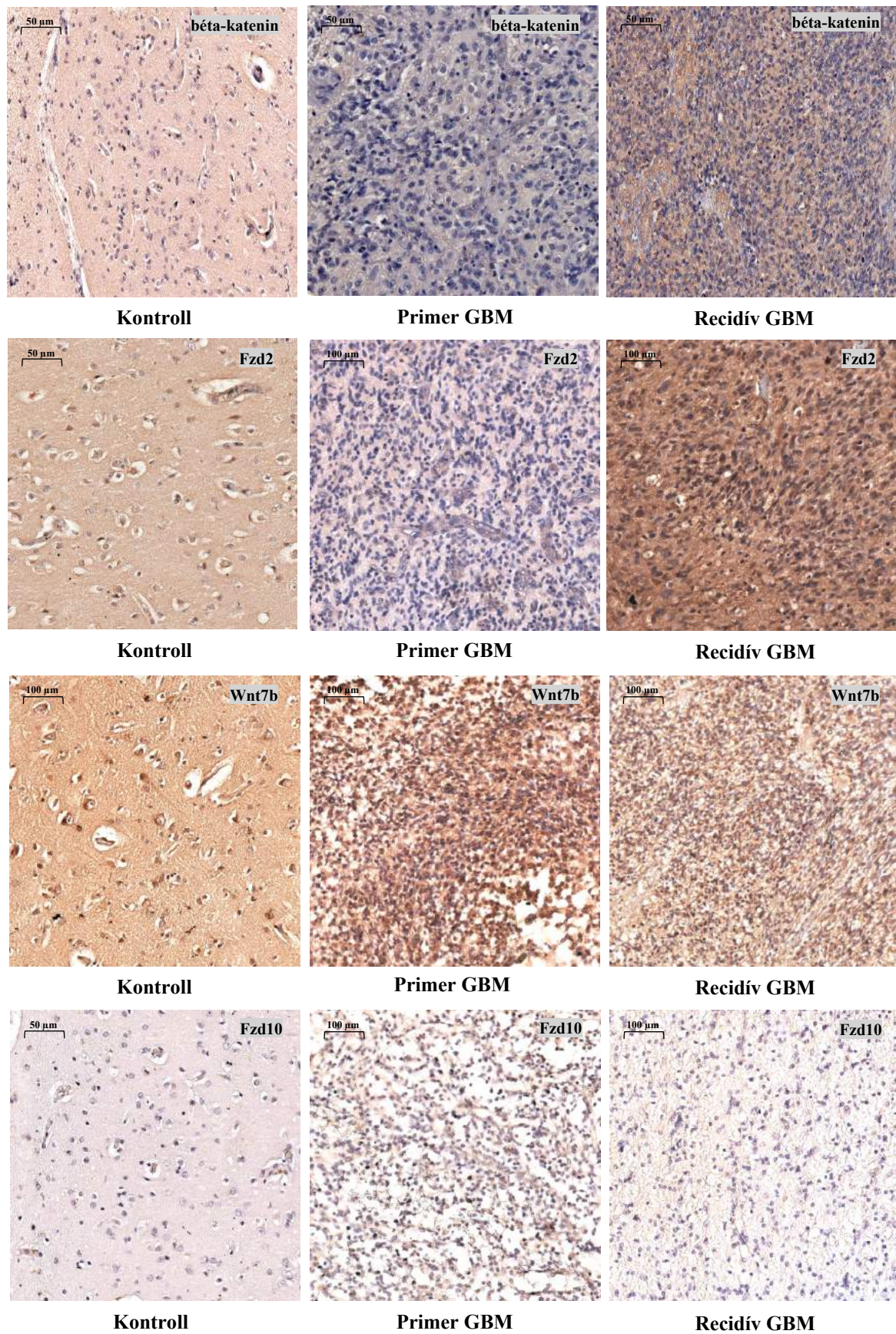
Gén név	A GBM-P és GBM-R közötti átlagolt metilációs mennyiségi különbségek (referencia a GBM-R)	p-érték
Ligandok		
WNT5A-AS1	0,035876789	0,045203637
WNT6	-0,063522517	0,004682226
WNT7B	0,361174242	1,83113E-07
WNT11	0,050134953	0,007675597
Receptorok/Ko-receptorok		
FZD1	0,050266551	0,033390294
FZD3	0,015233763	0,025245219
FZD10-AS1	0,129444497	0,002846416
FZD10	0,038540305	0,000421006
LRP6	0,134496371	8,7844E-06
RYK	-0,025986389	0,099676305
ROR2	0,128947164	0,002378599

Intermediér molekulák		
APC	-6,59295E-05	2,18823E-10
GSK-3 β	-0,000109043	0,013179114
LEF1	-0,025806452	6,19091E-07
AXIN2	0,006355158	0,001682212
DAAM1	0,030307392	0,000350737
NLK	-0,042816563	0,002709731
DVL1	-0,03305102	0,035001404
Inhibitorok		
ASPM	-0,000207609	8,70723E-06
UBAC2	-0,108446251	0,000964676
KREMEN	-0,166666667	1,13631E-05

11. Táblázat: A Wnt útvonal egyes elemeinek metilációs státusza a szekvenciális GBM mintapárok összehasonlítása alapján. Negatív: hipometilált / pozitív: hipermetilált a GBM-P kohortban a GBM-R kohorthoz képest.

A fenti adatokból és korábbi vizsgálatainkból kiindulva, a nagyfokú metiláltsági különbségük miatt a Wnt7b és az Fzd10 markerekkel egészítettük ki az általunk gliomákban már fentebb vizsgált négy Wnt markert (Wnt5a, Wnt3a, béta-katenin, Fzd2) a további részletes epigenomikai és IHC összehasonlító elemzéseinkhez (**25. Ábra**).

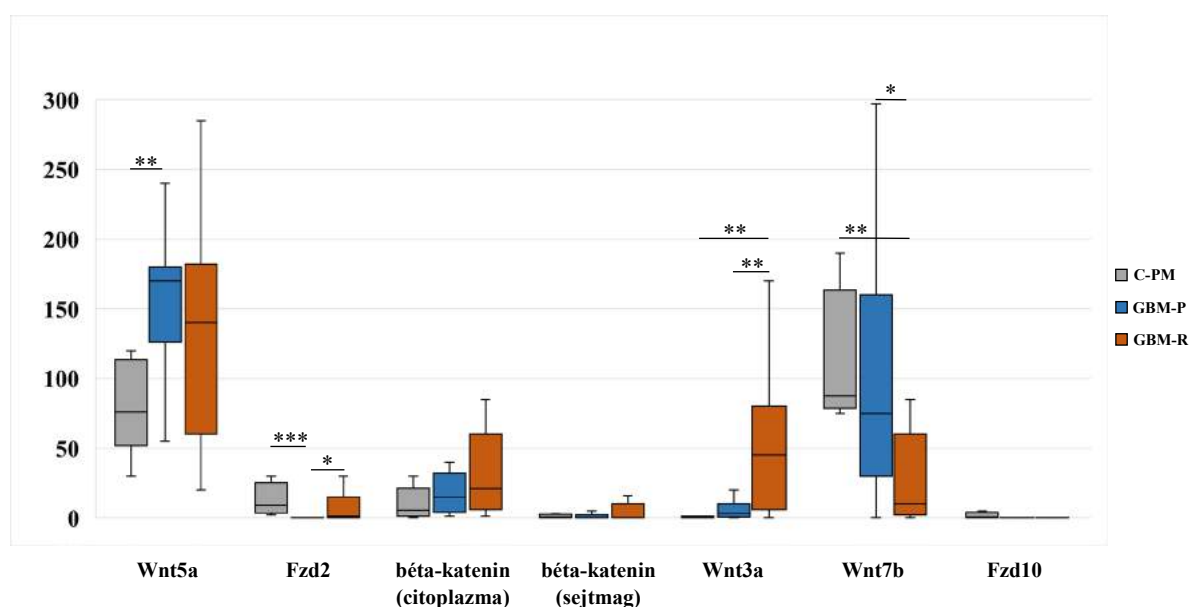




25. Ábra: *Reprezentatív IHC képek a szekvenciális epigenomikai tanulmány során vizsgált Wnt markerek festődéséről.*

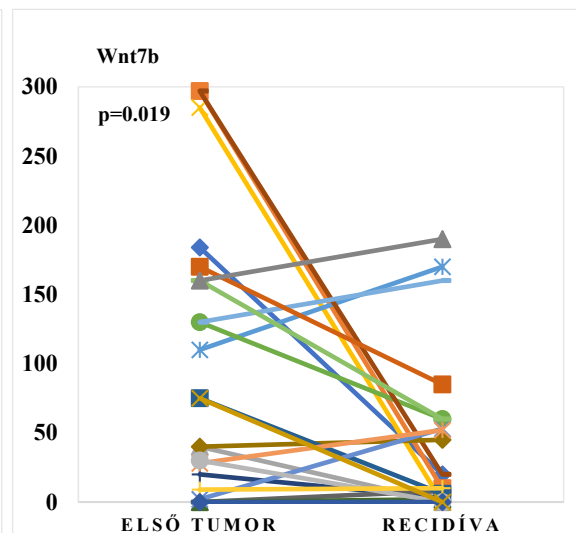
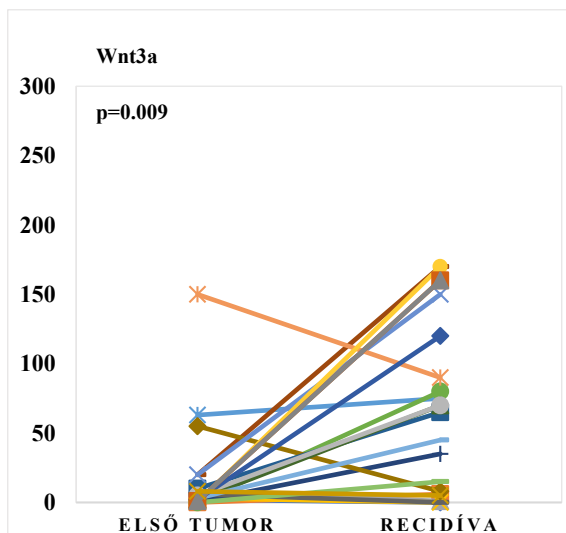
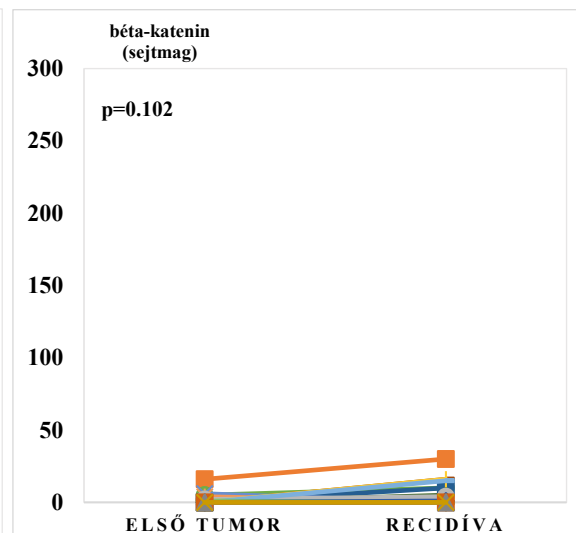
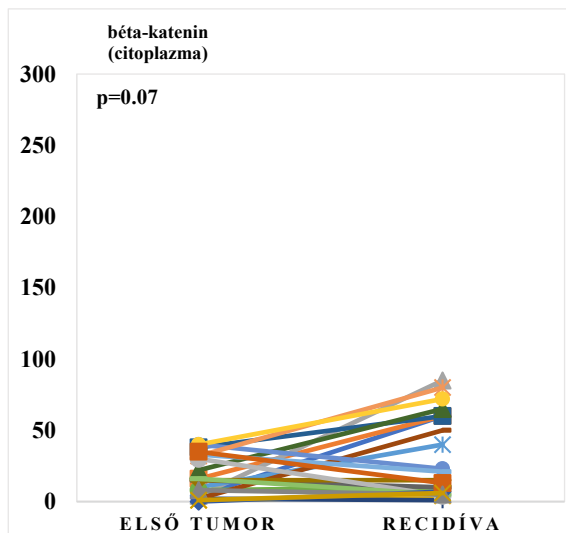
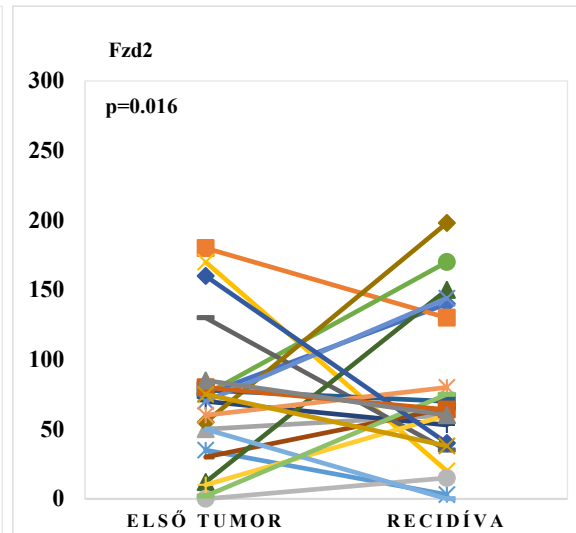
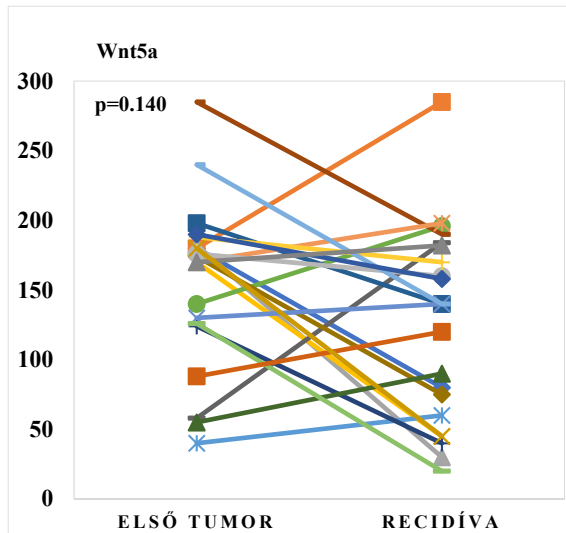
4.3.1. A Wnt markerek protein expressziós szintje a GBM mintapárokban és a kontroll mintákban

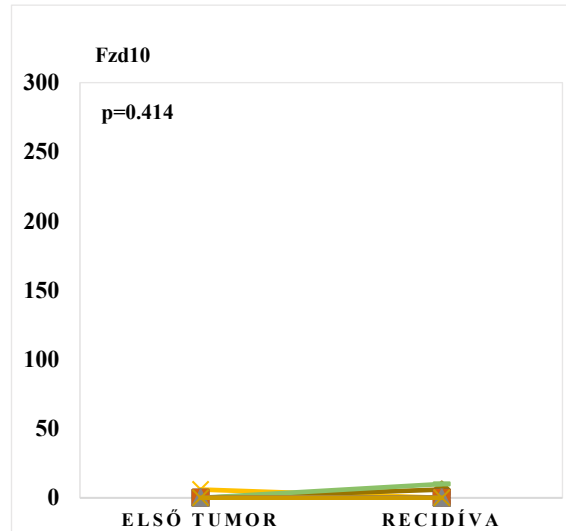
Növekedési trendet (citoplazmatikus és sejtmagi béta-katenin) vagy statisztikailag szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a GBM-P (Wnt5a $p=0.003$) és GBM-R (Wnt3a $p=0.003$) csoportokban a kontrollhoz (C-PM) képest, azonban mindegyik csoportban az Fzd10 expressziós szintje alacsony maradt. Továbbá szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető Fzd2 esetében a GBM-P-ben a C-PM-hez képest ($p<0.001$). A Wnt7b expresszió magas volt a C-PM csoportban, amelyhez képest kismértékű csökkenés volt megfigyelhető a GBM-P-ben és szignifikáns csökkenés a GBM-R-ben ($p=0.005$) (26. Ábra).



26. Ábra: A Wnt markerek expressziós mintázata a kontroll (C-PM), GBM-P és GBM-R csoport egyedeiben. A markerek egyedi mintákból nyert CS értékeinek mediánja és interkvartilis tartománya van feltüntetve (Mann-Whitney teszt (C-PM vs. GBM-P vagy GBM-R), illetve Wilcoxon páros elöljelteszt (GBM-P vs. GBM-R): * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$).

A Wnt markerek expressziós kifejeződésének egyedenkénti megjelenése során a Wnt5a, a sejtmagi béta-katenin és az Fzd10 fehérje expressziós irányának tekintetében nem volt egyértelmű emelkedő vagy csökkenő irány. Azonban a citoplazmatikus béta-katenin trendszerű növekedést, míg a Wnt3a ($p=0.009$) és Fzd2 ($p=0.016$) expresszió szignifikáns növekedést mutatott a progresszió során. Ezzel szemben a Wnt7b ($p=0.019$) esetében pont a fordított mintázatot és szignifikáns csökkenést tapasztaltuk. Végül az Fzd10 egyformán alacsony expresszióval fejeződött ki mindkét esetben (27. Ábra).





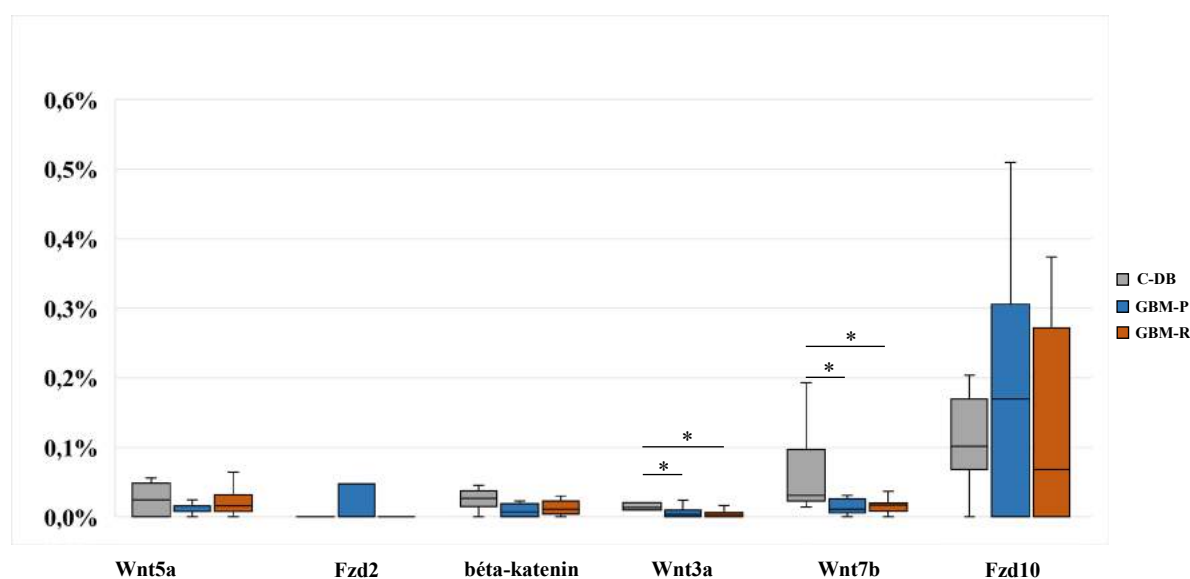
27. Ábra: A Wnt markerek expressziós mintázatának a változása egyedi GBM-P és GBM-R mintapárban. (Wilcoxon páros előjelteszt).

4.3.2. A Wnt markerek DNS CpG metilációs mintázata a promoter és gén régiókban a GBM mintapárokból és a kontroll mintákban

Az RRBS szekvenciák kohort szintű GO elemzése nem mutatott differenciális metilációt a Wnt útvonal génjeinek promoterében, amikor a C-DB és a GBM-P vagy C-DB és GBM-R csoportokat hasonlítottuk össze. Azonban szignifikánsan alacsonyabb metilációs szintet tapasztaltunk a kanonikus Wnt promoterekben a GBM-P kohortban a GBM-R kohorthoz képest [36]. Ezen eredmények nyomán vizsgáltuk meg a GBM kohortok egyedi mintáiban a szelektált Wnt markereink metilációs mintázatait (fehérje expresszióval is összehasonlítva).

Első lépésként meghatároztuk a Wnt5a, Fzd2, béta-katenin, Wnt3a, Wnt7b és Fzd10 markerek promoterének metilációs értékeit, azonban nem tudtuk a statisztikai elemzéshez elég CpG-ről információt nyerni az egyes mintákban az FFPE konzervációs technika következtében létrejövő DNS minőség csökkenés miatt. Ezért kiterjesztettük a vizsgálandó DNS szakaszt és bevontuk a promoter mellé magát a génrégiót is (**28. Ábra**). Amikor a promoter+gén metilációs arányokat a GBM-P és a GBM-R csoport egyedei között hasonlítottuk össze, nem találtunk szignifikáns különbséget egyik Wnt markerek esetében sem. Azonban erős trend jelleggel magasabb metilációt észleltünk a Wnt5a és béta-katenin, valamint szignifikánsan magasabb metilációs szintet találtunk a Wnt3a és Wnt7b markerek esetében a kontroll mintákban (C-DB) a GBM-P-hez képest (Wnt3a $p=0.028$; Wnt7b $p=0.015$), valamint a C-DB mintákban a GBM-R-hez képest (Wnt3a $p=0.012$; Wnt7b

$p=0.034$). Az Fzd2 és Fzd10 nem mutatott jelentős metilációs szintkülönbséget a csoportok között. Azonban az Fzd10 metilációs szintje mind a C-DB, mind a GBM-P és GBM-R mintákban kifejezetten magas volt a többi marker metilációs értékeihez képest. Ez a magas metilációs szint a primer és a recidív mintákban-összhangban volt az IHC-ban tapasztalt nagyon alacsony protein expressziós szinttel (26. Ábra). A Wnt5a, a béta-katenin és a Wnt3a CpG metilációjának tendenciális vagy statisztikai csökkenése a GBM-P és GBM-R mintákban a C-DB mintákkal szemben, megfelel ezeknek a markereknek a fokozott fehérje szintű expressziójának a tumorokban.

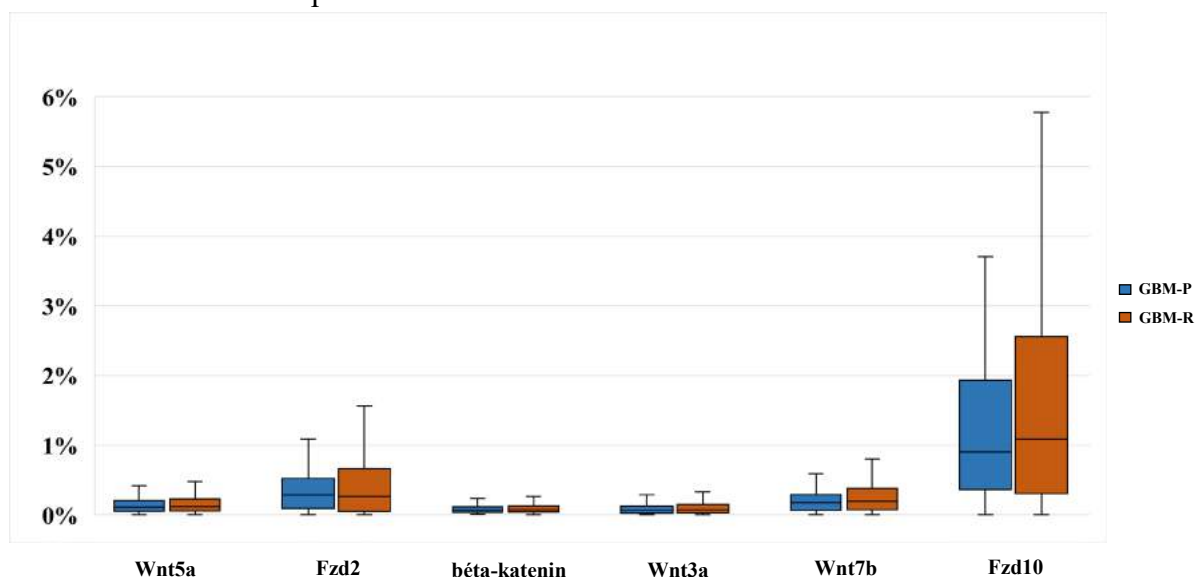


28. Ábra: A hat Wnt marker promotor+gén DNS CpG metilációs szintje a C-DB, GBM-P és GBM-R összehasonlításban. Az oszlopok reprezentálják az egyedi CpG metilációs százalékok medián értékét és interkvartilis tartományát. (Mann-Whitney teszt (C-PM vs. GBM-P vagy GBM-R), illetve Wilcoxon páros előjelteszt (GBM-P vs. GBM-R): * $p < 0.05$).

4.3.3. A Wnt markerek CpG metilációs szintje a promotor és gén régiókban az adatbázis szekvenciális GBM kohort egyéni mintáiban

Megfigyeléseink további megerősítése érdekében ugyanazt a hat Wnt promotor+gén régiót megvizsgáltuk Klughammer et al. [35] egy adatbázisba feltöltött és nyilvánosan is elérhető adataiban (<https://www.ebi.ac.uk/ena>, hozzáférési szám: EGAS00001002538). Ez a kutatócsoport szintén RRBS könyvtár szekvenálást alkalmazott szekvenciális FFPE GBM mintákon. Annak ellenére, hogy C-DB (kontroll) mintákat ebből a kutatási anyagból kaptuk, a kiértékelések és összehasonlítások során arra a következtetésre jutottunk, hogy a DNS CpG metilációjának egyedi összevetése az öt kontroll és az adatbázisban elérhető 112 GBM mintapár között a hat Wnt marker esetében torzításokat eredményezhet, ezért csak a GBM mintapárok DNS CpG-metilációs szintjének összehasonlítására használtuk az

adataikat (29. Ábra). (Az általunk használt script annál több CpG-ről ad információt egy adott régióban, minél nagyobb a vizsgált kohort. Ezért okozhatott volna torzított kimenetelt a jelentősen különböző méretű C-DB és GBM kohort összehasonlítása). Az adatbázisból nyert GBM-P és GBM-R összevetés során (29. Ábra) hasonlóan saját eredményeinkhez (28. Ábra) a következő tendenciák figyelhetők meg: 1) Az általunk vizsgált hat Wnt marker közül itt is az Fzd10 esetében tapasztaltuk a legmagasabb metilációs szintet; 2) A primer és a recidív kohort összehasonlításakor szintén nem tapasztaltunk különbséget a GBM-P és GBM-R csoportok között.



29. Ábra: A hat Wnt marker promoter+gén DNS CpG metilációs szintje az adatbázis primer és recidív GBM tumorainak egyedi mintáiban [35]. Az oszlopok reprezentálják a CpG metilációs százalékok medián értékeit és interkvartilis tartományait. (Wilcoxon páros előjelteszt [GBM-P vs. GBM-R]).

4.3.4. A Wnt markerek CpG metilációs szintje a gén enhancer régiókban a tanulmány és az adatbázis szekvenciális GBM kohort egyéni mintáiban

A fenti fehérje expressziós és promoter+gén CpG metilációs vizsgálatok eredményeinek összevetése során csak részleges negatív korrelációt tapasztaltunk. Ebből arra következtettünk, hogy a promoter+gén régiókon kívül eső szabályozó régiók metilációs változásai, vagy a CpG metilációtól eltérő mechanizmusok is hozzájárulhatnak a Wnt fehérjék expressziós változásaihoz. Kiegészítésként így megvizsgáltuk a hat Wnt marker enhancer régióinak metilációs mintázatait is, először a 6 C-DB-ben és a 21 GBM párban, majd az adatbázis 112 GBM mintapárjában. A formalin DNS károsító hatása következtében az RRBS alapú biszulfid szekvenálás rövid DNS szegmentekben vagy egyedi CpG helyeken, különösen egyedi mintákban, korlátozott CpG metilációt információt ad. Ezért nem volt meglepő, hogy nem kaptunk elég megbízható adatot az

enhancerek CpG metilációs mintázatáról a saját, 21 GBM-P és GBM-R párból álló kohortban. Azonban amikor az adatbázis 112 GBM-P és GBM-R mintapárjában vizsgáltuk meg a Wnt gének *cis* pozícióban levő enhancer régióit, azt találtuk, hogy a Wnt7b GH22J045611, Fzd10 GH12J130124 és Fzd10 GH12J130138 GeneHancer kódú enhancerek emelkedett metilációt mutattak a többihez képest, valamint e három enhancer metilációja magasabb volt a GBM-R-ben mint a GBM-P-ben.

5. Megbeszélés

A GBM egy rendkívül súlyos és végzetes kimenetelű agytumor. Számos kutatócsoport nagy konzorciumok keretein belül jelentős erőfeszítést tett a GBM jellegzetes molekuláris változásainak, mutációinak és metilációs profiljának a meghatározására, annak érdekében, hogy leírják a tumor etiológiáját és hogy potenciális terápiás beavatkozási célpontokat azonosítsanak. A GBM epigenomikai, genomikai és fehérje expressziós szinten is rendkívüli heterogenitást mutat. Biológiáját és viselkedését számos útvonal szabályozza. Ezek közül kiemelkedik az utóbbi évtizedekben jobban megismert, de még mindig nem teljesen megértett Wnt útvonal. A Wnt útvonal elemei magasan expresszálódnak és fontos szerepet játszanak az embrionális fejlődésben. Felnőtt korban az útvonalat alkotó fehérjék expressziója jelentős mértékben visszaesik, azonban elemei újra aktiválódnak és erős kifejeződést mutatnak számos neurodegeneratív betegségben, valamint a daganatok patogenezise során. Tanulmányunk során arra kerestük a választ, hogy a Wnt útvonal milyen szerepet játszik a gliomák és a GBM kialakulásában, fennmaradásában, terjedésében és progressziójában. Egyben próbáltuk felmérni, hogy e molekulák és útvonalak szolgálhatnak-e új terápiás célpontként. A kontroll minták megválasztása során számos problémába ütköztünk. Mint például: 1, Normál agyszövet műtéti eltávolítása és kontrollként alkalmazása etikai okokból nem megengedett. 2, A post mortem normál agyszövet a műtéti tumorra szemben biológiai módosulásoktól szenved. 3, A normál agyszövet kiérett sejtek heterogén populációja a tumor klonális természetével szemben, az epilepsziás agyszövetben a rohamok okozta patológiás és epigenomikai elváltozás is jelen lehet. A fent szempontokat figyelembe véve kiegészítő kísérletekkel igyekeztünk minimalizálni, és a tumor-specifikus mintázatokat a nem tumoros agyi mintázatok háttéréből próbáltuk azonosítani, mint ahogy hasonló humán tanulmányokban tapasztalható [25, 35, 65]. Vizsgálatainkat több kohortban végeztük.

5.1. A Wnt markerek expressziós mintázata a gliomák grádusa, eredete és molekuláris markerei szerint

Első lépésként megvizsgáltuk, hogy az általunk kiválasztott Wnt markerek (Wnt5a, Wnt3a, Fzd2, béta-katenin) expressziója miként változik a normál agyhoz képest a glioma grádus előrehaladtával. Tanulmányunk során arra a következtetésre jutottunk, hogy egy fokozatos növekedés tapasztalható a grádus előrehaladtával (**5. és 6. Ábra**), annak ellenére, hogy a II és III-as grádusú gliomák mintaelemszáma viszonylag kicsi volt (9 II-es és 10 III-as grádusú), illetve a kontroll mintaként (8 darab) csak post-mortem agyból származó szövetet

tudnunk felhasználni. A II-es és III-as grádusú gliomák összehasonlításakor nem találtunk szignifikáns Wnt marker expresszió eltérést, ezért egyes elemzésekben összevontuk ezeket. Amikor az összevont II+III grádust (19 darab) hasonlítottuk össze a IV-es (GBM) grádussal (72 darab), a Wnt5a és Wnt3a szignifikánsan emelkedett expressziót mutatott, ellentétben a többi Wnt markerrel. Hasonló megfigyeléseket közölt Pu et al. [69] és Denysenko et al. [70] korábbi kísérleteik során, miszerint a Wnt5a és a Wnt3a expressziója a normál agyban a legalacsonyabb és növekszik a grádus előrehaladtával [69, 70]. Egyes publikációk azt közölték, hogy a GBM-re jellemző a magas citoplazmatikus béta-katenin expresszió [69-71], azonban mi ennek az ellenkezőjét tapasztaltuk. Az eltérésre az egyik lehetséges magyarázat az, hogy a magas grádusban a béta-katenin transzlokálódik a sejtmagba, ezáltal alacsonyabb expressziót mutat a citoplazmában [72]. Egy másik lehetséges magyarázat pedig az alacsony mintaelemszám torzító hatásával állhat összefüggésben. Összességében azonban elmondható, hogy a normál agyban és a II-IV grádusú gliomákban a Wnt marker expressziójára vonatkozó adataink jelentős részben megegyeznek az irodalomban közölt eredményekkel. A grádus előrehaladása, vagyis a tumor progressziója mellett, a gliomák eredete (oligodendroglialis vagy asztrocitikus) is befolyásolhatja, hogy a tumorsejtekben mely útvonalak és molekulák fejeződnek ki és milyen mutációk halmozódnak fel.

Feltételezéseink szerint a Wnt útvonalnak eltérő az aktivitása a két glioma vonalban, azonban nagyon kevés olyan tanulmány létezik, amely ezt a kapcsolatot vizsgálta. Vizsgálataink során csak a Wnt5a esetében tapasztaltunk szignifikánsan magasabb expressziót a 8 darab asztrocitikus eredetű mintában a 11 oligodendroglialishoz képest (**8. Ábra**). Denysenko et al. [70] azonban a Wnt3a és a citoplazmatikus béta-katenin nagyobb expresszióját írta le az asztrocitikus útvonalban [70]. Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy van különbség a két glioma vonal Wnt expressziója között, azonban az inter- és intratumor GBM heterogenitás miatt nagyobb kohortok vizsgálata alapján lehet egyértelműen felfedni, hogy melyik glioma vonalban, melyik Wnt alútvonal a domináló.

5.2. A Wnt markerek kifejeződése az IDH-1 R132H/C mutáns és a vad típusú gliomákban

A GBM-ben kialakuló mutációk átfogó meghatározását elsőként a TCGA végezte el [14]. A konzorcium később a genomikai és transzkriptomikai adatok integrált elemzésével meghatározta a GBM molekuláris alcsoportjait, melyeknek a klasszikus (kulcsmarkere az EGFR amplifikáció és az EGFRvIII mutáció), a mesenchymalis (kulcsmarkere az NF-1

deléción vagy mutáció) és a proneurális (kulcsmarkere az IDH-1/2 mutáció) nevet adták [21]. A WHO 2016-os revíziójában javasolta az IDH-1 mutációs státusz meghatározását, mint elsődlegesen elvégzendő tesztet a gliomák molekuláris vizsgálataiban [24]. Az IDH klinikai kulcsfontossága miatt a különböző grádusú gliomákban megvizsgáltuk az IDH mutáció és a Wnt útvonal közötti lehetséges kapcsolatokat. Az első összehasonlítás során, ahol a 15 darab IDH-132H mutáns és 4 darab vad típusú betegek Wnt marker CS értékeit vizsgáltuk az összevont II-III-as grádusú gliomák esetében, nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a Wnt marker expresszió tekintetében, azonban a Wnt5a, Fzd2 és béta-katenin citoplazmatikus és sejtmagi festődése is emelkedett szintet mutatott a mutációval rendelkezőknél, míg a Wnt3a esetében nem találtunk markáns különbséget. Ugyanezt az összehasonlítást elvégezve a GBM-ben (7 minta IDH-1 R132H/C mutáns és 74 vad típus), a minden általunk vizsgált Wnt marker tendenciális jelleggel emelkedett szintet mutatott a mutációval rendelkezőknél (**22. Ábra**). Feltételezve, hogy az IDH mutációja erősebb hatással van a Wnt marker expresszióra, mint a grádus, ezért összevontuk mindegyik grádusban szereplő 22 darab IDH mutáns és 69 darab vad típusú mintát. Az Fzd2 és béta-katenin sejtmag továbbra is magasabban expresszáldott a mutáns csoportban, azonban az összevont elemzés során a Wnt3a expressziója szignifikánsan nagyobb volt a vad típusú csoportban a mutánséhoz képest (**10. Ábra**). Elmondható tehát, hogy Wnt útvonal aktivitása rendkívül komplex és változatos megjelenésű a különböző grádusú IDH-1 pozitív gliomák esetében [73, 74], azonban eredményeink alapján a Wnt útvonal aktivitása magasabb az IDH mutációval rendelkező betegnél a vad típussal szemben. Megfigyeléseinket Huang et al. [67] munkája is alátámasztja, ahol megállapította, hogy a kanonikus Wnt útvonal magas kifejeződéssel rendelkezik a proneurális alcsoportban [67], azonban ellenkezik Kim et al. [65] által leírtakkal, ahol azt találták, hogy a Wnt5a expressziója független az IDH-1 státuszától. Továbbá Cui et al. [66] arról számolt be, hogy az IDH-1 R132H mutáció jelenléte fordított összefüggésben van a béta-katenin sejtmagi expressziójával [66]. Tanulmányában az IDH-1 mutáció szignifikánsan csökkentette a kanonikus Wnt/béta-katenin jelátviteli aktivitását a GBM sejtvonalakban, mert az IDH-1 mutáció következtében erősebben aktiválódtak a Wnt útvonal egyes komponenseinek negatív regulátorai (pl. DKK1 és APC), mindemellett a mutáció csendesítette az útvonal több effektor és célmolekuláját is (pl. béta-katenin, TCF4/LEF1) [66]. Az egyik elképzelhető magyarázat az eltérő megfigyelésekre az, hogy az utóbb említett munka során *in vitro* sejtvonalakkal dolgoztak, amelyekből hiányzik a tumor komplex mikrokönyezete, illetve számos egyéb szignálútvonal, amely befolyásolhatja a Wnt útvonal működését és kifejeződését, valamint

interakcióját egyéb szignálkaskád rendszerben szerepet játszó molekulával. Azonban a TCGA adatai alapján a TCF4 TF (a kanonikus útvonal egyik céleleme) emelkedett szintet mutat a proneurális alcsoportban, amely egyetértésben van azzal, hogy az IDH-1 mutáció nem csökkenti, hanem inkább növeli a kanonikus Wnt útvonal aktivitását [14, 37]. Egy harmadik lehetséges magyarázat, hogy a FoxM1 (Forkhead box protein M1) fehérje túlműködése figyelhető meg a p53 expressziót vesztett IDH-1 mutáns proneurális alcsoportban. A FoxM1 kulcsszerepet játszik a béta-katenin citoplazmából a sejtmagba való transzlokációja során [75]. Tehát a tanulmányunkban detektált magas citoplazmatikus és sejtmagi béta-katenin szint az IDH-1 mutáns GBM-ben, az *in vivo* komplex környezet és az előbb említett egyéb szignálútvonallal (pl. Notch) való kölcsönhatás eredménye lehet [76]. Az előzőleg ismertetett eredmények alapján is látható, hogy a szakirodalmi adatok is erősen megosztottak az IDH mutáció és a Wnt útvonal expressziója közötti kapcsolatáról, amelyet tovább bonyolít az, hogy az egyes Wnt markerek milyen módon változnak a glioma grádusától és feltehetően a tumor mikrokozonyezettől függően.

5.3. A Wnt markerek protein kifejeződése a GBM molekuláris alcsoportjaiban

A kérdés klinikai relevanciája miatt, megvizsgáltunk egy nagyobb, csak GBM tumorból álló csoportot, amit kohort-1-nek neveztünk, ahol az IDH-1 mutáns proneurális alcsoport mellett, a klasszikus és a mesenchymalis alcsoportot is bevonva elemztük a Wnt útvonal expressziójának a mintázatát. Továbbá a szekvenciális mintákat tartalmazó kohort 2-ben (ugyanattól a betegtől származó primer és recidív minta), és a post mortem mintákból álló kohort 3-ban is megvizsgáltuk a Wnt markereink kifejeződésének mértékét (lásd Anyag és módszer 3.2.3, Eredmények 4.2.).

A kohort 1-ben (81 keresztmetszeti minta) elkülönítettük a GBM molekuláris alcsoportjait, klinikai rutindiagnosztikai környezetben IHC technika és a legjellemzőbb markerek felhasználásával. A TCGA által is megállapított alcsoportok százalékos megoszlásához nagyon hasonló eloszlási eredményt tapasztaltunk a munkánk során [21] (**14. Ábra**). Egybevégezőan a korábban leírt megfigyelésekkel az IDH-1 R132H mutációval rendelkező, proneurális alcsoportba tartozó 7 beteg a legfiatalabb, míg a citoplazma és sejtmagi NF-1 expressziót elvesztő mesenchymalis alcsoportba sorolt 15 beteg a legidősebb volt. Az IDH-1 mutáns tumorú betegek túlélése volt a leghosszabb, míg az NF-1 expressziót vesztett tumorúaké a legrövidebb. A klasszikus alcsoport EGFRvIII mutáns 27 beteg életkora szignifikánsan nem különbözött a vad típussal rendelkezőektől, illetve a teljes túlélésük a két előbb említett csoport közé esett [21, 23, 77] (**15. és 16. Ábra**). Fontos kiemelni, hogy

a GBM kialakulásában nem csak az alcsoportra legjellemzőbb markerek és útvonalak vesznek részt, hanem számos egyéb kulcsfontosságú szignáltranszdukciós kaszkád is, mint például a Wnt útvonal. A Wnt bizonyítottan hozzájárul a tumor fennmaradásához, terjedéséhez és progressziójához, illetve bizonyos terápiás kezelések elleni rezisztencia kialakításához [59, 60]. Ezeknek a kapcsolatoknak a jobb megértése érdekében megvizsgáltuk a GBM különböző alcsoportjaiban a kanonikus és non-kanonikus Wnt útvonal expressziójának mértékét és mintázatát. Kutatásunk során meglepő módon nem találtunk az általunk vizsgált Wnt markerek kifejeződésében szignifikáns különbségeket a GBM molekuláris alcsoportjai között (**17. Ábra**), azonban az alcsoportokon belül viszont jelentős eltéréseket tapasztaltunk a kanonikus (Wn3a és béta-katenin) és non-kanonikus (Wnt5a és Fzd2) Wnt útvonal markereinek megoszlásában (**18. 19. 20. 21. Ábra**).

Megvizsgálva a GBM alcsoportjaiban a Wnt markerek kifejeződését, eredményeink alapján főként a non-kanonikus útvonal járul hozzá a GBM biológiájához.

Az IDH mutáns betegeket tartalmazó proneurális alcsoportban (**18. Ábra**) a non-kanonikus útvonal Wnt5a ligandja szignifikánsan magasabban expresszálódott a kanonikus útvonal Wnt3a ligandjánál. Az előző bekezdésben ismertett szakirodalmi eredmények alapján egyes kutatók kiemelték, hogy az IDH-1 R132H mutáció jelentős csökkenést okoz a gliomák proliferációs, migrációs és invazív potenciáljában a Wnt/béta-katenin szignalizáció, vagyis a kanonikus útvonal visszaszorításának következtében [66]. Mások azonban azt találták, hogy a kanonikus Wnt útvonal magas aktivitása figyelhető meg az IDH-1 R132H mutációra jellemző proneurális alcsoportú GBM-ekben [67, 73]. Összességében megállapítható, hogy a Wnt útvonal és az IDH mutáció között van kapcsolat, amelyet *in vitro* és állatkísérletekkel is megerősítettek [74], azonban jelenleg nem tisztázott még ezen kapcsolat iránya. Mivel az IDH-1/IDH-2 génmutációk következtében kialakuló onkometabolit a D2HG direkt módon és teljes genom szinten befolyásolja a DNS CpG metilációs mintázatokat [25, 26], és a Wnt markerek elsősorban epigenomikai szabályozás alatt állnak, ennek a kérdésnek a további vizsgálata egy fontos iránya jövőbeli kutatásainknak.

A Wnt két alútvonala között a legmarkánsabb különbséget az NF-1 c-/m- (citoplazma és sejtmagi expressziót vesztett) dupla negatív fenotípusú, mesenchymalis alcsoportban írtuk le (**19. Ábra**). A non-kanonikus útvonal általunk vizsgált Wnt5a és Fzd2 markere lényegesen erősebb mértékben expresszálódott, mint a kanonikus kaszkád Wnt3a és béta-katenin fehérjéje. A TCGA és számos egyéb publikáció eredménye alátámasztja azon

megfigyelésünket, hogy a Wnt5a túlműködése figyelhető meg a mesenchymalis alcsoportban [21, 60]. A Wnt5a ligand egymagában képes növelni a tumor agresszivitását és invazivitását a GSC-k képzésével és modulálásával [59, 60, 62]. Bhat et al. [78] a non-kanonikus Wnt/Ca²⁺ útvonal fontos TF-ának, az NF-κB-nek fokozott aktivitását találta a besugárzással szemben fokozott rezisztenciát mutató tumorokban, rosszabb prognózissal és rövidebb túlélési idővel társulva [78]. Fontos megemlíteni azonban, hogy a Wnt ligandoknak és az intermedier fehérjéknek a tumorsejtekre gyakorolt hatása nagymértékben függ mind az intra-, mind az intercelluláris folyamatok összességétől. Például *in vitro* körülmények között a Wnt5a a béta-katenin independens (non-kanonikus) útvonalon keresztül növeli a melanoma invazivitását és agresszivitását, míg a kolorektális tumorok estében a béta-katenin dependens (kanonikus) szignálon keresztül fejt ki ugyanezeket a hatásokat [79]. Továbbá a Wnt5a képes az Fzd6 (mind a kanonikus, mind a non-kanonikus útvonal receptora) és az Fzd2 expresszióját növelni autokrin módon, majd ezek a receptorok facilitálják a Wnt5a szintjének emelését, ezzel egy pozitív visszacsatolási hurkot létrehozva [67].

A klasszikus alcsoporra jellemző a kisebb mértékű agresszivitás, valamint EGFRvIII pozitivitás és EGFR túlműködés. Eredményeink alapján Wnt5a és Fzd2 vagyis non-kanonikus útvonal túlműködés figyelhető meg a kanonikus útvonallal szemben, ebben az alcsoportban is (**20. Ábra**). Egyes tanulmányok korábban már vizsgálták az EGFR és a Wnt útvonal közötti kapcsolatot [37, 79, 80]. Puliappadamba et al. [81] kimutatta, hogy GBM-ben a non-kanonikus útvonal TAK1 (TGFβ-activated kinase-1) és NEMO (NFκ-B essential modulator) elemei fontos szerepet játszanak az EGFRvIII mediált tumor kialakulásában az NF-κB TF aktiválásán keresztül [81]. Ezzel szemben, Hu és Li [79] leírta, hogy a kanonikus útvonal intermedier molekulája a béta-katenin és az EGFR képesek aktiválni vagy éppen inaktiválni egymás regulatorikus elemeit. Továbbá megfigyelték, hogy az EGFR mutáció és a metilálatlan Wnt antagonistá gének összefüggésben állnak a kedvező prognózisú kissejtes tüdőrákkal, ezzel szemben emésztőrendszeri daganatok esetében az EGFR szignál útvonal egyes elemei szinergista hatásban állnak a Wnt fehérjékkel, részt vesznek a daganat formációjában és progressziójában [79]. Az EGFRvIII a kanonikus útvonal aktivitását növelheti bizonyos körülmények között, de például a caveolin-1 fehérje gátolja az EGFR facilitáló hatását a béta-kateninre [82], amely eredményezhette a tanulmányunkban tapasztalt csökkent citoplazmatikus és sejtmagi béta-katenin szintet. A szakirodalmi adatok és saját kutatásunk

alapján is leírható, hogy a Wnt útvonal és az EGFR és EGFRvIII jelátviteli útvonallal kapcsolata rendkívül komplex (akárcsak az IDH-1 mutációs és Wnt kapcsolat) és feltehetően a tumor sejtből és mikrokozonyzetében található számos molekulamoduláló hatással van erre a kapcsolatra.

A Nem besorolt alcsoportba tartozott azon 31 beteg, akik nem hordoztak sem IDH-1, sem EGFRvIII mutációt vagy NF-1 expresszióvesztést. A tanulmányunkban, akárcsak a TCGA konzorcium korábbi eredményei alapján, ennek az alcsoportnak a Wnt expressziós mintázata nagymértékben megegyezett a klasszikus alcsoportéval, feltehetően az EGFR (túl)expresszióknak köszönhetően [21] (**21. Ábra**). Gong és Huang [75] megfigyelésével egyetértésben alacsony sejtmagi béta-katenin szintet detektáltunk. Tanulmányuk során a TCGA adatait elemezték és azt találták, hogy a FoxM1 expressziója ebben az alcsoportban volt a legalacsonyabb a másik háromhoz képest. A FoxM1 hiánya vagy kismértékű kifejeződése magyarázhatja, miért tapasztaltuk a béta-katenin alacsony szintjét a sejtmagban [75].

Az intratumor heterogenitás miatt az alcsoport meghatározó markerek expressziója többnyire jelentősen a 100% alatt volt a ROI-ban. Ezért, egy kiegészítő elemzésben megvizsgáltuk külön azokat a mintákat, ahol az alcsoport meghatározó markerek megjelenése meghaladta az 50%-ot. Ez a „gazdagítás” nem változtatta meg a Wnt markerek eloszlását és nem növelte a statisztikai különbségeket az alcsoportok között. Az alcsoport meghatározó markerek további százalékos dúsításának nem volt statisztikai értelme a mintaelemszám jelentős lecsökkenése miatt.

Korábban már említettük, hogy a kanonikus és non-kanonikus Wnt markerek kifejeződése közötti legmarkánsabb különbséget (az eredeti és „gazdagított” csoportban is) az NF-1 c-/m-, mesenchymalis alcsoportban tapasztaltuk. Ezért ebben az alcsoportban külön megvizsgáltuk a Wnt markerek expressziós aktivitását a különböző NF-1 festődési mintázatokkal (c+/m-; c-/m+; c+/m+; c-/m-) összefüggésben. Az alacsony mintaelemszám miatt a 4 darab c-/m+ és a 19 darab c+/m+ („patológiás”) csoportot összevontuk, hogy növeljük a statisztikai erőt, illetve képeztünk egy 19 darabból álló c+/m- („normál”) és 15 darabot tartalmazó c-/m- dupla negatív mintázatu csoportot (**23. Ábra**). Az egészséges sejtekben, illetve a GBM sejtek kis hányadában az NF-1 csak citoplazmatikus expressziót mutat (c+/m-). A GBM tumorban az NF-1 gén áteshet bizonyos mutációkon és/vagy deléciókon, amelyek a fehérjetermék transzlokációját a sejtmagba (c-/m+ és c+/m+), vagy a termék teljesen elvesztését (c-/m-) eredményezi. Az NF-1-hez hasonlóan a béta-katenin

normál sejtekben főként citoplazmatikusan található meg, de daganatos sejtekben az aberránsan működő kanonikus Wnt útvonal, valamint a citoplazmában való felhalmozódás következtében transzlokálódhat a sejtmagba. Érdekes jelenséget tapasztaltunk, amikor az NF-1 és a béta-katenin festődési mintázatát hasonlítottuk össze (**23. Ábra**). A béta-katenin sejtmagi megjelenése abban a csoportban volt a legalacsonyabb, ahol az NF-1 „normál” (c+/m-) megjelenésű volt, míg a „patológiás” (kombinált: c-/m+ és c+/m+; c-/m-) NF-1 festődés esetén emelkedett sejtmagi béta-katenin szintet tapasztaltunk. Az NF-1 egy erős tumorsuppresszor, mutációja növeli a daganatok agresszivitását és invazivitását az EMT átalakuláson (epithelial–mesenchymal transition) keresztül. A béta-katenin magi szintje korrelál az EMT-t facilitáló fehérjékkel (pl. Snail, Slug, Twist1, ZEB1) [59, 75]. Feltételezéseink szerint azokban a GBM tumorokban, ahol az NF-1 c+/m- megjelenésű és a béta-katenin sejtmagi szintje alacsony, az EMT bekövetkezésének a valószínűsége kisebb, mint az előbb említett „patológiás” NF-1 festődésű és magas sejtmagi béta-katenin szintű csoportokban. Az ilyen NF-1 c+/m- és citoplazmatikus béta-katenin profilú tumorok biológiailag valószínűleg kevésbé agresszívek.

Az előző vizsgálatokban a Wnt markerek különbségeit tanulmányoztuk az alcsoportok között és azon belül is, de végeztünk egy másfajta megközelítést is. A GBM mind a három alcsoportjában korreláltuk a Wnt és az alcsoport meghatározó markerek CS értékét. Nem találtunk szignifikáns összefüggést sem a proneurális IDH-1 R132H mutációt, sem a mesenchymalis NF-1 expressziót vesztő alcsoportok és a Wnt markerek CS értéke között, azonban a klasszikus alcsoportban a non-kanonikus útvonal Fzd2 receptora és az EGFRvIII szignifikánsan korrelált. Továbbá erős tendenciális jelleggel a Wnt5a és Fzd2 CS értéke korrelált egymással az EGFRvIII mutáns alcsoportban, amely tovább erősíti az emelkedett EGFR/EGFRvIII mutáció és non-kanonikus Wnt útvonal közötti kapcsolatot.

Szintén megvizsgáltuk a Wnt markerek expressziója közötti különbségeket a GBM molekuláris besorolástól függetlenül a teljes kohort 1-ben. A Wnt5a szignifikánsan korrelált az Fzd2-vel és a sejtmagi béta-katenin szintjével. A Wnt5a legjellemzőbben a Fzd2 receptorhoz kapcsolódik [37, 83]. A korábbi GBM publikációkhoz hasonlóan az egész kohort 1 betegpopulációban emelkedett szintet mutatott a Wnt5a és az Fzd2 [57, 63]. A korreláció a Wnt5a és a béta-katenin sejtmagi expressziója között meglepő volt, de fontos megemlíteni, hogy a kanonikus és a non-kanonikus Wnt útvonal nem különül el egymástól teljesen. Számos Wnt ligand képes aktiválni egyaránt a kanonikus és non-kanonikus útvonalat is, amelyet elsősorban és feltehetően a biológiai körülmények

alakítanak ki. Például a Wnt3a (kanonikus útvonal aktivátor) ligand medulloblastomában gátolja a sejtproliferációt a non-kanonikus útvonalon keresztül, míg a Wnt7a (non-kanonikus útvonal aktivátor) képes a kanonikus útvonalat iniciálni a petefészekrákban [37]. A GBM-ben a kanonikus és non-kanonikus útvonal közötti lehetséges kommunikációról és átfedésről e vizsgálatok eredményein kívül jelenleg még nincs adat a szakirodalomban. Megvizsgáltuk a teljes túlélési idő és a Wnt markerek CS értéke közötti lehetséges összefüggéseket, azonban nem tapasztaltunk semmilyen korrelációt. Az összefüggés hiánya eredhetett a statisztikai erő alacsony szintjéből, a markerek expressziós mintázatának a nagyfokú variabilitásából, vagy abból, hogy a Wnt útvonalnak önmagában nincs nagy hatása a klinikai paraméterekre.

A kohort 2-ben (19 tumor 8 betegtől) a Wnt markerek expressziójának mértékét vizsgáltuk primer és recidív (szekvenciális) GBM mintapárokban. A szakirodalom alapján emelkedett Wnt expressziót vártunk a recidívában a primerhez képest, mivel a recidívákban a GSC-k emelkedett számban találhatóak, amelyek fokozott Wnt aktivitással társulnak [37, 84, 85]. Eredményeinkben inkább komplex mintázatot, mintsem egyértelmű emelkedést vagy csökkenést tapasztaltunk, amely arra enged következtetni, hogy Wnt ligandok és receptorok egy komplex és összetett mintázatban expresszálódnak a tumor progressziója során.

A kohort 3-ban olyan nyolc post mortem mintában vizsgáltuk a Wnt markerek expressziós szintjét, ahol egy betegtől rendelkezésünkre állt a tumor centrális régiója, az inváziós zóna és a normálnak tűnő agyszövet. Számos publikáció korábban már leírta, hogy a Wnt receptorok és ligandok nagyobb aktivitási szintet mutatnak a tumorban, mint a normál agyszövetben [59, 60]. Kahlert et al. [59] és Binda et al. [60] egyaránt kimutatta, hogy a kanonikus és non-kanonikus útvonal is az inváziós zónában expresszálódik a legnagyobb mértékben [59, 60]. Továbbá Kamino et al. [57] megállapította, hogy a normál agyhoz képest a glioma sejtvonalakban a Wnt5a, Wnt7b és Fzd2 mRNS mennyisége jelentősen megnőtt, amelynek mértéke tovább fokozódott, amikor a GBM-et vizsgálta [57]. Munkánk során is hasonló következtetésre jutottunk, miszerint a Wnt5a és Wnt3a expressziónövekedés a tumorban a nem tumoros résszel összehasonlítva szignifikánsan eltér a kis mintaelemszám ellenére. De az összes Wnt marker emelkedett expressziót mutatott a tumoros régióban (az inváziós zóna rendkívül elmosódott volt a mintákban) a normál agyhoz képest (**24. Ábra**).

5.4. A Wnt markerek protein expressziós és DNS metilációs mintázata a szekvenciális GBM mintapárokban

Az előzőekben ismertetett mechanizmusok alapján is jól látszik, hogy Wnt útvonal aktivitása, gátlása és interakciója egyéb útvonalakkal rendkívül összetett és komplex folyamatok eredménye. Fontos kiemelni, hogy az útvonal modulálása nem csak a ligand-receptor kapcsolaton alapulhat, hanem számos egyéb regulatorikus/inhibitor molekulán (pl. WIF1, sFRPs, Cerberus, DKK) is. A Wnt útvonal nem megfelelő működését viszonylag ritkán okozza génmutáció a tumorokban. Ezzel szemben számos tanulmány megállapította, hogy a Wnt útvonal újra aktiválódásért elsősorban epigenetikus szabályzó mechanizmusok a felelősek, különösen GBM-ben [34, 35, 54, 55]. Az epigenetikai mechanizmusok jobb megértése érdekében, genom szinten megvizsgáltuk a GBM DNS CpG metilációs mintázatát 22 pár szekvenciális mintán [36]. A DNS CpG metiláció blokkolni képes a TF-ok kötődését, és ezáltal az adott génexpresszióját, míg ugyanezen CpG-k hipo- vagy unmetilációja fokozott génexpresszióhoz vezet. A tanulmányunk részét képező GO analízis rávilágított arra, hogy egyes kanonikus Wnt gének promoterek régiói, amelyek az endotél sejtek vándorlásában, sejt-sejt adhézióban és sebgyógyulásban vesznek részt, differenciáltan metiláltak a GBM mintapárokban. Ez a metilációs különbség és korábbi eredményeink is azt sugallták, hogy a Wnt útvonal különböző aktivitást mutat a GBM primer és recidív tumorokban. A kohortszintű elemzés során Wnt útvonal számos ligandjának, receptorának és szabályzó molekulájának szélesebb körét is közelebbről megvizsgáltuk, mely során a változások összetett mintázatát tapasztaltuk. A ligandok és receptorok hipermetiláltságát, az intermedier molekulák hipo- és hipermetiláltságát, míg a negatív regulátoros molekulák hipometiláltságát figyeltük meg a GBM-P vs. GBM-R mintákban (**10. és 11. Táblázat**). A metiláltsági szintek fókuszált vizsgálata alapján, leszűkítettük a vizsgálandó elemeket a korábbi IHC kutatásokban használt Wnt markerekre (Wnt5a, Wnt3a, Fzd2 és béta-katenin), kiegészítve két új markerrel (Wnt7b-vel és az Fzd10-zel) abból a célból, hogy szimultán határozzuk meg a kiválasztott markerek metiláltsági szintjét és fehérje expresszióját ugyanazon szekvenciális GBM blokkokban. Elsősorban a Wnt elemek DNS promoterének a metiláltságára voltunk kíváncsiak, azonban az FFPE konzervációs technika következtében kialakuló DNS minőségcsökkenés (fragmentálódás) következtében nem kaptunk elegendő CpG-ről adatot. Ezért a promoter mellé bevontuk az adott gén régiót is, hogy kiterjedtebb DNS szakaszon (promoter+gén) vizsgáljuk a metilációs profilt. Vizsgálataink során nem találtunk szignifikáns különbséget

a hat Wnt marker promoter+gén régiójában a GBM-P és GBM-R összehasonlítás során, annak ellenére, hogy globálisan ugyanezen minták kohortjában egy hipometilációs eltolódás volt megfigyelhető [36], és az irodalmi adatok is egy ilyen irányú eltolódásra utalnak progresszív tumorokban [86, 87]. Viszont trendszerű vagy szignifikáns hipometilációs eltolódást tapasztaltunk markereinkben (az Fzd2 és Fzd10 kivételével), amikor a kontroll normál agyhoz (C-DB) hasonlítottuk a GBM-P és a GBM-R mintákat (**28. Ábra**). Eredményeinkben a promoter+gén hipometilációs eltolódás, tendenciális vagy szignifikáns Wnt5a, Wnt3a és béta-katenin fehérjeexpressziós növekedéssel társult a GBM-P és GBM-R mintákban a kontrollhoz képest (**26. Ábra**). Az Fzd10 esetében a magas promoter+gén metiláció összhangban volt az alacsony membrános fehérjeexpresszió mértékével, mind a kontroll, mind a tumoros mintákban (**26. és 28. Ábra**). Az IHC által detektált Wnt3a, Fzd2 és citoplazmatikus béta-katenin fehérjék növekvő expresszióját azonban nem kísérte promoter+gén hipometiláció a GBM-P és GBM-R mintapárokban, utalva arra, hogy vagy a vizsgált régió kívüli szabályozó régiók CpG metilációja/hipometilációja vagy a DNS metilációtól eltérő szabályozó mechanizmusok járulhattak hozzá a fehérjék expressziós növekedéséhez a GBM-R mintákban.

Megfigyeléseink további megerősítése és validálása érdekében ugyanazt a hat Wnt promoter+gén régiót megvizsgáltuk a Klughammer et al. [35] által feltöltött, nyilvánosan is elérhető RRBS szekvenciákban. Saját anyagunk elemzése során a 21 pár GBM metilációs mintázatát az öt C-DB mintázatával is összehasonlítottuk. Bár a C-DB száma alacsonyabb volt, mint a GBM mintáké, az a tény, hogy ennek ellenére magasabb metilációt tudtunk detektálni a vizsgált régiókban az öt kontrollban mint a 21 pár GBM-ben megerősítette eredményünk validitását. Mivel azonban az öt C-DB és a 112 pár GBM között már lényegesen nagyobb volt a számszerű különbség és így a detektált CpG-k száma is a vizsgált promoter+gén régiókban, az adatbázis mintáinak metilációs vizsgálatához már nem használtuk a C-DB kontrollokat az adattorzulás elkerülésének érdekében. Itt a hat promoter+gén régió metilációs mintázatát csak a 112 primer és 112 recidíva GBM mintapárban hasonlítottuk össze [35]. Ez az elemzés a saját mintáink elemzéséhez hasonlóan nem mutatott CpG metilációs különbséget a GBM-P és GBM-R mintapárok között a hat Wnt marker gén+promoter régiójában. Az adatbázis minták elemzése során szintén a Fzd10 promoter+gén jelentős metiláltságát találtuk a másik öt Wnt marker

promoter+gén régiójával összehasonlítva, és az IHC során detektált nagyon alacsony Fzd10 expresszióval összhangban (29. Ábra).

Összességében megfigyeléseink azt mutatták, hogy a Fzd10 alacsony expresszió a promoter+gén fokozott metilációval állhat kapcsolatban, míg a Wnt5a, Wnt3a és béta-katenin fehérjék expressziós változásai csak részben állnak összefüggésben a csökkent metilációs mértékével GBM-ben.

Míg a korábban már említett, átfogó DNS CpG hipometiláció irányába mutató elmozdulás figyelhető meg a daganatok esetében a normál agyszövethez képest [88, 89, 90], egyéni szinten az egyes gének és genomi régiók metilációs szintje mindkét irányban (hiper- és hipometiláció) változhat malignus transzformációkban [88]. Ezek a metilációs változások nemcsak a promotereket és a nyitott leolvasási kereteket érinthetik, hanem a szabályozó RNS-molekulák régióit, a splicing helyeket vagy az insulátorok topológiai doménjeinek kötőhelyeit is. Az RNS-interferencia mediátorai, a mikroRNS-ek és az siRNS-molekulák kódoló régióinak metilációs változásai az mRNS-ek transzlációs repressziójában fontos szerepet játszanak [91, 92]. A fehérje kötési helyek, illetve a splicing helyek metilációs változásai befolyásolhatják a fehérje izoformák kifejeződését [93]. A megnövekedett metilációs szint az insulátor molekulák kötőhelyein, mint például a CTCF (CCCTC-binding factor) kötőhelyén, befolyásolhatják a génexpressziót. A CTCF kötőhelyek metiláció általi gátlása inszuláció vesztést eredményez a topológiai domének között. Korábban az IDH-1 mutáns gliomákban leírták, hogy a doménhatár elvesztése lehetővé teszi a módosított génkifejeződést (egy távoli konstitutív enhancer használat által), amelynek következtében rendellenes onkogén expresszió és aktiváció jelentkezhet (pl. PDGFRA) [94-97]. Továbbá Moarii et al. [98] leírta, hogy a CpG-k metilációjának különböző hatása lehet a génexpresszióra, attól függően, hogy a metiláció a CpG szigeten belül vagy kívül van. Míg tanulmányunk a génexpresszió szabályozó mechanizmusok közül a promoter+gén DNS CpG metilációjára összpontosított, más mechanizmusok, mint például a hiszton módosulás, a gén kópiaszám, a strukturális kromoszómaváltozások vagy a távoli enhancerek metilációs/hipometilációs változásai szintén hozzájárulhatnak a fehérjék expressziójának módosulásához tumorokban [98].

Az enhancerek általában rövid (50-1500 bp) DNS szegmensek, amelyek néha közel, gyakran azonban akár 1 millió bp távolságban helyezkednek el a transzkripció kezdőhelyétől [99]. Minden génnek egy vagy több enhancere van, amelyek fokozhatják vagy gátolhatják a génexpressziót a TF kötődés helyének metilációs változása által. Az epigenomikai

vizsgálataink során használt script lehetőséget adott arra, hogy ezen aktiváló/szabályozó régiókat is megvizsgáljunk. A GeneCards adatbázisban meghatároztuk, hogy az általunk vizsgált minden egyes Wnt markernek melyek a fő enhancer elemei, majd megnéztük a metilációs mintázatukat. Nem találtunk CpG metilációs szintkülönbséget a saját GBM mintapárokban és a C-DB mintákban, amit magyaráz az alacsony mintaelemszám, és az enhancerek korlátozott kiterjedésű DNS szegmentje (az FFPE mintákból nyert nagyfokú random DNS károsodás miatt, rövid DNS szakaszokon és kevés mintában, a CpG detektálhatóság alacsony). Az adatbázis nagyobb (112) számú mintapárjaiban azonban a Wnt7b GH22J045611, Fzd10 GH12J130124 és Fzd10 GH12J130138 enhancerek emelkedett metilációt mutattak a többi enhancer régióhoz képest, valamint mindhárom enhancer esetében a recidívában magasabb volt a metilációs szint a primerhez képest. (Érdeemes megjegyezni azonban, hogy ezek az enhancerek az előzően vizsgált promoter+gén régiókon kívül esnek). Az Fzd10 nagyon alacsony fehérje expressziós megjelenése erősen összefügghet azzal, hogy a gén+promoter és az enhancer régióknak is magas a metilációs szintje. A Wnt7b esetében tapasztaltuk egyedül, hogy a fehérje expressziója a kontroll mintákban magas, a primer mintákban alacsonyabb, míg a recidív mintákban jelentősen alacsonyabb szintet mutatott. Ezt a graduális csökkenést okozhatta a Wnt7b GH22J045611 enhancer magasabb metilációja a recidív és feltételezhetően a kontroll mintákban a primerhez képest. Mivel a Wnt7b ligand kapcsolódik a Fzd10 receptorhoz, e ligand és receptor szimultán jelentkező fokozott metilációja és alacsony vagy csökkenő protein expressziója ezen kapcsolat szerepét nagy valószínűséggel kizárja progresszív GBM-ben. Míg az alacsony Fzd10 fehérjeexpresszió nagy valószínűséggel összefügg a promoter+gén és enhancer CpG régiójának magas metilációs szintjével, fontos megjegyezni, hogy még a TF-ek kötődési helyeinek a blokája (pl. metiláció által) a promoter régióban sem mindig eredményez génexpressziós szuppressziót. Irizarry et al. [100] kimutatta, hogy vastagbélrákban pozitív összefüggés vagy korreláció lehet a hipermetilált promoter és a célgén magas expressziója között, ha a metilált hely transzkripció kezdőhelyétől 300 bázispárral feljebb helyezkedett el [100]. Hasonló adat nem áll rendelkezésre GBM-ben, de a megfigyelés érdekes kérdéseket vet fel. Összességében, a Wnt markerek expressziójának modulálásához a GBM-ben számos epigenetikai mechanizmus hozzájárulhatott a DNS CpG metiláción kívül, mint például a hiszton módosulás vagy strukturális genomikai változások, kiegészítve az idő előrehaladtával történő promoter és a gén, illetve az enhancer CpG metilációs mintázatok változásaival.

6. Következtetések

A kanonikus (Wnt3a, béta-katenin) és non-kanonikus (Wnt5a, Fzd2) útvonal protein elemeinek expressziója fokozatosan növekszik a normál agyszövetből a glioma grádus előrehaladtával, és legkifejezettebben a GBM-ben jelenik meg. A gliomák (oligodendrogliális vagy asztrocitikus) eredete szerinti vizsgálatban, a non-kanonikus útvonal meghatározóbb szerepet játszik a kanonikus útvonallal szemben az asztrocitikus eredetű alacsony grádusú gliomák GBM-mé való transzformálódásában a Wnt5a magas expressziója miatt. Az összevont II-III-as grádusú IDH-1 mutáns és vad típusú csoportok között nincs Wnt expressziókülönbség, de tendenciális Wnt5a szintemelkedés figyelhető meg az IDH-1 mutáns GBM-ben, továbbá az összevont grádusú glioma csoportban a Wnt3a szignifikáns emelkedettsége tapasztalható az IDH-1 vad típusú csoportban, amely további vizsgálatok szükségességét jelzik az IDH-1 mutáció és a Wnt útvonal közötti kapcsolat tisztázására.

A GBM molekuláris alcsoportjai (proneurális, mesenchymalis, klasszikus és nem besorolt) között nincs különbség a kanonikus és non-kanonikus Wnt útvonal markereinek expressziójában, de szignifikáns eltérések állnak fenn az alcsoportokon belüli marker megoszlásban. Mindegyik alcsoportban a non-kanonikus útvonal markerek expressziója dominál a kanonikussal szemben. A legmarkánsabb elkülönülés a mesenchymalis alcsoportban tapasztalható. Továbbá interakciók lehetségesek az egyes alcsoport meghatározó markerek és a Wnt elemek között. Az NF-1 festődési mintázatok (c+/m; c-/m+ és c+/m+; c-/m-) és a Wnt marker expressziós profilok között különösen szoros a korreláció, nevezetesen az NF-1 és a béta-katenin szimultán sejtmagi (patológiás) magas szintű megjelenésében, amely hozzájárulhat a daganak malignitásának és kedvezőtlen prognózisának a kialakításához. A Wnt markerek GBM-ben betöltött szerepét aláhúzza markereink emelkedett expressziója a tumoros régiókban a normál agyhoz képest postmortem tumort+inváziós zónát+ nem érintett normál agyszövetet tartalmazó mintákban.

Bár a primer és recidív mintapárok között nincs szignifikáns különbség az általunk vizsgált Wnt marker promoter+gén régiójának DNS CpG metilációjában, ezek a markerek szignifikáns vagy trendszerű hipometilációs eltolódást mutatnak GBM-ben a normál agyszövettel történő összehasonlításban. Ez a promoter+gén hipometiláció tendenciális vagy szignifikáns expresszió növekedéssel társul Wnt5a, Wnt3a és béta-katenin fehérjék esetében GBM-ban a kontrollokhoz képest. A Fzd10 marker promoter+gén régiójának

magas szintű CpG metilációja alacsony fehérje expresszióval társul mind a kontrollokban, mind a GBM mintákban. Eredményeinket megerősítik egy adatbázisból származó nagyobb szekvenciális GBM kohort párhuzamos elemzései és hasonló eredményei. Az a megfigyelésünk, hogy a recidív mintákban a primerekhez képest magasabb a Wnt3a, Fzd2 és citoplazmatikus béta-katenin fehérje expresszió ezen markerek promoter+gén régiójának inverz metilációs változása nélkül arra utal, hogy vagy a vizsgált régió kívüli DNS metilációs mechanizmusok, vagy más (nem DNS metilációs) szabályozó mechanizmusok is hozzájárulhatnak a fehérjék expressziós növekedéséhez progresszív GBM tumorokban. Az enhancerek, amelyek részben vagy teljesen kívül eshetnek az általunk vizsgált promoter+gén régiókon, szintén CpG metiláció által szabályozott genetikai elemek, és jelentőséggel bírnak a génexpresszió szabályozásában. Összhangban a fenti megfigyelésekkel, a hat Wnt markerünk enhancerei közül a Fzd10 két, míg a Wnt7b egy fontos (promoter+gén régió kívül eső) enhancere is hipermetilációval jellemezhető a többi enhancerhez képest, és különösen a recidívákban a primerekhez hasonlítva az adatbázis GBM mintapárokban. A promoter+gén metilációs adatok mellett a Fzd10 és a Wnt7b hipermetilációja is jól korrelál a Fzd10 fehérje alacsony expressziójával valamennyi mintánkban, és a Wnt7b csökkenő fehérje expressziós profiljával a GBM progressziója során.

Összességében tanulmányunk eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy a Wnt útvonal fontos szerepet játszik a gliomák, különösen a GBM kialakulásában, bonyolult molekuláris kölcsönhatások által. A Wnt fehérjék expresszióját és ez által az útvonal aktivitását jelentős mértékben epigenomikai mechanizmusok, köztük a DNS CpG metiláció gliomagenezissel kapcsolatos változásai határozzák meg. Mindezen felismerések olyan további kutatásokat és terápiás fejlesztéseket támogatnak, amelyek a Wnt útvonal elemeire irányulnak.

7. Új megállapítások

- Az asztorcitikus eredetű gliomák progressziójában a Wnt non-kanonikus útvonal nagyobb szerepet játszik a kanonikussal szemben.
- A Wnt útvonal egyes elemei és az IDH-1 mutációs státusz között korreláció áll fenn, melynek mélyebb tisztázása folyamatban levő új tanulmányaink tárgya.
- A Wnt útvonal markereinek expressziójában nincs különbség a GBM molekuláris alcsoportjai között, azonban valamennyi alcsoportban a non-kanonikus útvonal markereinek expressziója a dominánsabb a kanonikus útvonallal szemben.
- A béta-katenin és az NF-1 sejtmagi megjelenése pozitív korrelációban áll egymással, amely feltehetően agresszívabb és rosszabb prognózisú GBM tumort eredményez.
- Az általunk vizsgált Wnt markerek expressziós mintázata jelentősen, azonban promoter+gén metilációs mintázata nem különbözik egymástól primer és recidív GBM mintapárokban.
- A promoter+gén metilációs státuszon kívül, az adott génrégióon kívül eső enhancerek metiláltsági profilja is fontos szerepet játszik a génexpresszió szabályozásában.
- A Wnt7b és Fzd10 ligand-receptor kapcsolat nem járul hozzá a GBM növekedéséhez és progressziójához.
- A Wnt7b és Fzd10 potenciális tumor szuppresszor funkcióval is bírhat, melyről szintén nincsenek még szakirodalmi adatok.

8. Saját publikációk jegyzéke

8.1. Az értekezés alapjául szolgáló publikációk jegyzéke

Tompa M, Nagy A, Komoly S, Kalman B (2019). Wnt pathway markers in molecular subgroups of glioblastoma. *Brain Res.* 1718:114-125. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.05.008>. IF (2019): 2.733

Nagy A*, **Tompa M***, Kraboth Z, Garzuly F, Maraczi A, Kalman B (2021). Wnt pathway markers in low-grade and high-grade gliomas. *Ideggyogy Sz.* 74(9–10):000–000. (in press). <https://doi.org/10.18071/isz.74.0000>. IF (2020): 0.427 (*Megosztott elsőszerzők)

Tompa M, Kajtar B, Galik B, Gyenesei A, Kalman B (2021). DNA methylation and protein expression of Wnt pathway markers in progressive glioblastoma. *Pathol Res Pract.* 222 (2021):153429. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2021>. IF (2020): 3.250

Kraboth Z, Galik B, **Tompa M**, Kajtar B, Urban P, Gyenesei A, Miseta A, Kalman B (2020). DNA CpG methylation in sequential glioblastoma specimens. *J Cancer Res Clin Oncol.*146:2885–2896. <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03349-w>. IF (2020): 4.553

Az értekezés alapját képező publikációk összesített impakt faktora: **10.963 (2021.08.08)**

8.2. Egyéb publikációk jegyzéke

Tompa M, Kalovits F, Nagy A, Kalman B (2018). Contribution of the Wnt pathway to defining biology of glioblastoma. *Neuromolecular Med.* 20:437-451. <https://doi.org/10.1007/s12017-018-8514-x>. IF (2018):2.576

Kalovits F, **Tompa M**, Nagy A, Kalman B (2018). Isocitrate dehydrogenase mutations in defining the biology of and supporting clinical decision making in glioblastoma. *Ideggyogy Sz.* 71:237-247. <https://doi.org/10.18071/isz.72.0141>. IF (2018):0,113

Kalovits F, Takats L, Somogyi K, Garzuly F, **Tompa M**, Kalman B (2019). Secretory meningioma with bone infiltration and orbital spreading. *Ideggyogy Sz.* 72:141-144. <https://doi.org/10.18071/isz.72.0141>. F (2019):0,337

Maraczi A, Nagy A, Eder LK, Gyurjan I, **Tompa M**, Kovacs G, Csejtej A, Kovalszky I, Kalman B (2020). Daganatos betegek molekuláris vizsgálatai a nyugat-dunántúli régióban 2015 és 2018 között. *Egészség-akadémia.* 9:1-8. IF (2019):0

8.3. Prezentációk

Tompa M, Kalman B. A glioblastoma őssejtek molekuláris genetikai jellegzetességei és szerepük a tumorgenezisben. Magyar Neurológiai Társaság konferenciája: *Magyar Klinikai Neurogenetika Szekció*. 2018. június 7-10. Debrecen

Tompa M, Kalman B. A Wnt útvonal aktivitása glioblastomában. Magyar Neurológiai Társaság konferenciája: *Magyar Klinikai Neurogenetika Szekció*. 2019. december 6-7. Debrecen

Tompa M, Kalovits F, Nagy A, Kalman B. A Wnt markerek expressziós mintázata a glioblastoma alcsoportokban. *Pécsi Tudományegyetem Idegtudományi Centrum III. PhD és TDK Konferencia* 2018. november. 22-23. Pécs

Tompa M, Kalovits F, Nagy A, Kalman B. The importance of the Wnt pathway in glioblastoma. *Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences (MedPécs)* 2018. október. 27. Pécs

Tompa M, Kalman B. Expression patterns of Wnt pathway markers in glioblastoma. *5th Congress of the European Academy of Neurology* 26:917-917; Paper: EPO3301. 2019. június 29-július 2. Oslo, Norvégia

9. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném megköszönni és hálámat kifejezni Prof. Dr. Kálmán Bernadette Témavezetőmnek az elmúlt négy évben nyújtott végtelen támogatásáért, türelméért és szakmai vezetéséért.

Köszönettel tartozom a Markusovszky Egyetemi Oktatókórház Patológia Osztályán és a Molekuláris Patológián, valamint a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Patológia Osztályán dolgozóknak.

Köszönetet mondok a Szentágotthai János Kutatóközpont Genomikai és Bioinformatikai Core Facility munkatársainak és a Pécsi Tudományegyetem Laboratóriumi Medicina Intézetének a szakmai együttműködésért és támogatásért.

Köszönöm Dr. Nagy Ádámnak a rengeteg szakmai támogatást és tanácsot, amelyet munkám során kaptam tőle.

Hálás vagyok valamennyi szomorú sorsú GBM-es betegnek, akiknek a klinikai feldolgozásból hátramaradott mintáját felhasználhattam a munkám során.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönöm a Családomnak és Barátaimnak a sok türelmet és támogatást, amelyet tőlük kaptam.

10. Referenciák

1. Stupp R, Mason WP, Van Den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New Engl J Med.* 352:987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>.
2. **Könyv:** De Vleeschouwer S (2017). Glioblastoma. Brisbane (AU): Codon Publications. PMID: 29251853. Bookshelf ID: NBK469998. <https://doi.org/10.15586/codon.glioblastoma.2017>.
3. **Internetes hivatkozás:** <https://rakliga.hu/agydaganat/> (Elérés dátuma: 2021.08.08)
4. Simpson JR, Horton J, Scott C, Curran WJ, Rubin P, Fischbach J et al. (1993). Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 26:239-244. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(93\)90203-8](https://doi.org/10.1016/0360-3016(93)90203-8).
5. Weller M, Butowski N, Tran DD, Recht LD, Lim M, Hirte H et al. (2017). Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 18:1373–1385. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30517-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30517-X).
6. Deorah S, Lynch CF, Sibenaller ZA, Ryken TC (2006). Trends in brain cancer incidence and survival in the United States: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, 1973 to 2001. *Neurosurg Focus* 20: E1. <https://doi.org/10.3171/foc.2006.20.4.E1>.
7. Reardon DA, Herndon JE, Peters KB, Desjardins A, Coan A, Lou E et al. (2012). Bevacizumab continuation beyond initial bevacizumab progression among recurrent glioblastoma patients. *Br. J. Cancer.* 107:1481–7. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.415>.
8. Fritz L, Dirven L, Reijneveld JC, Koekkoek JA, Stiggelbout AM, Pasma HRW, Taphoorn MJ (2016). Advance care planning in glioblastoma patients. *Cancers.* 8:102. <https://doi.org/10.3390/cancers8110102>.
9. Ohgaki H, Kleihues P (2012). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 9:764-772. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3002>.
10. Costello JF, Plass C, Arap W, Chapman VM, Held WA, Berger MS et al. (1997). Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) amplification in human gliomas identified using two-dimensional separation of genomic DNA. *Cancer Res.* 57:1250–4.
11. Kalovits F, Tompa M, Nagy A, Kalman B (2018). Isocitrate dehydrogenase mutations in defining the biology of and supporting clinical. *Ideggyogy Sz.* 71:237-247. <https://doi.org/10.18071/isz.71.0237>.
12. Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, Rasheed AB, Heaphy CM, de Wilde RF et al. (2012). Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget.* 3:709–22. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.588>.
13. Loeb LA (2011). Human cancers express mutator phenotypes: Origin, consequences and targeting. *Nat Rev Cancer.* 11:450–7. <https://doi.org/10.1038/nrc3063>.

14. The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 455:1061–8. <https://doi.org/10.1038/nature07385>.
15. Huang PH, Xu AM, White FM (2009). Oncogenic EGFR signaling networks in glioma. *Sci Signal*. 2:re6. <https://doi.org/10.1126/scisignal.287re6>.
16. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. (2007). Malignant astrocytic glioma: Genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev*. 21:2683–710. <https://doi.org/10.1101/gad.1596707>.
17. Shangary S, Wang S (2009). Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: A novel approach for cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 49:223–41. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094723>.
18. Sturm D, Bender S, Jones DT, Lichter P, Grill J, Becher O et al. (2014). Paediatric and adult glioblastoma: Multiform (epi)genomic culprits emerge. *Nat Rev Cancer*. 14:92–107. <https://doi.org/10.1038/nrc3655>.
19. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E et al. (2012). Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 366:883–92. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1113205>.
20. Tompa M, Kalovits F, Nagy A, Kalman B (2018). Contribution of the Wnt pathway to defining biology of glioblastoma. *Neuromolecular Med*. 20:437-451. <https://doi.org/10.1007/s12017-018-8514-x>.
21. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD et al. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 17:98–110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>.
22. Wang Q, Hu B, Hu X, Kim H, Squatrito M, Scarpace L et al. (2017). Tumor evolution of glioma-intrinsic gene expression subtypes associates with immunological changes in the microenvironment. *Cancer Cell*. 32:42–56. <https://doi.org/10.1016/j.ccell>.
23. Nagy Á, Garzuly F, Padányi G, Szűcs I, Feldmann Á, Murnyák B, Kálmán B (2019). Molecular Subgroups of Glioblastoma—an Assessment by Immunohistochemical Markers. *Pathol Oncol Res*. 25:21-31. <https://doi.org/10.1007/s12253-017-0311-6>.
24. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. (2016). The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol*. 131:803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.
25. Nounshmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP et al. (2010). Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell*. 17:510–522. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.03.017>.

26. Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E et al. (2012). IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature*. 483:479–83. <https://doi.org/10.1038/nature10866>.
27. Jones PA, Baylin SB (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*. 128:683–92. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.029>.
28. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG et al. (2001). Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet*. 10:687–92. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.7.687>.
29. Laird PW (2005). Cancer epigenetics. *Hum Mol Genet*. 14:65–76. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi113>.
30. Ehrlich M (2002). DNA methylation in cancer: Too much, but also too little. *Oncogene*. 21:5400–13. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205651>.
31. Herman JG, Baylin SB (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 349:2042–54. <https://doi.org/10.1056/NEJMra023075>.
32. Kim TY, Zhong S, Fields CR, Kim JH, Robertson KD (2006). Epigenomic profiling reveals novel and frequent targets of aberrant DNA methylation-mediated silencing in malignant glioma. *Cancer Res*. 66:7490–501. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4552>.
33. Soejima H, Zhao W, Mukai T (2005). Epigenetic silencing of the MGMT gene in cancer. *Biochem Cell Biol*. 83:429–37. <https://doi.org/10.1139/o05-140>.
34. Zhang Z, Tang H, Wang Z, Zhang B, Liu W, Lu H, et al. (2011). MiR-185 targets the DNA methyltransferases 1 and regulates global DNA methylation in human glioma. *Mol Cancer*. 10:124. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-124>.
35. Klughammer J, Kiesel B, Roetzer T, Fortelny N, Nemc A, Nanning KH et al. (2018). The DNA methylation landscape of glioblastoma disease progression shows extensive heterogeneity in time and space. *Nat Med*. 24:1611–1624. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0156-x>.
36. Kraboth Z, Galik B, Tompa M, Kajtar B, Urban P, Gyenesei A, Miseta A, Kalman B (2020). DNA CpG methylation in sequential glioblastoma specimens. *J Cancer Res Clin Oncol*. 146:2885–2896. <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03349-w>.
37. Suwala AK, Hanaford A, Kahlert UD, Maciaczyk J (2016). Clipping the wings of glioblastoma: modulation of Wnt as a novel therapeutic strategy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 75:388–396. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlw013>.
38. Nusse R, Varmus HE (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*. 31:99–109. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90409-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90409-3).
39. Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S (2011). New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. *Int Rev Cell Mol Biol*. 291:21–71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386035-4.00002-1>.

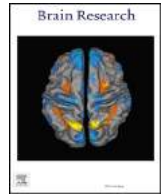
40. Peifer M, Polakis P (2000). Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis—a look outside the nucleus. *Science*. 287:1606–1609. <https://doi.org/10.1126/science.287.5458.1606>.
41. Tada M, Concha ML, Heisenberg CP (2002). Non-canonical Wnt signalling and regulation of gastrulation movements. *Semin Cell Dev Biol*. 13:251–260. [https://doi.org/10.1016/s1084-9521\(02\)00052-6](https://doi.org/10.1016/s1084-9521(02)00052-6).
42. Ortiz-Matamoros A, Salcedo-Tello P, Avila-Muñoz E, Zepeda A, Arias C (2013). Role of wnt signaling in the control of adult hippocampal functioning in health and disease: therapeutic implications. *Curr Neuropharmacol*. 11:465–476. <https://doi.org/10.2174/1570159X11311050001>.
43. Tompa M, Nagy A, Komoly S, Kalman B (2019). Wnt pathway markers in molecular subgroups of glioblastoma. *Brain Res*. 1718:114–125. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.05.008>.
44. Nagy A, Tompa M, Kraboth A, Garzuly F, Maraczi A, Kalman B (2021). Wnt pathway markers in low-grade and high-grade gliomas. *Ideggyogy Sz*. 74:1–10. (in press).
45. Shu W, Guttentag S, Wang Z, Andl T, Ballard P, Lu MM et al. (2005). Wnt/ β -catenin signaling acts upstream of N-myc, BMP4, and FGF signaling to regulate proximal–distal patterning in the lung. *Dev Biol*. 283:226–239. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.04.014>.
46. Klaus A, Birchmeier W (2008). Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer*. 8:387. <https://doi.org/10.1038/nrc2389>.
47. Valenta T, Hausmann G, Basler K (2012). The many faces and functions of β -catenin. *The EMBO Journal*. 31:2714–2736. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012>.
48. Darken RS, Scola AM, Rakeman AS, Das G, Mlodzik M, Wilson PA (2002). The planar polarity gene *strabismus* regulates convergent extension movements in *Xenopus*. *The EMBO journal*. 21:976–985. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.976>.
49. Komiya Y, Habas R (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*. 4(2): 68–75. <https://doi.org/10.4161/org.4.2.5851>.
50. Eubelen M, Bostaille N, Cabochette P, Gauquier A, Tebabi P, Dumitru AC et al. (2018). A molecular mechanism for Wnt ligand-specific signaling. *Science*. 361: eaat1178. <https://doi.org/10.1126/science.aat1178>.
51. Miller JR, Hocking AM, Brown JD, Moon RT (1999). Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/ β -catenin and Wnt/ Ca^{2+} pathways. *Oncogene*. 18: 7860–7872.
52. Kawano Y, Kypta R (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*. 116:2627–2634. <https://doi.org/10.1242/jcs.00623>.
53. Lambiv WL, Vassallo I, Delorenzi M, Shay T, Diserens AC, Misra A et al. (2011). The Wnt inhibitory factor 1 (WIF1) is targeted in glioblastoma and has a tumor suppressing function potentially by induction of senescence. *Neuro Oncol*. 13:736–747. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nor036>.

54. Roth W, Wild-Bode C, Platten M et al. (2000). Secreted frizzled-related proteins inhibit motility and promote growth of human malignant glioma cells. *Oncogene*. 19:4210–4220. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203783>.
55. Foltz G, Yoon JG, Lee H et al. (2010). Epigenetic regulation of wnt pathway antagonists in human glioblastoma Multiforme. *Genes Cancer*. 1:81–90. <https://doi.org/10.1177/1947601909356103>.
56. Morris LG, Kaufman AM, Gong Y, Ramaswami D, Walsh LA, Turcan Ş et al. (2013). Recurrent somatic mutation of FAT1 in multiple human cancers leads to aberrant Wnt activation. *Nat Genet*. 45:253. <https://doi.org/10.1038/ng.2538>.
57. Kamino M, Kishida M, Kibe T, Ikoma K, Iijima M, Hirano H et al. (2011). Wnt-5a signaling is correlated with infiltrative activity in human glioma by inducing cellular migration and MMP-2. *Cancer Sci*. 102:540–548. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01815.x>.
58. Kim JH, Park SY, Jun Y, Kim JY, Nam JS (2017). Roles of Wnt target genes in the journey of cancer stem cells. *Int J Mol Sci*. 18:1604. <https://doi.org/10.3390/ijms18081604>.
59. Kahlert UD, Maciaczyk D, Doostkam S, Orr BA, Simons B, Bogiel T et al. (2012). Activation of canonical WNT/ β -catenin signaling enhances in vitro motility of glioblastoma cells by activation of ZEB1 and other activators of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Lett*. 325:42–53. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.05.024>.
60. Binda E, Visioli A, Giani F, Trivieri N, Palumbo O, Restelli S et al. (2017). Wnt5a drives an invasive phenotype in human glioblastoma stem-like cells. *Cancer Res*. 77:996–1007. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1693>.
61. Reis M, Czupalla CJ, Ziegler N, Devraj K, Zinke J, Seidel S et al. (2012). Endothelial Wnt/ β -catenin signaling inhibits glioma angiogenesis and normalizes tumor blood vessels by inducing PDGF-B expression. *J Exp Med*. 209:1611–27. <https://doi.org/10.1084/jem.20111580>.
62. Kaur N, Chettiar S, Rathod S, Rath P, Muzumdar D, Shaikh ML, Shiras A (2013). Wnt3a mediated activation of Wnt/ β -catenin signaling promotes tumor progression in glioblastoma. *Mol Cell Neurosci*. 54:44–57. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2013.01.001>.
63. Zhang H, Qi Y, Geng D, Shi Y, Wang X, Yu R, Zhou X (2018). Expression profile and clinical significance of Wnt signaling in human gliomas. *Oncol Lett*. 15:610–617. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7315>.
64. Liu C, Tu Y, Sun X, Jiang J, Jin X, Bo X (2011). Wnt/beta-Catenin pathway in human glioma: expression pattern and clinical/prognostic correlations. *Clin Exp Med*. 11:105–112. <https://doi.org/10.1007/s10238-010-0110-9>.
65. Kim Y, Hong M, Do IG, Ha SY, Lee D, Suh YL (2015). Wnt5a, Ryk and Ror2 expression in glioblastoma subgroups. *Pathol Res Pract*. 211:963–972. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2015.10.00>.

66. Cui D, Ren J, Shi J, Feng L, Wang K, Zeng T et al. (2016). R132H mutation in IDH1 gene reduces proliferation, cell survival and invasion of human glioma by downregulating Wnt/ β -catenin signaling. *Int J Biochem Cell Biol.* 73:72–81. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.02.007>.
67. Huang T, Alvarez AA, Pangen RP, Horbinski CM, Lu S, Kim SH et al. (2016). A regulatory circuit of miR-125b/miR-20b and Wnt signalling controls glioblastoma phenotypes through FZD6-modulated pathways. *Nat Commun.* 7:12885. <https://doi.org/10.1038/ncomms12885>.
68. Setty P, Hammes J, Rothämel T, Vladimirova V, Kramm CM, Pietsch T, Waha A (2010). A pyrosequencing-based assay for the rapid detection of IDH1 mutations in clinical samples. *J Mol Diag.* 12:750-756. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2010.090237>.
69. Pu P, Zhang Z, Kang C, Jiang R, Jia Z, Wang G, Jiang H (2009). Downregulation of Wnt2 and β -catenin by siRNA suppresses malignant glioma cell growth. *Cancer Gene Ther.* 16:351. <https://doi.org/10.1038/cgt.2008.78>.
70. Denysenko T, Annovazzi L, Cassoni P, Melcarne A, Mellai M, Schiffer D. (2016) WNT/ β -catenin signaling pathway and downstream modulators in low-and high-grade glioma. *Cancer Genom Proteom.* 13:31–45.
71. Schüle, R, Dictus C, Campos B, Wan F, Felsberg J, Ahmadi R et al. (2012). Potential canonical wnt pathway activation in high-grade astrocytomas. *Sci World J.* 2012:697313. <https://doi.org/10.1100/2012/697313>.
72. Abula AA, Turner JD, Sanai N (2012). FoxM1 is vital in the Wnt/ β -catenin signaling pathogenesis of gliomas. *World Neurosurg.* 77:594–596. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2012.03.001>.
73. Yao Q, Cai G, Yu Q, Shen J, Gu Z, Chen J et al. (2018). IDH1 mutation diminishes aggressive phenotype in glioma stem cells. *Int J Oncol.* 52:270–278. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4186>.
74. Bardella C, Al-Dalahmah O, Krell D, Brazauskas P, Al-Qahtani K, Tomkova M et al. (2016). Expression of Idh1R132H in the murine subventricular zone stem cell niche recapitulates features of early gliomagenesis. *Cancer Cell.* 30:578-594. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.08.017>.
75. Gong A, Huang S (2012). FoxM1 and Wnt/ β -catenin signaling in glioma stem cells. *Cancer Res.* 72:5658–5662. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0953>.
76. Zhang K, Zhang J, Han L, Pu P, Kang C (2012). Wnt/beta-catenin signaling in glioma. *J Neuroimmune Pharmacol.* 7:740–749. <https://doi.org/10.1007/s11481-012-9359-y>.
77. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JCH, Leary RJ, Angenendt P et al. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 321:1807–1812. <https://doi.org/10.1126/science.1164382>.
78. Bhat KP, Balasubramaniyan V, Vaillant B, Ezhilarasan R, Hummelink K, Hollingsworth F et al. (2013). Mesenchymal differentiation mediated by NF- κ B

- promotes radiation resistance in glioblastoma. *Cancer Cell*. 24:331–346. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.001>.
79. Hu T, Li C (2010). Convergence between Wnt- β -catenin and EGFR signaling in cancer. *Mol. Cancer*. 9:236. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-236>.
 80. Paul I, Bhattacharya S, Chatterjee A, Ghosh MK (2013). Current understanding on EGFR and Wnt/ β -catenin signaling in glioma and their possible crosstalk. *Genes Cancer*. 4:427–446. <https://doi.org/10.1177/1947601913503341>.
 81. Puliappadamba VT, Chakraborty S, Chauncey SS, Li L, Hatanpaa KJ, Mickey B et al. (2013). Opposing effect of EGFRWT on EGFRvIII-mediated NF- κ B activation with RIP1 as a cell death switch. *Cell Rep*. 4:764–775. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.025>.
 82. Abulrob A, Giuseppin S, Andrade MF, McDermid A, Moreno M, Stanimirovic D (2004). Interactions of EGFR and caveolin-1 in human glioblastoma cells: evidence that tyrosine phosphorylation regulates EGFR association with caveolae. *Oncogene*. 23:6967. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207911>.
 83. Asem M, Buechler S, Wates R, Miller D, Stack M (2016). Wnt5a signaling in cancer. *Cancers*. 8:79. <https://doi.org/10.3390/cancers8090079>.
 84. Sandberg CJ, Altschuler G, Jeong J, Strømme KK, Stangeland B, Murrell W et al. (2013). Comparison of glioma stem cells to neural stem cells from the adult human brain identifies dysregulated Wnt-signaling and a fingerprint associated with clinical outcome. *Exp Cell Res*. 319:2230–2243. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.06.004>.
 85. Skoda J, Hermanova M, Loja T, Nemeč P, Neradil J, Karasek P, Veselska R (2016). Co-expression of cancer stem cell markers correspond to a pro-tumorigenic expression profile in pancreatic adenocarcinoma. *PLoS One*. 11: e0159255. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159255>.
 86. Mohtat D, Susztak K (2010). Fine tuning gene expression: the epigenome. *Semin Nephrol*. 30:468-476. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2010.07.004>.
 87. Rauluseviciute I, Drabløs F, Rye MB (2020). DNA hypermethylation associated with upregulated gene expression in prostate cancer demonstrates the diversity of epigenetic regulation. *BMC Med Genomics*. 13:6. <https://doi.org/10.1186/s12920-020-0657-6>.
 88. Sharma S, Kelly TK, Jones PA (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 31:27-36. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp220>.
 89. Rodríguez-Paredes M, Esteller M (2011). Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med*. 17:330-339. <https://doi.org/10.1038/nm.2305>.
 90. Timp W, Bravo HC, McDonald OG, Goggins M, Umbricht C, Zeiger M, Feinberg AP, Irizarry RA (2014). Large hypomethylated blocks as a universal defining epigenetic alteration in human solid tumors. *Genome med*. 6:61. <https://doi.org/10.1186/s13073-014-0061-y>.

91. Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Izaurralde E (2006). MicroRNAs silence gene expression by repressing protein expression and/or by promoting mRNA decay. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 71:523-530. <https://doi.org/10.1101/sqb.2006.71.013>
92. Li Z, Rana TM (2012). Molecular mechanisms of RNA-triggered gene silencing machineries. *Acc Chem Res.* 45:1122-1131. <https://doi.org/10.1021/ar200253u>.
93. Maor GL, Yearim A, Ast G (2015). The alternative role of DNA methylation in splicing regulation. *Trends Genet.* 31:274-280. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.03.002>.
94. Burgess-Beusse B, Farrell C, Gaszner M, Litt M, Mutskov V, Recillas-Targa F et al. (2002). The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc Natl Acad Sci.* 99:16433-16437. <https://doi.org/10.1073/pnas.162342499>.
95. Bell AC, West AG, Felsenfeld G (1999). The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell.* 98:387-396. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81967-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81967-4).
96. Ayala-Ortega E, Arzate-Mejía R, Pérez-Molina R, González-Buendía E, Meier K, Guerrero G, Recillas-Targa F (2016). Epigenetic silencing of miR-181c by DNA methylation in glioblastoma cell lines. *BMC cancer.* 16:226. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2273-6>.
97. Flavahan WA, Drier Y, Liao BB, Gillespie SM, Venteicher AS, Stemmer-Rachamimov AO et al. (2016). Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas. *Nature.* 529:110-114. <https://doi.org/10.1038/nature16490>.
98. Moarii M, Boeva V, Vert JP, Reyal F (2015). Changes in correlation between promoter methylation and gene expression in cancer. *BMC genomics.* 16:1-14. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1994-2>.
99. Maston GA, Evans SK, Green MR (2006). Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 7:29-59. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.7.080505.115623>.
100. Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P et al. (2009). The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet.* 41:178-186. <https://doi.org/10.1038/ng.298>.



Research report

Wnt pathway markers in molecular subgroups of glioblastoma

Marton Tompa^{a,b,c}, Adam Nagy^d, Samuel Komoly^e, Bernadette Kalman^{a,b,c,d,*}^a Graduate School in Neurosciences, University of Pecs, 12. Szigeti Str., 7624 Pecs, Hungary^b Institute of Laboratory Medicine, University of Pecs, 13. Ifjusag St., 7624 Pecs, Hungary^c Szentagotai Research Center, University of Pecs, 20. Ifjusag St., 7624 Pecs, Hungary^d Markusovszky University Teaching Hospital, 5. Markusovszky St., 9700 Szombathely, Hungary^e Institute of Neurology, University of Pecs, 2. Ret St., 7623 Pecs, Hungary

HIGHLIGHTS

- Glioblastoma may be sorted into molecular subgroups.
- Both the canonical and non-canonical Wnt pathways contribute to each subgroup.
- Non-canonical markers predominate over canonical markers in all subgroups.
- Correlations between subgroup and Wnt pathway markers can be observed.
- Nuclear accumulation of NF-1 is accompanied by nuclear accumulation of beta-catenin.

ARTICLE INFO

Keywords:

Glioblastoma
Molecular subgroups
Wnt pathway
Clinical correlations

ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is a highly heterogeneous and aggressive brain tumor. Comprehensive genomic and transcriptomic analyses revealed that GBM segregates into three subgroups with characteristic signaling pathways. The Wnt pathway recently received increasing attention with the recognition of its importance in tumor development and recurrence through the promotion of glioma stem cells. As an extension of our previous translational studies, here we tested the possible interactions between key subgroup markers (IDH-1 R132H, EGFRvIII and both cytoplasmic and nuclear loss [c-/n-] of NF-1 expression) and the canonical (Wnt3a and beta-catenin) and non-canonical (Wnt5a and Fzd2) Wnt pathway markers by immunohistochemistry. These analyses revealed increased expression levels of both Wnt pathway markers with significant quantitative differences within, but not among subgroups. Wnt5a and Fzd2 levels were higher than the canonical marker levels in all subgroups. The strongest evidence for correlation between expression levels of the EGFRvIII subgroup marker and the Fzd2 Wnt marker was found, but weaker correlations also could be noted for IDH-1 R132H and NF-1 and some Wnt markers. The correlations detected between markers of the canonical and non-canonical pathways raised the possibility of cross-talk between the two pathways. Analyses of tumors with various NF-1 expression patterns (c+/n-; c-/n+ combined with c+/n+, and c-/n-) revealed that aberrant nuclear accumulation of NF-1 is accompanied by nuclear accumulation of beta-catenin, suggesting that they may act synergistically to define the tumor's biology. Altogether, our study presents expression characteristics of Wnt ligands and receptors, and suggests complex molecular interactions in subgroups of GBM.

1. Introduction

Glioblastoma (GBM) is a grade IV glioma with a median overall survival of 14–20 months (Stupp et al., 2005; Weller et al., 2017). A

high rate of mitosis, pleiomorphism, necrosis and angiogenesis define the histological entity with significant intra- and inter-tumor heterogeneity (de Almeida Sassi et al., 2012; Dunn et al., 2012). Integrated analyses of genomic and transcriptomic data by The Cancer Genome

Abbreviations: GBM, glioblastoma; EGFR, epidermal growth factor receptor; EMT, epithelial-mesenchymal transition; FFPE, formalin-fixed, paraffin-embedded; GSC, glioblastoma stem cell; Fzd, Frizzled; G-CIMP, glioma CpG island methylation pattern; GFAP, glial fibrillary acidic protein; HE, Hematoxylin-Eosin; HS, histoscore; IDH, isocitrate dehydrogenase; IHC, immunohistochemistry; MMP, matrix metalloproteases; NF-1, neurofibromin-1; ROI, region of interest; TCGA, The Cancer Genome Atlas; TMZ, temozolomide; TPC, tumor-promoting stem-like characteristics; WHO, World Health Organization; Wnt, Wingless-related integration site

* Corresponding author at: Szentagotai Research Center, University of Pecs, 20 Ifjusag Street, 7624 Pecs, Hungary.

E-mail addresses: Bernadette.kalman@pte.hu, Kalman.bernadett@markusovszky.hu (B. Kalman).

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.05.008>

Received 25 February 2019; Received in revised form 3 May 2019; Accepted 6 May 2019

Available online 07 May 2019

0006-8993/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Atlas (TCGA) Network established the segregation of the clinicopathological entity into molecular subgroups (named proneural, classical and mesenchymal) that correlate with clinical outcomes (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008; Verhaak et al., 2010; Brennan et al., 2013). The proneural tumors have several molecular features characteristic of oligodendrocytes, while the classical and mesenchymal tumors of those of astrocytes (Verhaak et al., 2010). An epigenomic study identified a glioma CpG island methylation pattern (G-CIMP) in association with the proneural subtype and with mutations in the genes of isocitrate dehydrogenase (IDH) (Noushmehr et al., 2010). Subsequently, the molecular markers were incorporated into the 2016 revision of the World Health Organization (WHO) brain tumor classification, where screening for IDH mutations was recommended for all gliomas (Louis et al., 2016). While additional markers were proposed for lower grade astrocytoid and oligodendrocytoid gliomas, no further molecular markers were proposed for GBM. In a translational study, we have demonstrated that using markers from the TCGA results, the separation of molecular subgroups is feasible, and has both prognostic and therapeutic utility in the clinical setting (Nagy et al., 2019). Key markers of subgroup separation included the expression of the IDH-1 R132H mutation and the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) VIII mutation (EGFRvIII), and the loss of neurofibromin (NF-1) expression. These subgroups overlapped with the TCGA proneural, classical and mesenchymal subtypes, respectively (Nagy et al., 2019).

In the TCGA analyses, the subgroup-defining molecular markers appeared to align in a few pathways including the receptor tyrosine kinase, RB1 and p53 pathways (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). However, recognizing the importance of Wnt ligands and receptors, recent studies have focused on the involvement of the Wnt pathways (Lambiv et al., 2011; Zhang et al., 2018). Both the canonical and non-canonical Wnt pathways have been implicated in these tumors. In the non-canonical Wnt pathway, the expressions of Wnt5a and the Ryk, Frizzled (Fzd)-2 and Ror2 receptors correlated with GBM invasiveness (Kim et al., 2015). Wnt5a^{high} predicted worse prognosis, and discriminated the highly invasive mesenchymal from the less invasive classical and proneural subtypes (Binda et al., 2017). Wnt5a^{high} also associated with tumor-promoting stem-like characteristics (TPC). Enforcing high Wnt5a expression (Wnt5a^{high}) activated an infiltrative mesenchymal program in classical GBM TPCs and Wnt5a^{low} TPC. Epigenetic activation of Wnt5a prompted glioblastoma stem cell (GSC) differentiation and invasive growth (Binda et al., 2017; Hu et al., 2016). Defective activation of the canonical, beta-catenin-mediated Wnt pathway was also noted in the formation and maintenance of GSCs (Zhang et al., 2011; Suwala et al., 2016). Not only ligands and receptors, but also negative regulators of the inhibitors and positive regulators of this pathway were overexpressed (Miller et al., 1999; Tompa et al., 2018), and controlled epithelial-mesenchymal transition (EMT) and tumor microenvironment interactions (Kahlert et al., 2012; Kim et al., 2017). In another study, GBM-derived Wnt3a (a canonical ligand) induced M2-like microglial cells through Wnt/beta-catenin signaling, and by this interaction regulated a cross-talk between microglia and GBM cells as well as contributed to a more aggressive growth rate of tumors (Matias et al., 2019). An inverse relationship was found between the IDH1 R132H mutation and the expression levels as well as nuclear localization of beta-catenin and GSC frequency in gliomas (Cui et al., 2016). Overexpression of both the canonical and the non-canonical pathway markers was demonstrated in correlation with glioma grade (Liu et al., 2011a,b; Binda et al., 2017; Tompa et al., 2018; Zhang et al., 2018). Altogether, both the non-canonical and canonical Wnt pathway markers appeared as targetable master regulators of brain invasion, recurrence, GSC differentiation and angiogenesis in correlation with molecular GBM subtypes (Kamino et al., 2011; Tompa et al., 2018). Preclinical studies in GBM and in other tumors also suggest that Wnt pathway specific small molecular inhibitors, monoclonal antibodies, gene therapy or epigenetic approaches may modify the activity of this pathway with therapeutic benefit (see details in Tompa et al.,

2018). As Wnt pathway activity greatly contributes to resistance to standard chemotherapy, elements of this pathway appear as attractive supplementary treatment targets both in early and progressive GBMs. Since most prior studies were conducted in cell lines or in gliomas of various grades, our present study tested the expression of canonical (Wnt3, beta-catenin) and non-canonical (Wnt5a, Fzd2) Wnt markers in molecular subtypes of GBM. Our studies were carried out in three cohorts.

2. Results

2.1. Cohort 1 (specimens surgically removed after diagnosis, prior to chemoradiation therapy)

2.1.1. Molecular subgroups of GBM

In our previous study by Nagy et al. (2019), the GBM histopathological entity could be subdivided into four molecular subgroups: IDH-1 R132H mutant, EGFRvIII mutant with EGFR overexpression, NF-1 double negative (with loss of both cytoplasmic and nuclear expression [c-/n-]) and an unspecified subgroup, where the former three subgroups overlapped with the TCGA proneural, classical and mesenchymal subgroups, respectively. This subgroup distribution was confirmed by both hierarchical cluster analyses and manual sorting of tumors based on their markers. In the present study on 81 specimens from 78 patients and with the same immunohistochemistry (IHC) markers, the separation of GBM subgroups was similar to that described by Nagy et al. (2019). Fig. 1 also shows that the IDH-1 R32H mutant subgroup completely separates from the other subgroups, while there is one patient whose tumor was both EGFRvIII positive and had loss of NF-1 expression (c-/n-), representing an overlap between the classical-like and the mesenchymal-like subgroups.

Fig. 2 shows that patients whose tumors were positive for the IDH-1 R132H mutation, were significantly younger than those whose tumors were negative for this mutation, the latter category including patients in all other subgroups (Mann-Whitney U test, $p = 0.05$). Those patients who had tumors with c-/n- NF-1 staining patterns were older than patients who had NF-1 expression in either the cytoplasm or the nucleus (Mann-Whitney U test, $p = 0.039$). Finally, patients with tumors

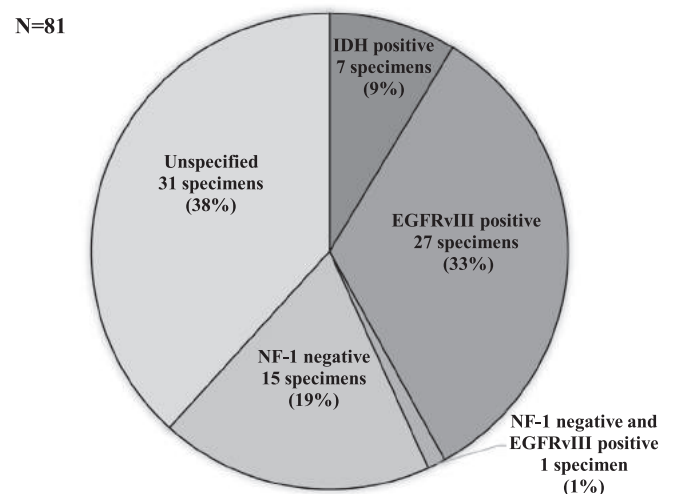


Fig. 1. Distribution of molecular subgroups in Cohort 1. This figure depicts the distribution of GBM molecular subgroups in Cohort 1 and indicates the subgroup-defining key markers. Tumors with the IDH-1 R132H mutation overlap with the TCGA proneural subgroup, tumors with EGFR overexpression and EGFRvIII mutation overlap with the TCGA classical subgroup, while tumors with cytoplasmic as well as nuclear loss of NF-1 expression overlap with the TCGA mesenchymal subgroup. Tumors falling out of the previous three subgroups have been sorted into the unspecified subgroup.

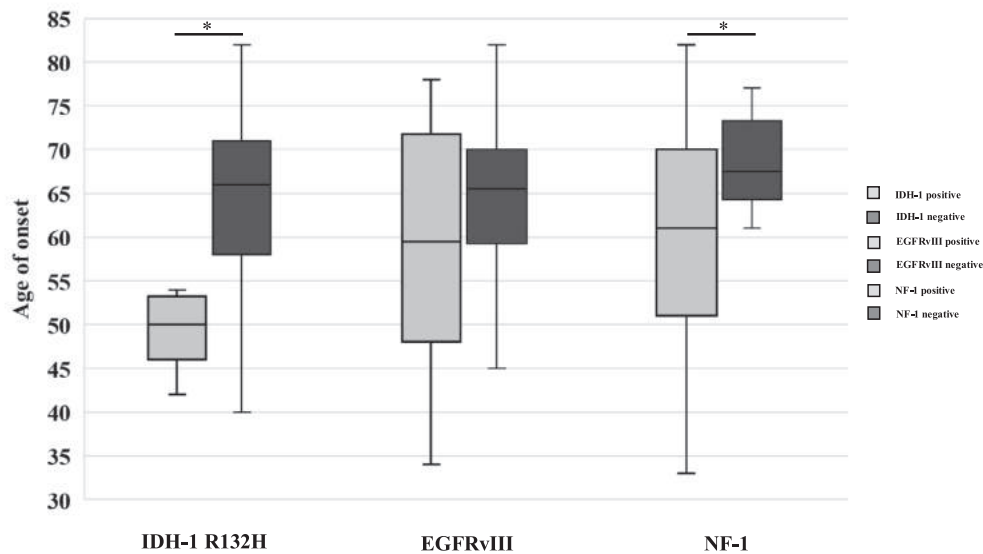


Fig. 2. Age of disease onset according to molecular subgroups markers of GBM in Cohort 1. This figure shows the age of disease onset in sub-cohorts positive and negative for the subgroup-defining markers. Median values along with the interquartile range are indicated (* $p < 0.05$). IDH-1 R132H positive $N = 6$, IDH-1 R132H negative $N = 53$; EGFRvIII positive $N = 16$, EGFRvIII negative $N = 42$; NF-1 positive $N = 46$, NF-1 negative $N = 14$.

carrying the EGFRvIII mutation had age of onset similar to those without the EGFRvIII mutation. No gender differences were found in any of the GBM molecular subgroups (Pearson's χ^2 test). Fig. 3a–c depict the Kaplan-Meier's survival curves of patients in the three molecular subgroups of GBM. Patients with the IDH-1 R132H mutation showed a strong trend for longer overall survival than patients without this mutation ($p = 0.052$).

2.1.2. Wnt markers in molecular subgroups of GBM

Fig. 4a–d indicate histoscore (HS) values of Wnt markers in the four subgroups. The Kruskal-Wallis test suggested only trends for differences in the Wnt3a ($p = 0.059$) and Wnt5a ($p = 0.077$) HS values among the subgroups. However, when we compared Wnt HS values within subgroups (Fig. 4e–h), significant differences were observed among several markers as indicated, but most strikingly between the non-canonical and canonical markers, when using the Kruskal-Wallis test.

We have also compared the Wnt HS values in the IDH-1 R132H positive and negative subgroups, but only a trend ($p = 0.071$) for increase of Wnt5a, and apparent tendencies for increase of beta-catenin and Fzd2 were observed in the mutant group (Fig. 5).

2.1.3. Wnt markers in enriched molecular subgroups of GBM

Since none of the molecular subgroup markers were 100% present in regions of interest (ROIs), we next asked if the Wnt marker distribution pattern is different when we only analyze those samples where the ROIs have a certain threshold of molecular subgroup markers. Therefore, we selected those GBMs, where the molecular markers were present in at least 50% in the ROI, and reanalyzed the Wnt distribution in these enriched molecular subgroups. However, these analyzes did not enhance the statistics in regards to Wnt marker distribution among or within molecular GBM subgroups (possibly because of the reduced samples size in each enriched subgroup).

When we analyzed Wnt marker distribution according to (the enriched) NF-1 expression, the result was remarkable (Fig. 6a–d). It is important to note, that in normal cells, NF-1 as well as beta-catenin is expressed only in the cytoplasm, while in tumors, nuclear expression of both markers can be characteristic. As Fig. 6c indicates, the subgroup with NF-1 c+/n- staining pattern had the lowest nuclear beta-catenin HS values, while all other tumor-characteristic NF-1 staining patterns (c-/n+ plus c+/n+, and c-/n-) were associated with increased nuclear beta-catenin HS values (Mann-Whitney U test $p = 0.021$ for c+/n- vs.

c-/n+ plus c+/n+; $p = 0.03$ for c+/n- vs. c-/n-). Even more striking difference was observed in Wnt marker distribution when the c+/n- (corresponding to the “normal” staining pattern of NF-1) subcohort was compared with the other two subcohorts (with “pathological” NF-1 staining) (Mann-Whitney U test, $p = 0.009$). Nevertheless, due to the low sample size (c+/n-: 19, c-/n+ combined with c+/n+: 23, c-/n-: 15), no statistical differences were reached when the other Wnt markers were tested among the NF-1 subcohorts.

2.1.4. Correlations between subgroup marker HSs and Wnt HSs in molecular subgroups

With the exception of EGFRvIII HS values, no correlations were observed between subgroup marker HSs and Wnt marker HSs. (Note that for the GBM subgroup definition, the presence or absence of EGFRvIII and IDH-1 R132H mutations or of the NF-1 c-/n- staining pattern were used. In the correlation analyses, HS values of the subgroup markers were correlated with HS values of the Wnt markers in each molecular subgroup of GBM). In the EGFRvIII (TCGA classical) subgroup, for both membrane and cytoplasmic EGFRvIII HSs, correlations were observed with the Fzd2 HS values (Kendall's τ correlation $p = 0.01$ and $p = 0.035$, respectively). In addition, in the EGFRvIII positive GBM subgroup, statistically significant correlations were observed between Wnt5a and the nuclear beta-catenin as well as Wnt5a and the cytoplasmic beta-catenin HS values (Kendall's τ $p = 0.005$ and $p = 0.047$, respectively). A tendentious correlation was also detected between the Wnt5a and Fzd2 HS values (Kendall's τ $p = 0.059$). No correlations were detected among the Wnt HSs or between Wnt and subgroup HSs within either the IDH-1 R132H (TCGA proneural) or the NF-1 c-/n- (TCGA mesenchymal) GBM subgroups.

2.1.5. Wnt marker correlations in the entire sample population of Cohort 1

Wnt5a correlated with nuclear beta-catenin HS values (Kendall's τ $p = 0.003$) and Fzd2 (Kendall's τ $p = 0.036$). Wnt3a showed tendentious correlation with cytoplasmic beta-catenin HS values (Kendall's τ $p = 0.051$) and significant correlation with Fzd2 (Kendall's τ $p = 0.015$). Beta-catenin cytoplasmic and nuclear HS values also significantly correlated with each other (Kendall's τ $p = 0.0001$). Beta-catenin nuclear HS values also correlated with the Fzd2 HS values ($p = 0.032$).

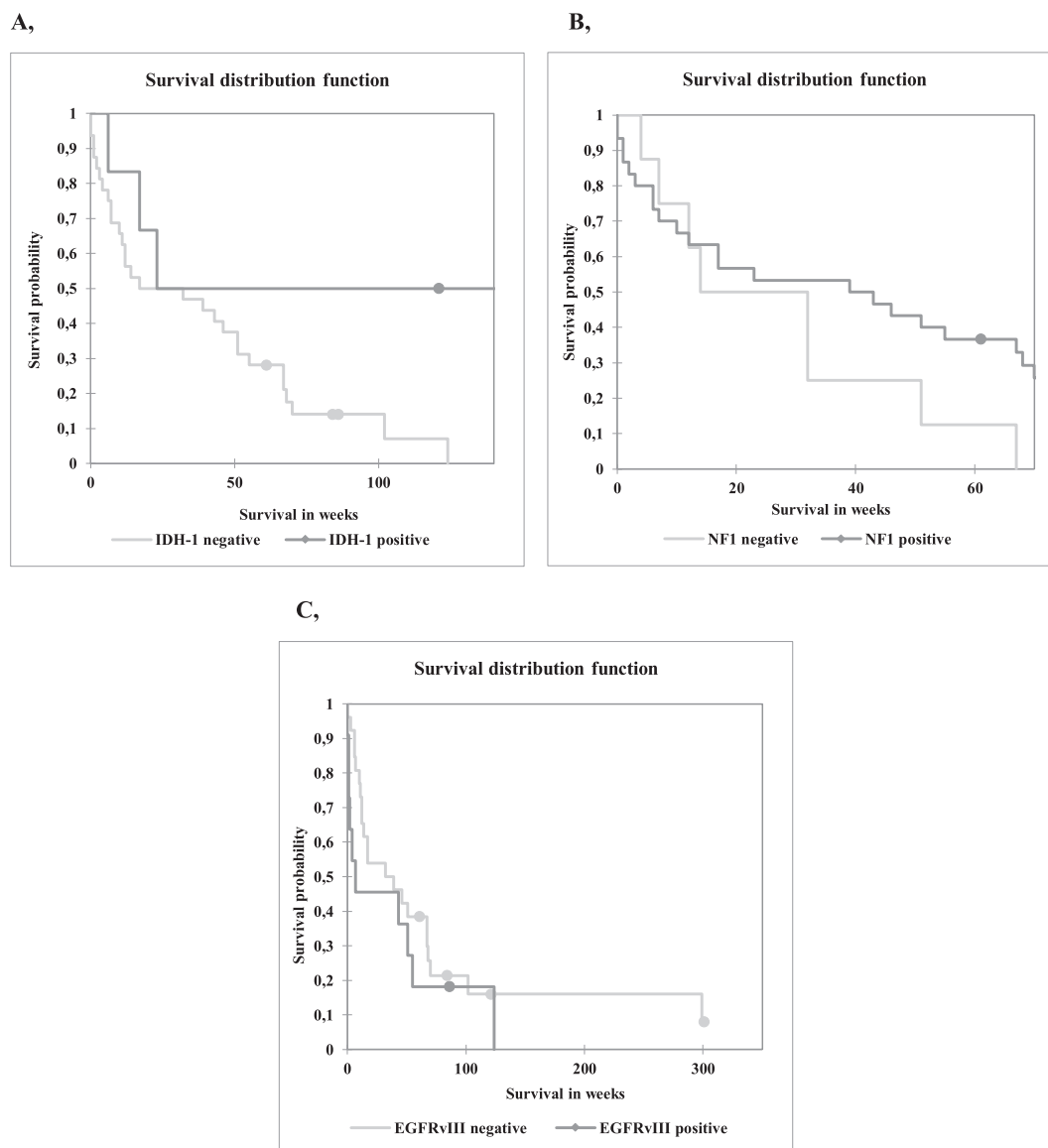


Fig. 3. A–C. Survival analyses in Cohort 1 according to GBM subgroup markers. This figure reflects overall survival time of patients whose GBMs were positive or negative for the subgroup markers in Cohort 1. The dots indicate those patients who were still alive at the writing of this manuscript. IDH-1 R132H positive N = 6, IDH-1 R132H negative N = 32; EGFRvIII positive N = 11, EGFRvIII negative N = 26; NF-1 positive N = 30, NF-1 negative N = 8.

2.1.6. Wnt marker correlation with overall survival

No significant correlations were detected between any of the Wnt markers and the overall survival figures of patients (Kendall's τ test).

2.2. Cohort 2 (paired specimens of surgical GBM at diagnosis prior to chemoradiation therapy and at recurrence after TMZ and radiation therapy)

2.2.1. Wnt markers in the sequential GBM samples

In Cohort 2, we compared the Wnt marker expression values in primary and recurrent tumor pairs (Wilcoxon Signed Rank test). Varying directions of changes were observed for each of the Wnt marker HS values but without significant p-values. Only a tendentious increase of Wnt5a HSs and decrease of Fzd2 HSs were noted in the recurrent samples when compared to those in the primary samples.

2.3. Cohort 3

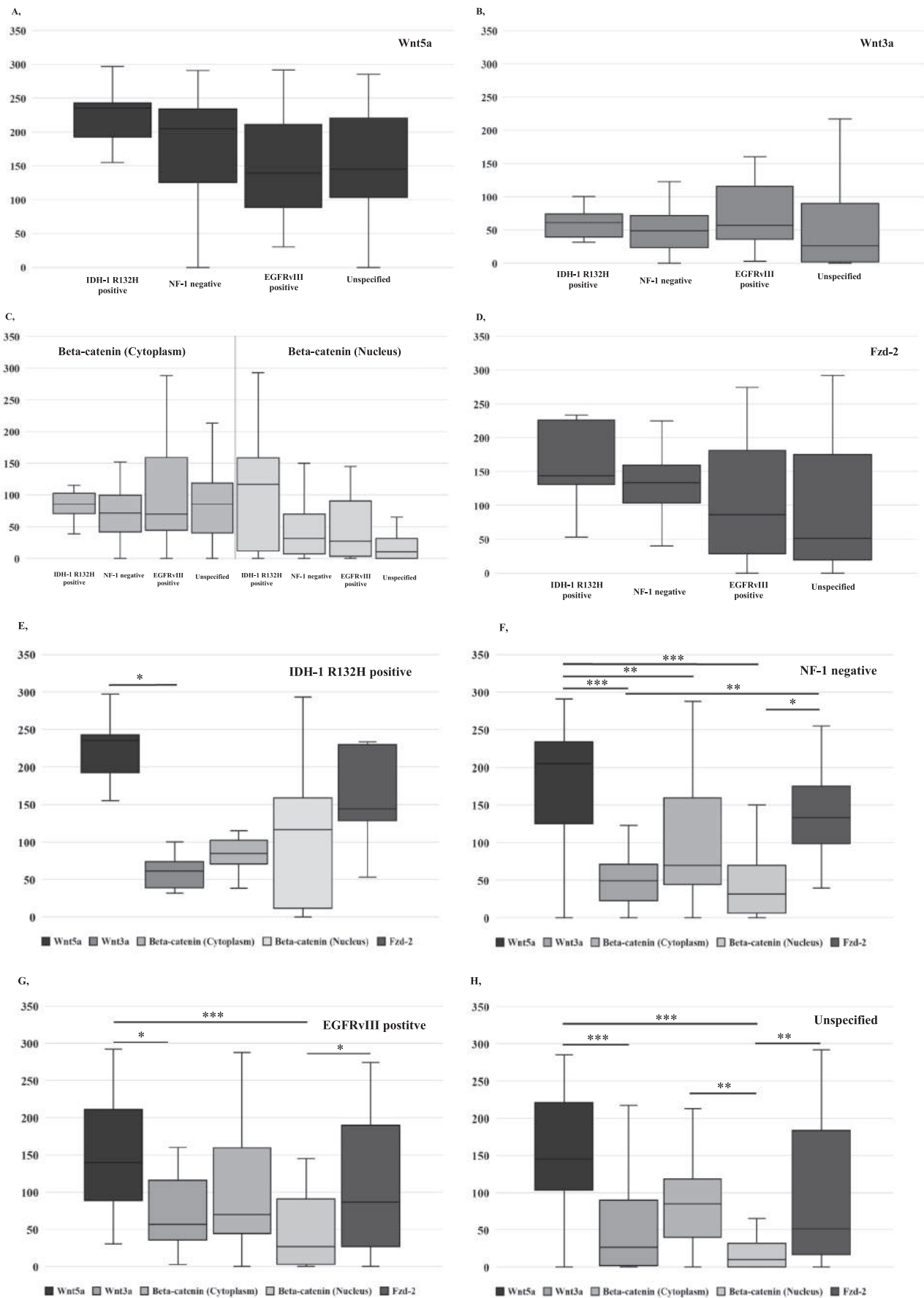
2.3.1. Wnt markers in the trios of GBM tumor, normal appearing brain and invasive zone

Since specimens in Cohort 1 and Cohort 2 were surgically removed

GBM tumors from live patients, no sufficient amounts of corresponding normal tissue regions could be available for comparison of Wnt expression levels in normal and tumorous regions. Therefore, post mortem specimens were used for addressing this question. Assessments of the Wnt marker HS values in corresponding postmortem tumor centers, invasive zones and normal brain regions were performed and differences were statistically tested by the Kruskal-Wallis test. While in all 8 trios for all Wnt markers we noted the highest levels of expression in the tumors, and the lowest levels in the normal brain regions, statistically only the Wnt5a and Wnt3a HS values were higher in the tumors ($p = 0.003$ and $p = 0.029$, respectively) when compared to those in the normal brain regions, likely due to the low sample size in the cohort.

3. Discussion

GBM is one of the most challenging tumors attributed to endogenous processes such as the rise of somatic mutations and the involvement of GSCs (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008; Tompa et al., 2018). Major efforts have been made to map by OMICS



(caption on next page)

Fig. 4. Distribution of Wnt pathway markers among (A–D) and within (E–H) molecular subgroups of GBM in Cohort 1. A–D feature the non-canonical and canonical Wnt markers in four molecular subgroups of GBM, while E–H show within-subgroup comparisons of Wnt marker HSs. Median HS values with the interquartile range are indicated. Note that black and dark grey indicate markers of the non-canonical pathway, while moderate and light grey indicate markers of the canonical pathway. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). IDH-1 R132H positive N = 7; EGFRvIII positive N = 27; NF-1 negative N = 15; Unspecified N = 31.

approaches all characteristic molecular alterations in order to better define its etiology and heterogeneity and to identify targets for therapy. Among the implicated signaling pathways, the Wnt pathway only recently attracted attention and thus far the available data are relatively scarce in GBM. Our approaches to the exploration of GBM has been mainly translational to provide tools to defining heterogeneity and important drivers of this tumor in patient care. Using the most characteristic markers from the TCGA analyses but along with the method of IHC, we have recently reproduced the segregation of GBM into molecular subgroups (Verhaak et al., 2010; Nagy et al., 2019). In the present study, we investigated the relationship between the subgroup markers and a few selected Wnt markers in human GBM specimens since most of the previous observations arose from experimental models (Binda et al., 2017; Huang et al., 2016). Our Wnt analyses were carried out in three cohorts.

3.1. Molecular subgroup and Wnt pathway markers in Cohort 1

3.1.1. Molecular subgroups of GBM

In Cohort 1, using the same markers (IDH-1 R132H, EGFR and EGFRvIII, and NF-1) and a proportion of the same specimens as in the study by Nagy et al. (2019), we identified the molecular subgroups in order to analyze the expression distributions of Wnt markers among and within them. The distribution of the molecular subgroups overlapping with the TCGA proneural, classical and mesenchymal subgroups, was similar in this study and in our published study (Nagy et al., 2019) (Fig. 1). Patients in the subgroup with the IDH-1 R132H mutation (overlapping with the TCGA proneural) were the youngest, while patients in the subgroup with nuclear as well as cytoplasmic loss of NF-1 expression (overlapping with the TCGA mesenchymal) were the oldest ones (Fig. 2). Patients with tumors positive for the EGFRvIII mutation (overlapping with the TCGA classical) had similar age of disease onset as the entire Cohort 1, and those patients without this mutation (Fig. 2). In addition, patients with IDH-1 R132H mutant tumors had the longest overall survival time, while those with the NF-1 double loss had the shortest overall survival time (Fig. 3a–c). These observations are in consensus with earlier findings regarding GBM subgroups, age of onset

and survival (Parsons et al., 2008; Verhaak et al., 2010; Nagy et al., 2019). In addition to the established prognostic utility of these subgroup markers in GBM, direct therapeutic targeting EGFR and EGFRvIII (elements in one of the receptor tyrosine kinase pathways) and IDH-1 R132H (an important metabolic and epigenetic regulator), or circumventing NF-1 deficiency (a tumor suppressor gene negatively regulating the EGFR-initiated receptor tyrosine kinase pathway) have been extensively investigated (Eder and Kalman, 2014; Nagy et al., 2019) either alone or in combination with other targets (Tompa et al., 2018). This being said, one must keep in mind that not all patients have mutations or defects in the highlighted pathways (also involving our subgroup markers) in GBM, as exemplified by a patient/tumor sample Br20P in the study by Parsons et al. (2008). Other pathways may be relevant, or epigenetic dysregulation of gene expression (as in the case of Wnt pathway markers) may also play key roles, underscoring the importance of individual evaluation of tumors and multi-target approaches for potential therapy. Interactions between or among various pathways is also possible. Most strikingly, the IDH-1 R132H mutation alters the catalytic activity of the enzyme that produces an oncometabolite, named 2-hydroxyglutarate. This oncometabolite has an established role in epigenetic regulation, also potentially affecting DNA CpG methylation in the genes of the Wnt pathway, known to be controlled by epigenetic changes (see details reviewed in Tompa et al., 2018). These observations were the reasons why we not only investigated the Wnt pathways in isolation, but rather in the context of GBM subgroup markers.

3.1.2. Wnt markers in molecular subgroups of GBM

We postulated that different signaling pathways may exert predominant effect in the different molecular subgroups of GBM, and therefore, tested the distributions of canonical and non-canonical Wnt pathway markers. IHC analyzes, however, did not reveal significant differences in the expression levels of the Wnt markers among GBM subgroups, but this negative outcome could have been related to the high variability of marker expression (Fig. 4a–d). In contrast, quantitative IHC analyzes showed significant differences in the expression levels of canonical (Wnt3a and beta-catenin) and non-canonical (Wnt5a

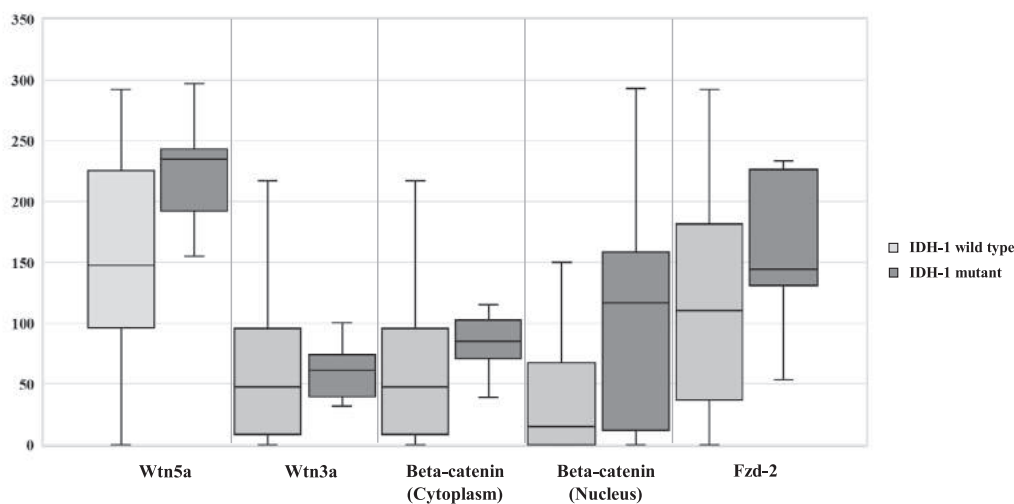


Fig. 5. Comparison of Wnt marker histoscores in GBM with and without the IDH-1 R132H mutation. Although the expression levels of all markers, with the exception of Wnt3a, appear to be higher in the IDH-1 mutant than in the IDH-1 wild type cohort, only Wnt5a approaches statistical significance ($p = 0.071$). Median HS values with the interquartile range are indicated. IDH-1 R132H positive N = 7, IDH-1 R132H negative N = 74.

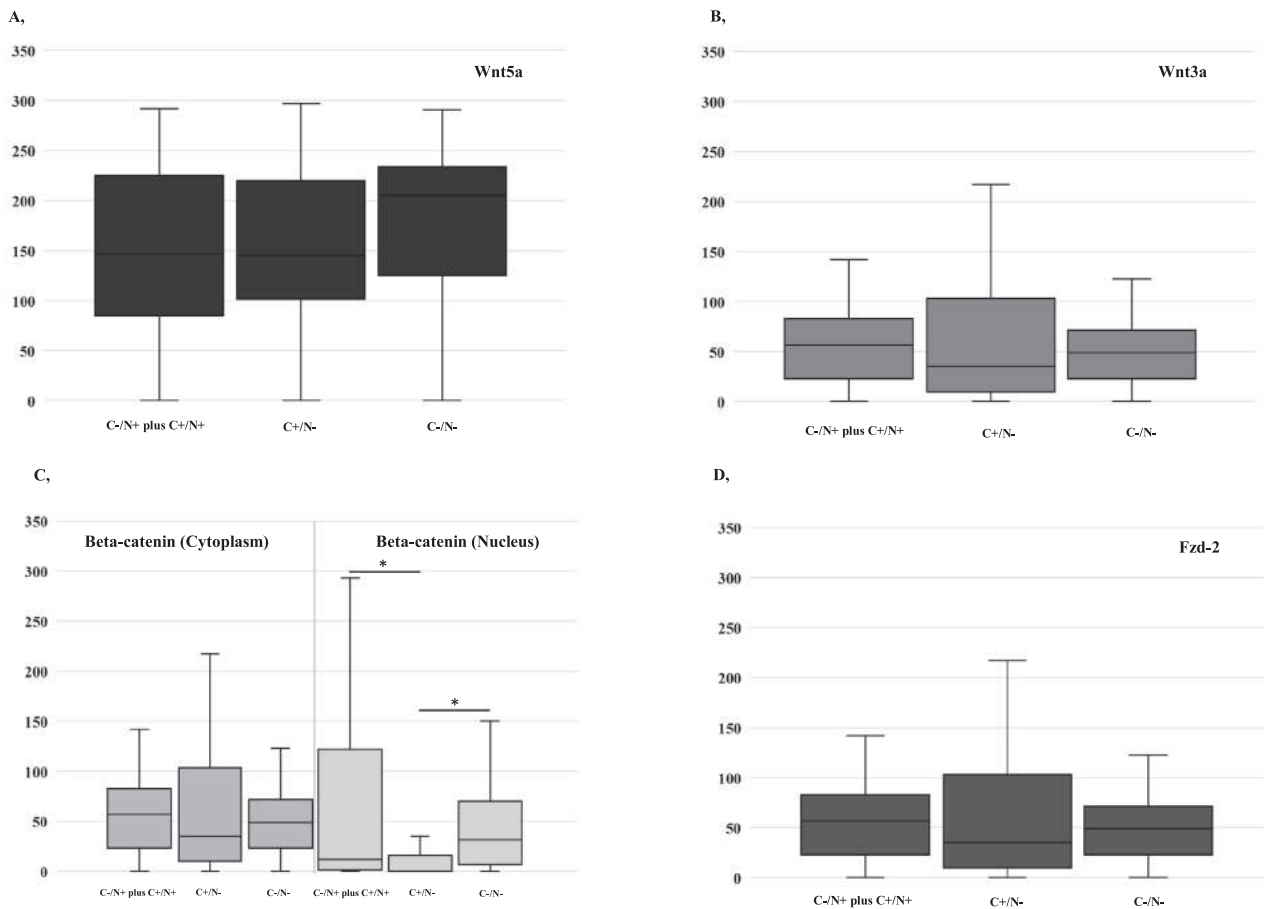


Fig. 6. Distribution of the Wnt markers in samples sorted according to NF-1 staining patterns. This figure shows expression patterns of non-canonical and canonical Wnt markers in NF-1 (marker enriched) subcohorts with c +/n-, N = 19; c-/n + combined with c +/n+, N = 23; and c-/n-, N = 15 staining patterns. A: Wnt5a, B: Wnt3a, C: cytoplasmic and nuclear beta-catenin, and D: Fzd-2. Medians Wnt marker HS values with the interquartile range are indicated. In the “among subgroup” comparisons, only HS values of the nuclear beta-catenin showed different distribution (Mann-Whitney *U* test $p = 0.021$ and $p = 0.03$ for c +/n- vs. c-/n + plus c +/n+, and c +/n- vs. c-/n-, respectively). (* $p < 0.05$).

and Fzd2) markers in the within subgroup comparisons (Fig. 4e–h). HS values for the Wnt5a ligand and its receptor Fzd2 seemed to be elevated in all subgroups, but statistically Wnt5a was significantly higher compared to Wnt3a in the IDH-1 R132H positive subgroup, while it was higher than Wnt3a and both the cytoplasmic and nuclear beta-catenin in the EGFRvIII and NF-1 c-/n- subgroups (Fig. 4e–h).

When we compared Wnt HS values between IDH-1 R132H positive and negative tumors, Wnt5a, beta-catenin and Fzd2 were again tentatively elevated while Wnt3a did not quantitatively differ (Fig. 5). This observation argues against the results of Kim et al. (2015) who found that Wnt5a signaling is independent of the IDH-1 status. Interestingly, Huang et al. (2016) found that the canonical Wnt pathway has a high activity in the proneural subgroup and Wnt3a is the major initiator of this pathway. On the contrary, Cui et al. (2016) reported that the presence of IDH-1 R132H mutation is in an inverse correlation with the expression level and nuclear localization of the Wnt mediator beta-catenin in gliomas (Cui et al., 2016). The R132H IDH-1 mutation significantly reduced the canonical Wnt/beta-catenin signaling in GBM cells, because the IDH-1 mutation upregulated negative regulators of the Wnt/beta-catenin pathway (e.g., DKK1 and APC), while downregulated several effector and target molecules (e.g., beta-catenin itself and TCF4/LEF1) (Cui et al., 2016). There may be a few possible explanations for these conflicting observations. First, the aforementioned authors worked with *in vitro* cell lines without the complex micro-environment of the clinical brain tumor specimens resulting in differences in the identity and number of interacting pathways. The lack of

down-regulation of beta-catenin in our IDH-1 R132H GBMs might have been due to the complexity of the *in vivo* regulatory pathways and the involvement of pathways not in operation in *in vitro* cell lines (eg. Notch) (Zhang et al., 2012). According to the TCGA data, the TCF4 transcription factor level is also elevated (indicating enhanced activation of the canonical Wnt pathway) in the proneural subgroup, consistent with our observation that the canonical Wnt pathway was not downregulated by IDH-1 R132H mutation (Suwala et al., 2016). Second, overexpression of the FoxM1 protein can be seen together with the loss of p53 in IDH-1 mutant GBMs, which may contribute to the nuclear translocation and accumulation of beta-catenin (Gong and Huang, 2012). Finally, the possibility of a biased Wnt/beta-catenin HS assessment cannot be excluded due to the low sample size of our IDH-1 mutant subgroup, representing 8% of the total GBM Cohort 1. In addition, affinity of the various primary antibodies used in IHC could also bias some of our observations.

In all subgroups (Fig. 4e–h), but in the NF-1 n/c- (TCGA mesenchymal) subgroup particularly (Fig. 4f), statistical differences were observed between the HS values for the non-canonical pathway and the canonical pathway markers suggesting that the non-canonical Wnt pathway predominantly contributes to GBM, and particularly to its mesenchymal subtype. The mesenchymal subgroup is the most aggressive and the most infiltrative type of the GBM. The TCGA data along with numerous other studies confirm that Wnt5a overactivation is characteristic of the mesenchymal subgroup (Verhaak et al., 2010; Binda et al., 2017). The Wnt5a ligand alone is capable of modifying the

TPC pattern, causing a global phenotypic shift of TPCs, and increasing the invasiveness of these cells in GBM. The Wnt5a-driven new molecular TPC phenotype is associated with poor prognosis and shorter survival time, features consistent with our findings (Liu et al., 2011a,b; Binda et al., 2017). Bhat et al. (2013) also showed that nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cell (NF- κ B), which is an important transcription factor of the non-canonical Wnt/Ca²⁺ pathway, is associated with elevated resistance to irradiation, and thus may contribute to the poor prognosis and shorter survival of patients in this subgroup. However, it is important to note, that the function of Wnt5a may depend on both intra- and intercellular processes. For example, in *in vitro* circumstances Wnt5a increases the invasiveness of melanoma through a beta-catenin independent pathway, whereas the beta-catenin independent pathway antagonizes the beta-catenin dependent pathway in colorectal tumors (Hu and Li, 2010). Wnt5a can stimulate the expression of the Fzd6 (that is involved in both the canonical and non-canonical Wnt pathways, but is predominantly reported as a non-canonical pathway receptor) and Fzd2 receptors in an autocrine manner, and these receptors then elevate the expression levels of the Wnt5a by creating a positive feedback loop. Finally, Fzd6 can affect the nuclear translocation of beta-catenin, and thus the canonical Wnt pathway (Huang et al., 2016). While our finding appears to be in consensus with previous observations concerning the higher expression of the non-canonical than the canonical Wnt pathway markers in GBM, particularly in the subtype overlapping with the TCGA mesenchymal subtype (Fig. 4f), the results generated by IHC may be confounded by potential affinity differences of primary antibodies. Therefore, a confirmation of the suggested differences in the expression levels of the non-canonical and canonical pathway markers in GBM subgroups is needed by more exact quantitative methods.

In the EGFRvIII positive (TCGA classical) subgroup, EGFR overactivity maybe associated with elements of both the canonical and non-canonical Wnt pathways (Fig. 4g). EGFR and beta-catenin are capable of mutually activating or inhibiting each other's regulatory elements (Hu and Li, 2010). In oral cancers, high EGFR activity promotes angiogenesis and cell migration by upregulating the vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteases (MMPs), which then contribute to the nuclear translocation of beta-catenin. *In vitro* and *in vivo* GBM studies showed that inhibition of beta-catenin results in decreased expression of EGFR (Paul et al., 2013). Furthermore, EGFR mutations and unmethylated genes of Wnt antagonists are associated with a favorable prognosis in non-small cell lung cancer, whereas the downstream genes of EGFR synergize with the Wnt pathway and promote tumor formation and progression in intestinal tumors (Hu and Li, 2010). In GBM, the non-canonical pathway-related TAK1 and NF-kappa-B essential modulator (NEMO) play important roles in the development of EGFRvIII-mediated tumor by the activation of NF- κ B transcription factor (Puliyappadamba et al., 2013). EGFRvIII also increases the activity of the canonical pathway, but for example the action of caveolin-1 protein inhibits the EGFR facilitating effect on beta-catenin (Abulrob et al., 2004). Taken together, the relationship of the Wnt pathway with the signal transduction pathway of EGFR and EGFRvIII is very complex, and is presumably influenced by the activation of many other molecules present in a given cancer cell and the tumor microenvironment.

Fig. 1 shows that about a third of all specimens in Cohort 1 remained unclassified. Although analyses of Wnt markers in this subgroup is not very informative (Fig. 4h), it is worth mentioning that the distribution patterns of the canonical and non-canonical Wnt markers in the unspecified subgroup resemble those in the classical subgroup, possibly due to EGFR (over)expression even in the unspecified subgroup (Verhaak et al., 2010). The lower level of nuclear beta-catenin in the unspecified GBM subgroup may be related to observations by Gong and Huang (2012), who analyzed the TCGA data and found that the other three GBM subgroups had much higher FoxM1 expression levels than the unspecified group. The lack of or the low level of FoxM1 might

have contributed to a low level of nuclear beta-catenin expression.

3.1.3. Wnt markers in enriched molecular subgroups of GBM

Since the GBM subgroup markers were not 100% present in the ROIs, we next performed the Wnt marker analyses in those specimens where the expression levels of the subgroup markers were at least 50%. However, this enrichment did not change the distribution or enhance the statistics of the Wnt markers. Further enrichment was precluded by the significant drop of sample size.

Since the most significant differences among the Wnt markers were detected in both the original and the enriched NF-1 c-/n- (TCGA mesenchymal) subgroups, we next further examined the Wnt HS values according to the NF-1 expression patterns (c+/n-, c-/n+ combined with c+/n+, and c-/n-) (Fig. 6). In normal cells and in a proportion of GBM tumor cells, NF-1 shows only cytoplasmic expression (c+/n-). Due to certain mutations or deletions within the large NF-1 gene, the neurofibromin protein may translocate in to the nucleus (c-/n+ or c+/n+) or alternatively, its expression may completely be lost (c-/n-) in tumors. Similarly, beta-catenin expression is predominantly cytoplasmic in differentiated normal cells, but due to the enhanced Wnt ligand - receptor engagement and activation of the canonical Wnt pathway, beta-catenin migrates and accumulates in the nucleus of tumor cells. Therefore, it was interesting to note in Fig. 6c, that the beta-catenin nuclear expression was the lowest in the NF-1 c+/n- sub-cohort, while all other (“pathological”) patterns of NF-1 expression (c+/n+ combined with c-/n+, and c-/n-) were associated with increased nuclear beta-catenin expression. Mutations in the tumor suppressor NF-1 increase tumor aggressiveness and invasiveness through EMT. The nuclear level of beta-catenin correlates with the expression level of EMT-promoting proteins (eg. Snail, Slug, Twist1, ZEB1) (Gong and Huang, 2012; Kahlert et al., 2012). We postulate that EMT is less likely to occur in GBMs with c+/n- NF-1 and low nuclear beta-catenin than in the subsets with other (“pathological”) NF-1 staining patterns (c-/n+, c+/n+ and c-/n-) and higher nuclear beta-catenin expression levels.

3.1.4. Correlations between subgroup marker HSs and Wnt HSs

We next correlated the HS values of the subgroup markers with the HS values of the Wnt pathway markers in each subgroup of GBM. No correlations were detected between the IDH-1 R132H and NF-1 HS values and the Wnt pathway markers. However, in the EGFRvIII positive subgroup, the non-canonical Fzd2 receptor HSs significantly correlated with the EGFRvIII HSs. We also noted a tendentious correlation between Wnt5a and Fzd-2 in the EGFRvIII subgroup, further suggesting that the elevated EGFR or EGFRvIII expression may be associated with non-canonical Wnt signaling. As detailed above (Discussion Section 3.1.2), there is a complex interaction between EGFR/EGFRvIII and the Wnt pathway ligands and receptors.

3.1.5. Wnt marker correlations in the entire sample population of Cohort 1

When we analyzed the expression levels of the Wnt pathway markers in the entire Cohort 1, Wnt5a significantly correlated with Fzd2 and nuclear β -catenin. Fzd2 is one of the most utilized receptors of Wnt5a (Asem et al., 2016; Suwala et al., 2016). Levels of both the Wnt5a and Fzd2 were found elevated in our entire Cohort 1 similar to those in other GBM publications (Kamino et al., 2011; Zhang et al., 2018). The correlation between Wnt5a and beta-catenin nuclear expression was somewhat unexpected, but may be explained by a cross-talk between the canonical and non-canonical Wnt pathways.

Wnt ligands and receptors are traditionally sorted into canonical and non-canonical pathways. Nevertheless, recent observations suggest a cross-talk between these ligands/receptors and the two pathways. Several Wnt ligands can activate either the canonical or non-canonical pathway dependent on biological circumstances and the assembly of certain receptors and co-receptors. For example, the Wnt3 (“canonical”) ligand in medulloblastoma inhibits cell proliferation via the non-

canonical pathway, while Wnt7a traditionally a “non-canonical” pathway ligand stimulates the canonical pathway (Suwala et al., 2016). Thus far, no data regarding cross-talk between the canonical and non-canonical pathways have been reported in GBM. The correlations detected here between Wnt5a (“non-canonical”) HSs and both the cytoplasmic and nuclear beta-catenin (“canonical”) HSs raise the possibility of an inter-pathway cross-talk.

Alternatively, the lack of correlation between the (“canonical”) Wnt3a and beta-catenin, and strong correlation between the (“non-canonical”) Wnt5a and beta-catenin may be the result of the more dynamic expression range of Wnt5a than of Wnt3a in a system, where both Wnt pathways are activated. Finally, higher affinity of Wnt5a and beta-catenin and lower affinity of Wnt3a specific antibodies used in IHC could be mere technical causes of the observations.

3.1.6. Wnt marker correlation with overall survival

Our study revealed no correlation between Wnt marker HS values and overall survival of patients with GBM. This finding may be explained by the lack of power due to a relatively small sample size and the high variability in the markers’ expressions. Alternatively, Wnt markers alone may not define outcome in clinical patient populations. This important question merits further studies in larger cohorts and with other methodological approaches.

3.2. Wnt markers in sequential GBM samples of Cohort 2

In Cohort 2, we analyzed the Wnt HS values in primary and recurrent tumor pairs. We expected elevated levels of Wnt markers in the recurrent tumors since several studies showed increased GSC activity accompanied with elevated Wnt expression in progressive tumors (Sandberg et al., 2013; Hu et al., 2016; Skoda et al., 2016; Suwala et al., 2016). However, no increasing levels, rather complex patterns of Wnt markers were detected in our paired GBM specimens over time. Although Wnt5a increased and Fzd2 decreased in most recurrent samples, even these markers could not reach statistical significance in the Wilcoxon signed rank test. Therefore, our data suggest that complex patterns of Wnt ligand and receptor expression may be characteristic of GBM over time. Larger cohorts of paired samples need to be tested to confirm if there are characteristic directions of changes in Wnt ligands and receptors in longitudinal GBM.

3.3. Wnt markers in trios of GBM tumor, normal appearing brain and invasive zone in Cohort 3

Several studies have established that Wnt ligands and receptors are expressed at much higher levels in tumors than in their normal tissue counterparts, setting the ground for our above studies. Kahlert et al. (2012) and Binda et al. (2017), also reported that the highest levels of both the canonical and non-canonical Wnt pathway markers may be in the tumor’s invasive zone. We did not have access to corresponding normal and tumor tissues in Cohort 1 and Cohort 2, since our samples were surgical specimens from live patients. However, in a small post-mortem series of tumor - invasive zone - normal brain region trios included in Cohort 3, we also found an increase of Wnt markers in the tumors compared to the normal regions, which was even statistically supported for the Wnt5a and Wnt3a markers, despite the small size of this cohort. Since the invasive zone is a blurred definition suffering from varying proportions of tumor cells (and of GSCs), we did not expect and indeed could not detect the highest proportion of Wnt HSC values in this zone of our small trio cohort.

4. Conclusions

The involvement of the Wnt pathway in tumorigenesis including the development of GBM is increasingly recognized. Our study revealed increased expression levels of markers involved in both the canonical

and non-canonical Wnt pathways in GBM but without significant differences among molecular tumor subgroups. Nevertheless, varying quantitative patterns of Wnt markers could be observed within each molecular tumor subclass. Overall, expression levels of the non-canonical markers appeared more predominant across samples and subgroups, but this finding needs to be taken with caution due to inherent methodological challenges associated with IHC. Our data also provided indirect evidence to presume interactions between GBM subgroup markers and Wnt markers as well as a possible cross-talk between the traditional canonical and non-canonical markers. In the small cohort of sequential samples we could not detect an unequivocal direction of changes in Wnt expression over time, instead complex patterns of changes were seen. Altogether our study suggests importance of the Wnt ligands and receptors in GBM development with likely complex inter-molecular/inter-pathway interactions underlying the tumor’s heterogeneous biological features. These IHC studies lay the ground for more comprehensive analyses using high resolution molecular methods in the evaluation of interactions between the Wnt and other pathways in this aggressive tumor, and for testing marker/pathway associations with clinical outcome in larger patient cohorts.

5. Materials and methods

5.1. Subjects of the study

GBM specimens were collected at the Pathology Department of the Markusovszky University Teaching Hospital (MUTH) between 2000 and 2018. Both the retrospectively and prospectively collected tissues were left over specimens from routine clinical histopathological evaluations. In each case, the clinical and histopathological diagnosis of GBM was established. All patients in the retrospective and also a great proportion of patients in the prospective subcohort had passed away by the end of the study. The protocol was approved by the local Ethics Committee and the Data Security Officer of the MUTH, and was fully compliant with the *Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki)*. From patients in the prospective subcohort, informed consent documents were obtained.

5.1.1. GBM specimens were studied in Cohort 1–3

Cohort 1 included 90 formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) blocks from 87 patients. After quality assessment by Hematoxylin-Eosin (HE) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) IHC staining of sections, 81 specimens of 78 patients were retained in the study. Of the 78 patients, 59 were retrospectively and 19 were prospectively included with the total number of 81 blocks. Sixty-two specimens from the 59 retrospective patients were also included in a previous study (Nagy et al., 2019). Only 5 patients were still alive among the prospectively included patients at the closure of the analyzes. All GBM specimens were surgically resected after the diagnosis, before any radiation and chemotherapy. A single specimen was available from each patient except for two, who had multifocal (two and three foci of) GBM, and thus in their cases, tumor tissues were obtained from multiple foci (Table 1a). For clinical correlation, patients’ age, gender and overall survival (time elapsed in weeks between the date of surgery and date of death) were used along with the molecular markers.

Cohort 2 represented sequential FFPE GBM specimens, where the first samples were surgically obtained after diagnosis, before radiation or chemotherapy, while the second and third samples were surgically resected recurrent tumors after radiation and TMZ chemotherapy. This cohort included 21 blocks from 9 patients in the initially selection, which was reduced to 19 specimens from 8 patients after quality selection of sections stained by HE and GFAP IHC (Table 1b).

Cohort 3 represented a small, post-mortem FFPE sample series, where 10 trios of GBM, normal appearing brain tissue and the invasive zone between the tumor and normal brain tissue were included in each. After quality selections, 8 trios were retained in the final analyzes

Table 1

Characteristics of the three study cohorts. A summarizes clinical data including patients' number, gender and the age of disease onset in Cohort 1. B shows the patients' gender, age at the onset and recurrence as well as the duration of GBM in Cohort 2. C summarizes the gender and age of death for patients whose post mortem samples were included in Cohort 3.

A					
Gender	Number of patients	Age of onset (Mean)	Age of onset (Median)	Age of onset (Range)	
Female	46	64	67	33–82	
Male	32	63	62	40–78	
Total	78	64	65	33–82	
B					
Gender	Histological codes of primary tumors	Histological codes of recurrent tumors	Age at first diagnosis	Age at recurrence	Time between the first and second surgery (weeks)
Male	7255/03	11880/05	51	53	114
Female	18769/04	1a_1567/06 1b_1568/06 12371/06	49	50	57
Female	8626/05	16804/05	56	56	86
Male	11396/05	12314/05	53	53	21
Male	11424/05	1350/06	51	52	3
Female	13602/05	5700/06	64	65	27
Female	5641/13	1465/18	45	50	31
Male	16945/15	1a_1500/17 1b_1500/17	66	67	249
Male			66	67	70
C					
Gender	Block code	Age of death (years)			
Female	194/05	83			
Male	157/03	25			
Female	197/09	40			
Male	148/10	74			
Female	177/N	85			
Female	201/16	61			
Male	40035/15	37			
Female	167/12	64			

(Table 1c)

5.2. Immunohistochemistry analyses

From the FFPE tissue blocks, 3 μm sections were prepared. ROI in each tumor was selected and marked based on a preliminary HE and GFAP evaluation of the tumor. The ROI contained the most malignant looking, highly cellular and mitotic segment of GBM with polymorphic

Table 2

Primary antibodies used in immunohistochemistry. This table lists the primary antibodies with indication of the manufacturers, catalogue numbers, characteristics concerning specificity, clonality, immunogenicity and working dilutions as used in this study.

Manufacturer	Catalogue number	Primary antibody	Clonality	Immunogen	Dilution
Dako	M7239	EGFR	Monoclonal (mouse)	Purified, denatured epidermal growth factor receptor	1:35
Biorbyt	orb47907	EGFRvIII	Polyclonal (rabbit)	Synthetic peptide: LEEKKGNVVTDHC	1:200
Abcam	ab128054	NF-1	Polyclonal (rabbit)	Synthetic peptide, Corresponding to an internal region of Human Neurofibromin	1:300
Dianova	DIA-H09	IDH-1 R132H	Monoclonal (mouse)	Synthetic peptide, amino acid sequence: CKPIIGHHAYGD	1:40
Biorbyt	orb69157	Wnt5a	Monoclonal (mouse)	Purified recombinant fragment of Wnt5A expressed in E. Coli.	1:200
Abcam	ab81614	Wnt3a	Monoclonal (mouse)	Recombinant full length human Wnt3a (aa19-352)	1:200
Abcam	ab6302	β-Catenin	Polyclonal (rabbit)	Synthetic peptide: PGDSNQLAWFDTDL, Corresponding to amino acids 768–781	1:500
Everest Biotech	EB08353	Fzd-2	Monoclonal (goat)	Peptide with sequence RYATLEHPFHCP, from internal region of the protein sequence	1:250
Abcam	ab6741	Anti-Goat	Polyclonal (rabbit)	Goat IgG whole molecule	1:200

nuclei, but without or with minimal amount of necrosis and vascularity.

Optimal conditions for antigen retrieval and antibody dilution were established in a small pilot study (Table 2, Fig. 7a, b). GBM molecular subgroup markers included: IDH-1 R132H, EGFR, EGFRvIII and NF-1. For the IDH-1 R132H and for EGFRvIII markers, the presence or absence of the mutant molecule was determined. For NF1 staining, four staining patterns were distinguished: Cytoplasmic + /nuclear- (c + /n-), c-/n +, c + /n + and c-/n-. For the Wnt pathway, the Wnt5a and Fzd2 (non-canonical) and the Wnt3a and beta-catenin (canonical) markers were used. Cytoplasmic and nuclear staining patterns were distinguished for beta-catenin. Secondary antibodies along with the diaminobenzidin substrate were included in the Novolink Polymer Detection System RE-7140-K kit (Leica Biosystems, Newcastle, UK) and used for labeling the primary antibody binding in case of all, except the anti-Fzd2 antibody. Anti-Fzd2 was generated in goat, therefore, a rabbit anti-goat secondary antibody was included along with the Novolink system. Hematoxylin counter-staining was used for the visualization of cell nuclei.

Three independent readers quantitatively evaluated the IHC results using 1:200 magnification objective of an Olympus BX51 microscope (Olympus Corp., Japan). The primary reader was the first author of this paper (MT), whose reading was used for the presentation of data. Due to an extensive reading exercise prior to the study, the primary reader's quantitation differed less than 10% from those by the secondary and tertiary readers (AN and BK) in all cases. The readers were blinded for the evaluations by the other two readers when they quantified staining under the microscope, but not for the specificity of antibody. In three marked subregions of each ROI, intensity of staining on the scale of 0, +, ++ and +++ (in a numerical scale of 0, 1, 2 and 3), and percentage of stained cells were determined and subsequently averaged. HistoScore (HS) values were derived by multiplying the numerical staining intensity values by the % of positive cells (Nagy et al., 2019).

5.3. Pyrosequencing

We performed pyrosequencing for the confirmation of the IDH1 R132H mutation detected by IHC, as previously described (Setty et al., 2010; Nagy et al., 2019).

5.4. Statistics

In Cohort 1, molecular subgroups of GBM were determined based on the IDH1 R132H and EGFRvIII mutant expression, and the cytoplasmic as well as nuclear loss of NF1 expression (c-/n-) (Nagy et al., 2019). For the distribution of Wnt marker HS values among and within the molecular GBM subgroups, Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests were used. Overall survival indicators of patients in the various molecular subgroups of GBM were compared by the Kaplan-Meier survival analyzes. For gender association with GBM molecular subgroups, the Pearson's Chi square test was applied. Differences in age of onset between molecular subgroups of GBM were tested by the Mann-Whitney

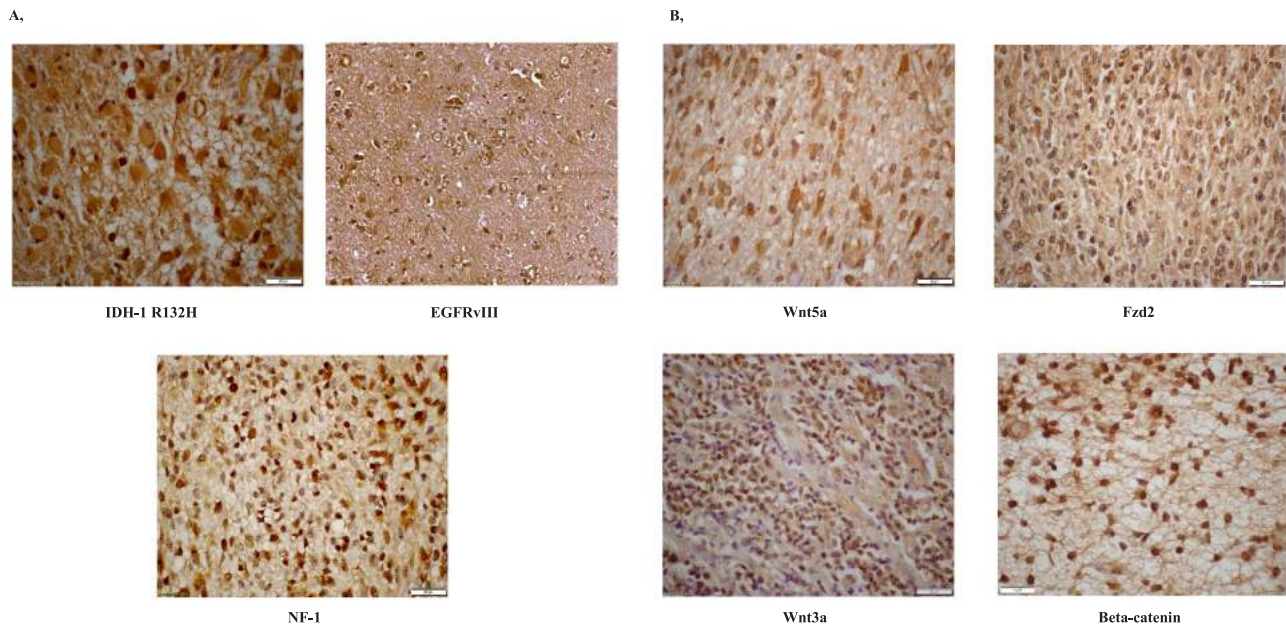


Fig. 7. Representative images of staining patterns with the GBM molecular subgroup and Wnt pathway markers. This figure illustrates IHC staining patterns with the IDH-1 R132H (cytoplasmic), EGFRvIII (membrane with faint cytoplasmic staining) and NF-1 (nuclear and cytoplasmic) molecular subgroup markers (A), and those with the Wnt5a (cytoplasmic), Fzd2 (mostly membrane), Wnt3a (cytoplasmic) and beta-catenin (both cytoplasmic and nuclear staining) Wnt pathway markers (B).

U test. Correlations between Wnt markers, overall survival and molecular subgroup markers were tested by using Kendall's τ correlation analysis. In Cohort 2, differences in the expression levels of Wnt HS values in the primary and recurrent GBM pairs were tested by using the Wilcoxon signed rank test. In Cohort 3, Wnt marker HS values in the three aforementioned zones were compared by Kruskal-Wallis test. All employed statistical tests were included in the SPSS v. 23.0 package (SAGE, IBM® SPSS® Statistics v23.0).

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgements

These studies were supported by state funds through the Graduate School for Neurosciences, University of Pecs, Pecs, Hungary and the Markusovszky University Teaching Hospital, Szombathely, Hungary.

References

- Abulrob, A., Giuseppin, S., Andrade, M.F., McDermid, A., Moreno, M., Stanimirovic, D., 2004. Interactions of EGFR and caveolin-1 in human glioblastoma cells: evidence that tyrosine phosphorylation regulates EGFR association with caveolae. *Oncogene* 23 (41), 6967. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207911>.
- Asem, M., Buechler, S., Wates, R., Miller, D., Stack, M., 2016. Wnt5a signaling in cancer. *Cancers* 8 (9), 79. <https://doi.org/10.3390/cancers8090079>.
- Bhat, K.P., Balasubramanian, V., Vaillant, B., Ezhilarasan, R., Hummelink, K., Hollingsworth, F., et al., 2013. Mesenchymal differentiation mediated by NF- κ B promotes radiation resistance in glioblastoma. *Cancer Cell* 24 (3), 331–346. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.001>.
- Binda, E., Visioli, A., Giani, F., Trivieri, N., Palumbo, O., Restelli, S., et al., 2017. Wnt5a drives an invasive phenotype in human glioblastoma stem-like cells. *Cancer Res.* 77 (4), 996–1007. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1693>.
- Brennan, C.W., Verhaak, R.G., McKenna, A., Campos, B., Nounshmehr, H., Salama, S.R., et al., 2013. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155 (2), 462–477. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.034>.
- Cui, D., Ren, J., Shi, J., Feng, L., Wang, K., Zeng, T., et al., 2016. R132H mutation in IDH1 gene reduces proliferation, cell survival and invasion of human glioma by down-regulating Wnt/ β -catenin signaling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 73, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.02.007>.
- de Almeida Sassi, F., Lunardi, Brunetto A., Schwartzmann, G., Roesler, R., Abujamra, A.L., 2012. Glioma revisited: from neurogenesis and cancer stem cells to the epigenetic regulation of the niche. *J. Oncol. Res.* <https://doi.org/10.1155/2012/537861>.

- Dunn, G.P., Rinne, M.L., Wykosky, J., Genovese, G., Quayle, S.N., Dunn, I.F., et al., 2012. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev.* 26 (8), 756–784. <https://doi.org/10.1101/gad.187922.112>.
- Eder, K., Kalman, B., 2014. Molecular heterogeneity of glioblastoma and its clinical relevance. *Pathol. Oncol. Res.* 20 (4), 777–787. <https://doi.org/10.1007/s12253-014-9833-3>.
- Gong, A., Huang, S., 2012. FoxM1 and Wnt/ β -catenin signaling in glioma stem cells. *Cancer Res.* 72 (22), 5658–5662. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0953>.
- Hu, T., Li, C., 2010. Convergence between Wnt/ β -catenin and EGFR signaling in cancer. *Mol. Cancer* 9, 236. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-236>.
- Hu, B., Wang, Q., Wang, Y.A., Hua, S., Sauvé, C.E.G., Ong, D., et al., 2016. Epigenetic activation of WNT5A drives glioblastoma stem cell differentiation and invasive growth. *Cell* 167 (5), 1281–1295. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.039>.
- Huang, T., Alvarez, A.A., Pangeni, R.P., Horbinski, C.M., Lu, S., Kim, S.H., et al., 2016. A regulatory circuit of miR-125b/miR-20b and Wnt signalling controls glioblastoma phenotypes through FZD6-modulated pathways. *Nat. Commun.* 7, 12885. <https://doi.org/10.1038/ncomms12885>.
- Kahlert, U.D., Maciaczyk, D., Doostkam, S., Orr, B.A., Simons, B., Bogiel, T., et al., 2012. Activation of canonical WNT/ β -catenin signaling enhances in vitro motility of glioblastoma cells by activation of ZEB1 and other activators of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Lett.* 325 (1), 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.05.024>.
- Kamino, M., Kishida, M., Kibe, T., Ikoma, K., Iijima, M., Hirano, H., et al., 2011. Wnt-5a signaling is correlated with infiltrative activity in human glioma by inducing cellular migration and MMP-2. *Cancer Sci.* 102 (3), 540–548. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01815.x>.
- Kim, Y., Hong, M., Do, I.G., Ha, S.Y., Lee, D., Suh, Y.L., 2015. Wnt5a, Ryk and Ror2 expression in glioblastoma subgroups. *Pathol. Res. Pract.* 211 (12), 963–972. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2015.10.00>.
- Kim, J.H., Park, S.Y., Jun, Y., Kim, J.Y., Nam, J.S., 2017. Roles of Wnt target genes in the journey of cancer stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* 18 (8), 1604.
- Lambiv, W.L., Vassallo, I., Delorenzi, M., Shay, T., Diserens, A.C., Misra, A., et al., 2011. The Wnt inhibitory factor 1 (WIF1) is targeted in glioblastoma and has a tumor suppressing function potentially by induction of senescence. *Neuro-Oncol.* 13 (7), 736–747. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nor036>.
- Liu, C., Tu, Y., Sun, X., Jiang, J., Jin, X., Bo, X., 2011a. Wnt/ β -Catenin pathway in human glioma: expression pattern and clinical/prognostic correlations. *Clin. Exp. Med.* 11 (2), 105–112. <https://doi.org/10.1007/s10238-010-0110-9>.
- Liu, X., Wang, L., Zhao, S., Ji, X., Luo, Y., et al., 2011b. β -Catenin overexpression in malignant glioma and its role in proliferation and apoptosis in glioblastoma cells. *Med. Oncol.* 28 (2), 608–614. <https://doi.org/10.1007/s12032-010-9476-5>.
- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., Von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., et al., 2016. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol.* 131 (6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.
- Matias, D., Dubois, L.G., Pontes, B., Rosário, L., Ferrer, V.P., Balça-Silva, J., et al., 2019. GBM-derived Wnt3a induces M2-like phenotype in microglial cells through Wnt/ β -catenin signaling. *Mol. Neurobiol.* 56 (2), 1517–1530. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1150-5>.
- Miller, J.R., Hocking, A.M., Brown, J.D., Moon, R.T., 1999. Mechanism and function of

- signal transduction by the Wnt/ β -catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene* 18 (55), 7860.
- Nagy, Á., Garzuly, F., Padányi, G., Szűcs, I., Feldmann, Á., Murnyák, B., et al., 2019. Molecular subgroups of glioblastoma—an assessment by immunohistochemical markers. *Pathol. Oncol. Res.* 25 (1), 21–31. <https://doi.org/10.1007/s12253-017-0311-6>.
- Noushmehr, H., Weisenberger, D.J., Diefes, K., Phillips, H.S., Pujara, K., Berman, B.P., et al., 2010. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 17 (5), 510–522. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.03.017>.
- Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C.H., Leary, R.J., Angenendt, P., et al., 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321 (5897), 1807–1812. <https://doi.org/10.1126/science.1164382>.
- Paul, I., Bhattacharya, S., Chatterjee, A., Ghosh, M.K., 2013. Current understanding on EGFR and Wnt/ β -catenin signaling in glioma and their possible crosstalk. *Genes Cancer* 4 (11–12), 427–446. <https://doi.org/10.1177/1947601913503341>.
- Puliyappadamba, V.T., Chakraborty, S., Chauncey, S.S., Li, L., Hatanpaa, K.J., Mickey, B., et al., 2013. Opposing effect of EGFRWT on EGFRvIII-mediated NF- κ B activation with RIP1 as a cell death switch. *Cell Rep.* 4 (4), 764–775. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.025>.
- Sandberg, C.J., Altschuler, G., Jeong, J., Strømme, K.K., Stangeland, B., Murrell, W., et al., 2013. Comparison of glioma stem cells to neural stem cells from the adult human brain identifies dysregulated Wnt-signaling and a fingerprint associated with clinical outcome. *Exp. Cell Res.* 319 (14), 2230–2243. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.06.004>.
- Setty, P., Hammes, J., Rothämel, T., Vladimirova, V., Kramm, C.M., Pietsch, T., et al., 2010. A pyrosequencing-based assay for the rapid detection of IDH1 mutations in clinical samples. *J. Mol. Diagn.* 12 (6), 750–756. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2010.090237>.
- Skoda, J., Hermanova, M., Loja, T., Nemeš, P., Neradil, J., Karasek, P., Veselska, R., 2016. Co-expression of cancer stem cell markers correspond to a pro-tumorigenic expression profile in pancreatic adenocarcinoma. *PLoS One* 11 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159255>.
- Stupp, R., Mason, W.P., Van Den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., et al., 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New Engl. J. Med.* 352 (10), 987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>.
- Suwala, A.K., Hanaford, A., Kahlert, U.D., Maciaczyk, J., 2016. Clipping the wings of glioblastoma: modulation of Wnt as a novel therapeutic strategy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 75 (5), 388–396. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlw013>.
- The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455 (7216), 1061–1068. <https://doi.org/10.1038/nature.e1190.3>.
- Tompa, M., Kalovits, F., Nagy, A., Kalman, B., 2018. Contribution of the Wnt pathway to defining biology of glioblastoma. *Neuromol. Med.* 20 (4), 437–451. <https://doi.org/10.1007/s12017-018-8514-x>.
- Verhaak, R.G., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., et al., 2010. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17 (1), 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>.
- Weller, M., Butowski, N., Tran, D.D., Recht, L.D., Lim, M., Hirte, H., et al., 2017. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 18 (10), 1373–1385. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30517-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30517-X).
- Zhang, H., Qi, Y., Geng, D., Shi, Y., Wang, X., Yu, R., Zhou, X., 2018. Expression profile and clinical significance of Wnt signaling in human gliomas. *Oncol. Lett.* 15 (1), 610–617. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7315>.
- Zhang, N., Wei, P., Gong, A., Chiu, W.T., Lee, H.T., Colman, H., et al., 2011. FoxM1 promotes β -catenin nuclear localization and controls Wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis. *Cancer Cell* 20 (4), 427–442. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.08.016>.
- Zhang, K., Zhang, J., Han, L., Pu, P., Kang, C., 2012. Wnt/ β -catenin signaling in glioma. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 7 (4), 740–749. <https://doi.org/10.1007/s11481-012-9359-y>.

Tudományos cikk elfogadásának igazolása

**2021 aug. 4.
Sze 14:02**

Kedves Tompa Márton,

elnézését kérem, hogy tanulmányuk az előző (7-8-as) lapszámba sem fér be (a covid-témájú cikkek elsőbbséget élveznek, és sorban állás nélkül bekerülnek, illetve a fast publication és a szponzorált cikkek is előre nem tervezhető módon beelőznek).

Elfogadott és nyomdakész tanulmányuk (Wnt pathway markers in low-grade and high-grade gliomas) a következő lapszámban (ISZ 2021 9-10) fog megjelenni, szeptember 30-án.

Elnézését kérem még egyszer, üdvözlöm:
dr. Kazai Anita

WNT PATHWAY MARKERS IN LOW-GRADE AND HIGH-GRADE GLIOMAS

Ádám NAGY^{1*}, Márton TOMPA^{2*}, Zoltan KRABÓTH², Ferenc GARZULY³,
Alexandra MARÁCZI¹, Bernadette KÁLMÁN^{1, 2}

¹Department of Molecular Pathology, Markusovszky University Teaching Hospital, Szombathely

²Institute of Laboratory Medicine, Clinical Center and the Szentagóthai Research Center, University of Pécs,
School of Medicine, Pécs

³Department of Pathology, Markusovszky University Teaching Hospital, Szombathely

*Contributed equally to the study and the preparation of the manuscript



English | <https://doi.org/10.18071/isz.74.0000> | www.elitmed.hu

WNT-ÚTVONALMARKEREK ALACSONY ÉS MAGAS GRÁDIUSÚ GLIOMÁKBAN

Nagy A, PhD; Tompa M, MSc; Krabóth Z, MSc; Garzuly F, MD, PhD; Maráci A, MSc; Kálmán B, MD, DSc, FAAN
Ideggyogy Sz 2021;74(5–6):000–000.

Background and purpose – Aberrant activation of the Wnt pathway contributes to differentiation and maintenance of cancer stem cells underlying gliomagenesis. The aim of our research was to determine as to what degrees some Wnt markers are expressed in gliomas of different grades, lineages and molecular subtypes.

Methods – Nine grade II, 10 grade III and 72 grade IV surgically removed, formalin-fixed paraffin-embedded glioma specimens were included. Mutation status of IDH1 codon 132 was defined by immunohistochemistry and pyrosequencing in all tumors. Grade II and III astrocytic and oligodendroglial tumors were further tested for the expression of p53 and ATRX by immunohistochemistry, and codeletion of 1p19q by fluorescent in situ hybridization. Expression levels of the non-canonical Wnt5a and Fzd2, and the canonical Wnt3a and beta-catenin Wnt pathway markers were determined by immunohistochemistry, and compared between subgroups stratified according to grade, lineage and the presence or absence of IDH1 R132H/C mutations.

Results – In the normal brain – grade II-IV glioma comparisons, a gradual increase was observed for the expressions of Wnt5a, Wnt3a, Fzd2 and beta-catenin. In the astroglial and oligodendroglial lineages of grade II and III gliomas, only the Wnt5a expression was significantly higher in the astroglial subgroup. Stratification according to the IDH1 status resulted in a significant increase of the Wnt3 expression in the wild type grade II-IV gliomas.

Háttér és cél – A glioma kialakulásában szerepet játszik a Wnt-útvonallal aberráns aktiválása az őssejtek differenciálódásának és fenntartásának szabályozása által. Kutatásunk célja volt meghatározni, hogy egyes Wnt-markerek milyen mértékben expresszálódnak a különböző grádusú, szövettani eredetű és mutációs profilú gliomákban.

Módszerek – Kilenc grádus II., 10 grádus III. és 72 grádus IV., műtéti úton eltávolított, formalinfixált paraffinba ágyazott gliomát vizsgáltunk. Az IDH1 132 kodon mutációs állapotát immunhisztokémia és pirosequálás módszerrel határoztuk meg minden tumorban. A II. és III. grádusú astroglialis és oligodendroglialis tumorokat tovább vizsgáltuk p53- és ATRX-expresszióra immunhisztokémiával, és 1p19q kodelécióra fluoreszcens in situ hibridizációval. A nem kanonikus Wnt5a és Fzd2, valamint a kanonikus Wnt3a és β -katenin Wnt-útvonalmarkerek expressziós szintjét immunhisztokémiai úton határoztuk meg, és az expressziós értékeket összehasonlítottuk a tumorok grádusa, hisztológiai eredete (asztrocitoid vs. oligodendroglial) és az IDH1 R132H / C mutációk jelenléte vagy hiánya szerinti alcsoportokban.

Eredmények – A normál agyi szövet vs. II-IV. grádusú gliomák összehasonlítása során egy grádus szerinti fokozatos növekedést figyeltünk meg a Wnt5a, Wnt3a, Fzd2 és a β -katenin expressziójában. A II. és III. grádusú gliomák astroglialis és oligodendroglialis szövettani eredetű összehasonlítása során csak a Wnt5a-expresszió volt szignifikánsan magasabb az asztroglia-alcsoportban. Az IDH1 R132H / C mutáns és vad típusú gliomák össze-

Correspondent: Prof. Bernadette KÁLMÁN, Institute of Laboratory Medicine, Szentagóthai Research Center, University of Pécs; 7624 Pécs, 20. Ifjúság Street, Room A112.

T: 36-72-501-500 ext 29205, e-mail: bernadette.kalman@pte.hu
<https://orcid.org/0000-0003-2592-3939>

Érkezett: 2020. október 2. Elfogadva: 2020. november 20.

Conclusion – These data extend previous observations and show a correlation of Wnt pathway activity with glioma grade. Further investigations of the Wnt marker expression regulation according to glioma lineage or IDH gene mutational status are in progress by using more exact molecular approaches.

Keywords: glioma, grade, lineage, IDH1 mutation, Wnt pathway

hasonlítása során a Wnt3 emelkedését találtuk a vad típusú grade II–IV. gliomák csoportjában.

Következtetés – Ezek az adatok kibővítik a korábbi megfigyelések eredményeit, és összefüggést mutatnak a Wnt-útvonallal aktivitása, valamint a gliomagrádus között. A Wnt-markerek expressziós szabályozásának további vizsgálata gliomákban már folyamatban van szövettani eredet vagy IDH-génmutációs státusz szerint, nagy felbontású molekuláris vizsgálatok alkalmazásával.

Kulcsszavak: glioma, grádus, szövettani eredet, IDH1 mutáció, Wnt-útvonallal

The Wingless-related integration site (Wnt) gene family has been intensively studied in both normal and pathological conditions¹. The 19 known human Wnt ligands may engage one or a few of their 15 different receptors and co-receptors aligning in two major signaling pathways: the canonical (beta-catenin-mediated) and the non-canonical (non-beta-catenin-mediated) pathways. These conserved pathways are involved in early embryonic development as well as in tumorigenesis by controlling cell differentiation, proliferation and migration¹.

Recent studies demonstrated that both Wnt signaling pathways may be involved in the pathogenesis of gliomas, however, likely with differential quantitative and qualitative characteristics dependent on grade and molecular profiles¹. Because of the key functions of these pathways in driving glioma initiation and progression, therapeutic targeting of the involved ligands, receptors and regulators appears to be an attractive approach that is under investigation at several research centers¹. Based on these considerations, we recently tested expression levels of the canonical and non-canonical Wnt pathways, and found no differences in marker expression among, but significant differences in marker distribution within molecular subgroups of glioblastoma (GBM)².

Here we analyze further the importance of canonical and non-canonical Wnt pathway markers in grade II–IV gliomas, and test the differential involvements of these markers in the grade II–III subgroups discriminated by lineage and molecular markers.

Materials and methods

SUBJECTS OF THE STUDIES

After quality selection, 9 grade II, 10 grade III and 72 grade IV formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) glioma specimens were included in the study from the tissue collection of the Pathology Department at our Hospital. The study was approved by the institutional research ethics committee and performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. Most specimens were retrospective, surgically removed tumors. In a few cases, the surgically removed specimens were prospectively obtained, after the patient signed the informed consent document. Parts of the GBM cohort were included in previous analyses^{2,3}. **Table 1.A** and **B** show demographic data of patients and distribution of histological tumor types. As a control, eight postmortem pairs of normal brain and GBM were used, since surgically removed non-tumor brain specimens were unavailable.

IHC AND MOLECULAR STUDIES

For details of GBM specimen selection, region of interest (ROI) definition and method of IHC see previous publications^{2,3}. In the more homogeneous grade II–III tumors, the entire area of each section was stained and evaluated by IHC.

Histological evaluation was complemented by determination of the isocitrate dehydrogenase-1 (IDH1) R132H mutation status, and the p53 and

Table 1. Demographic data of patients with grade II-IV gliomas. **Table 1.A** shows the number of patients with grade II-IV gliomas, and the figures of mean age and median age with interquartile range in years. Note that from two patients with multifocal GBMs, two and three specimens were included in the study (that is why 72 specimens from 69 patients were included). **Table 1.B** presents the number and age distribution of patients with histologically defined gliomas of various grades

Grade II gliomas				
Gender	Number of patients	Age of onset (Mean)	Age of onset (Median)	Age of onset (Range)
Female	5	47	45	37-62
Male	4	49	51	40-55
Total	9	48	47	37-62
Grade III gliomas				
Gender	Number of patients	Age of onset (Mean)	Age of onset (Median)	Age of onset (Range)
Female	6	58	57	37-74
Male	4	49	51	31-62
Total	10	54	56	31-74
Grade IV gliomas (GBMs)				
Gender	Number of patients	Age of onset (Mean)	Age of onset (Median)	Age of onset (Range)
Female	40	64	67	33-82
Male	29	63	62	40-78
Total	69	64	65	33-82

Table 1.B

Tumor type	Grade II			Grade III		Grade IV
	Diffuse astrocytoma	Oligodendroglioma	Anaplastic astrocytoma	Anaplastic oligodendroglioma	Anaplastic oligoastrocytoma	Glioblastoma
Number of patients	5	4	3	6	1	69
Age of onset (Mean)	46	52	49	56	56	64
Age of onset (Median)	46	53	45	57	56	65
Age of onset (Range)	37-55	40-62	31-70	37-74	-	33-82

ATRX expressions by IHC^{2, 3}. When the result of IDH1 R132H IHC was ambiguous, pyrosequencing was performed, which also revealed an IDH1 R132C mutation^{2, 3}. In oligodendroglial grade II and III tumors, 1p and 19q deletions were determined by using the Vysis 1p36/1q25 and 19q13/19p13 fluorescent *in situ* hybridization (FISH) probes (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). The histological diagnosis of one anaplastic oligoastrocytoma was reclassified to IDH1 R132H mutant, 1p19q codeleted oligodendroglioma (grade III) after molecular analyses.

For studying the Wnt pathway markers, the non-canonical Wnt5a and Fzd2, and the canonical Wnt3a and beta-catenin markers were tested by IHC as described². Representative images of these IHC preparations are shown in **Figure 1**. Wnt

expression levels were compared in the control normal brain – GBM pairs and in grade II - IV gliomas. Quantitative evaluations of Wnt IHC results were carried out by three readers under an Olympus BX51 microscope (Olympus Corp., Japan)². Combined score (CS) values were calculated by multiplying the staining intensity numerical values (0, 1, 2 and 3) by the % of positive cells².

STATISTICS

Median and interquartile range values of Wnt marker CSs were determined, and compared in controls and grade II - IV tumors. CS values were also compared in the grade II and III glioma subcohorts distinguished by grade and lineage, and by IDH1 R132H/C mutant and wild type status as well as by

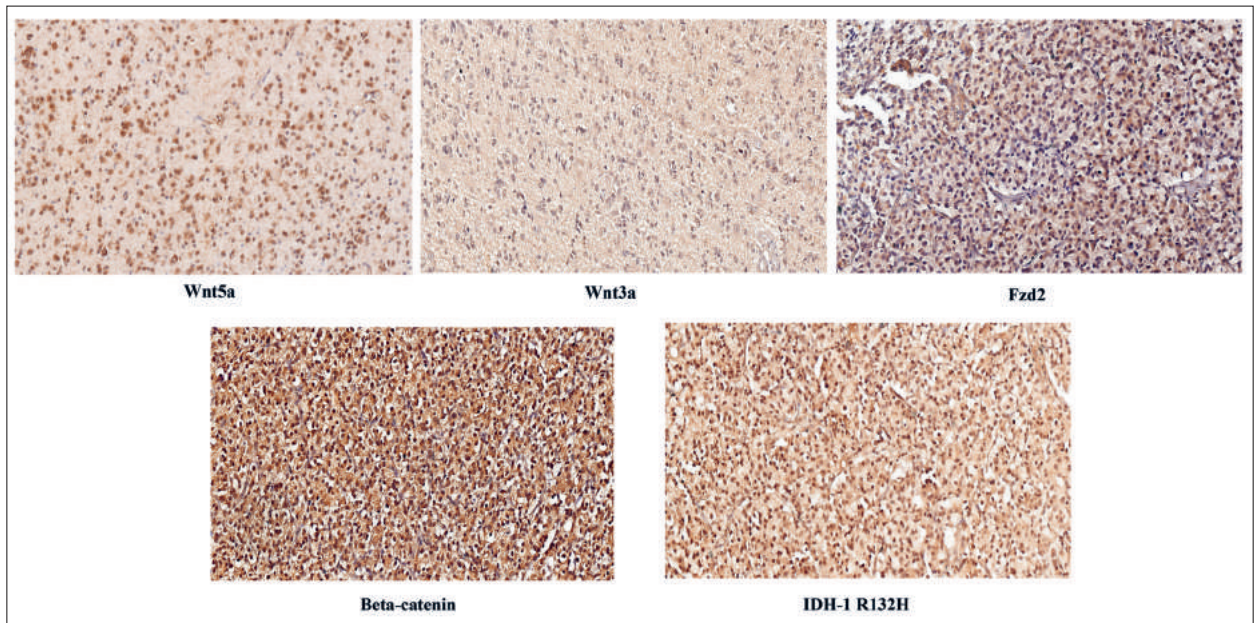


Figure 1. Representative IHC images of Wnt marker and IDH-1 R132H staining patterns. Figure depicts IHC appearance of Wnt5a, Wnt3a, Fzd2, beta-catenin and IDH-1 R132H in GBM specimens

p53 and ATRX positive and negative status. The Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests were used in the SPSS v. 23.0 package (SAGE, IBM® SPSS® Statistics v23.0).

Results

EXPRESSION LEVELS OF WNT MARKERS IN GRADE II-IV GLIOMAS AND NORMAL BRAIN

Figure 2.A indicates significant increases in the CS values for all Wnt markers, except for Wnt3a, in GBMs compared to normal brain tissues (Wnt5a $p=0.004$; Fzd2 $p=0.015$; cytoplasmic beta-catenin $p<0.001$; nuclear beta-catenin $p=0.001$). However, only the cytoplasmic ($p=0.016$) and nuclear ($p=0.030$) beta-catenin CS values were significantly increased in grade II and III tumors vs. normal brains (**Figure 2.A**). While the comparisons of Wnt marker expressions were not ideal in post mortem normal brain specimens and surgically removed gliomas (surgically removed normal brain controls are unavailable), the validity of the above observations was supported by the finding that these markers appeared higher either tententiously (Fzd2 and beta-catenin) or significantly (in cases of Wnt5a $p=0.003$, and Wnt3a $p=0.029$) in the GBMs compared to the corresponding normal brain regions in the eight post mortem tissue pairs.

In Figure 2b, we compared CS values for the four Wnt markers between grade II and grade III

tumors, but detected no differences, an observation that prompted us to combine grade II and III tumors in some analyses (as shown in **Figure 2.A**, **Figure 3**). However, in the three group comparisons including grade II, III and IV tumors, significant differences appeared for Wnt5a (grade III vs. grade IV $p<0.001$) and Wnt3a (grade II vs. grade IV $p=0.036$; and grade III vs. grade IV $p=0.001$), but only a trend for cytoplasmic beta-catenin (grade III vs. grade IV $p=0.07$) (**Figure 2.B**).

COMPARISON OF WNT MARKERS IN GRADE II-III GLIOMAS ACCORDING TO LINEAGES

Of the 19 grade II-III gliomas, 8 astroglial and 11 oligodendroglial tumors were distinguished based on histological and molecular markers (7 IDH1 R132H/C mutant and 1 IDH1 R132H/C wild type astroglomas; and 8 IDH1 mutant 1p19q codeleted and 3 IDH1 wild type 1p19q non-codeleted or NOS oligodendroglomas). Comparing the Wnt marker CSs, only Wnt5a ($p=0.02$) was significantly higher in the astroglial subgroup (**Figure 3**). Of note, at the time this study was initiated, we used the 2016 revision of the WHO recommendation for the molecular discrimination of glioma lineages⁴. However, more recent consensus statements recommend to abandon the NOS (IDH1 wild type, 1p19q non-codeleted) oligodendrogloma category, as further molecular refinements became available, at least in the research setting^{5,6}.

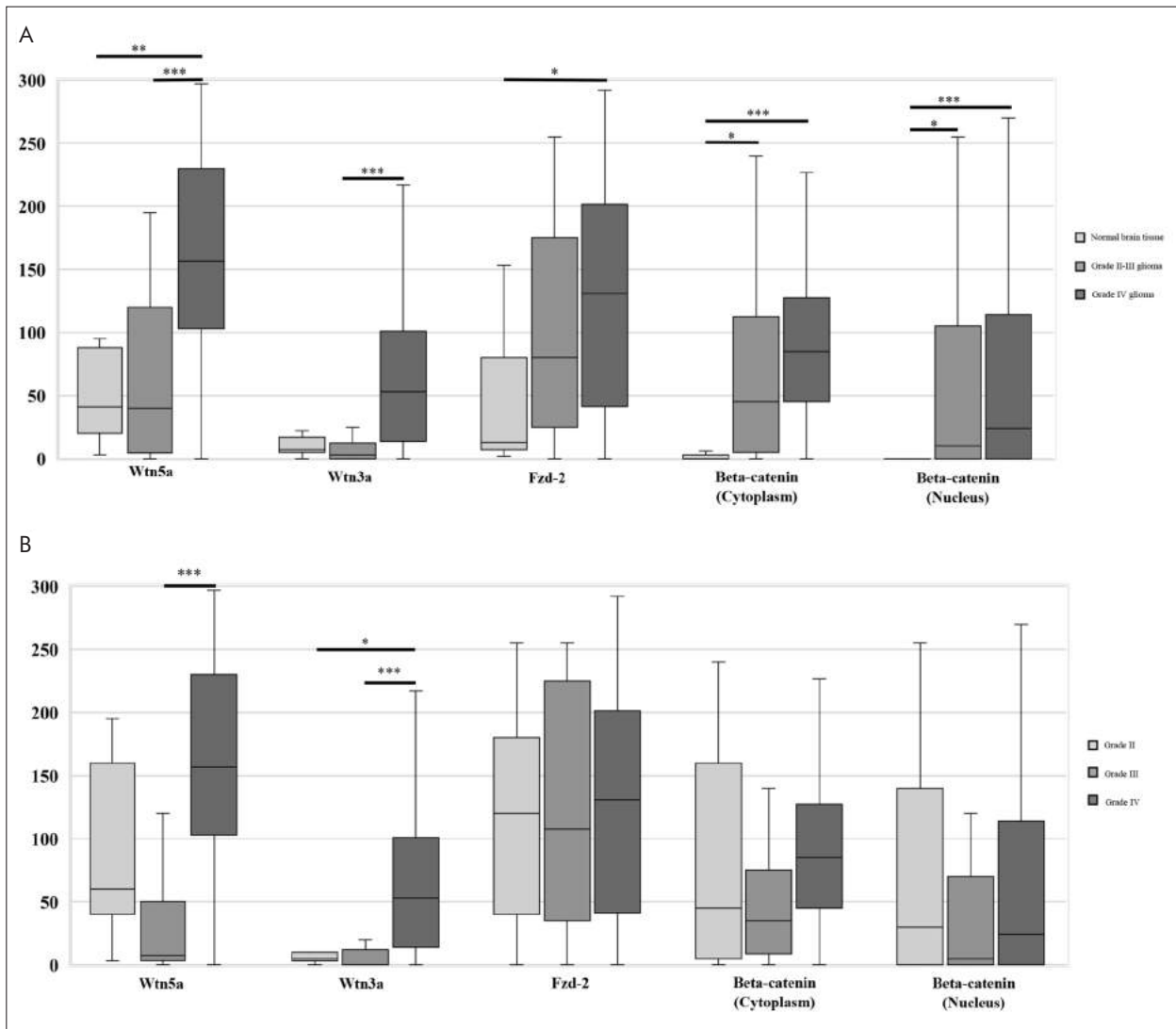


Figure 2.A, B. Comparison of Wnt marker expression in grade II-IV gliomas and normal brain. **Figure 2.A** shows median and interquartile range values of Wnt5a, Wnt3a, Fzd2, and both cytoplasmic and nuclear beta-catenin CSs in normal brain and grade II-III and IV glioma specimens. Kruskal-Wallis test * $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$ are indicated. **Figure 2.B** depicts median and interquartile range values of Wnt5a, Wnt3a, Fzd2, and both cytoplasmic and nuclear beta-catenin CSs in grade II, III and IV gliomas. Kruskal-Wallis test * $p<0.05$, and *** $p<0.001$ are indicated.

COMPARISON OF WNT MARKERS IN GLIOMAS ACCORDING TO MOLECULAR MARKERS

Of the 19 grade II-III gliomas, 15 were IDH1 R132H/C mutant and 4 wild type. Comparing the Wnt marker CSs between the two subgroups, no significant differences were detected.

Of the 72 grade IV tumors, 7 were IDH1 R132H mutant and 65 IDH1 wild type. Only the Wnt5a CSs showed a tendency ($p=0.065$) for increase in the mutant subgroup, while no significant differences were observed for any of the Wnt markers.

We also compared Wnt CSs between all (grade II-IV) IDH1 mutant vs. wild type gliomas, which showed significant increase in the Wnt3a CSs in the wild type cohort ($p=0.006$).

Stratifying grade II-III tumors according to IDH1 mutant 1p19q codeleted ($N=8$), IDH1 mutant 1p19q non-codeleted ($N=7$) and IDH1 wild type status ($N=4$), no differential distributions of the Wnt markers were revealed.

Similarly, we found no differences in Wnt marker expression distribution when the grade II-III tumors were compared according to (positive vs. negative) p53 and ATRX expression.

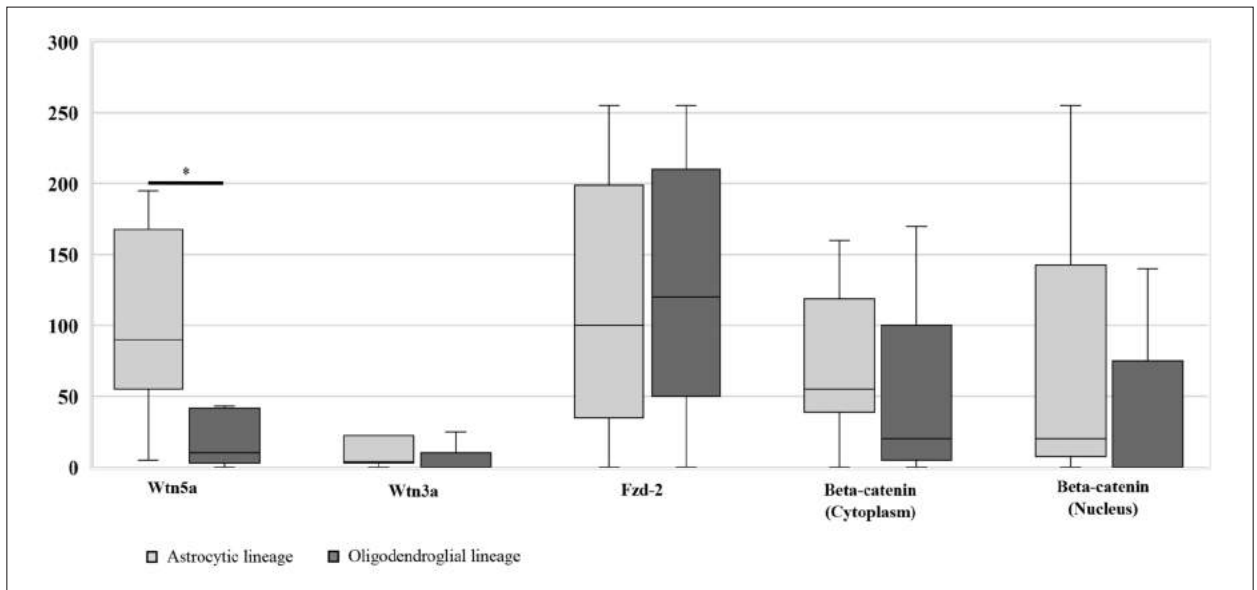


Figure 3. Wnt marker expression according to lineage in grade II and III gliomas. The figure shows median and interquartile range values of Wnt5a, Wnt3a, Fzd2, and both cytoplasmic and nuclear beta-catenin CSs in astrocytic and oligodendroglial lineages of grade II and III gliomas. Mann-Whitney U test $*p < 0.05$ is indicated

Discussion

COMPARISONS OF WNT MARKERS IN GRADE II-IV GLIOMAS AND NORMAL BRAIN

Our study of four Wnt markers revealed a gradual increase in expression when normal brain and grade II-IV glioma specimens were compared, though with varying levels and patterns of significance (**Figure 2.A**). This finding is in consensus with the results of previous studies^{7, 8} even though we could only compare autopsied normal brain and surgically removed glioma specimens, and our grade II / III glioma cohorts were rather small. Nevertheless, the observed differences between the post mortem normal brain and GBM pairs, and the overall concordance of our results with those in the literature confirm the validity of our findings. We observed significant differences when expression levels of Wnt5a and Wnt3a were compared in grade II+III and grade IV gliomas (**Figure 2.A, B**), but no differences emerged when expression levels of these markers between grade II and grade III tumors were compared. Some authors⁷⁻⁹ reported elevated levels of cytoplasmic beta-catenin in high grade compared to low grade gliomas. Other studies demonstrated that expression of Wnt5a⁷ and Wnt3a^{8, 10} are the lowest in the normal brain, and increase according to tumor grade. Overall, our data regarding Wnt marker expression in normal brain and grade II-IV gliomas concurs with the data reported in the literature.

COMPARISON OF WNT MARKERS IN GRADE II-III GLIOMAS ACCORDING TO LINEAGES

The literature is scarce regarding Wnt involvement in the development of the two glioma lineages. With the exception of Wnt5a that had higher expression in the astrocytic than in the oligodendroglial lineage, we observed no further differences in the expression levels of the Wnt markers (**Figure 3**). However, *Denysenko et al.*⁸ demonstrated an excess in the Wnt3a and beta-catenin levels in the astrocytic as compared to the oligodendroglial lineage. These observations suggesting some differences in Wnt marker expression in glioma lineages merit further studies in larger cohorts.

COMPARISON OF WNT MARKERS IN GLIOMAS ACCORDING TO MOLECULAR MARKERS

In GBM, we only noted a tendency for higher Wnt5a expression in the IDH1 R132H mutant (N=7) vs. wild type (N=65) subgroup. In grade II-III gliomas, no statistical differences were detected in the expression levels of Wnt markers in the IDH1 R132H and R132C mutant (N=15) vs. wild type (N=4) subgroup. Assuming that the IDH mutant status may have stronger influence on the Wnt marker expression than grade, we also tested these markers in combined IDH1 mutant and wild type cohorts of all grades, but only the expression of the Wnt3a marker was higher in the wild type than in the mutant group.

Previous studies revealed mixed results regarding IDH mutations and Wnt marker expression. Some demonstrated that IDH1 R132H causes a significant reduction in the proliferation, migration and invasiveness of gliomas due to the downregulation of the Wnt / beta-catenin signaling⁸. However, others^{11, 12} found that the canonical Wnt pathway had a high activity in proneural GBMs characterized by IDH1 R132H mutation. This apparent association between IDH1 mutation and Wnt pathway activity was confirmed in both *in vitro* systems and animal models¹³. These conflicting observations may result from intra- and inter-tumor heterogeneity as well as from technical factors. Because of the clinical relevance of the issue, we are currently in the process of further testing by higher resolution methods the expression regulation of Wnt pathway elements in IDH mutant and wild type gliomas.

Conclusion

Our data unambiguously reveal differential expression patterns of Wnt pathway markers according to glioma grade. However, based on both the literature and our data, further studies are needed with more comprehensive analytical approaches and in larger cohorts to clarify whether or not lineage and IDH status have impacts on Wnt activity.

ACKNOWLEDGEMENTS

These studies were supported by Hungarian state funds for PhD students, a private donation and internal resources of the Markusovszky University Teaching Hospital, Szombathely, Hungary. The authors are grateful to Dr. Ferenc Kalovits for helping with the clinical documentations.

REFERENCES

1. Tompa M, Kalovits F, Nagy A, Kalman B. Contribution of the Wnt pathway to defining biology of glioblastoma. *Neuromol Med* 2018;20(4):437-51. <https://doi.org/10.1007/s12017-018-8514-x>
2. Tompa M, Nagy A, Komoly S, Kalman B. Wnt pathway markers in molecular subgroups of glioblastoma. *Brain Res* 2019;1718:114-25. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.05.008>
3. Nagy Á, Garzuly F, Padányi G, et al. Molecular subgroups of glioblastoma – an assessment by immunohistochemical markers. *Pathol Oncol Res* 2019;25(1):21-31. <https://doi.org/10.1007/s12253-017-0311-6>
4. Louis D.N, Perry A, Reifenberger, et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta neuropathologica* 2016; 131(6):803-20. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.
5. Weller M, Van Den Bent M, Tonn J.C, et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *The Lancet Oncol* 2017;18(6):e315-e329. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30194-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30194-8).
6. Lauber C, Klink B, Seifert M. Comparative analysis of histologically classified oligodendrogliomas reveals characteristic molecular differences between subgroups. *BMC Cancer* 2018;18(1):399. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4251-7>.
7. Pu P, Zhang Z, Kang C, et al. Downregulation of Wnt2 and β -catenin by siRNA suppresses malignant glioma cell growth. *Cancer Gene Ther* 2009;16(4):351. <https://doi.org/10.1038/cgt.2008.78>
8. Denysenko T, Annovazzi L, Cassoni P, Melcarne A, Mellai M, Schiffer D. WNT/ β -catenin signaling pathway and downstream modulators in low-and high-grade glioma. *Cancer Genom Proteom* 2016;13(1):31-45.
9. Schüle R, Dictus C, Campos B, et al. Potential canonical wnt pathway activation in high-grade astrocytomas. *Sci World J* 2012;697313. <https://doi.org/10.1100/2012/697313>
10. Kaur N, Chettiar S, Rathod S, et al. Wnt3a mediated activation of Wnt/ β -catenin signaling promotes tumor progression in glioblastoma. *Mol Cell Neurosci* 2013;54:44-57. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2013.01.001>
11. Yao Q, Cai G, Yu Q, et al. IDH1 mutation diminishes aggressive phenotype in glioma stem cells. *Int J Oncol* 2018; 52(1):270-8. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4186>
12. Huang T, Alvarez A.A, Pangen PR, et al. A regulatory circuit of miR-125b/miR-20b and Wnt signalling controls glioblastoma phenotypes through FZD6-modulated pathways. *Nat Commun* 2016;7:2885. <https://doi.org/10.1038/ncomms12885>
13. Bardella C, Al-Dalahmah O, Krell D, et al. Expression of Idh1R132H in the murine subventricular zone stem cell niche recapitulates features of early gliomagenesis. *Cancer Cell* 2016;30(4):578-94. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.08.017>



DNA methylation and protein expression of Wnt pathway markers in progressive glioblastoma

Marton Tompa^{a,b}, Bela Kajtar^c, Bence Galik^{b,d}, Attila Gyenesei^{b,d}, Bernadette Kalman^{a,b,*}

^a Department of Laboratory Medicine, University of Pecs, School of Medicine, Pecs, Hungary

^b Szentagotai Research Center, University of Pecs, Pecs, Hungary

^c Department of Pathology, University of Pecs, School of Medicine, Pecs, Hungary

^d Department of Clinical Molecular Biology, Medical University of Bialystok, Bialystok, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Wnt ligands and receptors
DNA CpG methylation
Gene expression
Sequential glioblastoma

ABSTRACT

Background: Wnt signaling plays important roles in tumorigenesis, invasiveness and therapeutic resistance of glioblastoma (GBM).

Methods: We simultaneously investigated six Wnt pathway markers (Wnt5a, Fzd-2, beta-catenin, Wnt3a, Wnt7b, Fzd-10) at epigenetic and protein levels in 21 sequential formalin-fixed paraffin-embedded GBM pairs and controls.

Results: Expression levels of Wnt5a, beta-catenin and Wnt3a proteins either moderately or significantly increased, while those of Fzd-2, Wnt7b and Fzd-10 decreased in the primary (GBM-P) and recurrent (GBM-R) tumors compared to the controls. Methylation levels within promoters and genes showed corresponding decreases for Wnt5a, beta-catenin and Wnt3a in tumors vs. controls, while that of Fzd-10 was uniformly high. Comparing the GBM-P and GBM-R pairs, proteins of Fzd-2, beta-catenin and Wnt3a were either moderately or significantly up-, while that of Wnt7b was downregulated in GBM-R, but these patterns were not accompanied by inverse methylation patterns in the corresponding promoters and genes over time. No methylation differences were noted within promoters and genes of the same markers in 112 pairs of primary and recurrent GBMs in a database, suggesting that the observed changes in protein expression levels may not be explained by CpG methylation status alone. The promoter and gene methylation rate was the highest for Fzd-10 in the database cohort too, supporting the noted low Fzd-10 protein expression.

Discussion: These analyses underscore the relevance of Wnt pathway molecules in the context of their methylation profiles in the development and evolution of GBM, and suggest that Wnt pathway regulation as a potential treatment target merits further studies.

1. Introduction

Glioblastoma (GBM) is a grade IV glioma with a 14–20 months of median survival [1,2]. Although its cellular and molecular heterogeneity is well established, the tumor is believed to invariably arise from transformed neural stem cells (NSC), the so-called glioma stem cells (GSC). Somatic accumulations of structural chromosomal changes, mutations and copy number variations (CNV) accompany the branching evolution of GSC progenies [3,4], and contribute to the emergence of transcriptional patterns that segregate the entity into molecular subtypes [5]. The DNA CpG methylation profiles correlate with and further refine the subdivisions of GBM molecular subtypes [6].

Genome wide studies identified several signaling pathways (e.g. the receptor tyrosine kinase, Rb and TP53) that underlie GBM pathogenesis [3]. Wnt signaling is another important pathway that physiologically controls embryogenesis and tissue differentiation by the nuclear activation of target genes involved in mitosis and transcription regulation of a number of genes [7]. In GBM, this signaling pathway contributes to NSC / GSC maintenance and differentiation as well as to tumor growth, invasion, angiogenesis and treatment resistance [7]. The 19 known human Wnt ligands may bind to one or a few of their 15 different receptors and co-receptors to initiate the canonical (beta-catenin-mediated) or the non-canonical (non-beta-catenin-mediated) signaling pathways. The best characterized upstream elements of the

* Corresponding author at: Institute of Laboratory Medicine, University of Pecs, Szentagotai Research Center, 20. Ifjusag Street, 7624, Pecs, Hungary.

E-mail addresses: tmarc232@gmail.com (M. Tompa), kajtar.bela@pte.hu (B. Kajtar), galik.bence@pte.hu (B. Galik), gyenesei.attila@pte.hu (A. Gyenesei), bernadette.kalman@pte.hu (B. Kalman).

<https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153429>

Received 23 February 2021; Received in revised form 25 March 2021; Accepted 29 March 2021

Available online 5 April 2021

0344-0338/© 2021 Elsevier GmbH. All rights reserved.

non-canonical pathway include the Wnt5a and Wnt7b ligands, and the Fzd-2 and Fzd-7 receptors, while those of the canonical pathway include the Wnt1 and Wnt3a ligands, and the Fzd-1 and Fzd-10 receptors [8]. Certain ligands (e.g. Wnt7b) have the capability to activate both the canonical and non-canonical sub-pathways, and thus, to establish a cross-talk between them [9–11]. In a recent review [8], we surveyed the involvement of Wnt canonical and non-canonical pathway ligands and receptors in glioma initiation, and also highlighted their roles in epithelial-mesenchymal transition, angiogenesis, invasiveness, migration, interaction with the microenvironment, apoptosis regulation and development of resistance to therapy, key features active during progression of GBM. Because of the essential roles of the Wnt pathways in the occurrence, further transformation and recurrence of GBM, and because of the primary involvement of epigenetic mechanisms in the alterations of Wnt gene expression regulation, we had two prior studies focusing on Wnt markers in GBM.

In our first studies, we used immunohistochemistry (IHC) to reproduce the segregation of GBM into molecular subgroups with biological relevance in the clinical setting [12], and to determine the expression of Wnt ligands and receptors according to these molecular subdivisions [13]. We performed these investigations not only in cross-sectional formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumors, but also in eight pairs of sequential FFPE GBM specimens. While our data revealed no differential expressions of the selected Wnt ligands (Wnt5a, Wnt3a), receptor (Fzd-2) and signaling molecule (beta-catenin) among GBM molecular subgroups, there were significant differences in their distribution within subgroups [13]. Expression analyses of these markers showed no clear trend of increasing or decreasing protein expression profiles over time in the small sequential sample cohort [13].

Subsequently, we carried out a genome-wide DNA CpG methylation study in 22 pairs of sequential FFPE GBM using the Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) method to identify the most important pathways defining tumor occurrence and recurrence [14]. Gene ontology (GO) analyses of the bisulfite sequencing data suggested a differential involvement of the Wnt pathways in longitudinal GBM pairs. Namely, the canonical Wnt pathway involved in positive regulation of endothelial cell migration, cell-cell adhesion and wound healing appeared significantly less methylated (presumably more active) in the primary than in the recurrent tumors [14]. Therefore, in this study we decided to zoom into the Wnt DNA CpG methylation data, and to test the expression levels of some of the markers at protein levels (Fig. 1). We chose to investigate Wnt7b and Fzd-10 in addition to Wnt5a, Wnt3a, Fzd-2 and beta-catenin, of which the latter four markers were previously studied with different aims and in different cohorts [13]. The aims of the current study are:

- 1) To retest the protein expression of the previously studied four Wnt markers (Wnt5a, Wnt3a, Fzd-2 and beta-catenin) in a larger

sequential cohort of 21 GBM pairs [13] and also to quantitate the protein expression of two additional markers (Wnt7b, Fzd-10) in order to determine if their expression changes reflect any trend over time;

- 2) To evaluate the CpG methylation levels in promoters and genes of the six Wnt markers in individual tumors by zooming into the epigenomic data previously analyzed only at the cohort level [14];
- 3) To test if any correlation between the gene promoter methylation and protein expression may be revealed.

These analyses may further refine the involvement of the Wnt pathway in the evolution of GBM over time, reveal aspects of gene expression regulation and highlight new potential targets for treatment.

2. Material and methods

2.1. Subjects of the study

All specimens were obtained during the period of 1999–2017 at the Institute of Pathology, University of Pecs, School of Medicine. GBM blocks included surgically removed FFPE specimens. Control blocks were postmortem FFPE specimens. The study was approved by the Regional Clinical Research Committee (Number: 7517 PTE 2018 and 2019) and was compliant with the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki). Clinical and histopathological diagnoses of GBM were established based on the latest WHO guideline [15]. Patients had passed away before the start of the study and all specimens were leftover from routine histological evaluations. These GBM specimens were also included in a recent DNA CpG methylome analysis and a follow up study [14,16]. One pair of the original 22 pairs was omitted here due to the insufficient amount of the remaining tissue block.

2.2. GBM cohort

The present study cohort included 21 primary (GBM-P) and recurrent (GBM-R) pairs of isocitrate dehydrogenase (IDH)-1 R132H mutation negative *de novo* GBMs. GBM-P samples were surgically obtained at the time of initial diagnosis, before chemo- and irradiation therapy. GBM-R samples were also surgically obtained, but at recurrence, after chemo- and irradiation therapy. Of the 21 patients (14 males and 7 females), we could get documentation for 17 patients receiving temozolomide-based chemo- and irradiation therapy after the first surgery, while no therapy related information could be gathered in four cases. The mean age of patients at disease onset was 52 years (± 10) and the median age was 52 years (range: 43–61). The mean age at recurrence was 53 years (± 9) and the median age was 53 years (range: 45–61). The mean age at death was 53 years (± 8) and the median age was 53 (range: 46–61) (Table 1a, b).

2.3. Control groups

In the DNA CpG methylation analyses, methylation profiles in GBM-P and GBM-R were compared to those of five epileptic surgery specimens (C–DB) in the European Nucleotide Archive (<https://www.ebi.ac.uk/ena>, Primary Accession: PRJEB38380, Secondary Accession: ERP121800) [17,14]. In the IHC study, the control group included six post-mortem FFPE brain blocks (C–PM) of individuals who passed away of non-neurological causes (No surgically obtained other neurological controls or normal brain specimens were available). We could not use the C–PM in the DNA CpG methylation analyses, because the DNA fragmentation rates were significantly higher and the detection of CpG sites were significantly lower in the postmortem FFPE control samples than in the surgically obtained FFPE specimens. (For comparison of DNA fragmentation rates and the numbers of detected CpG sites in postmortem and surgical specimens, see [14]). As only bisulfite

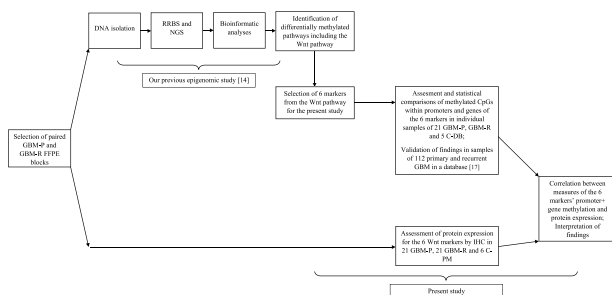


Fig. 1. Study design.

This figure shows main steps of a preceding investigation [14] leading to the design of the present study for the simultaneous assessments of promoter + gene CpG methylation and protein expression for six selected Wnt markers in our 21 pairs of GBM-P, GBM-R and C-PM / C-DB, and in 112 pairs of primary and recurrent GBM in a database [17].

Table 1
Demographic and clinical characteristics of the patients with GBM.

A								
Primary tumor								
Gender	Number of patients	Age at onset (Mean)	Standard deviation (\pm SD)	Age at onset (Median)	Quartile 1-Quartile 3 (Q1-Q3)	Age at onset (Range)		
Female	7	55	6	56	52-59	45-63		
Male	14	50	10	47	42-60	32-66		
Total	21	52	10	52	43-61	32-66		
Recurrent tumor								
Gender	Number of patients	Age at onset (Mean)	Standard deviation (\pm SD)	Age at onset (Median)	Quartile 1-Quartile 3 (Q1-Q3)	Age at onset (Range)		
Female	7	57	5	58	53-61	48-64		
Male	14	51	10	48	43-61	36-68		
Total	21	53	9	53	45-61	36-68		
B								
GBM-P	GBM-R	Gender	Age at onset (years)	Age at recurrence (years)	Age at death (years)	Time between GBM-P and GBM-R diagnosis (weeks)	Overall Survival (weeks)	Treatment
15043/1999	9849/2000	male	50	50	50	31	41	No data
9501/2001	3624/2002	male	52	53	53	33	59	No data
15916/2003	9527/2004	female	63	64	64	30	43	Surgery + Bevacizumab + Irradiation 50 Gy
9886/2004	15289/2004	male	41	42	43	17	70	No data
3094/2006	15302/2006	male	59	60	60	35	65	Surgery + Irradiation + TMZ
5526/2007	13808/2008/1	female	50	52	52	77	88	Surgery + Irradiation + TMZ
13501/2007/CI	9614/2008/1	male	39	39		40		Surgery + Irradiation + TMZ
12732/2008	17440/2010/1	male	41	43	43	117	149	Primary: Surgery + Irradiation + TMZ; Recidive: Bevacizumab + Irradiation
17578/2008	7779/2010/B	male	63	65		77		No data
15466/09	16534/10	male	66	68		56		Surgery + Irradiation + TMZ
10379/2010A	7536/2014	female	56	60	61	199	287	AVAGLIO clinical study (STUPP + Bevacizumab/placebo)
14561/2010/1	2315/2012/A	male	45	46		70		AVAGLIO clinical study (STUPP + Bevacizumab/placebo)
2525/2011/B	1365/2013/1	male	32	36	36	177	203	Surgery + TMZ, then Bevacizumab, Irradiation, BCNU
14642/2011/1	7990/2014/1	male	43	45	46	135	192	Surgery + Irradiation + TMZ
5693/2012/1	612/2015/1	female	45	48	48	143	169	Surgery + Irradiation + TMZ
7183/2012/1	11956/2012	female	57	58	59	51	95	Surgery + Irradiation + TMZ
6795/2013/1	17545/2013	female	61	62	62	31	54	Surgery + Irradiation + TMZ
16189/2014	16742/2015	female	53	54	55	55	69	Surgery + Irradiation + TMZ
3997/2016	5120/2017	male	62	63	63	58	62	Surgery + Irradiation + TMZ
10776/2016	2168/2017	male	43	43	44	29	46	Surgery + Irradiation + TMZ
13956/16/1	12107/17/1	male	60	61	62	49	60	Surgery + Irradiation + TMZ

Table 1a summarizes age distributions of patients. Table 1b shows the age at onset, recurrence and death of patients, the time elapsed between diagnosis and recurrence of the tumor, the overall survival (time between diagnosis and death, where the latter dates were available) and the employed treatment modalities. TMZ = temozolomide.

sequence data were available from the C-DB, we could not use these controls in the IHC part of the study. Therefore, different controls were used in the IHC (C-PM) and the methylation profile (C-DB) analyses.

2.4. DNA isolation and bisulfite sequencing

Details of DNA isolation, CpG methylation profiling and bioinformatics analyses have been described in a paper by Kraboth et al. [14]. In brief, sections of the FFPE specimens were subjected to DNA extraction using the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden,

Germany). The Premium Reduced Representation Bisulfite Sequencing kit (Premium RRBS Kit 24x, Diagenode SA, Seraing, Belgium) was used for the preparation of the bisulfite-converted libraries for sequencing by using the NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 cycles) on a NextSeq 550 machine (Illumina, San Diego, CA, USA) [14]. In this study, methylation levels only within the promoter + gene regions of the six selected markers were assessed in individual samples. Both the promoter + gene regions were investigated, because we considered that due to the compromised quality of DNA from the FFPE specimens, the information concerning CpG sites within only the (appr. 2000 bp) span of gene

promoters, may not be sufficiently reliable for comparative analyses of CpG methylation in individual samples.

2.5. Immunohistochemistry

Three µm sections were prepared from each FFPE tissue block. The region of interest (ROI) was determined based on Hematoxylin-Eosin (HE) staining and uniformly evaluated in the corresponding IHC preparations. The ROI contained the most malignant appearing tumor region with high degree of cellularity, polymorphic nuclei and mitotic rate, but with little or no necrosis and vascularity.

In a pilot study, we optimized parameters for the retrieval of antigens and dilutions of primary antibodies (Table 2). The expression levels of the non-canonical and canonical Wnt pathway markers in GBM-P and GBM-R were determined as previously described [13]. For Wnt5a, Wnt3a and Wnt7b, the cytoplasmic expression levels, for Fzd-2 and Fzd-10 the membranous expression levels, and for beta-catenin the cytoplasmic and nuclear expression levels were assessed. The secondary antibodies along with the diaminobenzidin (DAB) substrate were included in the Novolink Polymer Detection System RE7150-CE kit (Leica Biosystems, Newcastle, UK) that we used for labeling the primary antibody binding. Cell nuclei were visualized by hematoxylin counter-staining.

Quantitative evaluation of IHC was carried out manually and complemented by automated reading. Manual evaluations were made by three independent readers using a 1:200 magnification objective on a Nikon Optiphot-2 microscope. The primary reader was the first author of this paper (MT), whose assessment figures were used for the data presentation. Due to an extensive reading exercise prior to the study, the primary reader's quantitation differed less than 10 % from those by the secondary and tertiary readers (second and last co-authors). The readers were blinded for the evaluations by the other two readers, but not for the specificity of antibody. The intensity of staining on the scale of 0, 1, 2 and 3, and the percentage of stained cells were determined within each ROI. Combined score (CS) values were derived by multiplying the staining intensity values by the % of positive cells. In case of Wnt 3a, Wnt5a, Fzd-2 and beta-catenin IHC results, the manual readings were validated by automatic evaluation of digitalized slides by the Panoramic MIDI II (3DHISTECH, Budapest, Hungary) using the Quant-Center image analysis platform (3DHISTECH, Budapest, Hungary). All figures differed by ≤6% in the manual and automated readings.

2.6. Statistics and bioinformatics

For testing differences of Wnt IHC CS values and CpG methylation levels in the GBM-P and GBM-R sample pair comparisons, the Wilcoxon signed rank test was used, while in the control and GBM-P or GBM-R comparisons, the Mann-Whitney U test was used. These statistical tests were included in the SPSS v. 23.0 package (SAGE, IBM® SPSS® Statistics

v23.0). Methylation levels in the promoters and the promoter + gene regions of the selected Wnt markers were extracted from the Bismark analysis results by an in-house generated R script as previously detailed [14,16]. In brief, after quality control by FastQC and the removal low quality bases and adapters by TrimGalore, RRBS sequences were aligned to the GRCh37 reference genome. Methylation calls were made by Bismark, and differentially methylated sites, genes and pathways were identified by RnBeads. An in-house-generated R script allowed us to quantify DNA CpG methylation in predefined genomic regions of promoters and genes, and to plot the data in individual samples or in sample sets. The methylation levels were given as percentages calculated from the identified numbers of methylated sites with the relative degree of methylation at each site also computed in the numerator that was divided by the number of all possible CpG sites within the selected genomic region of interest, and then multiplied by 100.

3. Results

3.1. Expression levels of Wnt marker proteins in paired GBM specimens

We assessed the expression levels of six markers, namely Wnt5a, Fzd-2, beta-catenin, Wnt3a, Wnt7b and Fzd-10 in the cohort of 21 paired sequential GBM specimens and in controls.

Fig. 2 displays the median and interquartile range values of marker CSs in C-PM, GBM-P and GBM-R. Either trends for increase (cytoplasmic and nuclear beta-catenin) or statistically significant increases are seen in the GBM-P (Wnt5a p = 0.003) and GBM-R (Wnt3a p = 0.003) vs. C-PM comparisons, while the expression of the membranous Fzd-10 is uniformly low. Also, a statistically significant decrease of Fzd-2 can be observed in the comparison of GBM-P vs. C-PM (p < 0.001), while the expression of Wnt7b appears relatively high in C-PM and GBM-P, and

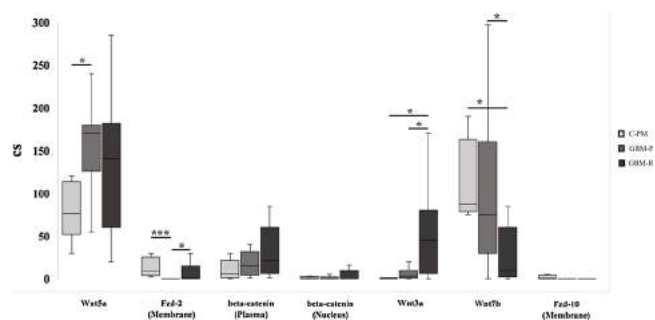


Fig. 2. Expression levels of the six Wnt markers in C-PM, GBM-P and GBM-R. This figure depicts median and interquartile range values of marker CSs on the Y axis in 6 C-PM (light gray), 21 GBM-P (gray) and 21 GBM-R (dark gray). Mann-Whitney (C-PM vs. GBM-P or GBM-R) and Wilcoxon signed rank test (GBM-P vs. GBM-R) p-values are indicated (*p < 0.05, ***p < 0.001).

Table 2
Technical parameters used in IHC studies.

Manufacturer	Catalogue number	Primary antibody	Clonality	Immunogen	Dilution
Abcam	ab224803	Beta-catenin	Rabbit monoclonal	Synthetic peptide corresponding to Human beta Catenin (C terminal).	1:500
Abcam	ab219412	Wnt3a	Rabbit monoclonal	Synthetic peptide within Human Wnt3a aa 250–350	1:300
Biorbyt	orb69157	Wnt5a	Mouse monoclonal	Purified recombinant fragment of Wnt5A expressed in E. Coli.	1:2000
Biorbyt	orb100745	Frizzled 2	Rabbit polyclonal	KLH conjugated synthetic peptide derived between 71–150 amino acids of human Frizzled 2	1:500
Biorbyt	orb100915	Wnt7b	Rabbit Polyclonal	KLH conjugated synthetic peptide derived between 251–290 amino acids of human WNT7B	1:200
Sigma-Aldrich	HPA014485	Frizzled 10	Rabbit Polyclonal	Recombinant Protein Epitope Signature Tag (PrEST) antigen sequence: KTLQSWQQVCSRRLLKKKSRRPASVITSGGGYKKAQHPQKTHHGKYEIPAQSPSTCV	1:100

This table summarizes the parameters of antigen retrieval and dilutions of the primary antibodies used in IHC.

significantly decreased in GBM-R ($p = 0.005$).

Fig. 3a-g visualize changes of the Wnt markers for each of the paired primary and recurrent GBM specimens to show the trends over time. No consistent direction of increases or decreases in the expression levels of Wnt5a, nuclear beta-catenin and Fzd-10 proteins can be discerned, possibly related to clonal and molecular heterogeneity within and among tumors. However, there seems to be a strong trend for the increase in the expression levels of cytoplasmic beta-catenin over time ($p = 0.07$), while the increases in the expression levels of Wnt3a ($p = 0.009$) and Fzd-2 ($p = 0.016$) reach significance in GBM-R compared to GBM-P. In contrast, a significant decrease can be seen in the expression of Wnt7b over time ($p = 0.019$). The Fzd-10 levels are notably low in all samples. These observations highlight that Wnt markers do not follow a uniform pattern during development and evolution of GBM.

3.2. DNA CpG methylation levels in promoters and genes of Wnt pathway markers in paired GBM specimens

Gene ontology (GO) analyses in our preceding publication by Kraboth et al. [14] showed no differential methylation in promoters of Wnt pathway genes when data of C-DB vs. GBM-P or GBM-R were compared, but revealed a significantly lower level of methylation in the canonical Wnt pathway in GBM-P vs. GBM-R. The Supplementary Table presents differential methylation data for ligands, receptors, co-receptors and regulatory elements of this pathway at cohort level in the GBM pairs. The results of this GO analysis and our IHC observations prompted us to look into the DNA CpG methylation changes of selected Wnt markers in individual samples over time.

First, we quantitated the methylation levels within promoters of the Wnt5a, Fzd-2, beta-catenin, Wnt3a, Wnt7b and Fzd-10 markers, but

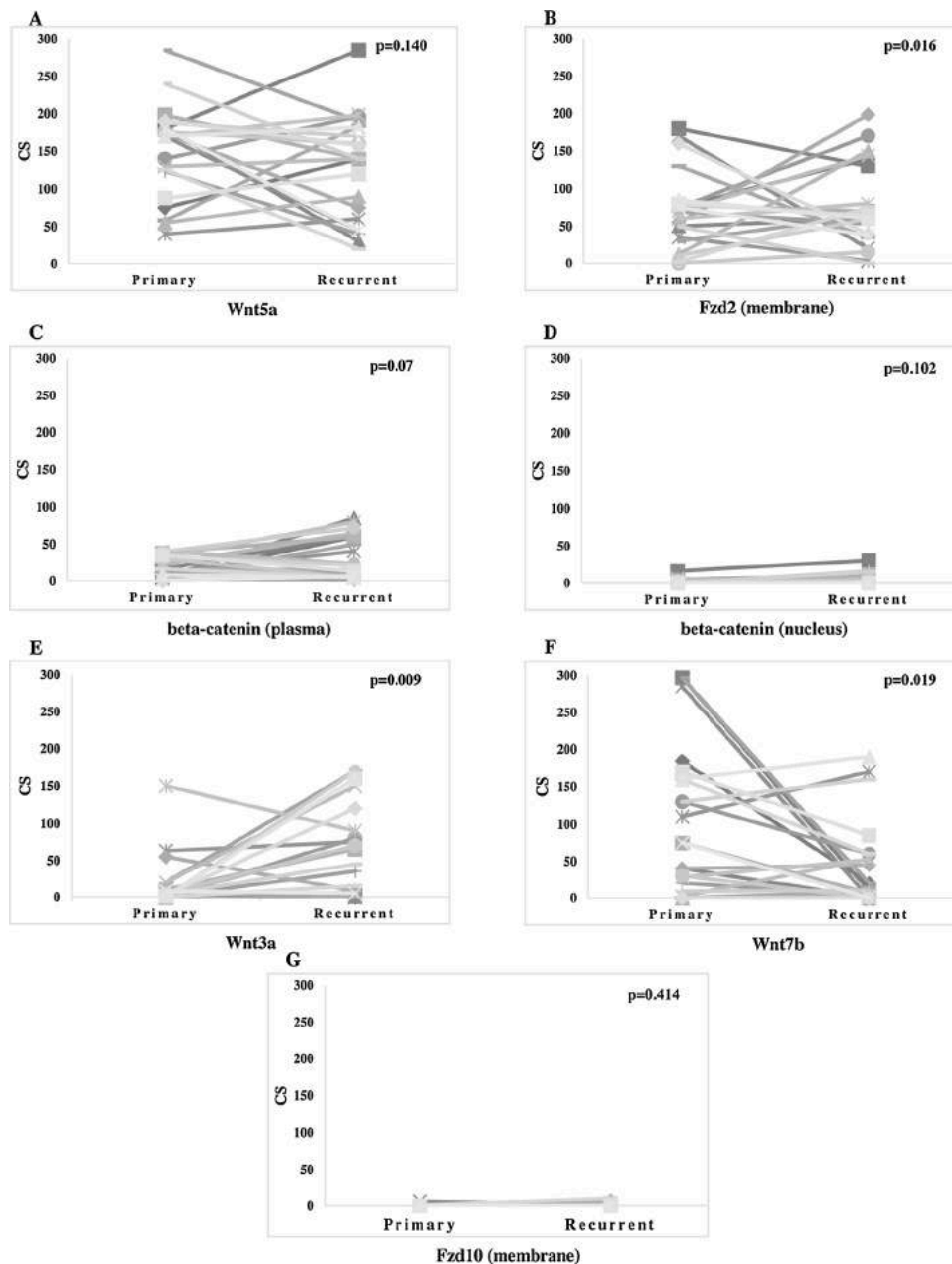


Fig. 3. Protein expression level changes of the six Wnt markers comparing GBM-P and GBM-R.

This figure highlights the complex patterns of changes in the protein expression (by showing the CS values on the Y axis) of Wnt5a, Fzd-2, cytoplasmic beta-catenin, nuclear beta-catenin, Wnt3a, Wnt7b and Fzd-10 in the 21 GBM-P and GBM-R pairs. Wilcoxon signed rank test p-values are indicated.

could not get sufficient CpG coverage in individual samples due to the FFPE nature of the initial specimens and quality of DNA. Therefore, next we extended the investigated DNA segments by combining the promoter and gene regions for the six markers. Fig. 4a shows the median and interquartile range values of promoter + gene CpG methylation percentages in GBM-P and GBM-R compared to each other and to the C-DB. No differential methylation levels can be seen in these regions when GBM-P and GBM-R samples are compared. However, a strong trend for higher promoter + gene region methylation in the Wnt5a and beta-catenin markers, and significantly higher promoter + gene methylation in the Wnt3a and Wnt7b markers can be seen in the C-DB than in the GBM-P (Wnt3a $p = 0.028$; Wnt7b $p = 0.015$) or in the C-DB than in the GBM-R (Wnt3a $p = 0.012$; Wnt7b $p = 0.034$) comparisons, while no differences are discerned for the Fzd-2 and Fzd-10 markers. In contrast, the CpG methylation levels appear higher in the Fzd-10 promoter + gene regions of all three of the C-DB, GBM-P and GBM-R samples. Of note, this methylation “blockade” of CpGs corresponds to the very low levels of the

membranous Fzd-10 protein detection in the GBM pairs (Figs. 2 and 3). The trend for or statistically decreased CpG methylation in Wnt markers (Wnt5a, beta-catenin, Wnt3a) in both the GBM-P and GBM-R vs. C-DB, corresponds to the increased expression of these markers at the protein levels in the tumors. However, the similar rates of hypomethylation within promoter + gene regions for all markers cannot explain the increasing expression of the Wnt3a, beta-catenin and Fzd-2 markers, or the decrease of Wnt7b in GBM-R compared to GBM-P, suggesting that mechanisms other than promoter and gene methylation may also contribute to the protein expression regulation over time.

3.3. CpG methylation in promoter + gene regions of Wnt markers in a database GBM cohort (Fig. 4b)

To further strengthen our observations, we assessed DNA CpG methylation within the same six promoter + gene regions in the publicly available RRBS sequence data of sequential FFPE GBM published by

Promoter + gene DNA CpG methylation (Study samples)

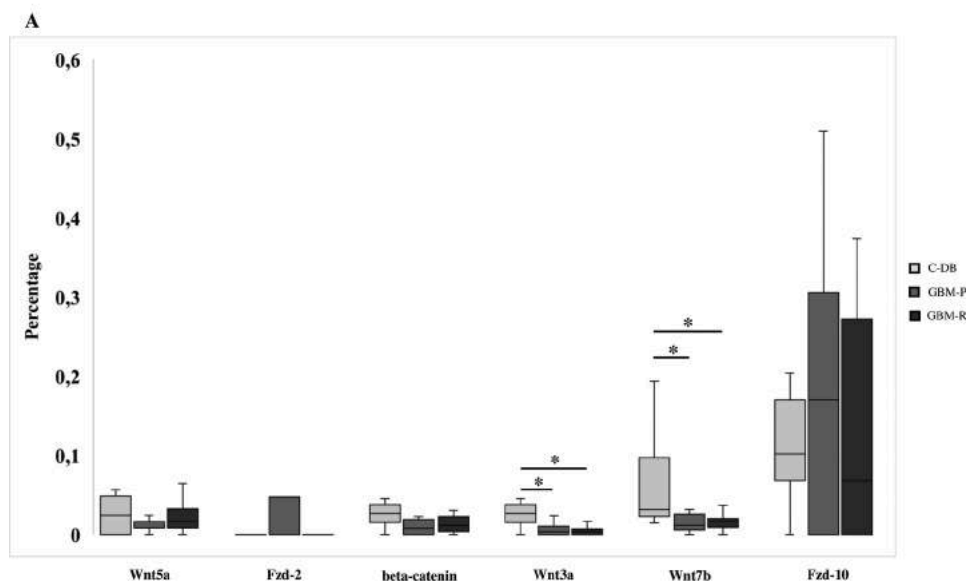
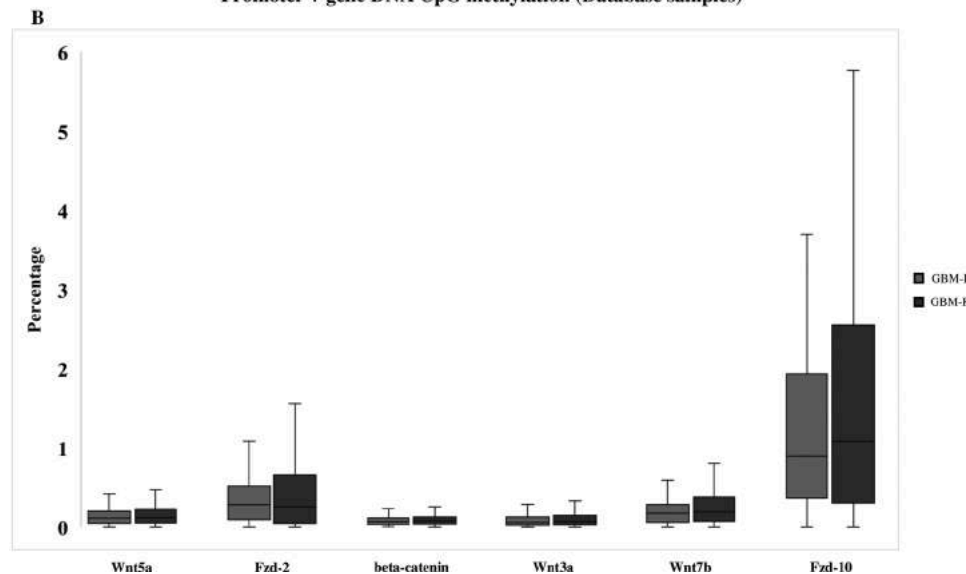


Fig. 4. Promoter + gene CpG methylation levels for the six markers in the C-DB, GBM-P and GBM-R samples.

Fig. 4a shows methylation data in 5 C-DB (light gray), 21 GBM-P (gray) and 21 GBM-R (dark gray) in this study. Fig. 4b shows methylation data in 112 GBM-P and 112 GBM-R samples deposited in a database by Klughammer et al. [17]. Bars represent median and interquartile range values of CpG methylation percentages within promoters + genes of Wnt5a, Fzd-2, beta-catenin, Wnt7b and Fzd-10 in C-DB, GBM-P and GBM-R of our cohorts (a) and in GBM-P and GBM-R of the database cohort [17]. Mann-Whitney (C-DB vs. GBM-P or GBM-R) and Wilcoxon signed rank test (GBM-P vs. GBM-R) p-values are indicated (* $p < 0.05$).

Promoter + gene DNA CpG methylation (Database samples)



Klughammer et al. [17] (<https://www.ebi.ac.uk/ena>, Primary Accession: PRJEB38380, Secondary Accession: ERP121800). Although the C-DB data as reference in our analyses were taken from this study, we concluded that individual comparison of DNA CpG methylation within the six Wnt marker genes in these five controls and the 112 GBM sample pairs could result in biases. (Due to the quality of FFPE sample - derived DNA, the larger the cohort, the more methylated CpG sites can be

captured and statistically evaluated by our script). Therefore, we only compared the DNA CpG methylation levels in the paired GBM samples (with similar preanalytical processing, and equal numbers of individuals in the primary and recurrent GBM cohorts). Fig. 4b shows no differential methylation levels in the GBM-P and GBM-R specimens. Comparing our own (Fig. 4a) and the database (Fig. 4b) primary and recurrent GBM promoter + gene methylation levels, the following similar trends may be

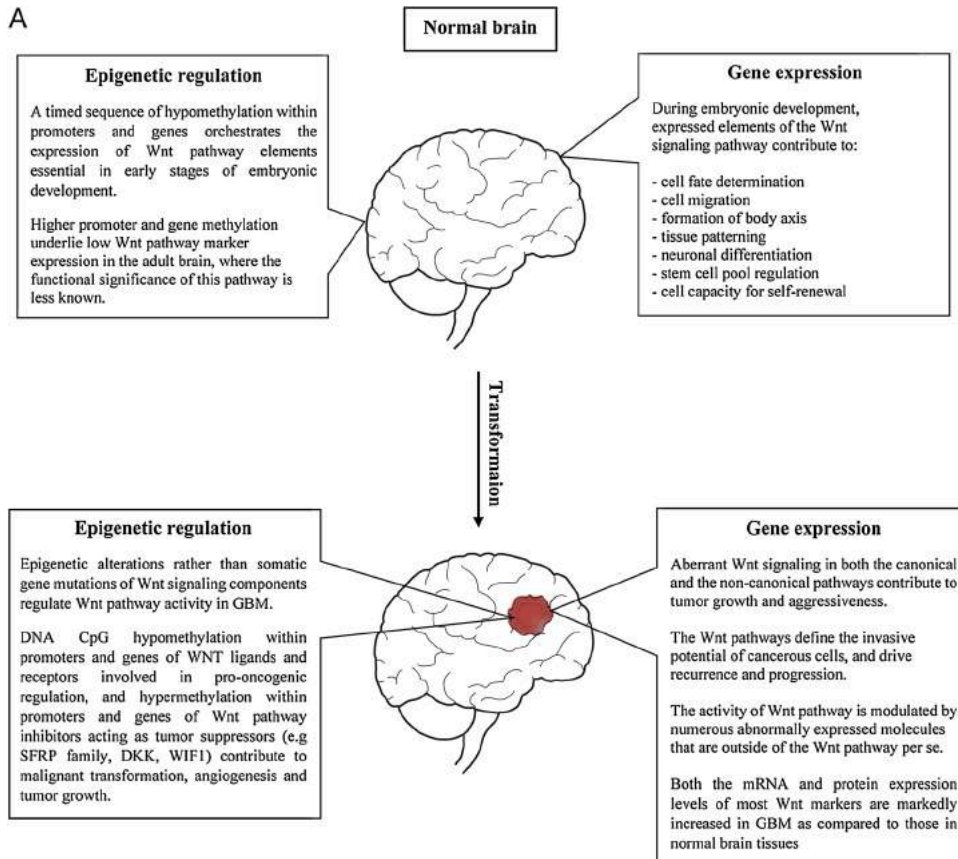
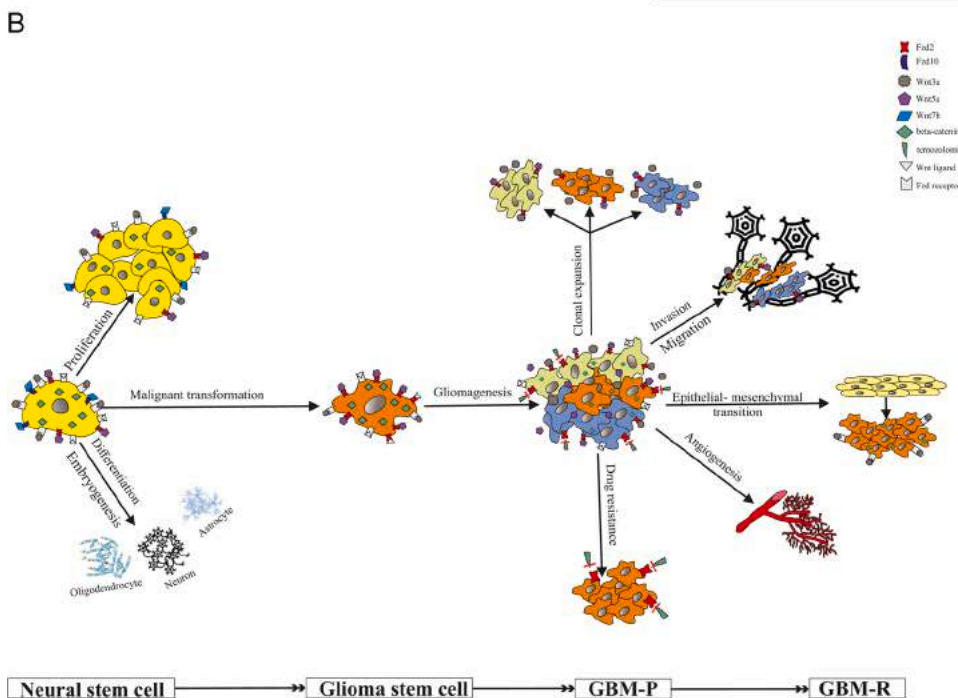


Fig. 5. The role of Wnt pathway in normal brains and gliomas.

Fig. 5a highlights the most important roles of the Wnt signaling pathway in normal brain development and in gliomas, primarily focusing on GBM. (For more details, see review papers [7,8]). Fig. 5b depicts a schematic functional model involving the studied Wnt pathway markers in normal development and GBM. Colored symbols represent Wnt markers involved in the study. Light gray symbols generally refer to Wnt ligands and receptors that might have a role in the depicted processes, but were not part of this study. Note the presence of all our studied Wnt ligands, receptors and beta-catenin in neural stem cells, but the lack of the Fzd-10 and Wnt7b pairs in progressive GBM. The engagements of specific ligands and receptors may depend on cellular and molecular context and deviate from the conventional canonical / non-canonical pairing in cancers [7–11, 19, 44–47].



observed: 1) The methylation levels are the highest for Fzd10 among the six markers in GBM; and 2) no differential methylation may be discerned when primary and recurrent cohorts are compared. The high Fzd-10 methylation corresponds to the low protein expression of the Fzd-10 marker in our IHC detection. The relative low methylation levels in promoter + gene regions for the Wnt5a, beta-catenin, Wnt3a and Wnt7b markers allow higher protein expressions of these markers detected by IHC in our GBM cohorts.

4. Discussion

The Wnt signaling pathway plays an important role during embryonic development, but its elements also show high activity during the pathogenesis of several disorders, particularly cancers (Fig. 5a,b). Aberrant signaling in both the canonical and non-canonical pathways contributes to the growth, aggressiveness and therapeutic resistance of GBM [8,7]. Kamino et al. [18] demonstrated that the mRNA molecules of Wnt5a, Wnt7b and Fzd-2 were increasingly upregulated in glioma cell lines compared to normal brain cells, and the most robust expression increase was noted in GBM. IHC analyses showed that the canonical as well as the non-canonical Wnt pathway molecules are most highly expressed in the infiltration zone as compared to the center of tumors or to the normal appearing brain regions [19,20]. In addition, numerous other proteins (e.g. PLAGL-2, VEGF) have also increased expression levels, thereby modulating the Wnt pathways and defining biological characteristics of GBM [21,22]. Activation and inhibition of Wnt pathways can be accomplished not only by their own ligands, but also by several other regulatory molecules (e.g. WIF1, FRPs, Cerberus and DKK) [23]. Evidence supports that the Wnt-mediated carcinogenesis predominantly relies on epigenetic regulatory mechanisms rather than on somatic gene mutations [24].

Because of the importance of Wnt signaling in gliomagenesis, we had previously undertaken studying some ligands and receptors of this pathway in GBM. In the first study [13], we demonstrated an increased expression of Wnt5a, Wnt3a, Fzd-2 and beta-catenin proteins by IHC in GBM compared to normal brain tissues, but did not detect a consistent direction of expression changes for these markers when primary and recurrent GBM tumors were compared in a small, and thus, for statistics inadequate, sequential cohort [13]. In the second study, a genome-wide assessment of DNA CpG methylation in 22 pairs of sequential GBM specimens [14], GO analyses revealed differential methylation in promoters of genes aligning in the canonical Wnt pathway involved in positive regulation of endothelial cell migration, cell-cell adhesion and wound healing. The differential methylation patterns suggested that these pathways may be more active (and the protein products may be expressed at higher levels) in the primary than in the recurrent GBM tumors. Surveying at cohort level a broader array of Wnt pathway ligands, receptors and regulatory molecules, a complex pattern of changes was seen with hypomethylation of not only ligands, but also hypomethylation of several positive regulators, and increased methylation of negative regulators in GBM-P vs. GBM-R (Supplementary Table).

These suggestive, but fragmented and far from unambiguous observations prompted us to pursue studying further some of the Wnt markers in GBM (Fig. 1). Having access to the same FFPE GBM blocks from which DNA was isolated in the epigenomic study [14], here we decided to individually zoom into the DNA CpG methylation data and compare those to protein expression levels of six markers by IHC. This simultaneous analysis was performed on specimens derived from sequential GBM blocks of 21 patients (one pair of GBM had to be omitted from the previously analyzed epigenomic cohort, as no sufficient tissue remained for IHC). Due to the FFPE nature of tissue blocks and thus, the compromised quality of DNA, instead of evaluating only the promoters, we determined methylation levels of CpGs within promoters + genes. We could not detect methylation differences within the promoter + gene regions for any of the six markers when GBM-P and GBM-R were compared (Fig. 4a). Nevertheless, in line with the known shift towards

hypomethylation in tumors [25,26], all markers except Fzd-2 and Fzd-10, showed either a trend for or a significant decrease in methylation in the GBM-P vs. C-DB and the GBM-R vs. C-DB comparisons (Fig. 4a). The promoter + gene hypomethylation patterns in tumors were accompanied with a moderately or significantly increased expression of the Wnt5a, cytoplasmic beta-catenin and Wnt3a marker proteins in the tumors as compared to controls (Fig. 2). In case of Fzd-10, the increased promoter + gene methylation seemed to correspond to the low levels of protein expressions in both the control and the tumorous cell membranes (Figs. 2 and 4).

The IHC-detected increasing expression levels of Wnt3a, Fzd-2 and cytoplasmic beta-catenin proteins (Figs. 2 and 3) could not be explained by the similar (instead of decreased) methylation levels in the promoter + gene regions of these markers in the primary and recurrent GBM samples (Fig. 4a), suggesting that regulatory mechanisms other than DNA methylation may also contribute to the increasing protein expression over time.

Although the informative CpGs in the promoter + gene regions of the six Wnt markers were different in the C-DB (five individuals) and GBM-P / GBM-R (21 patients) cohorts, the fact that higher levels of methylated CpGs were detected in the studied DNA segments even in the smaller control cohort (with lower numbers of captured CpG sites) seemed to support that Wnt5a, beta-catenin, Wnt3a and Wnt7b markers indeed have higher levels of methylation in the normal compared to the tumorous tissues. However, the difference in cohorts' sizes (five C-DB and 112 primary and recurrent GBM pairs), and thus, the number of informative CpGs within the promoter + gene regions of the six markers differed much more in the Viennese database cohort than in ours. To avoid a biased conclusion, we did not compare the control and GBM methylome data in the six Wnt marker promoter + gene regions in these database cohorts, but rather restricted our analyses only to the methylation data from the paired primary and recurrent GBM samples (Fig. 4b) [17]. The analysis of these data, similar to our own, suggested no statistical differences in the CpG methylation levels of the six markers when primary and recurrent samples were compared, and showed higher methylation level in the promoter + gene regions of Fzd-10 when compared to those of the other five Wnt markers.

Altogether, the above observations suggest that the stronger methylation within the promoter + gene region may be responsible for the low expression level of Fzd-10 in all samples, a finding not previously reported in GBM or in gliomas of lower grades. This observation raises the possibility that the Fzd-10 receptor might have growth and tumor suppressor potential in GBM, a hypothesis that merit further investigations. A few previous studies reported high Fzd-10 expression during embryogenesis, low expression in normal adult cells, individually varying expression in medulloblastoma and its involvements in the progression of colorectal and gastric cancers [27–29].

The increased expression of Wnt5a, beta-catenin and Wnt3a in GBMs compared to non-tumorous brains may be related, at least in part, to the decreased methylation patterns in GBMs. However, the increasing trend of Wnt marker expression in cases of Wnt5a, beta-catenin and Wnt3a in GBM-R vs. GBM-P may be related to regulatory mechanisms other than DNA methylation alone.

While there is an established shift towards an overall DNA CpG hypomethylation in tumors [30–32], at the individual gene and region level there may be changes in either direction in malignant tissues [30]. These methylation changes may not only affect promoters and open reading frames, but also regions of regulatory DNA and RNA, splice sites or binding sites for insulators of topological domains. Methylation changes in coding regions of microRNA and siRNA molecules, mediators of RNA interference, may result in changes in the translational repression of mRNAs [33,34]. Methylation changes in splice sites may affect expression of protein isoforms, and thus, their immune-based detection [35]. Increased methylation within binding sites of insulator molecules (e.g. CTCF) may also affect gene expression. For example, the blockade of CTCF binding by increased methylation of the binding site, causes a

loss of insulation between topological domains. The loss of domain boundary allows altered gene expression regulation by a remote constitutive enhancer that aberrantly interacts with genes of oncogenes (such as PDGFRA) described in IDH-1 mutant gliomas [36–39]. In addition, Moarii et al. [40] demonstrated that methylation of CpGs may have a differential impact on gene expression regulation depending on their location outside or within of the islands. While our study focused on DNA CpG methylation as a means of gene expression regulation, other mechanisms such as histone modification, and gene copy number or structural chromosomal alterations may also contribute to protein expression changes in tumors, and explain some of the discrepancies between the detected and expected protein expression levels in our study [40].

It is also important to note, that even the blockade of transcription factor (TF) binding by CpG methylation in promoters may not always result in gene expression suppression. Irizarry et al. [41] showed that there may be a positive association or correlation between hypermethylated promoter and high expression of a target gene if the methylated site is located 300 bp upstream from the transcription start site (TSSs) in colon cancer [41]. In brief, several epigenetic mechanisms related to DNA CpG methylation and also, to histone modification or structural genomic alterations might have contributed to the modulation of Wnt marker expression, in addition to changes in promoter and gene CpG methylation, in GBM over time. Nevertheless, the methylation levels of the selected Wnt markers were generally low in all samples, suggesting that these pathways may be active in GBM. However, the question arises as to how the relatively small changes in methylation levels could influence protein expression when control and GBM samples are compared. The answer might be related to differential methylation within a few CpGs with strong regulatory potential like those in enhancers and silencers. Enhancers are usually short (50–1500 bp) DNA segments located in some cases in the proximity, but often up to one million base pairs upstream or downstream of the transcription start sites of genes [42]. Each gene may have one or several enhancers that, by the means of CpG unmethylation and the binding of TFs, play key roles in gene expression regulation. As a corollary study, we performed a subanalysis restricting our focus to assessing CpG methylation within enhancers of the six markers using information from the GeneCards database (<https://www.genecards.org/Search/Keyword?queryString=Wnt>). As expected, in the smaller cohorts of 5 C-DB and our 21 GBM-P and 21 GBM-R, we could not detect sufficient methylation within these restricted regions to draw conclusion. However, in the larger database cohort of 112 GBM pairs [17], the enhancers with the GeneHancer identifier Wnt7b GH22J045611, Fzd10 GH12J130124 and Fzd10 GH12J130138 showed markedly higher CpG methylation than those of the other markers, in agreement with the marked suppression of Fzd-10 expression in all our samples, and the decreasing expression of Wnt7b during progression of GBM. As Wnt7b can functionally engage Fzd-10, these findings strongly suggest the downregulation of this particular receptor-ligand interaction in progressive GBM. Of note, however, the three enhancers mapped outside of the marker regions that we evaluated in the present study. It is also important to emphasize that RRBS data of chemically compromised DNA from FFPE samples are not optimal for defining if the methylation status of single CpG sites or CpGs within short regulatory subregions such as enhancers may differentially affect gene expression regulation in individual patients. The important question of as to how methylation of various regulatory elements (e.g. enhancers, silencers, insulators) affect gene expression in GBM may be more precisely addressed in future studies on frozen tumor specimens or cell lines with sufficient numbers.

Looking at our findings from the direction of corresponding Wnt ligands and receptors, one might deduce that neither the canonical, nor the non-canonical pathway could play a role in GBM development and progression, as the expression changes of no matching pathway ligand and receptor pairs were observed. For example, Wnt5a, Wnt3a and beta-catenin either moderately or significantly increased in GBM-P vs. C-PM,

but these increases in ligand and mediator expression were not accompanied by parallel changes in Fzd2 or Fzd-10 receptors. Similarly, the expression levels of Wnt3a and beta-catenin (either moderately or significantly) further increased in GBM-R vs. GBM-P, but again without an increase in the expression level of a canonical receptor. From these observations, however, a negative conclusion regarding the involvement of matching Wnt ligand and receptor pathways cannot be drawn in GBM, because 1) only selected markers and receptors were analyzed, while DNA methylation changes (along with the discussed other regulatory mechanisms of gene expression regulation) affect the expression of a broad array of Wnt ligands, receptors, and positive and negative regulatory molecules of these pathways; and 2) the conventional Wnt ligand and receptor engagement patterns may be altered, as both the canonical and non-canonical ligands can compete for the same receptor in tumors [9–11,43].

In conclusion, our study has demonstrated that on protein expression levels, Wnt5a, Fzd-2, beta-catenin and Wnt3a are either moderately or significantly increased, while Wnt7b and Fzd-10 are decreased or constitutively low in GBM compared to normal brain tissues. Comparing GBM-P and GBM-R pairs, Fzd-2 and Wnt3a expression levels were significantly elevated and beta-catenin showed a trend for increase in the recurrent samples, while Wnt7b significantly declined in GBM-R. Comparing the promoter + gene methylation levels in the three cohorts, Wnt3a and Wnt7b had significantly higher, Wnt5a and beta-catenin moderately elevated CpG methylation in the C-DB brain samples than in GBM-P or GBM-R, while Fzd-10 had the highest level of methylations among the six Wnt markers. These patterns inversely corresponded to the moderately or significantly increased expressions of the Wnt5a, Fzd-2, beta-catenin and Wnt3a proteins, and the low expression of the Fzd-10 marker in the tumors. To validate our results, we also assessed the promoter + gene CpG methylation for the six Wnt markers in a large sequential cohort of GBM published by Klughammer et al. [17]. Neither our, nor the database cohort revealed methylation differences in the investigated regions when the primary and recurrent GBM samples were compared. Of note, however, in both study cohorts, the methylation levels were low for the six markers, with Fzd-10 showing the highest promoter + gene CpG methylation corresponding to our low Fzd-10 protein detection. Our study has demonstrated that the methylation and the protein expression levels follow an inverse pattern in cases of the Wnt5a, Fzd-2, beta-catenin and Wnt3a markers when controls and tumors are compared, while Fzd-10 displays high methylation and low expression in all samples. In the case of Wnt7b, the decreasing promoter + gene methylation did not result in an increasing, rather a decreasing protein expression pattern in the tumor groups compared to controls. Neither in the database cohorts, nor in our own cohorts of sequential GBM samples could we see an inverse pattern in DNA CpG methylation and protein expression over time, suggesting that regulatory mechanisms other than CpG methylation may contribute to the increasing marker expression.

The strength of our study is that a corresponding comparison of DNA CpG methylation and protein expression within the same tissue blocks is unique, particularly in human pathological samples. Considering the importance of the Wnt pathway in tumor biology (Fig. 5a), this study has eliminated several ambiguities and further validated selected markers as potential treatment targets, while also highlighted the complexity of the regulation and involvement of these pathways in GBM (Fig. 5b). The main weakness of this study is primarily related to the human tissue origin and the pathological nature of the specimens as well as the relative small size of our sequential GBMs. FFPE tissue samples allow us obtaining only compromised, significantly fragmented DNA, but frozen tissues are typically unavailable at clinical centers. Although new methods involving e.g. the RRBS library preparation and next generation sequencing circumvent parts of the technical limitations, still many pitfalls remain as discussed above. Because of the aggressive biology of GBM, relatively few sequential samples are available even at larger university centers. In addition, controls frequently pose problems in

human studies. The ones presented here, also suffer of quantitative and qualitative limitations: First, because no surgically removed normal brains can be obtained from humans; second, because no normal brain cohort size can be matched to the study cohorts (GBM); and third, because the normal (or epileptic) brain controls involve a heterogeneity of normal (or degenerative) brain tissue cells, while the GBM samples are heterogeneous clones of glioma lineages. Even though several pitfalls were involved in the study, our results may reflect biologically highly relevant observations (Fig. 5b) that should lead to further explorations of the Wnt pathway in *in vitro* and *in vivo* models of gliomagenesis.

Availability of data and material

Raw sequencing data were uploaded to the European Nucleotide Archive (<https://www.ebi.ac.uk/ena>, Primary Accession: PRJEB38380, Secondary Accession: ERP121800). Some of the data are also provided in the Electronic Supplementary Material.

Code availability: Publicly available bioinformatics programs and tools were used as detailed in the Manuscript. The in-house script used in this study is available at <https://github.com/galikbence/MethylPatternViz>.

Authors contribution

Conceptualization: Bernadette Kalman; Material preparation, data collection and analyses: Marton Tompa, Bela Kajtar, Bence Galik, Attila Gyenesei and Bernadette Kalman; Writing – original manuscript draft preparation: Marton Tompa and Bernadette Kalman; Financial support: Bernadette Kalman, Attila Gyenesei and Bence Galik; Editing manuscript: All co-authors; Reading and approval of the final version of the manuscript: All co-authors.

Funding

The study was supported by Hungarian state funds administered through the graduate studies program of the University of Pecs, the Dr. Janos Szolcsanyi Research Fund by the University of Pecs, School of Medicine (Nr. KA-2019-42), and by a private donation. The research was performed in collaboration with the Genomics and Bioinformatics Core Facility at the Szentagothai Research Center of University of Pecs. Bioinformatics infrastructure was supported by ELIXIR Converge (Nr. 871075). Bence Galik and Attila Gyenesei were supported by the grants GINOP-2.3.4-15-2020-00010, GINOP-2.3.1-20-2020- 00001 and ERASMUS+-2019-0-HU01-KA203-061251. The bioinformatic research conducted within a project received additional funding from the Horizon 2020 research and innovation program under the H2020-MSCA-COFUND Marie Skłodowska-Curie grant agreement (Nr. 754432), and was also supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education, from financial resources for science in 2018-2023 granted for the implementation of an international cofinanced project. The funding sources had no influence on study design, material and data collection, analyses, interpretation of results, or the decision to submit the article for publication.

Ethics committee approval

The study was approved by the Regional Clinical Research Committee (Number: 7517 PTE 2018 and 2019) and was compliant with the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki).

Consent to participate or for publication

All specimens used in the study were tissue samples left over from routine histopathological evaluations. All patients had passed away by

the time of the study initiation.

Consent for publication

All authors and institutional authorities at the University of Pecs (where the study was carried out) approve the publication of the work.

Author statement

This work has not been published and is not under consideration for publication at other journals.

All studied specimens were left over from routine pathological evaluations of patients who had passed away by the time of study initiation. Therefore, patient consent was waived. The study was conducted in compliance with the current ethical regulations for human subject studies. All authors read the final version of the manuscript and approved the submission of the paper.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no financial or professional conflict of interests.

Acknowledgements

The study was supported by Hungarian state funds administered through the graduate studies program of the University of Pecs, the Dr. Janos Szolcsanyi Research Fund by the University of Pecs, School of Medicine (Nr. KA-2019-42), and by a private donation. The research was performed in collaboration with the Genomics and Bioinformatics Core Facility at the Szentagothai Research Center of University of Pecs. Bioinformatics infrastructure was supported by ELIXIR Converge (Nr. 871075). B.G and A.G. were supported by the grants GINOP-2.3.4-15-2020-00010, GINOP-2.3.1-20-2020- 00001 and ERASMUS+-2019-0-HU01-KA203-061251. The bioinformatic research conducted within a project received additional funding from the Horizon 2020 research and innovation program under the H2020-MSCA-COFUND Marie Skłodowska-Curie grant agreement (Nr. 754432), and was also supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education, from financial resources for science in 2018-2023 granted for the implementation of an international co-financed project.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153429>.

References

- [1] M. Weller, N. Butowski, D.D. Tran, L.D. Recht, M. Lim, H. Hirte, L. Ashby, L. Mechtler, S.A. Goldlust, et al., Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial, *Lancet Oncol.* 18 (2017) 1373–1385, [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30517-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30517-X).
- [2] A. Desjardins, M. Gromeier, J.E. Herndon, N. Beaubier, D.P. Bolognesi, A. H. Friedman, H.S. Friedman, F. McSherry, A.M. Muscat, et al., Recurrent glioblastoma treated with recombinant poliovirus, *N. Engl. J. Med.* 379 (2018) 150–161, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716435>.
- [3] Cancer Genome Atlas Research Network, Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways, *Nature.* 455 (2008) 1061–1068, <https://doi.org/10.1038/nature11903>.
- [4] J.E. Visvader, G.J. Lindeman, Cancer stem cells: current status and evolving complexities, *Cell Stem Cell* 14 (10) (2012) 717–728, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.007>.
- [5] R.G. Verhaak, K.A. Hoadley, E. Purdom, V. Wang, Y. Qi, M.D. Wilkerson, C. R. Miller, L. Ding, T. Golub, et al., Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1, *Cancer Cell* 17 (2010) 98–110, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>.
- [6] H. Noushahr, D.J. Weisenberger, K. Diefes, H.S. Phillips, K. Pujara, B.P. Berman, F. Pan, C.E. Pelloso, E.P. Sulman, et al., Identification of a CpG island methylator

- phenotype that defines a distinct subgroup of glioma, *Cancer Cell* 17 (2010) 510–522, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.03.017>.
- [7] M. Zuccarini, P. Giuliani, S. Ziberi, M. Carluccio, P.D. Iorio, F. Caciagli, R. Ciccirelli, The role of Wnt signal in glioblastoma development and progression: a possible new pharmacological target for the therapy of this tumor, *Genes* 9 (2018), <https://doi.org/10.3390/genes9020105>, 105.
- [8] M. Tompa, F. Kalovits, A. Nagy, B. Kalman, Contribution of the Wnt pathway to defining biology of glioblastoma, *Neuromol. Med.* 20 (2018) 437–451, <https://doi.org/10.1007/s12017-018-8514-x>.
- [9] Z. Wang, W. Shu, M.M. Lu, E.E. Morrissy, Wnt7b activates canonical signaling in epithelial and vascular smooth muscle cells through interactions with Fzd1, Fzd-10, and LRP5, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 5022–5030, <https://doi.org/10.1128/MCB.25.12.5022-5030.2005>.
- [10] L. Ring, P. Neth, C. Weber, S. Steffens, A. Faussner, β -Catenin-dependent pathway activation by both promiscuous “canonical” WNT3a–, and specific “noncanonical” WNT4– and WNT5a–FZD receptor combinations with strong differences in LRP5 and LRP6 dependency, *Cell. Signal.* 26 (2014) 260–267, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.021>.
- [11] N. Liu, H.G. Shi, W. Zhang, B. Gu, The crosstalk between canonical and noncanonical Wnt signaling pathway in osteoblast differentiation of periodontal ligament stem cells in inflammatory microenvironments. *Zhonghua kou qiang yi xue za zhi* = *Zhonghua kouqiang yixue zazhi* =, *Chinese Journal of Stomatology* 51 (2016) 673–679, <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1002-0098.2016.11.007>.
- [12] A. Nagy, F. Garzuly, G. Padanyi, I. Szucs, A. Feldmann, B. Murnyak, T. Hortobagyi, B. Kalman, Molecular subgroups of glioblastoma—an assessment by immunohistochemical markers, *Pathol. Oncol. Res.* 25 (2019) 21–31, <https://doi.org/10.1007/s12253-017-0311-6>.
- [13] M. Tompa, A. Nagy, S. Komoly, B. Kalman, Wnt pathway markers in molecular subgroups of glioblastoma, *Brain Res.* 1718 (2019) 114–125, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.05.008>.
- [14] Z. Kraboth, B. Galik, M. Tompa, B. Kajtar, P. Urban, A. Gyenesei, A. Miseta, B. Kalman, DNA CpG methylation in sequential glioblastoma specimens, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 146 (2020) 2885–2896, <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03349-w>.
- [15] D.N. Louis, A. Perry, G. Reifenberger, A. Von Deimling, D. Figarella-Branger, W. K. Cavenee, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, P. Kleihues, D.W. Ellison, The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary, *Acta Neuropathol.* 131 (2016) 803–820, <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.
- [16] Z. Kraboth, B. Kajtar, B. Galik, A. Gyenesei, A. Miseta, B. Kalman, Involvement of the catecholamine pathway in glioblastoma development, *Cells* 10 (543) (2021), <https://doi.org/10.3390/cells10030549>.
- [17] J. Klughammer, B. Kiesel, T. Roetzer, N. Fortelny, A. Nemc, K.H. Nanning, J. Furtner, N.C. Sheffield, P. Datlinger, N. Peter, et al., The DNA methylation landscape of glioblastoma disease progression shows extensive heterogeneity in time and space, *Nat. Med.* 24 (2018) 1611–1624, <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0156-x>.
- [18] M. Kamino, M. Kishida, T. Kibe, K. Ikoma, M. Iijima, H. Hirano, M. Tokudome, L. Chen, C. Koriyama, et al., Wnt-5a signaling is correlated with infiltrative activity in human glioma by inducing cellular migration and MMP-2, *Cancer Sci.* 102 (2011) 540–548, <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01815.x>.
- [19] U.D. Kahlert, D. Maciaczyk, S. Doostkam, B.A. Orr, B. Simons, T. Bogiel, T. Reithmeier, M. Prinz, J. Schubert, et al., Activation of canonical WNT/ β -catenin signaling enhances in vitro motility of glioblastoma cells by activation of ZEB1 and other activators of epithelial-to-mesenchymal transition, *Cancer Lett.* 325 (2012) 42–53, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.05.024>.
- [20] E. Binda, A. Visioli, F. Giani, N. Trivieri, O. Palumbo, S. Restelli, F. Dezi, T. Mazza, C. Fusili, et al., Wnt5a drives an invasive phenotype in human glioblastoma stem-like cells, *Cancer Res.* 77 (2016) 996–1007, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.ccr-16-1693>.
- [21] X. Jin, H.Y. Jeon, K.M. Joo, J.K. Kim, J. Jin, S.H. Kim, B.G. Kang, S. Beck, S.J. Lee, et al., Frizzled 4 regulates stemness and invasiveness of migrating glioma cells established by serial intracranial transplantation, *Cancer Res.* 71 (2011) 3066–3075, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1495>.
- [22] Z. Liu, B. Sun, L. Qi, Y. Li, X. Zhao, D. Zhang, Y. Zhang, Dickkopf-1 expression is down-regulated during the colorectal adenoma–carcinoma sequence and correlates with reduced microvessel density and VEGF expression, *Histopathology.* 67 (2015) 158–166, <https://doi.org/10.1111/his.12474>.
- [23] J.R. Miller, A.M. Hocking, J.D. Brown, R.T. Moon, Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/ β -catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways, *Oncogene.* 18 (1999) 7860–7872.
- [24] S. Urakami, H. Shiina, H. Enokida, H. Hirata, K. Kawamoto, T. Kawakami, N. Kikuno, Y. Tanaka, S. Majid, et al., Wnt antagonist family genes as biomarkers for diagnosis, staging, and prognosis of renal cell carcinoma using tumor and serum DNA, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 6989–6997, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1194>.
- [25] D. Mohtat, K. Susztak, Fine tuning gene expression: the epigenome, *Semin. Nephrol.* 30 (2010) 468–476, <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2010.07.004>.
- [26] I. Raulusevičute, F. Drablos, M.B. Rye, DNA hypermethylation associated with upregulated gene expression in prostate cancer demonstrates the diversity of epigenetic regulation, *BMC Med. Genomics* 13 (2020), <https://doi.org/10.1186/s12920-020-0657-6>, 6.
- [27] E. Salsano, R. Paterra, M. Figus, F. Menghi, E. Madera, B. Pollo, C.L. Solero, L. Massimi, G. Finocchiaro, Expression profile of frizzled receptors in human medulloblastomas, *J. Neurooncol.* 106 (2012) 271–280, <https://doi.org/10.1007/s11060-011-0682-6>.
- [28] M.P. Scavo, L. Fucci, L. Caldarella, A. Mangia, A. Azzariti, G. Simone, G. Gasparini, S. Krol, Frizzled-10 and cancer progression: Is it a new prognostic marker? *Oncotarget* 12 (2017) 824–830, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23159>.
- [29] M.P. Scavo, A. Cigliano, N. Depalo, E. FaniZZa, M.G. Bianco, N. Denora, V. Laquintana, M.L. Curri, D. Lorusso, C. Lotesoriere, A. Panarese, G. Giannelli, Frizzled-10 Extracellular Vesicles Plasma Concentration Is Associated with Tumor Progression in Patients with Colorectal and Gastric Cancer, *J. Oncol.* 2 (2019), <https://doi.org/10.1155/2019/2715968>, 2715968.
- [30] S. Sharma, T.K. Kelly, P.A. Jones, Epigenetics in cancer, *Carcinogenesis.* 31 (2010) 27–36, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp220>.
- [31] M. Rodríguez-Paredes, M. Esteller, Cancer epigenetics reaches mainstream oncology, *Nat. Med.* 17 (2011) 330–339, <https://doi.org/10.1038/nm.2305>.
- [32] W. Timp, H.C. Bravo, O.G. McDonald, M. Goggins, C. Umbricht, M. Zeiger, A. P. Feinberg, R.A. Irizarry, Large hypomethylated blocks as a universal defining epigenetic alteration in human solid tumors, *Genome Med.* 26 (61) (2014), <https://doi.org/10.1186/s13073-014-0061-y>.
- [33] I. Behm-Ansmant, J. Rehwinkel, E. Izaurralde, MicroRNAs silence gene expression by repressing protein expression and/or by promoting mRNA decay, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 71 (2016) 523–530, <https://doi.org/10.1101/sqb.2006.71.013>.
- [34] Z. Li, T.M. Rana, Molecular mechanisms of RNA-triggered gene silencing machineries, *Acc. Chem. Res.* 45 (2012) 1122–1131, <https://doi.org/10.1021/ar200253u>.
- [35] G.L. Maor, A. Yearim, G. Ast, The alternative role of DNA methylation in splicing regulation, *Trends Genet.* 31 (2015) 274–280, <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.03.002>.
- [36] B. Burgess-Beusse, C. Farrell, M. Gaszner, M. Litt, V. Mutskov, F. Recillas-Targa, M. Simpson, A. West, G. Felsenfeld, The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin, *PNAS.* 99 (2002) 16433–16437, <https://doi.org/10.1073/pnas.162342499>.
- [37] A.C. Bell, A.G. West, G. Felsenfeld, The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators, *Cell.* 98 (1999) 387–396, [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81967-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81967-4).
- [38] E. Ayala-Ortega, R. Arzate-Mejía, R. Pérez-Molina, E. González-Buendía, K. Meier, G. Guerrero, F. Recillas-Targa, Epigenetic silencing of miR-181c by DNA methylation in glioblastoma cell lines, *BMC Cancer* 16 (2016), <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2273-6>, 226.
- [39] W.A. Flavahan, Y. Drier, B.B. Liau, S.M. Gillespie, A.S. Venteicher, A.O. Stemmer-Rachamimov, M.L. Suvà, B.E. Bernstein, Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas, *Nature.* 529 (2016) 110–114, <https://doi.org/10.1038/nature16490>.
- [40] M. Moarri, V. Boeva, J.P. Vert, F. Reyat, Changes in correlation between promoter methylation and gene expression in cancer, *BMC Genomics* 16 (2015) 1–14, <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1994-2>.
- [41] R.A. Irizarry, C. Ladd-Acosta, B. Wen, Z. Wu, C. Montano, P. Onyango, H. Cui, K. Gabo, M. Rongione, et al., The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores, *Nat. Gen.* 41 (2009) 178–186, <https://doi.org/10.1038/ng.298>.
- [42] G.A. Maston, S.K. Evans, M.R. Green, Transcriptional regulatory elements in the human genome, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 7 (2006) 29–59, <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.7.080505.115623.A>.
- [43] M.Czyz Gajos-Michniewicz, WNT Signaling in Melanoma, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020), <https://doi.org/10.3390/ijms21144852>, 4852.
- [44] Z. Zhang, X. Wang, L. Wang, Y. Shi, J. Wang, H. Yan, Wnt/ β -catenin signaling pathway in trophoblasts and abnormal activation in preeclampsia, *Mol. med. rep.* 16 (2017) 1007–1013, <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6718>.
- [45] C. Lange, E. Mix, K. Rateitschak, A. Rolfs, Wnt signal pathways and neural stem cell differentiation, *Neurodegener. Dis.* 3 (2006) 76–86, <https://doi.org/10.1159/000092097>.
- [46] G. Foltz, J.G. Yoon, H. Lee, M. Li, T. Qiang, L. Hood, A. Madan, Epigenetic regulation of wnt pathway antagonists in human glioblastoma multiforme, *Genes Cancer* 1 (2010) 81–90, <https://doi.org/10.1177/1947601909356103>.
- [47] E.J. Yeo, L. Cassetta, B.Z. Qian, I. Lewkowich, J.F. Li, J.A. Stefater, R.A. Stefater, et al., Myeloid WNT7b mediates the angiogenic switch and metastasis in breast cancer, *Cancer Res.* 74 (2014) 2962–2973, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2421>.



DNA CpG methylation in sequential glioblastoma specimens

Zoltan Kraboth^{1,2} · Bence Galik^{2,4} · Marton Tompa^{1,2} · Bela Kajtar³ · Peter Urban² · Attila Gyenesi^{2,4} · Attila Miseta¹ · Bernadette Kalman^{1,2}

Received: 11 June 2020 / Accepted: 4 August 2020
© The Author(s) 2020

Abstract

Purpose Glioblastoma is the most aggressive form of brain tumors. A better understanding of the molecular mechanisms leading to its evolution is essential for the development of treatments more effective than the available modalities. Here, we aim to identify molecular drivers of glioblastoma development and recurrence by analyzing DNA CpG methylation patterns in sequential samples.

Methods DNA was isolated from 22 pairs of primary and recurrent formalin-fixed, paraffin-embedded glioblastoma specimens, and subjected to reduced representation bisulfite sequencing. Bioinformatic analyses were conducted to identify differentially methylated sites and pathways, and biostatistics was used to test correlations among clinical and pathological parameters.

Results Differentially methylated pathways likely involved in primary tumor development included those of neuronal differentiation, myelination, metabolic processes, synapse organization and endothelial cell proliferation, while pathways differentially active during glioblastoma recurrence involved those associated with cell processes and differentiation, immune response, Wnt regulation and catecholamine secretion and transport.

Conclusion DNA CpG methylation analyses in sequential clinical specimens revealed hypomethylation in certain pathways such as neuronal tissue development and angiogenesis likely involved in early tumor development and growth, while suggested altered regulation in catecholamine secretion and transport, Wnt expression and immune response contributing to glioblastoma recurrence. These pathways merit further investigations and may represent novel therapeutic targets.

Keywords Glioblastoma · DNA CpG methylation · Gene ontology analyses · Tumorigenesis · Progression

Zoltan Kraboth and Bence Galik co-authors equally contributed to the paper.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00432-020-03349-w>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Bernadette Kalman
Bernadette.kalman@pte.hu

¹ Institute of Laboratory Medicine, School of Medicine, University of Pecs, Pecs, Hungary

² Szentagothai Research Center, University of Pecs, 20. Ifjusag street, Pecs 7624, Hungary

³ Institute of Pathology, School of Medicine, University of Pecs, Pecs, Hungary

⁴ Department of Clinical Molecular Biology, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most aggressive brain tumor exhibiting great variability at histopathological and molecular levels. Its development is related to the accumulation of somatic genomic rearrangements, mutations and copy number alterations (CNAs), accompanied by changes in epigenomic and gene expression profiles. In some cases, chromothripsis, a sudden catastrophic rearrangement involving one or a few chromosomes, may also play a role (Furgason et al. 2015). Numerous studies presented genomic and transcriptomic characteristics of GBM (Cancer Genome Atlas Research Network 2008; Verhaak et al. 2010; Sottoriva et al. 2013; Brennan et al. 2013; Kim et al. 2015a, b; Patel et al. 2014; Wang et al. 2016, 2017). The first comprehensive epigenomic analysis was reported by Noushmehr et al (2010), followed by several similar efforts (Nagarajan et al. 2014; Hu et al. 2016; de Souza et al. 2018; Klughammer et al. 2018).

GBM is today subdivided into transcriptional and epigenomic subgroups, and the most characteristic mutational events and pathways driving its development have been identified (Cancer Genome Atlas Research Network 2008; Verhaak et al. 2010; Brennan et al. 2013; Noushmehr et al. 2010). However, most molecular analyses involved cross-sectional cohorts, since the collection of sequential samples is hindered by the aggressiveness of GBM. Nevertheless, the available sequential studies contributed invaluable information to the understanding of GBM evolution and drug resistance (Muscat et al. 2018; Erson-Omay et al. 2017).

The initial epigenetic studies determined levels of CpG methylation within the promoter of the O-6-methylguanine-DNA methyltransferase, because its silencing renders GBM more sensitive to temozolomide (Hegi et al. 2005). The first comprehensive methylome revealed the glioma CpG island methylator phenotype (G-CIMP) in correlation with the GBM proneural transcriptional subtype (Noushmehr et al. 2010).

DNA CpG methylome studies as an alternative to RNA expression profiling in FFPE GBM specimens became feasible due to the recent availability of the reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) method. Combining RRBS with next-generation sequencing (NGS), Klughammer et al. (2018) reported the single-CpG and single allele methylation profiles, the most important pathways and inferred transcriptional subtypes of FFPE GBM specimens in the context of multidimensional clinical and molecular data.

Testing key molecular markers (Verhaak et al. 2010) by immunohistochemistry (IHC), we previously reproduced the segregation of subgroups (Nagy et al. 2019) and demonstrated the involvement of the Wnt pathways in both cross-sectional and sequential FFPE GBM (Tompa et al. 2018). To further explore mechanisms of GBM development and recurrence, here we analyzed genome-wide distribution of differentially methylated DNA CpG sites, regions and pathways in 22 pairs of sequential FFPE GBM specimens.

Materials and methods

Subjects of the study and samples

Surgically removed FFPE GBM specimens were obtained between 1999 and 2017, and evaluated by routine histological work up at the Institute of Pathology, University of Pecs (UP). Leftover blocks were used for these molecular analyses after receiving approval (Number: 7517 PTE 2018 and 2019) from the Regional Clinical Research Committee.

The characteristics of patients and specimens are summarized in Table 1. The diagnosis of primary (de novo) GBM was established based on standard clinical and histopathological criteria (Louis et al. 2016). After quality

assessment, 24 pairs of isocitrate dehydrogenase (IDH)-1 R132H mutation negative, initial (GBM1) and recurrent (GBM2) tumor blocks were identified. Subsequently, two pairs were excluded as the patients turned out to be younger than 20 years of age, leaving 22 pairs of GBM in the study. GBM1 specimens were taken before chemoradiation, and GBM2 specimens at recurrence after chemoradiation. All but one patient received temozolomide-based chemo- and radiation therapy after the first surgery.

In control group 1 (CG1), six postmortem FFPE normal brain specimens were included from the tissue archive of the Pathology Institute, UP. This unideal choice was necessitated because no surgically dissected normal brain or other neurological disease control FFPE specimens were available. In control group 2 (CG2), DNA CpG methylation data of five brain specimens obtained during epilepsy surgery were included by downloading from the EBI European genome-phenome archive (accession number: EGAS00001002538) (Klughammer et al. 2018). DNA specimens of CG1 were processed by the same methods as GBM1 and GBM2. DNA specimens of CG2 were also processed by RRBS, but sequenced on Illumina HiSeq 3000 and 4000 machines (Klughammer et al. 2018).

Evaluation of a hematoxylin–eosin stained section from each tumor block allowed us to exclude normal brain contamination, necrosis or highly vascular regions. The characteristics of the tumors are summarized in Table 2.

DNA isolation

Five cuts per FFPE block were used for DNA extraction with the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). DNA quantitation was carried out using a Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit on a Qubit 3 Fluorimeter (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The distribution of DNA fragments was determined by an Agilent Genomic DNA ScreenTape Assay on an Agilent 4200 TapeStation System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

DNA methylation profiling

Bisulfite converted libraries were prepared from DNA by using the Premium RRBS kit 24x (Diagenode SA, Seraing, Belgium) according to the manufacturer's instructions. To compensate for higher degrees of fragmentation, we increased from the recommended 200 ng to higher amounts (350–400 ng) of input DNA. DNA digestion by MspI was then followed by fragment-end repair and adaptor ligation. The amount of effective library was determined using the Kapa Sybr Fast qPCR kit (Kapabiosystems, Cape Town, South Africa) on a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Samples with similar quantitative (q)PCR threshold cycle (Ct) values were

Table 1 Patients' characteristics

Primary	RRBS ID	Recurrent	RRBS ID2	Gender	Age at onset (years)	Age at death (years)	Treatment	T1-T2 (weeks)	Overall survival (weeks)
15043	1	9849	R1	Man	50	50	No data	31	41
9501	2	3624	R2	Man	52	53	No data	33	59
15916	4	9527	R4	Woman	63	64	Surgery + irradiation	30	43
9886	5	15289	R5	Man	41	43	No data	17	70
3094	6	15302	R6	Man	59	60	Surgery + irradiation + TMZ	35	65
5526	7	13808	R7	Woman	50	52	Surgery + irradiation + TMZ	77	88
13501	8	9614	R8	Man	39		Surgery + irradiation + TMZ	40	
12732	9	17440	R9	Man	41	43	Primary: Surgery + irradiation + TMZ; Recurrent: Bevacizumab + irradiation	117	149
17578	10	7779	R10	Man	63		No data	77	
15466	11	16534	R11	Man	66		Surgery + irradiation + TMZ	56	
10379	12	7536	R12	Woman	56	61	AVAGLIO clinical study (STUPP+ Bevacizumab/placebo)	199	287
14561	13	2315	R13	Man	45		AVAGLIO clinical study (STUPP+ Bevacizumab/placebo)	70	
2525	14	1365	R14	Man	32	36	Surgery + TMZ, then Bevacizumab, irradiation, BCNU	177	203
14642	15	7990	R15	Man	43	46	Surgery + irradiation + TMZ	135	192
5693	16	612	R16	Woman	45	48	Surgery + irradiation + TMZ	143	169
7183	17	11956	R17	Woman	57	59	Surgery + irradiation + TMZ	51	95
6795	18	17545	R18	Woman	61	62	Surgery + irradiation + TMZ	31	54
16189	19	16742	R19	Woman	53	55	Surgery + irradiation + TMZ	55	69
8117	20	2908	R20	Woman	37	40	Surgery + irradiation + TMZ	92	106
3997	21	5120	R21	Man	62	63	Surgery + irradiation + TMZ	58	62
10776	23	2168	R23	Man	43	44	Surgery + irradiation + TMZ	29	46
13956	24	12107	R24	Man	60	62	Surgery + irradiation + TMZ	49	60

This table summarizes the gender, age at onset and age at death of patients, the treatment modalities and T1-T2 time. OS could not be calculated for four patients because the time of death was unavailable after extensive search of all electronic medical records. Therefore, instead of OS, the T1-T2 time values were used in the statistical analyses

TMZ temozolomide

multiplexed in pools of eight. The pools were subjected to bisulfite conversion, followed by a second qPCR to determine the enrichment amplification cycles for the final PCR on a GeneAmp PCR Systems 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). After confirming the adequate fragment size distributions on the 4200 TapeStation System and the concentrations by the Qubit 3 Fluorometer, the amplified libraries were sequenced using the NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 cycles) on a NextSeq 550 machine (Illumina, San Diego, CA, USA). Raw sequencing data were uploaded to the European Nucleotide Archive (<https://www.ebi.ac.uk/ena>, Primary Accession: PRJEB38380, Secondary Accession: ERP121800). The glioma CpG island methylator phenotype (G-CIMP) was excluded with high probability in the GBM1 and GBM2 cohorts by adapting the eight gene

method for bisulfite-converted sequence data (Noushmehr et al. 2010).

Bioinformatics

After the quality control step using FastQC, sequences were filtered to remove low-quality bases and adapters by Trim-Galore. Bisulfite-treated reads were aligned to the hg19 reference genome and methylation calls were performed using Bismark (Krueger and Andrews 2011). After obtaining the CpG calls, RnBeads (Müller et al. 2019) was run to identify differentially methylated sites, regions and pathways in the cohorts. The Locus Overlap Analysis (LOLA) program (in RnBeads) was used for an enrichment analysis of genomic region sets and regulatory elements (Sheffield and Bock

Table 2 Characteristics of tumors

GBM1	RRBS ID	MI	MVP	Necrosis	Cell	TIL
15043	1	36	Yes	None	Astrocytic	Moderate
9501	2	2	Yes	Extensive with palisade	Astrocytic	Moderate
15916	4	10	Yes	None	Astrocytic	None
9886	5	91	Yes	Extensive	Astrocytic	None
3094	6	120	Yes	Extensive	Astrocytic	Dense
5526	7	20	Yes	Extensive	Astrocytic	Sparse
13501	8	13	Yes	Extensive	Epithelioid	Sparse
12732	9	2	Yes	Extensive with palisade	Astrocytic	Moderate
17578	10	0	No	Extensive	Astrocytic	Dense
15466	11	18	Yes	Extensive	Astrocytic	Dense
10379	12	30	Yes	Extensive	Small cell	Dense
14561	13	36	Yes	Extensive with palisade	Astrocytic	Sparse
2525	14	38	Yes	Extensive with palisade	Astrocytic	Sparse
14642	15	78	Yes	Extensive with palisade	Small cell	Dense
5693	16	42	Yes	Extensive with palisade	Astrocytic	Sparse
7183	17	44	Yes	Extensive with palisade	Astrocytic	Sparse
6795	18	15	Yes	Extensive	Astrocytic	Sparse
16189	19	24	No	None	Small cell	Sparse
8117	20	25	Yes	None	Astrocytic	Dense
3997	21	12	Yes	Palisade	Astrocytic	Sparse
10776	23	32	Yes	Extensive	Astrocytic	Sparse
13956	24	32	Yes	Extensive	Astrocytic	Sparse
GBM2	RRBS ID	MI	MVP	Necrosis	Cell	TIL
9849	R1	100	Yes	Extensive with palisade	Small cell	Sparse
3624	R2	2	No	None	Astrocytic	Dense
9527	R4	32	Yes	Extensive with palisade	Small cell	None
15289	R5	94	Yes	Extensive	Astrocytic	Sparse
15302	R6	4	No	Extensive	Astrocytic	Sparse
13808	R7	21	No	None	Astrocytic	Sparse
9614	R8	20	No	Extensive with palisade	Epithelioid	Sparse
17440	R9	14	No	Extensive	Astrocytic	Sparse
7779	R10	50	Yes	Palisade	Astrocytic	Moderate
16534	R11	14	Yes	Extensive	Astrocytic	Dense
7536	R12	62	Yes	Palisade	Astrocytic	Dense
2315	R13	36	Yes	Palisade	Astrocytic	Sparse
1365	R14	40	Yes	None	Astrocytic	Dense
7990	R15	16	Yes	Extensive with palisade	Small cell	Dense
612	R16	12	Yes	Extensive with palisade	Astrocytic	Dense
11956	R17	22	Yes	Palisade	Astrocytic	Sparse
17545	R18	18	No	Extensive with palisade	Astrocytic	Sparse
16742	R19	18	No	Extensive with palisade	Small cell	Sparse
2908	R20	20	Yes	Palisade	Astrocytic	None
5120	R21	18	Yes	Extensive with palisade	Astrocytic	Sparse
2168	R23	10	No	None	Small cell	Dense
12107	R24	16	No	Palisade	Astrocytic	Dense

This table summarizes histopathological characteristics of GBM1 and GBM2. Histological parameters were assessed by manual eyeballing using low microscopic magnification (100x) and semiquantitative evaluation criteria published previously (Tompa et al. 2018). In statistical analyses, semiquantitative determinants were replaced by numerical values: e.g. TIL: no=0, sparse=1, moderate=2, dense=3

MI mitotic index (number of mitoses per 10 high power fields), *MVP* microvascular proliferation, *TIL* tumor infiltrating lymphocytes

2016). Biological interpretation of data was assisted by the BioMethyl R package. All raw sequencing data, reports and results were stored in-house on a network-attached storage (NAS) server.

Statistics

Patients' age, gender and time to recurrence (T1–T2) were correlated with histological characteristics using the Kruskal–Wallis and Mann–Whitney *U* tests, and Pearson's correlation.

Results

DNA CpG methylation data in FFPE control and GBM specimens

We compared DNA CpG methylation patterns in normal brain tissues and IDH-wild-type GBM specimens at initial diagnosis (GBM1) and at first recurrence (GBM2). Two control groups were initially considered. CG1 included the DNA CpG methylomes of six postmortem normal brain regions from individuals who passed away from non-neurological causes. CG2 included the DNA CpG methylomes of five FFPE brain tissues obtained during epilepsy surgery and deposited in a publicly available database (Klughhammer et al. 2018). Twenty-two pairs of sequential surgically obtained FFPE GBM specimens in GBM1 and GBM2 represented the main study groups with clinical variables of age, gender, time between first and second surgery (T1–T2), OS and treatment parameters (Table 1). Pathological characteristics included tumor cell morphology, mitotic index, degree of immune infiltration and necrosis (Table 2).

TapeStation analyses revealed that DNA fragmentation was slightly, but not significantly higher in GBM1 than in GBM2 (21.65% vs. 25.10% of DNA fragments were above 2000 bp, respectively). For comparison, the DNA fragment rates above 2000 bp were 87.15% in freshly drawn total blood and 70.18% in buffy coat (Supplementary Table 1).

The mean bisulfite conversion rate that reflects the chemical conversion of unmethylated cytosine to uracil was 98.48% (Supplementary Table 2). Using the spike-in controls, the mean underconversion rate was 1.32%, and the mean overconversion rate was 1.70% (Supplementary Table 2). At an average alignment rate of 69%, the mean number of informative CpGs per sample was 20,741,979 and the median number of CpGs was 16,574,809 in the non-duplicated raw data, representing over ten times higher than expected figures due to duplications during library amplification. Deduplication is not recommended, since it could result in biases in the CpG representation and a loss of information. Instead, 19,936 sites with overlapping SNPs

were removed and CpGs with extremely high coverage were filtered out for the correction of duplicated sequences during bioinformatics preprocessing.

There was a trend for fewer informative CpGs in samples with lower quality of DNA. In CG2 (Klughhammer et al. 2018), a higher mean CpG methylation rate (47.91%) was noted compared to that of CG1 (32.31%), a difference attributable to DNA quality differences in surgical and post-mortem FFPE specimens. TapeStation analysis of DNA from CG1 showed the highest levels of DNA fragmentation (the mean rate of DNA fragments above 2000 bp was only 5.91%) among all groups. Based on these observations, we abandoned the CG1 data, and used the CG2 data as reference in all subsequent analyses (Klughhammer et al. 2018).

Overall, a shift toward hypomethylation was observed when comparing the controls and the sequential tumor samples (the mean CpG methylation levels in CG2: 47.91%; in GBM1: 41.34%; and in GBM2: 31.6%). The methylation differences showed only a trend in the GBM1–CG2 comparison (Kruskal–Wallis test $p=0.35$), but reached significance in the GBM2–GBM1 ($p=0.046$) and GBM2–CG2 ($p=0.032$) comparisons (Supplementary Table 3).

Differential DNA methylation profiles in CG2, GBM1 and GBM2

The sample summary table in RnBeads with filtered and corrected data revealed a mean CpG site number of 60,169.48 and mean coverage of 366.07. In addition to CpG sites, four regions were covered by the analyses: tiling, genes, promoters and CpG islands (Supplementary Table 4). We primarily focused on differential methylation rates in gene promoters comparing CG2–GBM1, CG2–GBM2, and GBM1–GBM2 in all analyses.

Differential methylation on the site and region levels revealed no FDR corrected p -values of ≤ 0.05 in the scatterplots in the three group-wise comparisons.

In the GO analyses, hypermethylation was observed within promoters of genes related to pathways of neuronal differentiation and morphogenesis, and transcription and metabolic processes in GBM1 compared to CG2. The most significantly hypermethylated gene promoters were related to gastrulation regulation (OTX2 $p=8.38E-05$) and cellular responses to the fibroblast growth factor (FGR) (PTBP1 $p=5.52E-13$; POLR2D $p=6.09E-09$; NOG $p=4.32E-07$). There were, however, also genes showing higher degrees of promoter methylation, but with lower degrees of significance. For instance, 17 different promoters in genes associated with nucleic acid-templated transcription had hypermethylation in GBM1 compared to CG2 (mean $p=0.0079$). Eighteen promoters in genes associated with the regulation of different nucleobase-containing compound metabolic processes were hypermethylated (mean $p=0.0088$).

Furthermore, there were 19 hypermethylated promoters of genes associated with pathways of neuron morphogenesis and differentiation in GBM1 compared to CG2.

Pathways with promoter hypomethylation in GBM1 compared to CG2 included genes related to synapse organization and assembly, neuronal ensheathment and endothelial cell proliferation. The most significantly hypomethylated pathways were also the ones in which numerically the most promoters were hypomethylated. These pathways associated with regulation of postsynapse organization (e.g., GHSR; HSPA8; FZD9; SEMA3F), synapse assembly (e.g., AMIGO1; NTRK1; THBS2), endothelial cell proliferation (e.g., HIF1A; EGFL7; TNFSF12; PRKD2) and myelination (e.g., NKX6-2; KCNJ10; NCSTN; TENM4).

The GBM2–CG2 comparison showed pathways with gene promoter hypermethylation associated with transcription regulation, cell adhesion and morphogenesis and embryonic development in the GBM2 samples. Pathways which showed the most significant hypermethylation in promoters were associated with appendage morphogenesis and limb development (e.g., ALX3; HOXD10; NOG; FRAS1; SALL4). The pathways with numerically the most promoters hypermethylated were associated with transcription regulation by RNA polymerase II and cell adhesion processes. Pathways with hypomethylated gene promoters in GBM2, compared to CG2, included a few associated with purine and pyrimidine nucleobase transports (SLC28A1), Golgi transports (SNX12; SGSM2; GCC2) and allantoin catabolic processes (ALLC).

Comparing GBM1 and GBM2, the GO analysis revealed several pathways of biological relevance. Pathways with gene promoter hypermethylation in the recurrent compared to the primary tumors included genes related to regulation of the Wnt pathway, catecholamine secretion and transport, and cellular response, signaling and communication. The most significantly hypermethylated pathways in the recurrent samples were those associated with catecholamine secretion regulation (SYT15; SYT17; PINK1; OXTR), catecholamine transport (SLC18A2; TOR1A) and signaling receptor activity regulation (CACNG8; TSG101; DLG1) as well as those negatively regulating the canonical Wnt signaling pathways (e.g., ASPM; UBAC2; KREMEN), and some Wnt ligands and receptors. However, the pathways with numerically the most hypermethylated promoters in GBM2 were those associated with regulation of the stimulus response (e.g., NDUFA13; DROSHA; FMR1), cell communication (e.g., PTP4A3; FRMPD1; PRKD2), signaling (e.g., MBIP; RNF6; NOD1) and localization (e.g., KCNJ3; KDM1A; TRIM8; PRKD2).

Pathways with promoter hypomethylation in the recurrent compared to the initial tumors included genes related to both the innate and adaptive immune responses, cellular processes and cell differentiation. The most significant *p*

values were noted in pathways linked to the regulation of lymphocyte-mediated immunity (TFRC; FOXJ1; IL4R), natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity (e.g., HAVCR2; SERPINB9; LAMP1; CADM1) and regulation of cell killing (e.g., ICAM1; MICA; DUSP22; FERC2). In addition, several other important regulators of immune response were hypomethylated (adaptive immune response, NK- and leukocyte-mediated immunity, T cell-mediated cytotoxicity) in the recurrent samples compared to the initial GBMs. Finally, the most hypomethylated and most numerous (altogether 11) promoters, although with the least significant *p* values (mean $p=0.0098$), were detected in cell proliferation pathways in GBM2.

Enrichment for genomic region sets and regulatory elements

The LOLA program was run to enrich for genomic region sets and regulatory elements relevant to the interpretation of functional epigenomics data (Sheffield and Bock 2016). Here, we primarily focused on the top-ranking 1000 hyper- and hypomethylated tiling regions. In both the CG2–GBM1 and CG2–GBM2 comparisons, we identified strong enrichment in hypomethylated regions in the tumors for binding sites of transcription factors (e.g., RUNX1, ESR1, ESR2 and CTCF) and histone proteins (e.g., H3K4me1; H3K4me2; H3K4me3; H3K9me3; H3K27me3) relevant to proper embryonic stem cell differentiation and lineage fidelity maintenance. In the GBM1–GBM2 comparison, GBM2 tumors showed enrichment in binding sites for transcription factors (e.g., FOXA2, ESR1, ESR2, RXR) and histone proteins (e.g., H3K27me3, H3K9me3, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3) among the hypomethylated regions.

Correlation between pathological and clinical data

We detected no association between T1–T2 and gender or the age of patients, or T1–T2 and morphological subtype, mitotic rate, microvascular proliferation or necrosis of the tumors. However, a trend for association was found between T1–T2 and the amount of tumor infiltrating lymphocytes (TIL) in the GBM1 samples (Kruskal–Wallis test $p=0.08$), but not in the GBM2 samples ($p=0.737$). Neither Mann–Whitney nor Pearson's correlation analysis showed a link between TIL and mitotic rate.

Discussion

In this study, we aimed to identify molecular drivers and pathways essential for GBM development and recurrence (Fig. 1). We analyzed genome-wide DNA CpG methylation patterns to infer the expression of genes defining the most

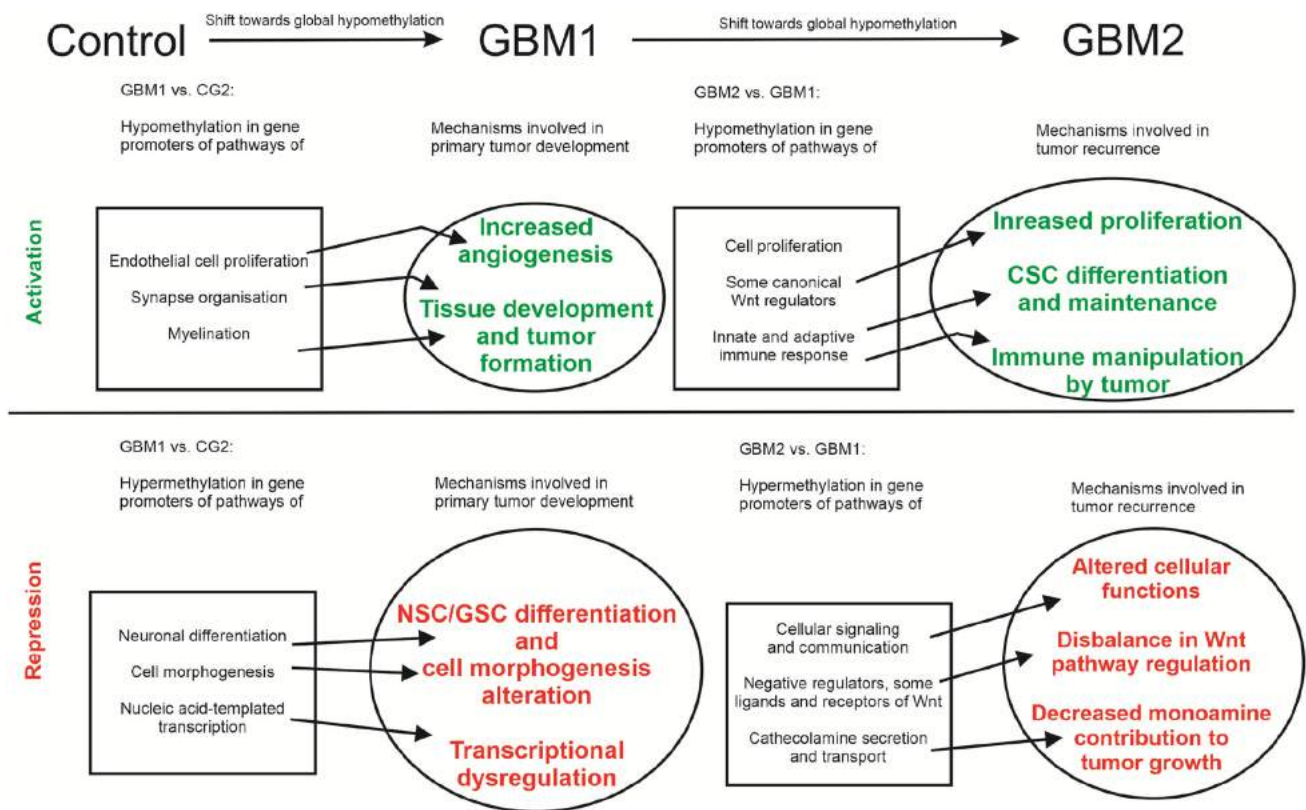


Fig. 1 Mechanisms of GBM development and recurrence revealed by DNA CpG methylation. This figure provides a schematic depiction of molecular pathways and potential mechanisms contributing to

GBM development and recurrence as revealed by RRBS and NGS of sequential GBM specimens

critical pathways in 22 paired FFPE specimens (GBM1; GBM2) from 18 years.

Although quality assessment revealed that DNA specimens from surgically removed FFPE GBM were significantly more fragmented than that of freshly obtained blood (fragments above 2000 bp in buffy coat: 70.18%; whole blood: 87.15%; GBM1: 21.65% and GBM2: 25.10%), these samples worked well in RRBS. However, because DNA quality was profoundly further compromised in the post-mortem CG1 (mean fragment rate above 2000 bp: 5.91%), and the number of methylated CpG sites proportionally decreased with increasing fragmentation consistent with previous reports (Klughammer et al. 2018; Wang et al. 2013; Gillio-Meina et al. 2016), we abandoned CG1, and focused all analyses on the CG2, GBM1 and GBM2 cohorts. CG2 included DNA CpG methylomes of five brain specimens obtained during epilepsy surgery (Klughammer et al. 2018). We did realize that such DNA controls from heterogeneous populations of all normal and some degenerative cell types of adult brains may not be ideal references for the methylome from transformed glial tumor cells of GBM. However, using glial cell lines as control DNA source would be compounded by other shortcomings including oligodendroglial

or astrocytic lineage specification and potential in vitro (including epigenomic) modifications. As no ideal control tissue is available for human GBM, we chose using the control brain methylomes that have been successfully applied in a similar epigenomic analysis (Klughammer et al. 2018). Using normal or near normal brain tissue as control also matches with the strategy of other GBM epigenomic studies (Noushmehr et al. 2010; Etcheverry et al. 2010).

As previously established (Nagarajan et al. 2014; Makos et al. 1992; Feinberg et al. 1988; Brothman et al. 2005; Ehrlich 2009; Hansen et al. 2011), we also observed a shift toward global DNA hypomethylation when comparing CG2, GBM1 and GBM2 (where the mean methylation rates were 47.91%, 41.34% and 31.6%, respectively).

Comparisons of differential methylation data at site and region levels revealed no significant *p* values in any of the three pairwise comparisons. GO analyses, however, highlighted several pathways with biological relevance. In the comparison of GBM1 vs. CG2, we found significant hypomethylation (likely activation) in the pathway of positive regulation of endothelial cell proliferation, a factor contributing to angiogenesis, and thereby promoting GBM growth (Fisher et al. 2005). This finding was not surprising,

as upregulation of VEGF transcripts has also been described (Etcheverry et al. 2010), and anti-angiogenic therapy (i.e., bevacizumab) has been used to prolong progression-free survival and to reduce clinical symptom burden in GBM (Ameratunga et al. 2018; Roth et al. 2020). In the same GBM1 vs. CG2 comparison, we found hypermethylation (repression) in pathways of nucleic acid-templated transcription and different nucleobase containing metabolic processes, which affect multiple genes whose abnormal function may modify cell function and define subtype formation (Cuperlovic-Culf et al. 2012; Marziali et al. 2016). The most strikingly hypermethylated pathways were related to neuronal differentiation, while hypomethylated pathways included those related to synapse formation and myelination. We postulate that these latter findings reflect a disturbed balance in elements of a normal neuronal differentiation underlying the distorted patterns also observed by other investigators in cancer stem cells (CSCs) and in GBM (Etcheverry et al. 2010; Silvestris et al. 2019).

Comparing differential promoter methylation in GBM2 vs. CG2, the hypomethylated pathways were primarily related to intracellular function and transport, offering new targets for experimental intervention (Fallacara et al. 2019). The hypermethylated pathways included transcriptional regulation, cell adhesion and embryonic development, which may also contribute to a distortion of normal neuronal differentiation and abnormal proliferation of pluripotent neuroepithelial cells, thereby defining progression of GBM (Bradshaw et al. 2016a, b; Etcheverry et al. 2010).

The comparison of differentially methylated pathways in GBM2 vs. GBM1 revealed a number of changes involving essential cellular functions that may contribute to GBM progression. Higher gene expression and activity were inferred from the lower methylation of elements essential in cell response, signaling and communication in GBM1 than in GBM2. Elements of the canonical Wnt signaling pathway, particularly those regulating endothelial cell migration, cell adhesion or wound healing also appeared more active in GBM1 compared to GBM2. However, elements of this pathway included KREMEN1 that is capable of blocking Wnt signaling, ASPM that is essential for normal mitotic spindle function to regulate neurogenesis, or UBAC2 that has a role in degradation of Wnt receptor FZD6 and LRP6 to negatively regulate the canonical Wnt signaling pathway. Further, certain ligands (e.g., Wnt11) and receptors (e.g., Fzd8) were also significantly less methylated in GBM1 as compared to GBM2. In contrast, promoters of other Wnt ligands (e.g., Wnt6, Wnt7b) and receptors (e.g., Fzd1, Fzd3) were less methylated in GBM2 than in GBM1. Although not in sequential samples, but in GBM and control brain comparisons, a differential methylation of Wnt genes (e.g., Wnt2, Fzd6) and pathways, and both up- (Wnt5a, Fzd7, Fzd5) and downregulation of Wnt pathway transcripts

(Wnt10b, Wnt7a, Wnt7b, Wnt2b) have been noted (Etcheverry et al. 2010; Nagarajan et al. 2014). In a similar DNA CpG methylation and biological pathway analysis in sequential GBM, Klughammer et al (2018) found Wnt pathway genes among those whose promoters lost methylation over time. Altogether, our data, overlapping with results in other publications, showed that negative regulators of the Wnt pathway are more active in GBM1 than in GBM2, while changes in methylation patterns occur in both directions for ligands and receptors, suggesting that the shifts and balances in Wnt pathway elements are complex during evolution of GBM. As the canonical Wnt pathway is involved in CSC stemness, tumor invasiveness and angiogenesis, our finding likely points to an important determinant of GBM evolution (Etcheverry et al. 2010; Klughammer et al. 2018; Tompa et al. 2018; Hu et al. 2016; Mazieres et al. 2005; Lamb et al. 2013; Anastas and Moon 2013). In line with this conclusion, numerous experimental therapies targeting Wnt pathway elements are already under investigation (Tompa et al. 2018; Zuccarini et al. 2018).

Another noteworthy result of GO analyses was the lower methylation of promoters (and thus higher inferred activity) in genes defining catecholamine secretion and transport in GBM1 compared to GBM2. Monoamine signaling in glioma initiating cells participates in hijacking normal developmental mechanisms and promotes tumor development. Synaptic monoamines in the GBM microenvironment influence tumor growth and angiogenesis (Caragher et al. 2018, 2019). The observation that these pathways are more hypomethylated (and likely more active) in GBM1 than in GBM2 reflects the biological characteristics of early- versus late-stage tumors, which merits further explorations. Differential methylation in catecholamine-encoding genes (e.g., ADRA2c, ADRA1a, DRD5, DRD2) and neurotransmitter pathways as well as differential expressions of such genes (e.g., ADRA1b, ADRA2a, ADRA2C, DRD5, DRD1) have been reported (Etcheverry et al. 2010; Nagarajan et al. 2014). The therapeutic potential of monoamines and their receptors in GBM have also been the subject of recent research studies (Caragher et al. 2018, 2019).

In contrast, GBM2 compared to GBM1 showed less methylation (and thus inferred higher activity) in immune pathway genes regulating leukocyte, lymphocyte and NK cell-mediated immunity. However, there were other immune-regulatory processes such as macrophage inflammatory protein production and CD8+ T cell proliferation that appeared more active (with promoters more hypomethylated) in GBM1 than in GBM2. These data are in consensus with the detected association between TIL in GBM1 and T1-T2, and align with previous observations concerning differential activity of various immune pathways during the development and progression of GBM (Etcheverry et al. 2010; Klughammer et al. 2018; Greaves et al. 2012;

Wang et al. 2017). While the use of immune therapies has not been as efficient in GBM as in other solid tumors, there are several newer modalities with better blood–brain barrier penetrance and more robust cytotoxicity (e.g., vaccines, monoclonal antibodies, engineered T cells and stem cells, immune checkpoint inhibitors, proteasome inhibitors, RNA-based therapies, oncolytic viruses), which are expected to overcome immune evasion and to specifically target tumor cells or their microenvironment (Giotta Lucifero et al. 2020; Roth et al. 2020).

Finally, we also found support to our observations by comparing the array-based DNA CpG methylation data of TCGA GBMs to the sequence-based methylomes of our CG2 controls (Klughhammer et al. 2018), and the array-based methylation data of the available 12 sequential TCGA GBM pairs to each other (https://portal.gdc.cancer.gov/repository?filters=%7B%22op%22%3A%22and%22%2C%22content%22%3A%5B%7B%22op%22%3A%22in%22%2C%22content%22%3A%7B%22field%22%3A%22cases.project.project_id%22%2C%22value%22%3A%5B%22TCGA-GBM%22%5D%7D%7D%2C%7B%22op%22%3A%22in%22%2C%22content%22%3A%7B%22field%22%3A%22files.data_category%22%2C%22value%22%3A%5B%22DNA%20Methylation%22%5D%7D%7D%5D%7D&searchTableTab=cases). The results of the first (cross-platform) analysis revealed that promoters in genes of pathways involved in embryonic development, immune regulation and Wnt signaling were less methylated (presumably more active) in the TCGA GBM samples than in the CG2 controls. The results of the second analysis showed less methylated (presumably more active) promoters in genes of pathways involved in stem cell proliferation and cell dedifferentiation, intracellular regulatory and metabolic processes, negative regulation of apoptosis, cell adhesion and T cell polarity as well as migration in the TCGA recurrent compared to the primary samples. In contrast, promoters of genes in pathways involved in endothelial cell proliferation, negative regulation of the execution phase of apoptosis, T cell proliferation, cell–cell signaling, neuronal differentiation, and regulation of G protein-mediated signaling (including neurotransmitter, catecholamine and some Wnt receptor signaling, though with lower ranking in the list) were less methylated (presumably more active) in the TCGA primary than in the recurrent samples. Considering the technical limitations and interpretive difficulties when comparing data from various platforms and also results from small cohorts, the outcome of the TCGA sample analyses in overlap with ours lends further support to our conclusions.

Enrichment analyses highlighted regions representing hypomethylated binding sites for transcription factors (e.g., ESR1, ESR2, CTCF, RUNX1) and histone proteins (e.g., H3K27me3; H3K4me1; H3K4me3) likely relevant to CSC differentiation and GBM development (Klughhammer

et al. 2018; Huang et al. 2004; Bernstein et al. 2006; Hyun et al. 2017). These analyses also showed an enrichment for hypomethylated binding sites of transcription factors (e.g., ESR1, ESR2, FOXA2) and histone proteins (e.g., H3K4m1, H3K4m2, H3K4m3, H3K27m3, H3K9m3) in GBM2 compared to GBM1, suggesting a role for these factors in tumor progression (Kondo et al. 2004; Steward et al. 2006).

Altogether, these methylome analyses revealed important molecular pathways and mechanisms contributing to the occurrence and progression of GBM (Fig. 1). While our methodological approach was similar to that of Klughhammer et al. (2018), the presence of several modifying factors including the heterogeneous tumor biology, differences in cohorts' sizes, distributions of patients' age, gender and ethnic background, and the reduced representation of methylome itself may explain the partial (although still notable) overlap between the two studies. A weakness of our analyses is the omission of the full IDH1/IDH2 mutational status evaluation due to the limited availability of the archived samples, though we excluded with high probability the presence of G-CIMP. These issues, however, were not among the original aims and the information would not have modified the outcome. Also, due to the limited availability of paired primary and recurrent GBM samples, a hierarchical cluster analysis, testing for intra- and inter-tumor heterogeneity or correlations of the methylome data with other somatic molecular changes statistically would not have been meaningful. Finally, it is also important to note that gene expression regulation is a complex process involving multiple mechanisms (e.g., gene copy number variation, transcription factor expression, histone modification, microRNA and long non-coding RNA expression, or splicing), explaining that DNA CpG methylation alone may not always correlate with gene expression, and cautioning us when inferring gene transcription from promoter methylation status (Etcheverry et al. 2010). Our sequential methylome analyses in FFPE clinical specimens is, however, one of the few longitudinal GBM studies, which not only extends existing data by confirmatory information, but also identifies new elements and pathways of tumor development. Even among longitudinal analyses, this differential methylation profiling represents one of a few similar studies (Klughhammer et al. 2018) and aligns with the goals of the recently formed Glioma Longitudinal Analysis Consortium (GLASS) (The Glass Consortium 2018; Barthel et al. 2019).

Conclusions

This study in sequential FFPE tumor specimens revealed several important mechanisms that may underlie the development and progression of GBM. Pathways involved in synapse formation, myelination and endothelial cell

proliferation were more active in GBM1 than in CG2, likely underlying a faulty tissue formation and angiogenesis during tumorigenesis. The repression of elements of normal neurogenesis also might support a distorted stem cell differentiation in GBM. Pathways of basic cell response, signaling and communication as well as catecholamine signaling appeared more active in early than late phases of GBM. The inferred involvement of the canonical Wnt pathway regulation, while essential, also appeared complex regarding the development and progression of GBM. Similarly, various elements of immune regulatory pathways seemed to be differentially active in early and late stages of GBM. Altogether, this study revealed several differentially methylated pathways in GBM, which translate into differentially active genes and pathways with potential importance in new treatment development.

Acknowledgements Open access funding provided by University of Pécs. The authors are very grateful to Dr. Ferenc Kalovits, Prof. Dr. Laszlo Mangel, Dr. Karoly Mahr and Dr. Zsolt Horvath for helping with the collection of patients' clinical data. The study was supported by Hungarian state funds administered through the graduate studies program of University of Pécs, the Dr. Janos Szolcsanyi Research fund by the University of Pécs, School of Medicine (Nr. KA-2019-42), and by a private donation. The research was performed in collaboration with the Genomics and Bioinformatics Core Facility at the Szentagothai Research Center of University of Pécs. Bioinformatics infrastructure was supported by ELIXIR Converge (Nr. 871075). Bence Galik was supported by an H2020-MSCA-COFUND grant (Nr. 754432) and the Polish Ministry of Science and Higher Education.

Author contributions Conceptualization: BK; material preparation, data collection and analyses: ZK, PU, MT, BK, BG, AG and BK; writing—original manuscript draft preparation: ZK and BK; financial support: BK, AG, AM; editing manuscript: all co-authors; reading and approval of the final version of the manuscript: all co-authors.

Funding The study was supported by Hungarian state funds administered through the graduate studies program of the University of Pécs, the Dr. Janos Szolcsanyi Research Fund by the University of Pécs, School of Medicine (Nr. KA-2019-42), and by a private donation. The research was performed in collaboration with the Genomics and Bioinformatics Core Facility at the Szentagothai Research Center of University of Pécs. Bioinformatics infrastructure was supported by ELIXIR Converge (Nr. 871075). Bence Galik's research was conducted within a project that received funding from the Horizon 2020 research and innovation program under the H2020-MSCA-COFUND Marie Skłodowska-Curie grant agreement (Nr. 754432), and was also supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education, from financial resources for science in 2018–2023 granted for the implementation of an international co-financed project.

Availability of data and material Raw sequencing data were uploaded to the European Nucleotide Archive (<https://www.ebi.ac.uk/ena>, Primary Accession: PRJEB38380, Secondary Accession: ERP121800). Some of the data are also provided in the Electronic Supplementary Material.

Code availability Publicly available bioinformatics programs and tools were used as detailed in the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no financial or professional conflict of interest related to this study.

Ethical approval The study was approved (Number: 7517 PTE 2018 and 2019) by the Regional Clinical Research Committee, University of Pécs, following the Declaration of Helsinki code of ethics.

Consent to participate or for publication NA. All specimens used in the study were tissue samples left over from routine histopathological evaluations. All patients had passed away by the time of the study initiation.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Ameratunga M, Pavlakis N, Wheeler H, Grant R, Simes J, Kharaw M (2018) Anti-angiogenic therapy for high-grade glioma. *Cochrane Database Syst Rev* 11(11):CD008218. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008218.pub4>
- Anastas JN, Moon RT (2013) WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer* 13(1):11–26. <https://doi.org/10.1038/nrc3419>
- Barthel FP, Johnson KC, Varn FS, Moskalik AD, Tanner G, Kocakavuk E, GLASS Consortium (2019) Longitudinal molecular trajectories of diffuse glioma in adults. *Nature* 576(7785):112–120. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1775-1> (Epub 2019 Nov 20)
- Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B et al (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125(2):315–326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.041>
- Bradshaw A, Wickremsekera A, Brasch HD, Chibnall AM, Davis PF, Tan ST, Itinteang T (2016a) Cancer stem cells in glioblastoma multiforme. *Front Surg* 3:48. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2016.00048>
- Bradshaw A, Wickremsekera A, Tan ST, Peng L, Davis PF, Itinteang T (2016b) Cancer stem cell hierarchy in glioblastoma multiforme. *Front Surg* 3:21. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2016.00021>
- Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, Zheng S et al (2013) The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155(2):462–477. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.034>
- Brothman AR, Swanson G, Maxwell TM, Cui J, Murphy KJ, Herrick J, Speights VO (2005) Global hypomethylation is common in prostate cancer cells: a quantitative predictor for clinical outcome? *Cancer Genet Cytogenet* 156(1):31–36. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2004.04.004>
- Cancer Genome Atlas Research Network (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and

- core pathways. *Nature* 455(7216):1061. <https://doi.org/10.1038/nature07385>
- Caragher SP, Hall RR, Ahsan R, Ahmed AU (2018) Monoamines in glioblastoma: complex biology with therapeutic potential. *Neuro-oncology* 20(8):1014–1025. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox210>
- Caragher SP, Shireman JM, Huang M, Miska J, Atashi F, Baisiwal S, Park CH et al (2019) Activation of dopamine receptor 2 prompts transcriptomic and metabolic plasticity in glioblastoma. *J Neurosci* 39(11):1982–1993. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1589-18.2018>
- Cuperlovic-Culf M, Ferguson D, Culf A, Morin P, Touaibia M (2012) 1H NMR metabolomics analysis of glioblastoma subtypes correlation between metabolomics and gene expression characteristics. *J Biol Chem* 287(24):20164–20175. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.337196>
- de Souza CF, Sabedot TS, Malta TM, Stetson L, Morozova O, Sokolov A, Laird PW et al (2018) A distinct DNA methylation shift in a subset of glioma CpG island methylator phenotypes during tumor recurrence. *Cell Rep* 23(2):637–651. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.107>
- Ehrlich M (2009) DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* 1(2):239–259. <https://doi.org/10.2217/epi.09.33>
- Erson-Omay EZ, Henegariu O, Omay SB, Harmanaci AS, Youngblood MW, Mishra-Gorur K, Li J et al (2017) Longitudinal analysis of treatment-induced genomic alterations in gliomas. *Genome Med* 9(1):12. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0401-9>
- Etcheverry A, Aubry M, de Tayrac M, Vauleon E, Boniface R, Guenet F, Saikali S, Hamlat A, Riffaud L, Menei P, Quillien V, Mosser J (2010) DNA methylation in glioblastoma: impact on gene expression and clinical outcome. *BMC Genom* 11:701. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-701>
- Fallacara AL, Zamperini C, Podolski-Renić A, Dinić J, Stanković T, Stepanović M, Mancini A, Rango E, Iovenitti G, Molinari A, Bugli F, Sanguinetti M, Torelli R, Martini M, Maccari L, Valoti M, Dreassi E, Botta M, Pešić M, Schenone S (2019) A New Strategy for Glioblastoma Treatment: In Vitro and In Vivo Preclinical Characterization of Si306, a Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidine Dual Src/P-Glycoprotein Inhibitor. *Cancers (Basel)*. 11(6):848. <https://doi.org/10.3390/cancers11060848>
- Feinberg AP, Gehrke CW, Kuo KC, Ehrlich M (1988) Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Can Res* 48(5):1159–1161
- Fischer I, Gagner JP, Law M, Newcomb EW, Zagzag D (2005) Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. *Brain Pathol* 15(4):297–310. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2005.tb00115.x>
- Furgason JM, Koncar RF, Michelhaugh SK, Sarkar FH, Mittal S, Sloan AE, Bahassi EM (2015) Whole genome sequence analysis links chromothripsis to EGFR, MDM2, MDM4, and CDK4 amplification in glioblastoma. *Oncoscience* 2(7):618. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.178>
- Gillio-Meina C, Zielke HR, Fraser DD (2016) Translational research in pediatrics IV: solid tissue collection and processing. *Pediatrics* 137(1):e20150490. <https://doi.org/10.1542/peds.2015-0490>
- Giotta Lucifero A, Luzzi S, Brambilla I, Trabatti C, Mosconi M, Savasta S, Foidadelli T (2020) Innovative therapies for malignant brain tumors: the road to a tailored cure. *Acta Biomed* 91(7-S):5–17. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i7-S.9951>
- GLASS Consortium (2018) Glioma through the looking GLASS: molecular evolution of diffuse gliomas and the Glioma Longitudinal Analysis Consortium. *Neuro Oncol* 20(7):873–884. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy020>
- Greaves M, Maley CC (2012) Clonal evolution in cancer. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature10762>
- Hansen KD, Timp W, Bravo HC, Sabuncian S, Langmead B, McDonald OG, Wen B et al (2011) Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nat Genet* 43(8):768. <https://doi.org/10.1038/ng.865>
- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, De Tribolet N, Weller M, Kros JM et al (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352(10):997–1003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331>
- Hu B, Wang Q, Wang YA, Hua S, Sauvé CEG, Ong D, Lan ZD et al (2016) Epigenetic activation of WNT5A drives glioblastoma stem cell differentiation and invasive growth. *Cell* 167(5):1281–1295. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.039>
- Huang J, Fan T, Yan Q, Zhu H, Fox S, Issaq HJ, Best L et al (2004) Lsh, an epigenetic guardian of repetitive elements. *Nucleic Acids Res* 32(17):5019–5028. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh821>
- Hyun K, Jeon J, Park K, Kim J (2017) Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Exp Mol Med* 49(4):e324–e324. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.11>
- Kim H, Zheng S, Amini SS, Virk SM, Mikkelsen T, Brat DJ, Grimsby J et al (2015a) Whole-genome and multisector exome sequencing of primary and post-treatment glioblastoma reveals patterns of tumor evolution. *Genome Res* 25(3):316–327. <https://doi.org/10.1101/gr.180612.114>
- Kim J, Lee IH, Cho HJ, Park CK, Jung YS, Kim Y, Nam SH et al (2015b) Spatiotemporal evolution of the primary glioblastoma genome. *Cancer Cell* 28(3):318–328. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.07.013>
- Klughammer J, Kiesel B, Roetzer T, Fortelny N, Nemeš A, Nennig KH, Furtner J et al (2018) The DNA methylation landscape of glioblastoma disease progression shows extensive heterogeneity in time and space. *Nat Med* 24(10):1611–1624. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0156-x>
- Kondo Y, Shen L, Yan PS, Huang THM, Issa JPJ (2004) Chromatin immunoprecipitation microarrays for identification of genes silenced by histone H3 lysine 9 methylation. *Proc Natl Acad Sci* 101(19):7398–7403. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2008.01.012>
- Krueger F, Andrews SR (2011) Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics* 27(11):1571–1572. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr167>
- Lamb R, Ablett MP, Spence K, Landberg G, Sims AH, Clarke RB (2013) Wnt pathway activity in breast cancer sub-types and stem-like cells. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067811>
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H et al (2016) The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol* 131(6):803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- Makos M, Nelkin BD, Lerman MI, Latif F, Zbar B, Baylin SB (1992) Distinct hypermethylation patterns occur at altered chromosome loci in human lung and colon cancer. *Proc Natl Acad Sci* 89(5):1929–1933. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1929>
- Marziali G, Signore M, Buccarelli M, Grande S, Palma A, Biffoni M, Rosi A et al (2016) Metabolic/proteomic signature defines two glioblastoma subtypes with different clinical outcome. *Sci Rep* 6(1):1–13. <https://doi.org/10.1038/srep21557>
- Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Jablons DM (2005) Wnt signaling in lung cancer. *Cancer Lett* 222(1):1–10. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.08.040>
- Muscat AM, Wong NC, Drummond KJ, Algar EM, Khasraw M, Verhaak R, Field K et al (2018) The evolutionary pattern of mutations in glioblastoma reveals therapy-mediated selection. *Oncotarget* 9(8):7844. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23541>
- Müller F, Scherer M, Assenov Y, Lutsik P, Walter J, Lengauer T, Bock C (2019) RnBeads 2.0: comprehensive analysis of DNA

- methylation data. *Genome Biol* 20(1):55. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1664-9>
- Nagarajan RP, Zhang B, Bell RJ, Johnson BE, Olshen AB, Sundaram V, Li D et al (2014) Recurrent epimutations activate gene body promoters in primary glioblastoma. *Genome Res* 24(5):761–774. <https://doi.org/10.1101/gr.164707.113>
- Nagy Á, Garzuly F, Padányi G, Szűcs I, Feldmann Á, Murnyák B, Kálmán B et al (2019) Molecular subgroups of glioblastoma—an assessment by immunohistochemical markers. *Pathol Oncol Res* 25(1):21–31. <https://doi.org/10.1007/s12253-017-0311-6>
- Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berberman BP, Pan F et al (2010) Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 17(5):510–522. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.03.017>
- Patel AP, Tirosch I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, Cahill DP et al (2014) Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 344(6190):1396–1401. <https://doi.org/10.1126/science.1254257>
- Roth P, Hottinger AF, Hundsberger T, Läubli H, Schucht P, Reinert M, Mamot C, Roelcke U, Pesce G, Hofer S, Weller M (2020) A contemporary perspective on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas in adults. *Swiss Med Wkly* 150:w20256. <https://doi.org/10.4414/smw.2020.20256> (eCollection 2020 Jun 1)
- Sheffield NC, Bock C (2016) LOLA: enrichment analysis for genomic region sets and regulatory elements in R and Bioconductor. *Bioinformatics* 32(4):587–589. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv612>
- Silvestris F, D’Oronzo S, Lovero D, Palmirotta R, Dammacco F (2019) Bone metastases from solid tumors: in search of predictive biomarkers for clinical translation. *Oncogenomics*. Academic Press, Cambridge, pp 141–163. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811785-9.00010-7>
- Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SG, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC et al (2013) Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci* 110(10):4009–4014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219747110>
- Steward MM, Lee JS, O’Donovan A, Wyatt M, Bernstein BE, Shilatifard A (2006) Molecular regulation of H3K4 trimethylation by ASH2L, a shared subunit of MLL complexes. *Nat Struct Mol Biol* 13(9):852–854. <https://doi.org/10.1038/nsmb1131>
- Tompa M, Kalovits F, Nagy A, Kalman B (2018) Contribution of the Wnt pathway to defining biology of glioblastoma. *NeuroMol Med* 20(4):437–451. <https://doi.org/10.1007/s12017-018-8514-x>
- Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Alexe G et al (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17(1):98–110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
- Wang J, Cazzato E, Ladewig E, Frattini V, Rosenbloom DI, Zairis S, Abate F et al (2016) Clonal evolution of glioblastoma under therapy. *Nat Genet* 48(7):768. <https://doi.org/10.1038/ng.3590>
- Wang JH, Gouda-Vossos A, Dzamko N, Halliday G, Huang Y (2013) DNA extraction from fresh-frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded human brain tissue. *Neurosci Bull* 29(5):649–654. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1379-y>
- Wang Q, Hu B, Hu X, Kim H, Squatrito M, Scarpace L, deCarvalho AC et al (2017) Tumor evolution of glioma-intrinsic gene expression subtypes associates with immunological changes in the microenvironment. *Cancer Cell* 32(1):42–56. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.06.003>
- Zuccarini M, Giuliani P, Ziberi S, Carluccio M, Iorio PD, Caciagli F, Ciccarelli R (2018) The role of wnt signal in glioblastoma development and progression: a possible new pharmacological target for the therapy of this tumor. *Genes (Basel)* 9(2):105. <https://doi.org/10.3390/genes9020105>

Publisher’s Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.