

A Wnt útvonal szerepe a glioblastoma biológiájában

Doktori (PhD) – értekezés



Tompa Márton

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi

Kar,

Klinikai Idegtudományi Doktori Iskola (D221)

Témavezető:

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

Programvezető:

Prof. Komoly Sámuel, MD, PhD, DSc

Doktori Iskola vezetője:

Prof. Komoly Sámuel, MD, PhD, DSc

Pécs, 2021

Tartalom

Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés	4
2. Hipotézisek és célkitűzések	6
3. Anyag és módszer	7
3.1. Általános leírás.....	7
3.2. A Wnt markerek expressziós mintázatának vizsgálata a gliomák grádusa, eredete és molekuláris markerei szerint.....	7
3.3. A Wnt markerek expressziós mintázatának vizsgálata a GBM molekuláris alcsoportjaiban.....	7
3.4. A Wnt útvonal expressziós és DNS metilációs mintázatának vizsgálata a szekvenciális GBM mintapárokbán.....	8
3.5. Immunhisztokémia.....	8
3.6. DNS izolálás.....	9
3.7. Piroszekvenálás.....	9
3.8. Epigenomika.....	9
3.9. Bioinformatika.....	10
3.10. Statisztika.....	10
4. Eredmények	11
4.1. A Wnt markerek expressziós mintázatának vizsgálata a gliomák grádusa, eredete és molekuláris markerei szerint.....	11
4.2. A Wnt markerek protein kifejeződése a GBM molekuláris alcsoportjaiban	12
4.3. A Wnt markerek expressziós és DNS metilációs mintázata a szekvenciális GBM mintapárokbán.....	14
5. Megbeszélés	17
6. Új megállapítások	22
7. Saját publikációk jegyzéke	23
7.1. Az értekezés alapjául szolgáló publikációk jegyzéke.....	23
7.2. Egyéb publikációk jegyzéke.....	23
7.3. Prezentációk.....	24
8. Köszönetnyilvánítás	25
9. Referenciák	26

Rövidítések jegyzéke

APC – Adenomatous Polyposis Coli Protein
AXIN2 – Axis inhibiton protein 2
CS – Complex Score
DAAM1– Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1
DNA – Deoxyribonucleic acid
DVL1 – Dishevelled segment polarity protein 1
EGFR – Epidermal growth factor receptor
EMT – Epithelial–mesenchymal transition
FFPE – Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
Fzd – Frizzled
GBM – Glioblastoma
GO – Gene ontology
GSK-3 β – Glycogen synthase kinase 3 β
IDH1/2 – Isocitrate dehydrogenase 1 and 2
IHC – Immunohisztokémia
LEF1 – Lymphoid enhancer factor 1
LRP6 – Low density lipoprotein receptor-related protein 6
MEOK – Markusovszky Egyetemi Oktatókórház
NF-1 – Neurofibromin 1
NGS – Next generation sequencing
NLK – Nemo-Like Kinase
PCR – Polymerase chain reaction
PTE – Pécsi Tudományegyetem
ROI – Region of Interest
ROR2 – Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2
Ryk – Receptor-like tyrosine kinase
RRBS – Reduced representation bisulfite sequencing
TCGA – The Cancer Genome Atlas

1. Bevezetés

A glioblastoma (GBM) a legsúlyosabb grádusú (IV) glioma, valamint a leggyakoribb primer agydaganat, melynek medián teljes túlélési ideje 14-20 hónap között mozog [1, 2]. A jelenleg is alkalmazott terápiás eljárást Stupp et al. [1] dolgoztak ki. A GBM-ek jelentős része (90-95%) *de novo* jelenik meg. A primer GBM-re rendkívüli agresszivitás és invazivitás jellemző és elsősorban idősebb betegekben alakul ki (medián életkor 62 év). Ezzel szemben, a másodlagos GBM kevésbé gyakori (5-10%) és fiatalabb korban alakul ki (medián életkor 45 év) alacsonyabb grádusú gliomák progressziójának következtében [3]. A primer és másodlagos GBM-ek eltérő molekuláris tulajdonságokkal rendelkeznek, mivel eltérő mutációk halmozódnak fel és különböző útvonalak aktiválódnak fejlődésük során.

A "The Cancer Genome Atlas" (TCGA) konzorciális hálózat publikálta először a GBM-re jellemző szomatikus mutációk átfogó meghatározását. Integrált genomikai és transzkriptomikai adatok alapján elkülönítette a klasszikus, a mesenchymalis és a proneurális molekuláris alcsoportokat [4, 5]. A klasszikus alcsoportra jellemző az EGFR (epidermal growth factor receptor) amplifikáció és az EGFRvIII mutáció. A mesenchymalis alcsoportban rendszeres a deléció/mutáció az NF-1 (neurofibromin 1) génben. Végül a p53 és IDH-1/2 (isocitrate dehydrogenase 1/2) gének gyakran mutálódnak a proneurális alcsoportban. A mutáns IDH-1 enzim egy onkometabolitot termel, amely jelentősen befolyásolja a DNS CpG metilációs mintázatát genom szinten, ezáltal hatást gyakorol a transzkripció profilokra [6]. A daganatokra

jellemző egy genom szintű hipometilációs eltolódás, amelyet lókuszt specifikus hipermetiláció szakíthat meg [7-9].

Tanulmányaink során a Wnt útvonal aktivitására és kifejeződésének szabályozására fókuszáltunk [10-13]. A Wnt útvonal hatása számos tumorban jól meghatározott, de viszonylag kevés információ áll rendelkezésre a gliomákban. Mind a kanonikus, mind a non-kanonikus Wnt alútvonal erősen konzervált, és kulcs szerepet játszik az embriogenezis korai szakaszában, illetve a patológiás körülmények között, mint például a tumorok kialakulásban [11-13]. A Wnt útvonal újraaktiválódását a daganatokban főként epigenetikai változások, mintsem mutációk okozzák. Az útvonal aktiválódását vagy gátlását a ligand-receptor kapcsolatok mellett a kaskád negatív és pozitív regulátoros molekulái is szabályozzák. Tanulmányok rámutattak arra, hogy a Wnt ligand és a Frizzled (Fzd) receptor proteinek expressziós aktivitása szignifikánsan magasabb a GBM-ben, mint a normál agyban [14, 15], illetve az útvonal legmarkánsabb a tumor inváziós zónájában fejeződik ki [16, 17]. Wnt mRNS molekulák szintén túlexpresszáltak a GBM-ben és az alacsonyabb grádusú gliomákban [5, 17, 18]. Annak ellenére, hogy a Wnt útvonal és az IDH-1/2 mutáció közötti kapcsolatot néhány kutató vizsgálta már, egyértelmű összefüggést még nem sikerült megállapítani [13, 19, 20].

Összeségében elmondható, hogy mind a kanonikus, mind a non-kanonikus Wnt útvonal kiemelkedő szerepet játszik a GBM kialakulásában, terjedésében, kemo- és sugárterápia elleni rezisztenciájában és a recidívák létrejöttében. Az útvonal működésének jobb megértése kulcsfontosságú lehet a GBM kezelésében, valamint egyes elemei potenciális terápiás célpontokként is szolgálhatnak.

2. Hipotézisek és célkitűzések

Hipotézisek

A Wnt kanonikus és non-kanonikus útvonala:

1. Fontos szerepet játszanak a gliomák kialakulásában grádustól, hisztológiai altípustól és molekuláris jellegzetességektől függően.
2. Eltérően expresszálódnak a GBM molekuláris alcsoportjaiban és progressziója során.
3. Elemeinek differenciált expressziója összefüggésben áll a DNS CpG metilációs mintázataival a tumor progressziója során.

Célkitűzések

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

4. Anyag és módszer

4.1. Általános leírás

A glioma minták a Markusovszky Egyetemi Oktatókórház (MEOK) Patológiai Osztályán és a Pécsi Tudományegyetem (PTE) Általános Orvostudományi Kar (PTE ÁOK) Patológiai Intézetében kerültek összegyűjtésre. A tanulmány vizsgálatait a MEOK és a Szentágothai János Kutatóközpont laborjaiban végeztük. A II, III és IV grádusú gliomák mintáit sugár- és/vagy kemoterápia kezelés előttről kaptuk. A GBM mintapárok esetében a primer minták mindegyike sugár-és kemoterápiai kezelés előttről, míg a recidív minták kezelés utánról származtak. A lokális és regionális etikai bizottságok (EB) jóváhagyásának dokumentációja: MEOK EB 56/2012, 21/2014, 28/2014, 025782-003/2014/, valamint PTE EB 7517-2018 és 2019.

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

Összesen 72 IV-es grádusú FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded) gliomát 69 betegtől, és 19 II-es és III-as grádusú FFPE gliomát 19 betegtől elemeztünk.

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

Három alkohorttal dolgoztunk. A kohort 1, 78 beteg 81 FFPE blokkját tartalmazta. A molekuláris alcsoportokkal való korrelációkhoz a beteg életkorát, nemét és teljes túlélési idejét (műtét és halál között eltelt idő hetekben) használtuk. A kohort 2, 19 szekvenciális FFPE GBM mintát tartalmazott 8 betegtől. A kohort 3-ban 8 FFPE post-mortem mintát vizsgáltunk, ahol elkülönült a normál agyszövet, az inváziós zóna és a GBM.

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

A tanulmányt két alkohortban végeztük. A kohort 1-ben 21 pár primer (GBM-P) és recidíva (GBM-R) FFPE blokkot vizsgáltunk, amelyek a PTE Patológiai Intézetéből származtak. Kohort 2-ben Klughammer et al. [21] által feltöltött, nyilvános adatbázisban elérhető szekvenciális FFPE GBM mintapárok metilom adatait használtuk (<https://www.ebi.ac.uk/ena>, hozzáférési szám: EGAS00001002538) [21]. Kontrollként az IHC tanulmány során 6 FFPE post mortem agyi mintát, míg a DNS CpG metilációs elemzéseinkhez 5 epilepszia műtéti minta adatait használtunk (ez utóbbit az European Nucleotide Archive adatbázisból) [21].

4.5. Immunhisztokémia

Az elsődleges antitesteket egy pilot IHC tanulmányban állítottuk be. A szövetszövetmintákat citrát pufferrel vagy proteináz K-val tártuk fel. Az elsődleges antitestek kötődését Novolink Polymer Detection kit-tel detektáltuk. Mindegyik metszet esetében egy patológus szakorvos meghatározta a „region of interest”-et (ROI). A ROI-n belül meghatároztuk százalékosan a festődött sejtek számát és a festődés intenzitását, majd ezeket megszoroztuk egymással, így generálva egy „Complex Score” (CS) értéket. A II-es és III-as grádusú oligodendroglialis és asztroglialis gliomák elkülönítésére hisztológiai és molekuláris vizsgálatokat végeztünk, a WHO 2016-os agydaganatokra vonatkozó ajánlása alapján [22]. Az IDH-1 R132H és EGFRvIII mutáns molekula jelenlétét vagy hiányát regisztráltuk. A Wnt3a, béta-katenin, Fzd10, Wnt5a, Wnt7b, Fzd2, valamint az EGFR és az NF-1 esetében CS értéket számoltunk.

4.6. DNS izolálás

Az FFPE blokkokból 4-5 darab metszetet készítettünk. Deparaffinizáció után DNS-t izoláltunk a QIAamp DNA FFPE Tissue Kit használatával. Az epigenomikai tanulmányhoz szükséges DNS fragmentanalízist a Genomic DNA ScreenTape Assay kit-tel egy 4200 TapeStation System készüléken végeztük.

4.7. Piroszekvenálás

Az IHC során detektált IDH-1 R132H mutációt piroszekvenálással is validáltunk. A PCR és a szekvenáló primereket egy korábbi publikáció alapján szintetizáltattuk a BioScience Kft közvetítésével. A reverz PCR primer biotin konjugált volt.

4.8. Epigenomika

Az RRBS (reduced representation bisulfite sequencig) 24x kit-et használtuk a könyvtárkészítéshez a gyártói (Diagenode) protokollt követve. A mintákban lévő DNS minőségi eltérések kompenzálásának érdekében, az input DNS mennyiségét az ajánlott 200 ng-ról megnöveltük.

A DNS-t megemésztettük az MspI-gyel, amely CCGG helyeket ismer fel, így CpG-vel végződő fragmentekkel dúsítottuk a mintákat. Ezt követően a fargmentumok végét adapterekkel ligáltuk és méretszelekciót végeztünk, majd a mintákat pool-okba raktuk és biszulfid konvertáltuk. A konvertált könyvtárakat PCR-ral amplifikáltuk és ellenőriztük a mennyiségüket és a minőségüket, mielőtt megszekvenáltuk a NextSeq 550 szekvenáló készüléken. A nyers szekvencia adatokat az European Nucleotide Archive-ba töltöttük fel (<https://www.ebi.ac.uk/ena>, Primary Accession: PRJEB38380, Secondary Accession: ERP121800).

4.9. Bioinformatika

A nyers adatok minőségét FastQC programmal ellenőriztük és eltávolítottuk az adaptereket. A biszulfít konvertált read-eket a hg19 (GRCh37) referenciagenomhoz hasonlítottuk. Az RnBeads programmal kohort szinten elkülönítettük a differenciáltan metilált CpG helyeket, gén régiókat, a GO (gene ontology) analízissel az útvonalakat, összehasonlítva a primer és recidív GBM mintapárokat egymással és a kontrollal. Fókuszáltan megvizsgáltuk a Wnt útvonal markereinek promoter+gén régiójában a DNS CpG metiláció szintjét az egyéni mintákban, a tanulmányhoz írt script segítségével, amely a BioMethyl R csomagon alapult. Az adott egyedi metilációs szintet százalékos formában adta meg a program úgy, hogy meghatározta a metilációs (CpG) helyeket a megadott régióon belül az összes mintában, majd ezeknek a helyeknek egyedi szinten meghatározta a számszerű metiláltságát és annak relatív fokát, végül a metilált helyek számát elosztott az összes lehetséges metilációs hely számával és megszorozta 100-zal. Továbbá megvizsgáltuk a hat Wnt marker GeneCards Genhancer adatbázisból nyert enhancer régióinak metilációs mintázatát, az adatbázis szekvenciális GBM mintáiban.

4.10. Statisztika

Két független minta összehasonlítása esetén Mann-Whitney U tesztet, míg egymástól függő mintapárok esetén Wilcoxon signed rank tesztet alkalmaztunk. Több minta egyidejű összehasonlításakor Kruskal-Wallis próbát futtatunk le. A Wnt és az alcsoport meghatározó markerek, valamint a teljes túlélés közötti kapcsolatot Kendall's τ korreláció analízissel vizsgáltuk. A teljes túlélést a GBM különböző alcsoportjaiban Kaplan-Meier tesztel vizsgáltuk.

5. Eredmények

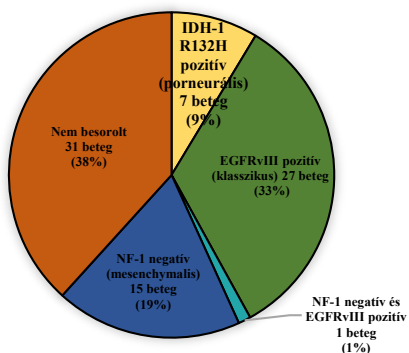
5.1. A Wnt markerek expressziós mintázatának vizsgálata a gliomák grádusa, eredete és molekuláris markerei szerint

Szignifikánsan magasabb Wnt5a (grádus III vs. grádus IV $p < 0.001$) és Wnt3a (grádus II vs. grádus IV $p = 0.036$; and grádus III vs. grádus IV $p = 0.001$) expressziót figyeltünk meg, amikor a 72 darab GBM mintát vetettük össze a 9 darab II-es és 10 darab III-as grádusú gliomával. A Wnt markerek expressziójában fokozatos emelkedést tapasztaltunk a grádus növekedésével. Az összevont 19 darab II-III-as grádusú glioma összehasonlítása során a 72 darab IV-es grádusú GBM-mel, a Wnt5a ($p < 0.001$), a Wnt3a ($p < 0.001$) és a citoplazmás béta-katenin ($p = 0.039$) emelkedett szintjét találtuk a GBM-ben. Amikor a GBM mintákat a 8 darab normál agyi régióhoz hasonlítottuk, mindegyik Wnt marker (kivéve a Wnt3a) magasabb expressziót mutatott (Wnt5a $p = 0.004$; Fzd2 $p = 0.015$; citoplazmatikus béta-katenin $p < 0.001$; magi béta-katenin $p = 0.001$) a tumorban. Egyedül a citoplazmatikus ($p = 0.030$) és a magi ($p = 0.016$) béta-katenin expressziója különbözött a normál agyi régiók és a II-III-as grádusú gliomák között.

A 8 darab asztroglialis és 11 darab oligodendroglialis minták vizsgálatakor, egyedül a Wnt5a expressziója volt szignifikánsan magasabb az asztroglialis csoportban ($p = 0.02$). A 19 darab II-III-as grádusú gliomából, 15 darab volt IDH-1 mutáns és 4 darab vad típusú, azonban szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk Wnt markerek kifejeződésében a két csoport között. Amikor az összes (II-IV grádusú), 91 darab glioma Wnt marker CS értékét hasonlítottuk össze az IDH státusz szerint, egyedül a Wnt3a expresszálódott szignifikánsan magasabban ($p = 0.006$) a 69 mintából álló IDH-1 vad típusú csoportban.

5.2. A Wnt markerek protein kifejeződése a GBM molekuláris alcsoportjaiban

A kohort 1 keresztmetszeti tanulmányban, a 78 betegből származó tumor 61.7%-át (50/81) tudtuk valamelyik GBM alcsoportba besorolni (1. Ábra).



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

Az IDH-1 R132H mutációt (proneurális) hordozó 7 beteg fiatalabb volt ($p=0.05$), mint a 74 vad típust hordozó beteg, míg az a 15 beteg, akik dupla NF-1 negatív fenotípusú (citoplazma/mag- vagy c-/m-, mesenchymalis alcsoport) GBM-mel rendelkezett idősebb volt, mint azon 66 beteg, akiknél tapasztaltunk NF-1 protein expressziót ($p=0.039$). Nem volt a betegek életkorában különbség a 27 darab EGFRvIII mutáns (klasszikus alcsoport) és az 54 darab EGFR vad típusú csoport között. Amikor a betegek teljes túlélési idejét vizsgáltuk a GBM alcsoportok szerint, nem találtunk szignifikáns különbségeket, kivéve hogy az IDH-1 R132H mutáns tumorú betegek teljes túlélési ideje hosszabb volt, mint az IDH-1 vad típusú tumort hordozóké ($p=0.052$).

A molekuláris alcsoportok közötti Wnt expresszió összehasonlítása során, nem találtunk szignifikáns különbséget. Azonban az alcsoportokon belül szignifikáns eltéréseket észleltünk a kanonikus és a non-kanonikus útvonal markereinek expressziós szintjeiben. A proneurális alcsoportban, amely 7 betegből állt, szignifikáns különbséget tapasztaltunk a Wnt5a és Wnt3a között ($p=0.012$). A leglátványosabb differenciát a két alútvonal között a 15 betegből álló mesenchymalis alcsoportban figyeltük meg. A Wnt5a szignifikánsan magasabban expresszáldott (Wnt5a vs. Wnt3a $p<0.001$; Wnt5a vs. citoplazmatikus béta-katenin $p=0.002$; Wnt5a vs. magi béta-katenin $p<0.001$) mindegyik kanonikus útvonal markernél. Továbbá az Fzd2 emelkedett kifejeződést mutatott a Wnt3a-val ($p=0.009$) és a magi béta-katenin-nel ($p=0.04$) szemben. A 27 beteget magába foglaló klasszikus alcsoportban, a Wnt5a magasabban expresszáldott, mint a Wnt3a ($p=0.021$) és a magi béta-katenin ($p<0.001$), valamint az Fzd2-nek magasabb CS értéke volt, mint a magi béta-katenin-nek ($p=0.046$). Végül a nem besorolt alcsoport 31 betege esetében, a Wnt5a szintje szignifikánsan nagyobb volt, mint a Wnt3a ($p<0.001$) vagy a magi béta-katenin ($p<0.001$), míg az Fzd2 szintén magasabb CS értékkel rendelkezett a magi béta-katenin-nél ($p=0.01$). Ebben az alcsoportba figyeltük meg egyedül a citoplazmatikus béta-katenin magasabb expresszióját a magi megjelenéssel szemben ($p=0.005$). Az IDH-1 státusz szerinti összehasonlításban, csak a Wnt5a mutatott tendenciálisan emelkedett expressziót ($p=0.071$) a mutáns GBM csoportban.

Normál esetben az NF-1 és a béta-katenin protein csak a citoplazmában van jelen, de daganatokban a fehérje elvesztése vagy a magba történő transzlokálódása figyelhető meg. A kohortunkban a magi béta-katenin expressziója magasabb volt a magi NF-1 expresszióval vagy az NF-1 proteint vesztett

fenotípussal rendelkező alcsoportban, szemben a citoplazmatikus NF-1 expresszióval rendelkező alcsoporttal ($p=0.021$ és $p=0.03$).

A molekuláris alcsoport és a Wnt útvonal markerek közötti kapcsolat elemzésekor csak a citoplazmában ($p=0.01$), illetve membránosan megjelenő EGFRvIII ($p=0.035$) és az Fzd2 expressziója között észleltünk szignifikáns összefüggést.

A kombinált kohort 1 (molekuláris alcsoporttól független) analízis során, a Wnt5a szignifikánsan korrelált az Fzd2-vel ($p=0.036$).

A szekvenciális kohort 2 elemzésekben nem tapasztaltunk szignifikáns különbségeket egyik Wnt marker expressziójának a tekintetében sem, amikor a 8 beteg primer és recidív GBM mintáit hasonlítottuk össze.

A kohort 3 nyolc post mortem mintáiban, graduális emelkedést figyeltünk meg a Wnt markerek expressziójának a tekintetében, amikor a normál szövet - inváziós zóna - tumor régiót hasonlítottuk össze. A Wnt5a ($p=0.003$) és a Wnt3a ($p=0.029$) kifejeződése a normál agyszövetben volt a legalacsonyabb, míg a legmagasabb a tumor központi részében.

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

A kohort és genom szintű metilációs vizsgálatunkban, a Wnt7b, Wnt11 hipermetilált, míg a Wnt6 hipometilált volt a GBM-P csoportban a GBM-R-hez képest. A receptorok és koreceptorok tekintetében az Fzd1, Fzd3, Fzd10, LRP6 (Low density lipoprotein receptor-related protein 6), és a ROR2 (Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2) hipermetilált, azonban a Ryk (Receptor-like tyrosine kinase) hipometilált volt a GBM-P-ben a GBM-R-rel összehasonlítva. A kanonikus útvonal

intermediér molekulái közül az AXIN2 (Axis inhibitor protein 2) hipermetilált, míg az APC (Adenomatous Polyposis Coli Protein), a DVL1 (Dishevelled segment polarity protein 1), a GSK-3 β (Glycogen synthase kinase 3 β) és a LEF1 (Lymphoid enhancer factor 1) hipometilált volt. A non-kanonikus útvonal intermediér molekulái esetében a DAAM1 (Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1) hipermetilált, az NLK (Nemo Like Kinase) pedig hipometilált volt a GBM-P vs. GBM-R összehasonlításban.

A kohort szintű megfigyelések arra készítettek bennünket, hogy egyidejűleg megvizsgáljuk a kiválasztott Wnt markerek fehérje expresszióját és promóter+gén DNS CpG metilációját egyéni kontroll (C-PM az IHC-ben, C-DB az epigenomikában), GBM-P és GBM-R mintákban.

A C-PM kontrollhoz képest szignifikánsan magasabb fehérje expressziót figyeltünk meg a Wnt5a ($p=0.003$) esetében GBM-P-ben és a Wnt3a esetében ($p=0.003$) a GBM-R-ben. Az Fzd10 expressziós szintje egységesen nagyon alacsony volt az összes GBM-P, GBM-R és C-PM mintában. Továbbá szignifikáns csökkenés volt tapasztalható az Fzd2 esetében a GBM-P-ben a C-PM-hez képest ($p<0.001$). A Wnt7b fehérje expressziója magas volt a C-PM-ben, kis mértékben csökkent a GBM-P-ben, míg szignifikánsan alacsonyabb volt a GBM-R-ben ($p=0.005$). Amikor összehasonlítottuk a Wnt markerek expresszióját egyéni szinten a GBM-P és GBM-R mintapárokban, a Wnt3a ($p=0.009$) és az Fzd2 ($p=0.016$) szignifikáns növekedést mutatott a progresszió során, ellenben a Wnt7b esetében ($p=0.019$) ellenkező mintázatot figyeltünk meg.

A Wnt markerek promóter+gén metilációs szintjében nem találtunk szignifikáns különbséget GBM-P és GBM-R minták összehasonlításakor. Azonban a C-DB, a GBM-P és a GBM-R

összehasonlításakor szignifikánsan magasabb metilációs szintet tapasztaltunk a Wnt3a ($p=0.028$) és a Wnt7b ($p=0.015$) esetében a C-DB-ben a GBM-P-hez képest, valamint a Wnt3a ($p=0.012$) és Wnt7b ($p=0.034$) esetében a C-DB-ben a GBM-R-hez képest. Az Fzd10 metilációs szintje jelentősen magasabb volt, mint a többi vizsgált Wnt útvonal markeré a C-DB, a GBM-P és a GBM-R mintákban.

Nem találtunk szignifikáns különbséget a hat Wnt marker metilációs szintjében a 21 GBM-P és GBM-R mintapárban. A megfigyelésünk megerősítésének érdekében, szintén megvizsgáltuk a hat marker promoter+gén régiójának metilációs szintjét egy 112 betegből álló szekvenciális GBM adatbázis-kohortban [21]. Saját eredményeinkhez hasonlóan ebben a primer – recidív kohortban sem találtunk különbséget a kiválasztott Wnt markerek promoter+gén régiójának metilációs szintjében a tumor progressziója során.

Részben találtunk csak negatív korrelációt, amikor összehasonlítottuk a fehérje expressziót és a promoter+gén CpG metilációs szinteket a kontroll és a szekvenciális GBM mintáinkban. Ezért megvizsgáltuk a hat Wnt marker enhancer régióinak metilációs szintjét, mind a saját kisebb, mind az adatbázis nagyobb GBM kohortban. A Wnt7b GH22J045611, Fzd10 GH12J130124 és Fzd10 GH12J130138 GeneHancer ID-vel rendelkező enhancer-ek magasabb metilációs szintet mutattak, mint a többi enhancer az adatbázis GBM mintákban, valamint e három enhancer metilációs szintje magasabb volt a GBM-R-ben a GBM-P-hez képest.

6. Megbeszélés

Tanulmányaink rámutatnak a Wnt útvonal gliomagenezisben betöltött szerepére, és ezáltal felvetik ezen útvonal elemeinek, mint terápiás célpontoknak a mérlegelését.

Az első altanulmányunkban a Wnt marker expresszió és a glioma gádus, eredet és molekuláris profil kapcsolatát vizsgáltuk. Pu et al. [23] és Denysenko et al. [24] is hasonló eredményeket közölt az általunk tapasztaltakhoz, miszerint korreláció figyelhető meg a Wnt marker expresszió és a glioma grádus között, míg normál agyban nagyon alacsony ezen markerek kifejeződése [23, 24]. A Wnt markerek nem mutattak kifejeződésbeli különbségeket az IDH-1 mutációs státusza szerint a II-es, a III-as vagy a IV-es grádusú glioma alcsoportokban, azonban a Wnt3a expressziója szignifikánsan magasabb volt az IDH-1 vad típusú csoportban a mutánshoz képest a kombinált grádusú (II-III-IV) összehasonlítás során. A szakirodalom megosztott az IDH mutáció és Wnt útvonal markereinek kapcsolatát tekintve. Egyes kutatók azt találták, hogy az IDH-1 mutáció a gliomák proliferatív és invazív potenciáljának jelentős csökkenését okozzák a béta-katenin szignalizáció gátlása következtében [19]. Mások azonban azt írták le, hogy az IDH-1 mutációt hordozó daganatokban szenvedő betegeknél a kanonikus Wnt útvonal emelkedett aktivitással rendelkezik [20, 25]. Nagy valószínűséggel van összefüggés a Wnt útvonal aktivitása és az IDH mutációs státusz között, azonban ezt a kapcsolatot még tisztázni kell. A Wnt marker expresszió és a glioma eredete között, eddig mi és mások is csak utaló jellegű kapcsolatot észlelt, ami alapján további vizsgálatok szükségesek a végső következtetésig.

A második altanulmányban, a korábbi megfigyelésekhez hasonlóan, a proneurális alcsoportba tartozó IDH-1 R132H mutáns tumor típusú betegek voltak a legfiatalabbak, és a leghosszabb teljes túlélési idővel rendelkeztek. Ezzel szemben a mesenchymalis tumort hordozó betegek, akiknél mind a citoplazmatikus, mind a magi NF-1 expresszió hiányzott, a legidősebbek voltak, a legrövidebb teljes túlélési idővel [5, 12, 22].

Nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a Wnt markerek expressziós szintjében a GBM molekuláris alcsoportjai között. Azonban szignifikáns különbségeket figyeltünk ezen markerek kifejeződésében az alcsoportokon belül. Különösen nagy differenciát tapasztaltunk a mesenchymalis alcsoportban a non-kanonikus vs. kanonikus útvonal markereinek összehasonlítása során. Megfigyelésünkkel összhangban a TCGA és számos más kutatócsoport is a Wnt5a túlműködését írta le a mesenchymalis alcsoportban [5, 15]. A klasszikus alcsoportban korrelációt tapasztaltunk az EGFR expressziója és mind a kanonikus, mind a non-kanonikus Wnt markerek között. Az EGFR és a béta-katenin kölcsönösen képesek aktiválni vagy inaktíválni egymás szabályozó elemeit [26], míg a non-kanonikus útvonal elemei fontos szerepet játszanak az EGFRvIII által vezérelt tumor kialakulásban [27]. Eredményeinkhez hasonlóan, a TCGA adatai is azt mutatják, hogy a Wnt markerek expressziós mintázatai a nem besorolt GBM alcsoportban hasonló a klasszikus alcsoportéhoz, feltehetően az EGFR (túl)expresszió miatt [5].

Szoros összefüggést találtunk a béta-katenin és az NF-1 magi expressziója között, nem egészen meglepő módon, mivel mindkét fehérjének a citoplazmából magba történő transzlokációja összefügg a tumor kialakulásával. Az NF-1 egy

tumor szupresszor, elvesztése vagy funkcionális megváltozása növeli a tumorok agresszivitását és invazivitását az EMT (epithelialis–mesenchymalis tranzíció) által [28]. Feltételezéseink szerint, az NF-1 és a béta-katenin citoplazmatikus expresszióját mutató GBM daganatoknál kisebb az EMT valószínűsége, ezáltal ezek a tumorok kevésbé lesznek agresszívak, míg a két fehérje magba történő transzlokálódása ellentétes tulajdonságú GBM-et eredményez. Összességében azonban nem találtunk összefüggést a GBM alcsoport markerek és a Wnt markerek expressziós szintjei között, a klasszikus alcsoport Fzd2 és EGFRvIII kivételével. Továbbá, a Wnt5a és az Fzd2 expressziós szintje tendenciálisan korrelált egymással ebben az alcsoportban, jelezve az EGFRvIII mutáció és a non-kanonikus Wnt útvonal markerek közötti összefüggést. A kombinált kohort 1-ben (az alcsoport besorolástól függetlenül) a Wnt5a szignifikánsan korrelált az Fzd2-vel, egyetértésben a korábbi GBM publikációkkal [17, 14].

A szakirodalom alapján a Wnt markerek expressziójának növekedésére számítottunk a recidívában a primer GBM-ekhez képest a kohort 2-ben, de eredményeinek szerint a Wnt ligandok és receptorok komplex expressziós mintázatot követnek a tumor progressziója során.

A kohort 3-ban megfigyeléseink összhangban vannak Kahlert et al. [29] és Binda és et al. [16] megfigyeléseivel, amelyek azt mutatják, hogy mind a kanonikus, mind a non-kanonikus útvonal markerei magasan expresszálódnak az inváziós és a tumoros zónákban a normál agyrégiókhöz képest [29, 16].

A harmadik altanulmányunkban először a hat kiválasztott Wnt-marker promoter+gén metilációs mintázatát elemeztük kohort szinten, összehasonlítva a C-DB, GBM-P és GBM-R

csoportokban [10]. Ezen előzetes vizsgálat megfigyelései arra készítettek minket, hogy fókuszáltan vizsgáljuk meg a kiválasztott Wnt markerek promoter és gén régióit, és összevessük a metilációs mintázatokat a fehérje expresszióval egyedi kontroll mintákban és GBM mintapárokban. A GBM-P és a GBM-R összehasonlításakor nem találtunk különböző metilációs mintázatot sem a saját, sem az adatbázis szekvenciális GBM mintáiban a hat Wnt marker promoter+gén régiójában [21]. Azonban, amint az várható volt a daganatok hipometiláció felé történő elmozdulása alapján a kontroll mintákhoz képest [30, 31], saját tanulmányunkban is tapasztaltunk a hipometiláció felé való eltolódást GBM mintákban a legtöbb Wnt marker esetében a kontroll mintákhoz képest (az Fzd2 és Fzd10 kivételével).

A promoter+gén hipometilációi a Wnt5a, Wnt3a és béta-katenin fehérje expressziójának tendenciális vagy szignifikáns növekedésével társult a GBM-P-ben és a GBM-R-ben a C-PM-hez képest. Az Fzd10 magas promoter+gén metilációja következetesen alacsony membránfehérje-expressziót eredményezett mind a kontroll, mind a tumor mintákban.

A fenti megfigyelésekből, melyek szerint a Wnt marker expresszió és a promoter+gén metiláció nem mindig áll inverz kapcsolatban egymással, arra következtethetünk, hogy gén expresszió epigenetikai szabályozásának nem kizárólagos eleme a DNS CpG metiláció. Ezért egy kiegészítő vizsgálatot is elvégeztünk, melynek során a hat Wnt marker enhancer régióiban (többnyire a gén+promoter régió kivül) meghatároztuk a DNS metilációs szinteket a saját és az adatbázis GBM mintákban. Az adatbázis kohortban fokozott metilációt mutatott egy Wnt7b és két Fzd10 enhancer a többi enhancer-rel szemben, valamint az előbb említett három

enhancer-nek magasabb volt a metilációs szintje a recidívában a primer mintához képest. A Fzd10 nagyon alacsony fehérje expressziója minden mintában a metiláció magas szintjével magyarázható, mind a gén+promoter, mind az enhancer régiókban. A Wnt7b fehérje expressziójának fokozatos csökkenését a kontrolltól a GBM-P-n át a GBM-R-ig, a daganat progressziója során megfigyelhető emelkedő DNS-metilációs szint okozhatta. Mivel a Wnt7b ligand kötődik az Fzd10 receptorhoz, promoter+gén régiójuk egyidejű hipermetilációja, melynek eredménye az alacsony vagy csökkenő fehérje expresszió, valószínűleg kizárja a GBM progressziójában való részvételüket. A metilációs változások nemcsak a promotereket, enhancer-eket és a nyitott olvasási kereteket érinthetik, hanem a szabályozó RNS molekulák régióit, a splicing helyeket vagy az insulátorok topológiai doménjeinek kötőhelyeit is, amelyek fokozhatják vagy gátolhatják az mRNS expresszióját, transzlációját vagy módosíthatják a fehérjék izoformáit [32, 33, 34]. A szabályozási mechanizmusok bonyolultsága magyarázhatja a csupán részleges egybeesést a várt és megfigyelt (részlegesen inverz) fehérje expressziós és promoter+gén metilációs szintek között a tanulmányunkban, és a szakirodalomban.

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 Wn7b 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 első szerzők)

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, Csejtei 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. 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).
3. 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>.
4. The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 455:1061. <https://doi.org/10.1038/nature07385>.
5. 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>.
6. Noushmehr 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>.
7. 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>.
8. Laird PW (2005). Cancer epigenetics. *Hum Mol Genet.* 14:65–76. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi113>.
9. 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>.
10. 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>.
11. 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>.
12. 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).

13. 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>.
14. 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>.
15. Liu C, Tu Y, Sun X, Jiang J, Jin X, Bo X (2011a). 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>.
16. 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>.
17. 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>.
18. 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>.
19. 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>.
20. 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>
21. Klughammer J, Kiesel B, Roetzer T, Fortelny N, Nemeš 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>.
22. 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>.
23. Pu P, Zhang Z, Kang C et al. (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>.
24. 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.
25. 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>.

26. 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>.
27. 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>.
28. 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>.
29. 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>.
30. 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>.
31. 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>.
32. 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>
33. 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>.
34. 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>.