

A glioblasztóma patogenezisében és progressziójában szerepet játszó molekuláris útvonalak feltárása epigenomikai megközelítéssel

Doktori (PhD) – értekezés



Krabóth Zoltán

**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, 2022

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés	7
1.1 A GBM általános jellemzői	7
1.2 A GBM kialakulása és progressziója, főbb mutációk és érintett jelátviteli útvonalak	9
1.3 A GBM epigenetikai sajátosságai	12
1.4 A neurotranszmitterek tumorbiológiai szerepe.....	17
2. Hipotézisek és célkitűzések	19
2.1 Hipotézisek	19
2.2 Célkitűzések.....	19
3. Anyag és módszer	19
3.1 Etikai nyilatkozat	19
3.2 Beteganyag a dolgozat két tanulmányában	20
3.2.1 Általános adatok.....	20
3.2.2 DNS CpG metilációs mintázatok genom-szintű elemzése kontrollok és szekvenciális GBM mintapárok kohortjaiban.....	20
3.2.3 Négy szelektált katekolamin marker promoter+gén DNS CpG metilációjának és fehérje expressziójának mennyiségi meghatározása egyedi kontroll mintákban és szekvenciális GBM mintapárokbán	23
3.3 Módszerek	24
3.3.1 DNS izolálás.....	24
3.3.2 Könyvtárkészítés	24
3.3.3 Bioinformatikai elemzés	27
3.3.4 Immunhisztokémia	28
3.3.5 Statisztikai elemzések	30
4. Eredmények	30
4.1 Genom-szintű CpG metilációs elemzések az CG2 - GBM1 - GBM2 kohortokban..	30
4.1.1 Genomikus DNS fragmentmegoszlások összehasonlítása FFPE postmortem GBM, FFPE műtéti GBM, buffy coat és teljes vérmintákból.....	30
4.1.2 Genom-szintű DNS CpG metiláció elemzés szekvenciális FFPE GBM és kontroll minták kohortjaiban.....	37
4.1.3 Korrelációs elemzések a patológiai és klinikai adatok között.....	43
4.2 A katekolamin útvonal kiválasztott markereinek promoter + gén metilációja és protein expressziója GBM mintapárokbán	44
4.2.1 A szelektált katekolamin útvonal markerek protein expressziójának kvantitativ IHC vizsgálata.....	45

4.2.2	A szelektált katekolamin útvonal markerek metilációs szintje egyedi GBM és kontroll mintákban	47
4.2.3	A szelektált katekolamin útvonal markerek promóter+gén régióinak metilációs szintjei a validációs adatbázis egyedi primer és recidív mintáiban	49
5.	Diszkusszió	51
5.1	Genom-szintű CpG metilációs elemzések a CG2 – GBM1 – GBM2 kohortokban ..	52
5.1.1	Primer tumorok (GBM1) összehasonlítása az agyi kontroll (CG2) mintákkal ..	53
5.1.2	Recidív tumorok (GBM2) összehasonlítása az agyi kontroll (CG2) mintákkal	53
5.1.3	Recidív tumorok (GBM2) összehasonlítása primer tumorokkal (GBM1).....	54
5.1.4	Cross-platform (szekvenálás vs. microarray) metilom adatok összevetése saját és TCGA szekvenciális GBM mintapárokbán	55
5.1.5	Locus Overlap Analysis (LOLA) a GBM1-CG2, GBM2-CG2 és GBM2-GBM1 epigenomikai adatok összevetése nyomán.....	55
5.1.6	Korrelációs elemzések a klinikai és patológiai adatok között.....	56
5.2	A katekolamin útvonal kiválasztott markerei	56
5.2.1	A katekolamin útvonal kiválasztott markereinek promoter + gén metilációja és protein expressziója kontroll, GBM1 és GBM2 mintákban	58
6.	Következtetések	63
7.	Új megállapítások	65
8.	Referencialista.....	66

Rövidítések jegyzéke

ADRA1D – Adrenoreceptor Alpha 1D

ADRBK1/GRK2 - Adrenergic, Beta, Receptor Kinase 1/G-protein-coupled receptor kinase 2

ATRX - Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked

CDK/cyclin – Cyclin-dependent kinase-cyclin

CG1 – Control group 1

CG2 – Control group 2

CT – Threshold cycle

CS – „Complex Score”

CSC – Cancer stem cell

DAB – 3, 3'-diaminobenzidine

DNS – Deoxiribonucleic acid

DRD1/2/3/4/5 – Dopamine receptor D1/2/3/4/5

E – Epinephrine

EGFR – Epidermal growth factor receptor

FFPE – Formalin-Fixed Paraffin-Embedded

GBM – Glioblastoma

G-CIMP – Glioma-CpG island methylator phenotype

GO – Gene Ontology

GPCR – G-protein coupled receptor

GSC – Glioma stem cell

HC – Histological control

HDM – Histone demethylase

HE – Hematoxylin-eosin

HTM – Histone methyltransferase

IDH-1/2 – Isocitrate dehydrogenase 1 and 2

IHC – Immunohistochemistry

IQR – Interquartile range

ITH – Intra-tumor heterogeneity

LOLA – Locus Overlap Analysis

MC – Methylation control

MEK – Mitogen activated protein kinase kinase

MGMT – O⁶-methylguanine-DNA methyl-transferase

NE – Norepinephrine

NF-1 – Neurofibromin 1

NGS – Next generation sequencing

NPC – Neural progenitor cell

NSC – Neural stem cell

OPC – Oligodendrocyte progenitor cell

PCR – Polymerase chain reaction

PDGFRA – Platelet-derived growth factor receptor A

PI3K – Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase

PTEN – Phosphatase and tensin homolog

RB – Retinoblastoma

ROI – „Region of Interest”

RRBS – Reduced representation bisulfite sequencing

RTK – Receptor tyrosine kinase

scRNA-seq – single-cell RNA sequencing

siRNS- Small interfering RNA

SLC18A2/VMAT2 - Solute Carrier Family 18 Member A2/ vesicular monoamine transporter
2

TCGA – The Cancer Genome Atlas

TES – Targeted exome sequencing

TMZ – Temozolomid

TP53 - Tumor Suppressor P53

VEGF – Vascular endothelial growth factor

VEGFR2 - Vascular endothelial growth factor receptor 2

WES – Whole exome sequencing

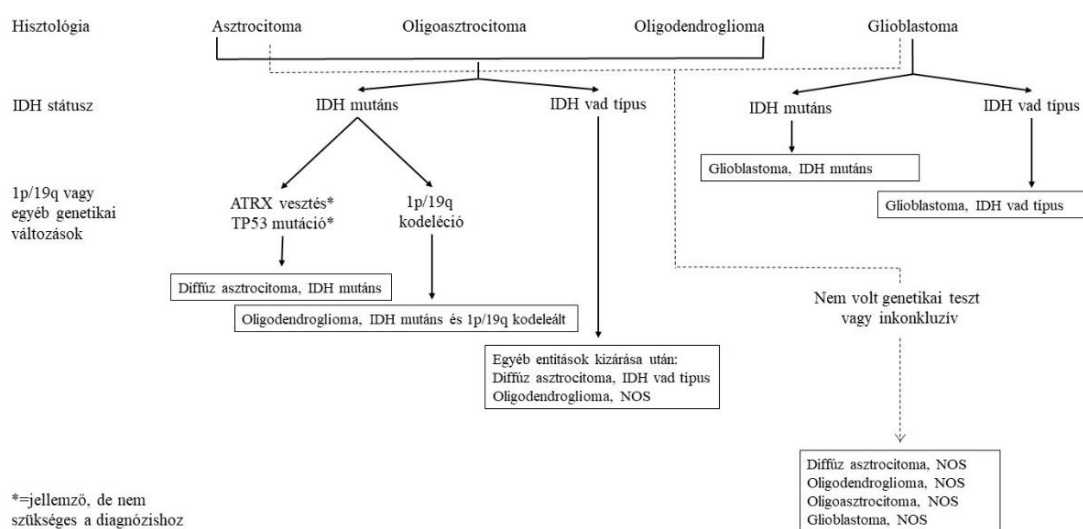
WGS – Whole genome sequencing

1. Bevezetés

1.1 A GBM általános jellemzői

A glioblastoma (GBM) a leggyakoribb és legmalignusabb primer agydaganat. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) osztályozása szerint a legsúlyosabb, IV-es grádusú glioma. A GBM 90%-a primer tumor, mely *de novo* alakul ki. Ezek a tumorok idősebb korra (medián 62 év) jellemzőek. A maradék kisebb hányad a szekunder tumorokat adja (5-10%), melyek fiatalabb korban jelentkeznek (medián 45 év), és a WHO II. grádusú diffúz asztrocitómákból vagy III. grádusú anaplasztikus asztrocitómákból fejlődnek tovább (1. ábra) [1, 2].

1. ábra A diffúz gliomák szövettani és molekuláris felosztásának gyakorlata az agydaganatok osztályozásának 2016-os WHO revíziója alapján (eredeti ábra magyar verziója [1])



Fontos megjegyezni, hogy bár az eredményeinket nem befolyásolta, a saját kutatásaink elvégzésekor az agydaganatok osztályozásának 2016-os WHO revíziója volt érvényben, azonban a közelmúltban megjelent az új, 2021-es WHO revízió, mely több ponton eltér a korábitól (pl. minden szövettanilag korábban elkülönített IDH-1/2 vad típusú astrocytoma GBM besorolást kapott; a grádus jelzéséhez nem római, hanem arab számokat javasoltak) [3]. Évente körülbelül 240 000 agydaganatot diagnosztizálnak világszerte, melyek jelentős részét a GBM teszi ki [4]. Magyarországon a GBM a daganatos megbetegedések 2-3%-át képviseli, az agyszövetből kiinduló daganatoknak pedig körülbelül 40%-áért felelős, mely évente 400 új esetet jelent [5]. A GBM incidenciája az életkor előrehaladtával növekszik, jellemzően időskorban diagnosztizálják, de ritkán gyermekkorban és újszülöttkorban is jelentkezik (Azonban a WHO 2021-es revízió szerint az utóbbiakat nem GBM-nek, hanem diffuse gliomának nevezzük, morfológiai és molekuláris alcsoportok elkülönítésével. A gyermekkori

és felnőttkori gliomák biológiailag és klinikailag is nagymértékben különböznek). A legtöbb felnőttkori esetben a GBM a hemiszfériumokat érinti, elsősorban frontális, ritkábban a temporális lebenyt. Azonban kialakulhat az agy bármely részében és a gerincvelőben is [6]. A GBM kezelésére alkalmazott standard terápiás eljárás a temozolomid (TMZ) alapú kemo- és sugárterápia, melyet operábilis esetekben a tumor rezekciója előz meg. A Stupp protokoll 6 hetes 75 mg/m² dózisu TMZ-t és 60 (30 x 2) Gy (Gray) sugárterápiát foglal magába. Négy hét szünet után újabb 6 ciklus TMZ-monoterápia, 150-200 mg/m² dózisban 5 napon keresztül [4]. A Stupp protokoll és az újabb (szinte kizárólag experimentális) molekuláris kezelési stratégiák mellett is a GBM-t változatlanul rendkívül rossz prognózis jellemzi. A betegség medián túlélési ideje általában 12-15 hónap, specializált agytumor központokban 20 hónap [7, 8]. A GBM más, áttétet képező tumorokkal szemben szinte kizárólag a központi idegrendszerre lokalizálódik. A tumorra jellemző az invázív növekedés, mely kapcsán a normál rostok mentén kúszva roncsolja a normális agyállományt és fokális neurológiai tünetek, valamint konvulziók kialakulását okozza. A térfoglaló tumor és a kísérő agyi ödéma intrakraniális nyomásfokozódással jár, melynek tünetei a fejfájás, szédülés és hányinger lehet [9]. A tumor növekedését kísérő angiogenezis abnormális érképződéssel, hipoxiás és nekrotikus gócok kialakulásával jár. A különböző beavatkozásokkal ugyan átmenetileg feltartóztatható a tumor növekedése, de a reziduális tumorsejtekből gyorsan újraképződik a daganat, átlagosan a műtétet követően 7 hónap elteltével [10]. A recidív tumorra jellemző a terápia rezisztencia és az inoperábilitás, mely rövid időn belül a beteg halálához vezet [7].

A primer és szekunder GBM tumorok hisztológiailag nem különíthetők el, molekuláris evolúciójuk különböző. A GBM progressziója során számos mutációt halmoz fel, melyek különböző molekuláris útvonalakat érintenek. A primer GBM kb. harmadában tapasztalható az EGFR (epidermal growth factor receptor) gén amplifikációja és mutációja, illetve a PTEN (phosphatase and tensin homolog) deléciója vagy mutációja. Szekunder GBM esetén gyakori a p53 gén mutációja (isocitrate dehydrogenase 1 és 2 [IDH-1/2] vad típusú GBM-ek 27%-ában, IDH mutáns tumorok 81%-ában) és az IDH-1/2 gén mutációja, mely egy korai esemény a gliomagenezis során. Ugyan az IDH mutáns státusz ritkán (kb. 5-7%-ban) primer GBM-ben is megfigyelhető, ez a mutáció nagy valószínűséggel elkülöníti a primer és szekunder GBM-t [11, 12].

1.2 A GBM kialakulása és progressziója, főbb mutációk és érintett jelátviteli útvonalak

A GBM egy rendkívül heterogén tumor szövettani és molekuláris szinten egyaránt. Ez a heterogenitás a tumor evolúciója során kialakuló klonális heterogenitással függ össze, mely különböző szomatikus mutációk és epigenetikai változások tumoron belüli felhalmozódásának köszönhető. Más tumortípusokkal ellentétben (pl.: kolorektális karcinóma), melyek esetében a progresszió különböző stádiumai jól ismertek és jól definiált szomatikus mutációkkal jellemezhetők, GBM esetében a klonális diverzitás és a molekuláris heterogenitás komplex, és számos különböző jelátviteli útvonalat érinthet [13]. Továbbá a heterogenitás nem csak egyes tumorok között (intertumor), de egy tumoron belül is (intratumor heterogenitás – ITH) megfigyelhető. Az ITH különböző grádusú gliómák (másodlagos GBM esetében), vagy különböző molekuláris alcsoportokba sorolható GBM-k (primer GBM esetében) egyidejű jelenlétét tükrözheti. Legtöbb vizsgálat, beleértve saját hosszsmetszeti elemzéseinket is, azt mutatta, hogy a GBM nagy vonalakban megtartja eredeti molekuláris tulajdonságait, bár idővel további molekuláris evolúciós változások történnek [14, 15, 16, 17]. Két modellel próbálták leírni egy tumor kialakulását és progresszióját, illetve a rá jellemző heterogenitás és a kezelésekkal szembeni rezisztencia kialakulását. Az egyik modell, a tumor őssejt hipotézis, azt feltételezi, hogy egy relatíve kicsi, őssejtekre jellemző tulajdonságokkal rendelkező tumorsejt csoport, az ún. glioma őssejtek (glioma stem cells, GSC) csoportja differenciálódik különböző molekuláris tulajdonságú tumorsejt populációkká, és ezekben később új genetikai elváltozások folytán kialakulhat a terápia rezisztencia [18]. Ezzel szemben a másik hipotézis, az alternatív klonális evolúció modell, azt mondja, hogy minden tumorsejt egymástól függetlenül szerez új genetikai elváltozásokat, így minden alpopulációnak megvan az esélye a progresszióra, de egyfajta természetes szelekción keresztül, az adott mikro környezeti és terápiás körülmények hatása alatt [19]. Hogy melyik modell írja le pontosabban a tumor evolúcióját, még megválaszolatlan.

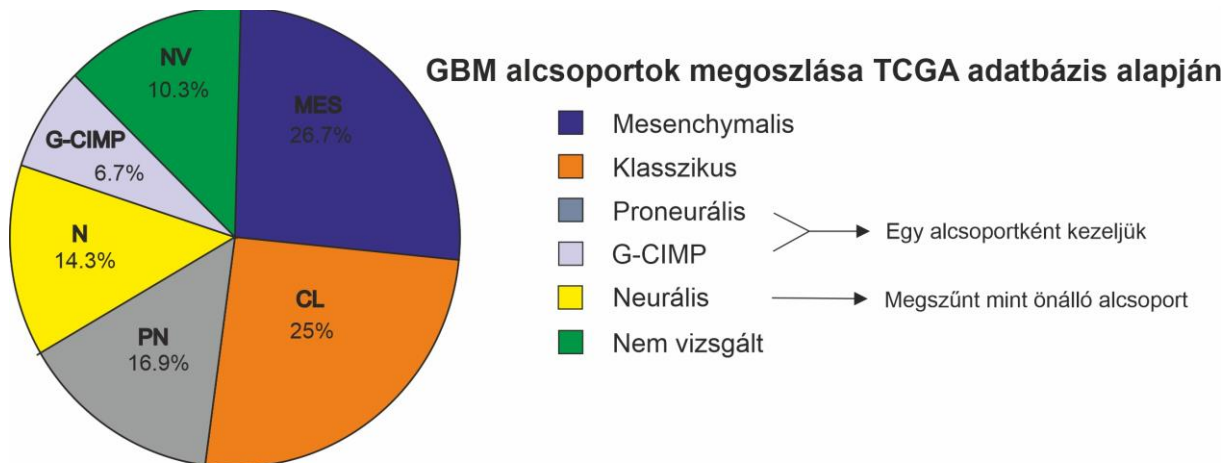
Az újgenerációs szekvenálás (NGS) alkalmazása új ablakot nyitott a tumorbiológia, így a glióma biológia, jobb megértéséhez. A GBM kialakulásában szerepet játszó mutációk és jelátviteli útvonalak első átfogó azonosítását a „The Cancer Genome Atlas” (TCGA) konzorcium írta le [20]. A GBM-ben egyik leggyakrabban érintett útvonal a receptor tirozin kináz (RTK) útvonal, RTK/RAS/PI3K (RTK / RAS/ phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase) jelátvitellel. Az RTK molekulák sejtfelszíni (transzmembrán) receptorok, melyek növekedési faktorokat kötnek meg. Az egyik legfontosabb RTK az EGFR, mely szignalizációs útja szerepet játszik a sejt proliferációban, migrációban, differenciálódásban és a központi

idegrendszer sejtjeinek túlélésében. GBM sejtekben az EGFR szignalizáció a receptor és a ligand túlexpresszációja miatt is aktiválódhat (gén amplifikáció vagy epigenetikailag szabályozott fokozott protein expresszió miatt), de az EGFR gén konstitutív aktivációt okozó mutációja is gyakori gliomákban [21]. GBM-ben, az EGFR magas expressziója mellett az u.n. EGFRvIII mutáció (a gén 2-7 exonjának deléciója) az egyik leggyakoribb, mely szintén ligandtól független, konstitutív receptor aktivációt eredményez [22]. Az EGFR RTK a Ras útvonalon keresztül is küld jelet a magba. A Ras egy G-protein, mely aktív állapotában (Ras-GTP) foszforilálja a RAF molekulát, ami pedig a PI3K és MEK molekulákon keresztül pozitívan szabályozza a sejtciklust és túlélést. A Ras útvonal negatív szabályozó elemei a PTEN és az NF-1 (neurofibromin 1) fehérjék, melyek gyakori deléciója és mutációja GBM-ben a tumor szupresszor funkció elvesztésével, így szintén a tumor agresszív terjedésével jár együtt [23]. A TCGA genomikai tanulmányok az RTK útvonal mellett szintén kiemelték a tumorbiológiai szempontból fontos RB (retinoblastoma) és TP53 útvonalak érintettségét GBM-ben [20]. Az RB útvonal kulcsszerepet játszik a sejtciklus szabályozásában. Nyugvó vagy nem osztódó sejtekben a RB hipofoszforilált állapotban van és az E2F transzkripciós faktorhoz kapcsolódik. Ez az inaktív állapot megakadályozza olyan gének átírását, melyek a mitózishoz szükségesek, és így a sejtciklus a G1/S pontnál blokkolódik. Osztódó sejtekben a növekedési faktorok cyclin-függő kináz-cyclin (CDK/cyclin) komplexek aktiválását indukálják, melyek az RB foszforilálásával és az E2F transzkripciós faktor felszabadításával DNS szintézist és sejtproliferációt indukáló gének transzkripciójához vezetnek. GBM esetében az RB útvonal negatív regulációja (cyclin-függő kináz inhibitor fehérjék – CDKN) metiláció útján is felülírható, így a sejtciklusban további zavarok léphetnek fel [24]. A TP53 útvonal GBM-ben (mint számos más tumorban) szintén kulcsszerepet játszik a sejtciklus szabályozásában, a DNS sérülésére adott válaszbán, a sejthalálban és differenciálódásban. DNS sérülése esetén az útvonal működésbe lép, és egy CDKN fehérje (p21) aktivitásán keresztül megállítja a sejtciklust, hogy időt adjon a DNS javítási mechanizmusoknak. Amennyiben a sérülés nem javítható, programozott sejthalál irányába tereli a sejtet. GBM sejtekben a DNS-hez való kötődésért felelős exonban kialakuló misszensz mutációk következtében, a p53 fehérje affinitása a DNS egyes szakaszaihoz minimálisra csökken vagy teljesen megszűnik, így hozzájárulva az érintett klónok terjedéséhez [20, 25].

A TCGA integrált genomikai és transzkriptomikai klusztter elemzéseiről rámutattak a GBM molekuláris alcsoportjainak elkülönülésére is [20, 25], melyeket az érintett sejtbiológiai mechanizmusok alapján klasszikus (CL), mesenchymalis (MES), proneurális (PN) és neurális

alcsoporthoz neveztek el (a legutóbbi csoport mintázatát később normál szöveti kontaminációnak tulajdonították és ezért a neurális alcsoporthoz elvetették) (2.ábra). Ezeket az

2. ábra: Glioblastoma molekuláris alcsoportjainak megoszlása és jellemzői TCGA adatok alapján [20]



Revízióal GBM alcsoporthoz felosztás

<p>Klasszikus</p> <p>7-es kromoszóma amplifikáció 10-es kromoszóma deléció EGF és EGFR amplifikáció EGFRvIII mutáció P53 vad típus RTK (EGFR), AKT, CDKN2A útvonalak érintettsége</p> <p>Rossz prognózis</p>	<p>Mesenchymalis</p> <p>7-es kromoszóma amplifikáció 10-es kromoszóma deléció NF-1 deléció/mutáció RAS (NF-1) Met útvonalak érintettsége</p> <p>Rossz prognózis</p>	<p>Proneurális/G-CIMP</p> <p>Normál 7-es és 10-es kromoszóma, 8-as és 10-es kromoszóma amplifikáció p53 mutáció, IDH-mutáció Notch, p53, PDGFRA, IDH, MYC útvonalak érintettsége</p> <p>Viszonylag jó prognózis</p>
---	--	---

alcsoporthozkat a TCGA legmeghatározóbb alcsoporthoz markereinek fehérje szintű alkalmazásával mi is reprodukáltunk immunhisztokémiai módszerrel klinikai GBM mintákban [17]. A klasszikus alcsoporthoz egyik legmeghatározóbb markere az EGFR gén gyakran egyidejűleg előforduló amplifikációja és EGFRvIII mutációja, de szintén jellemző a 10-es kromoszóma PTEN gént magába foglaló deléciója is. A mesenchymalis alcsoporthozra az RTK/Ras/RAF/PI3K és MEK útvonal negatív regulátoraként fentebb említett NF-1 gén deléciója és mutációja a legjellemzőbb. A proneurális alcsoporthozot pedig alapvetően az IDH-1/2 gének mutációja, valamint a p53 és a PDGFRA (platelet-derived growth factor receptor A) gének mutációja határozza meg (2.ábra).

A klasszikus és mesenchymalis tumorok jellegzetesen agresszívebb, míg a proneurális tumorok valamivel jobb prognózisú biológiai tulajdonságokat mutatnak alacsonyabb proliferációs rátával, kevesebb gyulladáshoz infiltrációval és mérsékelt nekrozissal [20, 26, 17]. Továbbá

jellemző a proneurális tumorok korábbi, a mesenchymalis tumorok későbbi életkorban történő megjelenése [20, 26, 17]. A fenti vizsgálatok azt is jelezték, hogy a molekuláris profil erősebben határozza meg a GBM biológiai tulajdonságait, mint a hisztológiai grádus.

1.3 A GBM epigenetikai sajátosságai

Az epigenomika fő mechanizmusait magába foglalja a transzkripció szabályozása a hiszton fehérjék módosítása és a DNS CpG metilációja által, valamint a transláció szabályozása mikro-(mi)RNS-ek által. A hisztonfehérjék esszenciális szerepet játszanak a kromatin és gén reguláció egyensúlyának fenntartásában. A hisztonfehérjék N-terminális régiói reverzibilis kémiai módosuláson eshetnek át (pl. metiláció, foszforiláció, acetiláció, sumoiláció, ubiquitináció stb.), mely módosulások direkt vagy indirekt módon befolyásolhatják a kromatin struktúráját, és ezáltal a gének transzkripcióját. Az egyik legmélyebben tanulmányozott folyamat a hisztonfehérjék mono-, di-, és trimetilációja (hiszton metiltransferázok által – HMT) és demetilációja (hiszton demetilázok által – HDM). A metiláció a hisztonok lizin és arginin oldalláncain következik be. GBM-ben a leggyakrabban érintett hisztonok a H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79 és H4K20 [27; 28]. H3K4 demetilációja a HDM1A által például a MYC gén expresszióját erősíti, mely számos transzkripciós faktort, többek között a GSC fenntartásában fontos OLIG2-t is szabályozza [29]. De a HDM1A a p53 szignál útvonal szuppresszora is, ezáltal elősegítve a tumorigenezist [30]. A hiszton fehérjék módosulásainak formái (mono-, di-, és trimetilációja vagy demetilációja) komplex szabályozási folyamatokban vesznek részt, és különböző módon hatnak a génexpresszió indulására vagy repressziójára [31].

A nem kódoló RNS-ek az epigenomikai szabályozás második nagy csoportjának elemei. A miRNS-ek rövid, 20-22 nukleotidból álló nem kódoló RNS-ek, melyek a cél messenger (m)RNS-ek 3' régiójához egy RNS-indukált „silencing” (RISC) komplexben kapcsolódnak és destabilizálják a mRNS-t, gátolva a translációt és csökkentve a génexpressziót [32; 33]. A miRNS-ek az epigenomikai szabályozásban, mint például a DNS metilációjában szerepet játszó rendszer mRNS-eit is célba vehetik, ezáltal befolyásolva azt. GBM-ben például a miR-381 és a miR-182 *in vitro* és *in vivo* körülmények között is fokozza a tumor növekedését. Ezeknek a miRNS-eknek a blokkolásával a GBM-ben a sejtciklus megáll a G0/G1 fázisban, a proliferáció pedig gátolt lesz az E2F3 transzkripciós faktor által foszforilált RB tumor szupresszor hatása alatt [34].

A long, noncoding RNS-ek (lncRNS-ek), hosszú, általában 200 nukleotidnál hosszabb nem kódoló RNS-ek, melyek kiterjedt és komplex szerepkört töltenek be. Az lncRNS-ek egyfajta kisegítő szerepet játszhatnak különböző makromolekulák interakciója során, mint például protein – DNS vagy lipid – protein kapcsolatoknál. Ilyen lncRNS a Xist, mely X kromoszómát inaktívál egy retinoid és thyroid hormon receptor (SMART) csendesítésén keresztül. Működhetnek továbbá úgy, mint a scaffold fehérjek, facilitálva több molekula interakcióját, mint például a p53 és az MDM2 fehérjékét. Továbbá néhány lncRNS rendelkezik „open reading frame”-el, mely rövid regulátor funkcióval rendelkező fehérjéket kódol. Ez a megfigyelés felvetette a korábban bejegyzett „nem kódoló” nomenklatura jövőbeli módosítását is. Emellett egyes lncRNS molekulák a nukleáris molekuláris interakciók irányítói, vagy nukleáris szabályozó molekulák szekvesztrálói is lehetnek, ezáltal pozitívan vagy negatívan befolyásolva komplex celluláris folyamatokat [35; 36].

Tanulmányunk fókuszában az epigenomikai szabályozás harmadik csoportja áll. Ez egyben a legkiterjedtebben vizsgált mechanizmus, a DNS CpG metilációja, mely a gén promoterek, enhancerek / silencerek, szabályozó intergenomikus régiók és gének metilációja által a génexpresszió / transzkripció szabályozás egyik kulcs eleme. A DNS CpG metilációját a DNS metiltransferáz (DNMT) katalizálja, mely során a citozinhoz egy metilcsoport kapcsol 5-metilcitozint eredményezve. Ez a modifikáció általában az 5'-CpG-3' dinukleotidok esetében figyelhető meg és a gén expressziójának blokkolásához vezethet [37]. A DNMT aktivitása szoros szabályozás alatt áll molekuláris interakciók, poszt-transzlációs módosulások, alternatív splicing és gén duplikáció vagy vesztés által. Azonban a DNMT-k nem csak a génexpresszió blokkolásában, hanem a transzkripció aktiválásában és poszt-transzkripcionális folyamatok szabályozásában is részt vehetnek [38].

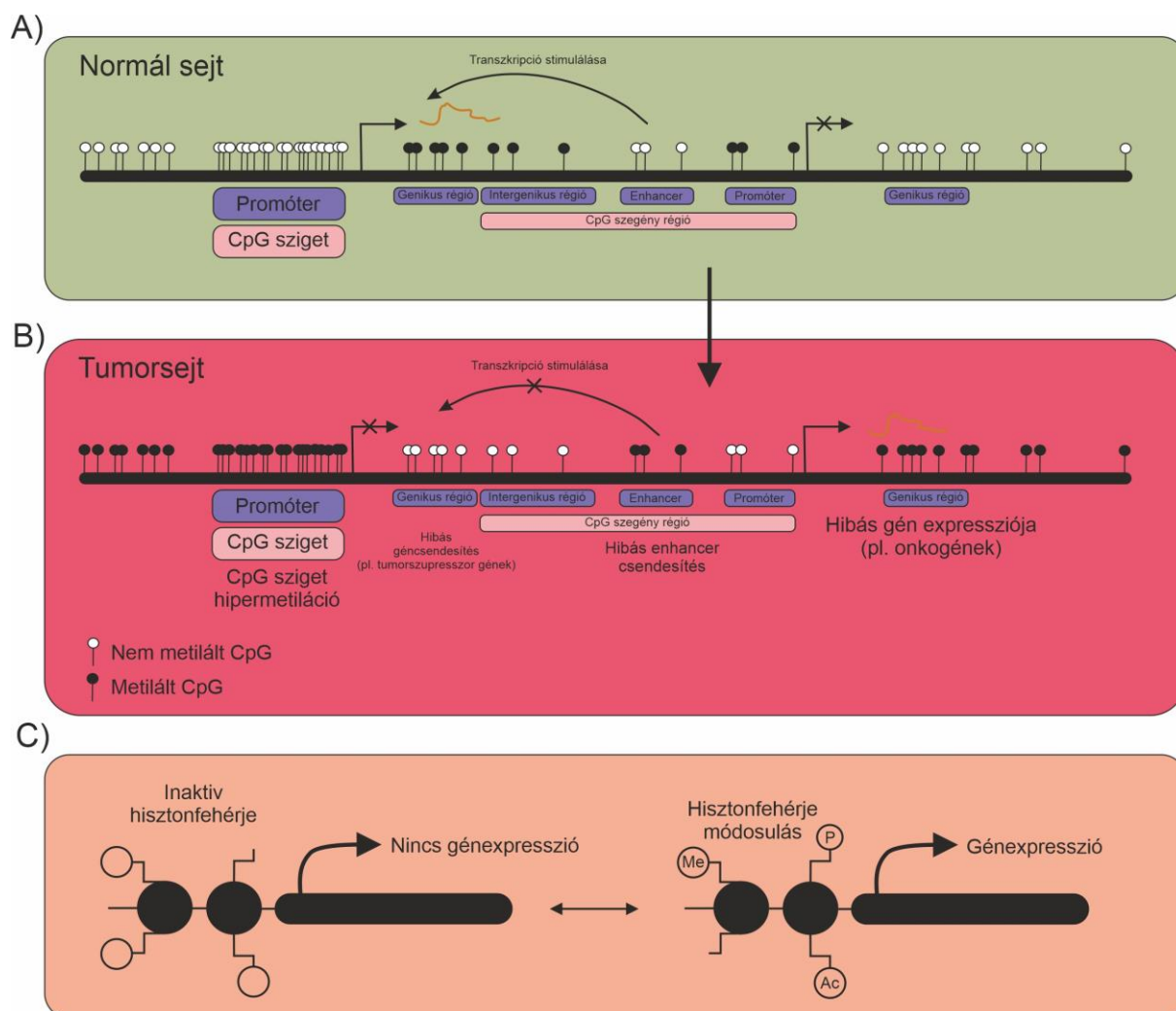
A génexpresszió szabályozásban a DNS demetilációja is fontos szerepet tölt be, mely passzív módon a DNS replikációs ciklusai során, vagy aktív módon a DNS demetiláció során követhet be. A DNS demetilációt a ten-eleven translocation (TET) enzimek, egy dioxigenáz enzimes család tagjai végzik. TET-függő DNS demetiláció esetén egy sor oxidáció megy végbe, melynek eredményeképp az 5-metilcitozinok 5-hidroximetilcitozinokká (5hmC), 5-formilcitozinokká (5fC) vagy 5-karboxilcitozinokká (5caC) konvertálódnak. Ezek közül az 5fC-t és 5caC-t felismerik a DNS exciziós javító faktorai, és módosulatlan citozinokra cserélik, ezáltal bevégezve a DNS demetilációt. Az 5fC-t és 5caC-t továbbá az RNS polimeráz II is felismeri, mely ezáltal lassítja a transzkripciót. Ezek ismeretében a TET-mediált DNS oxidáció

epigenetikai faktorként jelentősnek tekinthető, mivel a transzkripció modulálásával közvetlenül befolyásolja a génexpressziót [39; 40].

Az epigenomikai szabályozás valamennyi mechanizmusa kulcsszerepet játszik a korai embrionális fejlődés, a környezeti hatások által kiváltott válaszok és a tumorerő fejlődése során is. Fontos szintén megemlíteni, hogy e mechanizmusok egymástól nem függetlenek. Például a hiszton poszt-transzlációs módosulása korrelál a promóter transzkripciós aktivitásával. Például a hiszton H3 lizin 4 (H3K4me3) trimetilációja aktív (hipometilált) génpromotereket jelez, míg a H3K9me3 olyan régiókban található, melyek hosszútávú represszió alatt állnak (hipermetilált állapotban) [41]. A H3K4 monometilációját (H3K4me1) pedig az enhancerekhez kötik, de promotereknél is megtalálható [41].

Tumorokra általában jellemző egy genom-szintű, CpG hipometilációs irányú eltolódás, mely gyakran fokozza a normálisan inaktív onkogének átírását a transzkripciós faktorok enhancerekhez és promoterekhez való fokozott hozzáférése által [42] (3. ábra). Azonban fokális hipermetiláció is jelentkezhet, mely gátolhatja például a DNS javító vagy tumor szupresszor gének átírását [42]. GBM-ek 80%-ában a DNS globális hipometilációja figyelhető meg a normális, kiérett agyszövethez képest, mely számos onkogén fokozottabb expressziójához és genomikus instabilitáshoz vezet [43]. A DNS CpG metilációs profilok biomarkerekként is használhatók vérből és egyéb testfolyadékokból a tumorerő korai detektálásához, kezelési lehetőségek felméréséhez, és kiújulás monitorozásához, habár a klinikai gyakorlatba ezt még nem sikerült teljes biztonsággal átültetni [44].

3. Ábra: A CpG metiláció (A,B) és hisztonfehérje módosulás (C) hatása a génexpresszióra



ME: metiláció, P: foszforiláció, Ac: acetiláció

A dolgozat főként a promóterek metilációs státuszával foglalkozik. A promóterek olyan 100-2000 bp DNS szakaszok az átírt géntől többnyire upstream irányban, melyekhez a releváns proteinek, mint pl. RNS polimeráz és különböző transzkripció faktorok kapcsolódnak, hogy elindítsák az adott gén transzkripcióját. A transzkripció „start site” (TSS) a core promóterbe ágyazva helyezkedik el, ahonnan a transzkripció indul a gén 5'-végéről. A TSS-en kívül, a promóter régiók számos más különböző szekvenciát tartalmazhatnak, például CpG szigeteket, TATA-boxot vagy iniciátor régiókat és számos akár távolabb lévő regulátoros elemmel léphetnek kölcsönhatásba (pl. kromatinnal, mely blokkolhatja vagy enhancerekkel, melyek elősegíthetik a transzkripciót) [45].

GBM-ben a legkiterjedtebben tanulmányozott metilációs változás az MGMT (O^6 -methylguanine-DNA methyl-transferase) gén promoterét érinti. Az MGMT enzim normál esetben kijavítja a DNS alkilálószerke (pl. TMZ kemoterápia) által okozott károsodását, viszont ezzel segíti a tumor túlélését és rontja a kezelés hatékonyságát. Következésképpen, az MGMT hipometiláció rossz prognózissal jár. Ellenkezőleg, az MGMT promóterének hipermetilációja a TMZ kemoterápiára adott válasz egy kedvező prognosztikus faktora [46]. A GBM átfogó, genom-szintű DNS metilációs adatainak elemzése vezetett a „glioma-CpG island methylator phenotype” (G-CIMP) elkülönítéséhez, mely számos további tanulmány alapját képezte. A G-CIMP szoros korrelációt mutat az IDH-1/2 gének mutációival és így a proneurális molekuláris alcsoporttal, mely más molekuláris és klinikai paraméterek alapján is külön GBM alcsoportot képez [1. Táblázat] [47, 48].

1. táblázat: GBM molekuláris alcsoportjainak legfontosabb paramétereit, kiegészítve a G-CIMP fenotípussal

	Klasszikus (CL)	Mesenchymalis (MES)	Proneurális (PL)/G-CIMP
Életkor	Idős	Idős	Középkorú
Kromoszóma változás	7-es kromoszóma amplifikáció, 10-es kromoszóma deléció	7-es kromoszóma amplifikáció, 10-es kromoszóma deléció	PL: Normál 7-es és 10-es kromoszóma, G-CIMP: 8-as és 10-es kromoszóma amplifikáció
Jellemző mutáció	EGF és EGFR amplifikáció, EGFRvIII mutáció	NF-1 deléció vagy mutáció	p53 mutáció, IDH-1/2 mutáció
Érintett útvonalak	RTK (EGFR) AKT, CDKN2A	RAS (NF-1) Met	Notch, p53, PDGFRA, IDH, MYC
Prognózis	Rossz	Rossz	Viszonylag jó

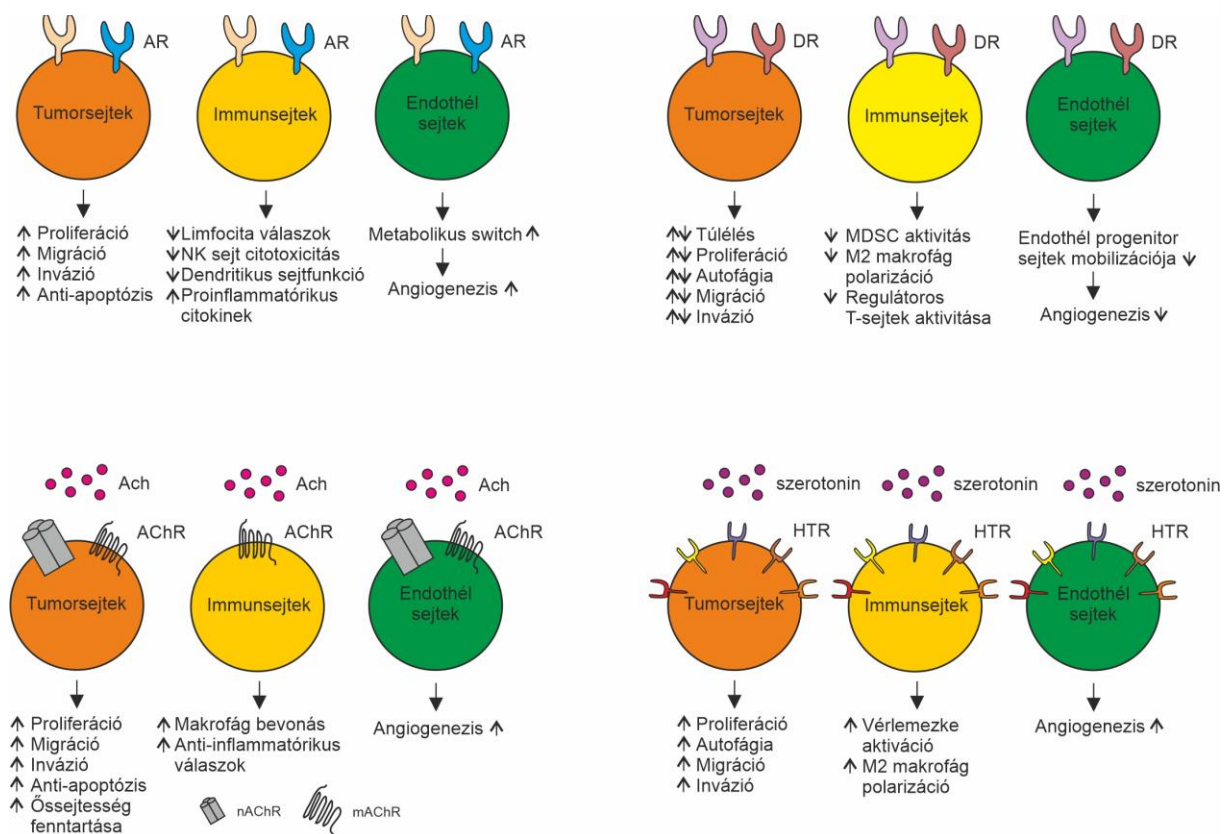
A tumorok klinikai gyakorlatban rutin-szerűen történő formalin-fixálása, paraffinba ágyazása (FFPE) sokáig kizárta e minták genom-szintű (array vagy NGS alapú) tanulmányozását a formalin-okozta DNA károsítás miatt. Azonban a közelmúltban piacra került új könyvtár készítésre alkalmas kit, az RRBS (reduced representation bisulfite sequencing) segítségével e minták NGS feldolgozása is lehetővé vált, melyet mi is alkalmaztunk az alább bemutatásra kerülő GBM metilom tanulmányainkban.

1.4 A neurotranszmitterek tumorbiológiai szerepe

A neurotranszmitterekre általában úgy tekintünk, mint a neuronok által szekretált és speciális neuron receptorokhoz kötődő molekulákra, melyek serkentő és gátló funkciókat közvetítenek. Az utóbbi években azonban már esszenciális mikrokörnyezeti moduláló molekulaként is ismerjük a neurotranszmittereket, melyeknek fontos szerep jut a normál szöveti homeosztázis és a malignus tumor fenotípusok biológiai szabályozásában [49]. Egyre több bizonyíték szól amellett, hogy neurotranszmittereket a glioma sejtek is képesek termelni és expresszált receptorukon keresztül autokrin/parakrin módon önmagukat és mikrokörnyezetüket befolyásolni. Továbbá, e molekulák elősegítik a tumoron belül új idegvégződések formálódását, az ún. neoneurogenézist [50]. Mivel a tumor mikrokörnyezetébe bejutó immun- és endothél sejtek szintén képesek neurotranszmitter receptorokat expresszálni, e sejtek is a neurotranszmitterek befolyása alá kerülnek, míg saját neurotranszmitter termelésük által vissza is hatnak a daganatok növekedésére [51]. A neurotranszmitterek közül különösen a monoaminok (acetilkolin, dopamin, epinephrine, norepinephrine, szerotonin) lehetnek jelentős befolyással a progenitor sejtek proliferációjára és differenciálódására (4. ábra). A leginkább tanulmányozott monoamin neurotranszmitterek az epinephrine (E) és norepinephrine (NE). Ezek a molekulák alpha (α)- és béta (β)-adrenerg receptorokon keresztül fejtik ki hatásukat, melyek 7 transzmembrán régióval rendelkező G-fehérje-kapcsolt receptorok, és a legtöbb emlős szövetben széleskörben jelen vannak. Az E és NE számos tumorbiológiai folyamatban érintett, többek között a tumorsejtek túlélésében, proliferációjában, az apoptózis elleni rezisztencia kialakításában, az inváziós és metasztatikus tulajdonságok, valamint az angiogenezis szabályozásában [52, 53, 54]. A NE képes az endothelsejtek metabolizmusát stimulálni az oxidatív foszforiláción keresztül, mely által segíti az angioneogenezist és a tumor progresszióját [55, 56]. Az E és NE jelentősen befolyásolja a gyulladásozó folyamatokat is a helper és szupresszor T limfociták, B limfociták, természetes ölüsejtek (NK), makrofágok és dendritikus sejtek β -adrenerg receptorain keresztül [51].

Másik nagyon fontos neurotranszmitter az E és NE szintézisének prekuzora, a dopamin (D). A dopamin a szinaptikus terminálok citoplazmájában szintetizálódik, hatását pedig öt különböző, hét transzmembrán domént tartalmazó G-fehérje-kapcsolt receptoron keresztül fejti ki. Ezek két csoportba, a D1 dopamine receptorok (DRD1, DRD5) és a D2 dopamine receptorok (DRD2, DRD3, DRD4) csoportjába sorolhatók. A dopamin nem kategorizálható sem gátló, sem serkentő szignálként, mert hatása receptorfüggő [57]. A neuronális őssejteken és progenitorsejteken kívül, oligodendrocita progenitor sejtek (OPC) is expresszálnak dopamin receptorokat. Ezeket a sejteket érő dopamin szignalizáció a DRD3 receptorokon keresztül történik, és nagyban hozzájárul a dedifferenciált stádium fenntartásához, mely feltételezhetően a gliomagenézis során is egy aktív útvonal [58]. GBM esetében a tumorsejtek egy erősen specifikus mikro környezetben léteznek és sokféle szekretált faktornak vannak kitéve. A fölösleges és/vagy az idegvégződésbe vissza nem juttatott monoaminok interakcióba léphetnek GSC-ekkel és a környező endothél sejtekkel is. Mivel ezek a sejtek is expresszálnak monoamine receptorokat, ezek aktivációja a GBM növekedésének modulációját

4. ábra Neurotranszmitterek szerepe a tumorok kialakulásában és progressiójában



E: epinephrine; NE: norepinephrine; AR: adrenoreceptor; DR: dopamin receptor; MDSC: myeloid-derived suppressor cell; ACh: acetyl-choline; nAChR: nikotinos acethyl-choline receptor; mAChR: muscarinos acethyl-choline receptor; HTR: 5-HT(szerotonin) receptor [49].

eredményezheti [58]. A fenti megfigyeléseket, valamint a saját, hipotézismentes DNS CpG metilációs eredményeinket figyelembe véve, kutatócsoportunk szintén megvizsgálta néhány catekolamin marker promoterének és génjének differenciált metilációját korai és recidiv GBM-ben (DRD2, ADRA1D, ADRBK1/GRK2, SLC18A2/VMAT2). Ezekről a markerekről csak nagyon korlátozott eredmények szerepeltek eddig a GBM szakirodalomban, hosszmetzeti megfigyeléseket pedig egyáltalán nem találtunk.

2. Hipotézisek és célkitűzések

2.1 Hipotézisek

- Bizonyos jelátvivő útvonalak differenciált metiláltsági státusza fontos befolyásoló tényező a GBM kialakulásában és fejlődésében
- Egyes jelátvivő útvonalak differenciáltan metiláltak primer és recidiv GBM tumorminták között
- A promoter és gén metilációs mintázatok fordított korrelációt mutatnak a fehérje expresszió szintjével primer és recidiv GBM-ben
- A differenciáltan metilált promoterek és gének, valamint differenciáltan expressziált fehérjék azonosítása segíti a gliomagenézisben szerepet játszó molekulák felfedezését

2.2 Célkitűzések

- A differenciáltan metilált DNS CpG-szigetek, gének és molekuláris útvonalak genomszinű meghatározása primer és recidiv GBM mintapárokban normál kontroll mintákhoz képest
- A differenciáltan metilált DNS CpG-szigetek, gének és molekuláris útvonalak azonosítása primer és recidiv GBM mintapárokban
- Korrelációk meghatározása szelektált catekolamin promoterek és gének metiláltsági foka, valamint azok fehérje termékeinek expressziója között szekvenciális GBM mintapárokban
- A catekolaminok szerepének feltárása a GBM kialakulásában és progressziójában

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 Pécsi Tudományegyetem (PTE) Regionális Tudományos Etikai Bizottságának (RKEB) a jóváhagyásával történt. Az etikai döntés dokumentációja: PTE

RKEB 7517-2018 és 2019 protokollok jóváhagyása. A kutatáshoz felhasznált mintákat a betegek műtétje során szerzett, a rutin patológiai vizsgálatokból visszamaradt FFPE blokkokból nyertük. Kizárólag retrospektív anyag került a tanulmányba.

3.2 Beteganyag a dolgozat két tanulmányában

3.2.1 Általános adatok

A szekvenciális GBM minták 1997 és 2017 között kerültek összegyűjtésre és nyilvántartásba a PTE Általános Orvostudományi Kar (ÁOK) Patológiai Intézetében. A GBM párok esetében a primer minták mindegyike a sugár-és kemoterápiai kezeléseket megelőző állapotból származott, míg a recidív minták a kezeléseket követően kerültek eltávolításra. A minták kiválasztását és a kohortok kialakítását minőségellenőrzés előzte meg, mely során a minták HE (hematoxylin-eosin) festésen és IDH-1 R132H mutáció analízisen estek át.

3.2.2 DNS CpG metilációs mintázatok genom-szintű elemzése kontrollok és szekvenciális GBM mintapárok kohortjaiban

Az első tanulmányban 24 betegből 48 FFPE IDH-1 R132H mutáció negatív GBM blokk (24 primer és 24 recidív tumor) állt rendelkezésünkre. A klinikai adatok áttekintését követően 2 beteg mintáit a kiugróan fiatal koruk miatt kizártuk a vizsgálatból, így 22 betegből 44 minta került be a tanulmányba. A 22 betegből 8 nő és 14 férfi volt (**2. Táblázat**), az első műtétet követően 18 beteg kapott irradiációt és temozolomid alapú kemoterápiát, míg 4 beteg esetében a dokumentáció nem tartalmazott adatot a kezelésekről (**3. Táblázat**).

A primer és recidív tumorok hisztológiai tulajdonságait a **4. és 5. táblázat** összegezi.

A metilációs elemzéseinkhez 5 epilepszia műtétből származó beteg RRBS adatait használtuk fel metilációs kontrollcsoportként a European Nucleotide Archive adatbázisból. A metilációs adataink validálásához ugyanezen adatbázisból 112 primer és recidív GBM mintapár RRBS adatait használtuk fel (<https://www.ebi.ac.uk/ena>, hozzáférési szám: EGAS00001002538) [51]. Hasonlóan a saját kohortunk betegmintáihoz, ezek az adatok is műtéti eredetű, FFPE GBM mintákból származtak.

2. Táblázat: A szekvenciális GBM kohort betegek demográfiai adatai

Nem	Betegszám	Primer tumor			Recidiv tumor		
		Életkor a primer tumor diagnózisakor (Átlag)	Életkor a primer tumor diagnózisakor (Medián)	Életkor a primer tumor diagnózisakor (Eloszlás)	Életkor a recidiv tumor diagnózisakor (Átlag)	Életkor a recidiv tumor diagnózisakor (Medián)	Életkor a recidiv tumor diagnózisakor (Eloszlás)
Férfi	14	50	48	32-66	51	48	36-68
Nő	8	53	55	38-63	55	56	39-64
Összes	22	51	51	32-66	52	52	36-68

3. Táblázat: A szekvenciális GBM kohort betegek egyéni klinikai adatai

Primer tumor	Recidiv tumor	Nem	Életkor a primer tumor megjelenésekor (Évek)	Életkor a recidiv tumor megjelenésekor (Évek)	Beteg életkora a halál időpontjában (Évek)	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 + besugárzás
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
8117/2015	2908/2017	Nő	38	39	40	92	106	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

4. Táblázat: A primer tumorok patológiai sajátosságai

Primer tumorok patológiai tulajdonságai						
GBM1	RRBS ID	MI	MVP	Nekrózis	Sejtvonal	TIL
15043	1	36	igen	nincs	asztrocita	mérsékelt
9501	2	2	igen	kiterjedt, paliszádokkal	asztrocita	mérsékelt
15916	4	10	igen	nincs	asztrocita	nincs
9886	5	91	igen	kiterjedt	asztrocita	nincs
3094	6	120	igen	kiterjedt	asztrocita	sűrű
5526	7	20	igen	kiterjedt	asztrocita	ritka
13501	8	13	igen	kiterjedt	epithéliális	ritka
12732	9	2	igen	kiterjedt, paliszádokkal	asztrocita	mérsékelt
17578	10	0	nem	kiterjedt	asztrocita	sűrű
15466	11	18	igen	kiterjedt	asztrocita	sűrű
10379	12	30	igen	kiterjedt	kis sejtes	sűrű
14561	13	36	igen	kiterjedt, paliszádokkal	asztrocita	ritka
2525	14	38	igen	kiterjedt, paliszádokkal	asztrocita	ritka
14642	15	78	igen	kiterjedt, paliszádokkal	kis sejtes	sűrű
5693	16	42	igen	kiterjedt, paliszádokkal	asztrocita	ritka
7183	17	44	igen	kiterjedt, paliszádokkal	asztrocita	ritka
6795	18	15	igen	kiterjedt	asztrocita	ritka
16189	19	24	nem	nincs	kis sejtes	ritka
8117	20	25	igen	nincs	asztrocita	sűrű
3997	21	12	igen	paliszád	asztrocita	ritka
10776	23	32	igen	kiterjedt	asztrocita	ritka
13956	24	32	igen	kiterjedt	asztrocita	ritka

MI: mitotikus index; MVP: mikrovaszkuláris proliferáció; TIL: tumor infiltráló limfociták)

5. Táblázat: A recidív tumorok patológiai sajátosságai

Recidív GBM tumorok patológiai tulajdonságai						
GBM2	RRBS ID	MI	MVP	Necrosis	Cell	TIL
9849	R1	100	igen	kiterjedt, paliszádokkal	kis sejtes	ritka
3624	R2	2	nem	nincs	asztrocita	sűrű
9527	R4	32	igen	kiterjedt, paliszádokkal	kis sejtes	nincs
15289	R5	94	igen	kiterjedt	asztrocita	ritka
15302	R6	4	nem	kiterjedt	asztrocita	ritka
13808	R7	21	nem	nincs	asztrocita	ritka
9614	R8	20	nem	kiterjedt, paliszádokkal	epithéliális	ritka
17440	R9	14	nem	kiterjedt	asztrocita	ritka
7779	R10	50	igen	paliszád	asztrocita	mérsékelt
16534	R11	14	igen	kiterjedt	asztrocita	sűrű
7536	R12	62	igen	paliszád	asztrocita	sűrű
2315	R13	36	igen	paliszád	asztrocita	ritka
1365	R14	40	igen	nincs	asztrocita	sűrű
7990	R15	16	igen	kiterjedt, paliszádokkal	kis sejtes	sűrű
612	R16	12	igen	kiterjedt, paliszádokkal	asztrocita	sűrű
11956	R17	22	igen	paliszád	asztrocita	ritka
17545	R18	18	nem	kiterjedt, paliszádokkal	asztrocita	ritka
16742	R19	18	nem	kiterjedt, paliszádokkal	kis sejtes	ritka
2908	R20	20	igen	paliszád	asztrocita	nincs
5120	R21	18	igen	kiterjedt, paliszádokkal	asztrocita	ritka
2168	R23	10	nem	nincs	kis sejtes	sűrű
12107	R24	16	nem	paliszád	asztrocita	sűrű

MI: mitotikus index; MVP: mikrovaszkuláris proliferáció; TIL: tumor infiltráló limfociták)

3.2.3 Négy szelektált katekolamin marker promoter+gén DNS CpG metilációjának és fehérje expressziójának mennyiségi meghatározása egyedi kontroll mintákban és szekvenciális GBM mintapárokban

Négy szelektált katekolamin marker promoter + gén régiójának fókuszált DNS CpG metilációját egyéni mintákban is mennyiségileg meghatároztuk a 3.2.2 fejezet 22 pár primer és recidív GBM mintáiban. Majd e négy kiválasztott katekolamin marker fehérje expressziós elemzéseit is elvégeztük ugyanazon GBM FFPE blokkokból, mint az epigenomikai elemzéseket. Azonban a minták korlátozott mennyisége miatt 1 további beteg anyagát ki kellett zárunk a fehérje expressziós vizsgálatból (8117/2015-2908/2017). A katekolamin útvonalak metilációs és fehérje expressziós vizsgálatait így a 21 szekvenciális GBM mintapáron végeztük el. A katekolamin markerek expressziós vizsgálataihoz 6 FFPE post

mortem kontroll agyi mintát használtunk fel, mivel etikai okokból műtéileg eltávolított normál agyszövet nem állt rendelkezésünkre (Másképpen, a DNS metilációs vizsgálatainkhoz ez a postmortem anyag technikai okokból nem volt használható kontrollként).

3.3 Módszerek

3.3.1 DNS izolálás

Az FFPE blokkokból 4-5 darab 5 µm vastagságú metszetet készítettünk, amelyről a lehető legalaposabban eltávolítottuk a paraffint mielőtt Eppendorf csőbe helyeztünk. Az FFPE mintákat xilollal deparaffináltuk, majd alkoholos mosás után a QiaGen® QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen®, Hilden, Németország) oszlopos DNS izolálási módszert alkalmaztuk. Az oszlopokról a DNS-t 50 µl -ben eluáltuk, és további felhasználásig -20 °C-on tároltuk. Az eluátum koncentrációját a Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit segítségével határoztuk meg egy Qubit 3 Fluorimeteren (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Az izolált DNS minőségi ellenőrzését fragmentanalízissel végeztük az Agilent Genomic DNA ScreenTape Assay kit felhasználásával egy Agilent 4200 TapeStation System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) készüléken.

3.3.2 Könyvtárkészítés

Az izolált DNS-ekből az RRBS kit 24x (Diagenode SA, Seraing, Belgium) felhasználásával, a gyártó által javasolt protokolltól egy pilot tanulmány optimalizálási eredményei alapján minimálisan eltérve, biszulfid konvertált könyvtárakat készítettünk. Mivel az FFPE mintákban a formalinos kezelés a DNS különböző mértékű fragmentációját okozza, a könyvtárkészítéshez ajánlott 100-200 ng input DNS mennyiséget az Agilent TapeStation elemzésben meghatározott fragmentációtól függő mértékben megemelt (350-400 ng) DNS mennyiséggel helyettesítettük. Amennyiben a 2000bp feletti fragmentek aránya nem érte el a 20%-ot, 400 ng-ot, ha meghaladta azt, 350 ng mennyiséget használtunk fel a könyvtárkészítés folyamán.

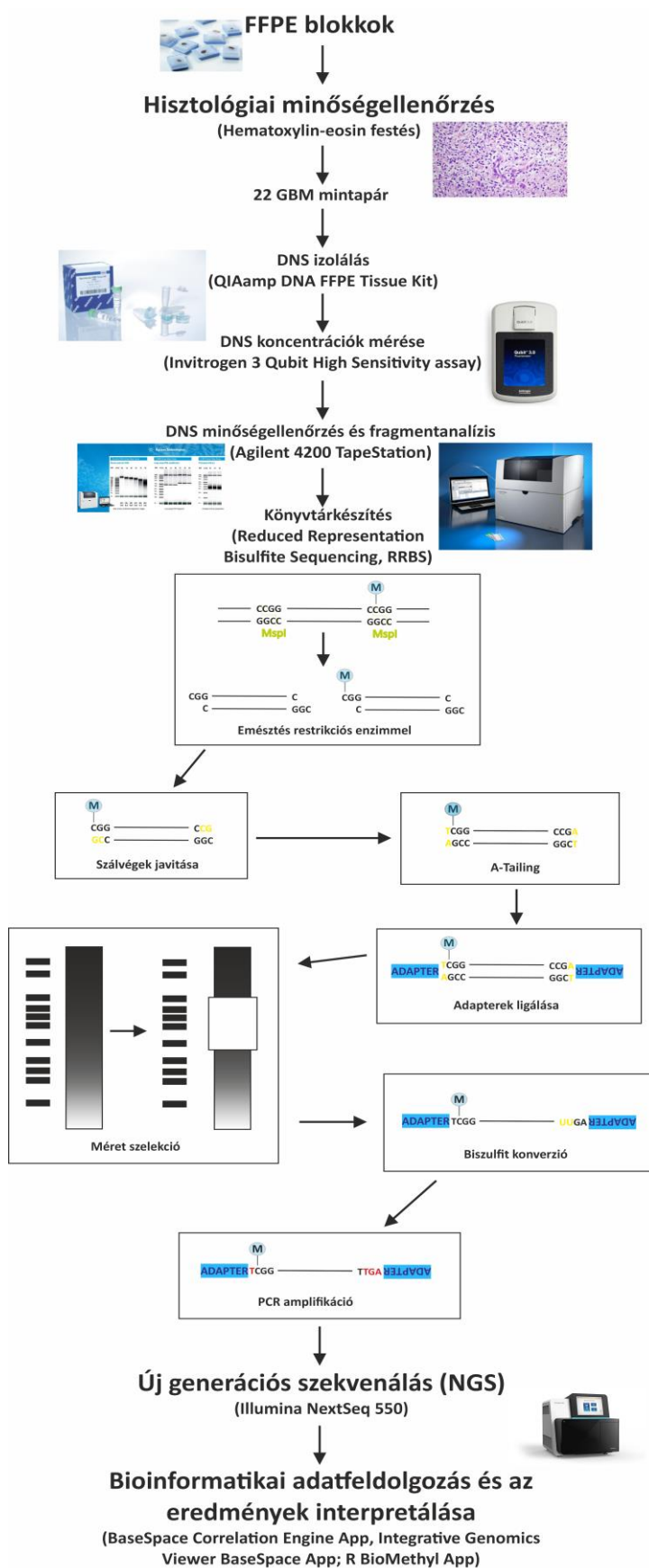
Az RRBS könyvtárkészítés folyamata röviden a következőképpen zajlott:

Első fázis: Kiszámoltuk, hogy az egyes DNS eluátumokból a megfelelő (350-400 ng) mennyiség eléréséhez mekkora térfogatot kell felhasználnunk. Az RRBS reakció első lépéséhez maximum 26 µl lehetett a minta térfogata, így abban az esetben, ha a szükséges mennyiséget ennél nagyobb térfogat felhasználásával lehetett volna csak elérni, vákuumos koncentrációt alkalmaztunk, amíg a megfelelő térfogatot el nem értük. A könyvtárkészítés első lépéseként egy CCGG felismerőhellyel rendelkező MspI nevű restrikciós endonukleázzal

emésztettük meg a megfelelő mennyiségű input DNS-t. A 26 µl-nyi mintához 4 µl enzimatikus emésztő keveréket adtunk, majd az emésztést egy GeneAmp PCR Systems 9700 (Applied Biosystems, Foster City, Egyesült Államok) készüléken futtattuk le a protokollban szereplő beállításokkal (37 °C 12 órás emésztés, majd 8 °C-on való tárolás). Az emésztés folyamatának eredményeképp olyan változó nagyságú DNS fragmentumokat kaptunk, melyek végén CpG dinukleotidok találhatóak.

Második fázis: A emésztés folyamatából nyert DNS fragmentumok végeit egy ún. „ends preparation mix” segítségével készítettük elő a következő fázishoz. Az előkészítő kezelés egy thermocycler készülékben történt a gyártó által meghatározott paraméterekkel: 30°C 20 perc → 37°C 20 perc → 75°C 20 perc → tárolás 8°C-on. Az így kezelt fragmentumok végei már alkalmasak voltak adaptereket kötésére. Ezt az ún. „ligation mix” segítségével értük el szintén a gyártó által meghatározott paraméterekkel beállított thermocyclerben: 25°C 20 perc → 65°C 10 perc → tárolás 8°C-on. Az adapterek ligálását követően egy méretszelekciós lépés következett, melyet egy mágneses Eppendorf-cső tartóban végeztünk AMPure XP Bead (Beckman Coulter, Washington D.C., Egyesült Államok) felhasználásával. A méretszelektált fragmentek minőségét a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) készüléken végeztük a KAPA SYBR Fast qPCR kit (Kapabiosystems, Cape Town, South Africa) felhasználásával a protokollban megállapított paraméterek szerint: denaturáció 98°C-on 3 perc-ig (1x), majd denaturáció 95°C-on 15 másodpercig → kapcsolódás 60°C-on 30 másodpercig → lánchosszabbítás 72°C-on 30 másodpercig (25x) → tárolás 4°C-on. Nyolc-nyolc könyvtárat a kvantitatív (q)PCR CT (threshold cycle) értékeik alapján szekvenálási pool-okba rendeztünk. Azonos pool-ba olyan könyvtárak kerültek, melyek CT értékei a lehető legkisebb eltérést mutattak egymáshoz viszonyítva. A pool-ok összeállítását követően elvégeztük a biszulfít konverziós lépést, mely során a metilálatlan citozinok uracillá deaminálódtak, ezzel szemben a metilált citozinok esetében nem történt változás a metilcsoport protektív hatása miatt. A biszulfít konverziót a GeneAmp PCR Systems 9700 készüléken végeztük a következő paraméterek betartásával: denaturáció : 95°C-on 1 percig → konverzió 60°C-on 10 percig (20x) → tárolás 4°C-on.

5. ábra: Az RRBS módszerrel végzett könyvtárkészítés, NGS és elemzés folyamata



Harmadik fázis: A konvertált könyvtárak egy újabb qPCR tesztelésen estek át, hogy meghatároztuk az optimális ciklusszámot a könyvtár PCR amplifikációjához. A qPCR reakció paraméterei a következők voltak: első denaturáció 98°C-on 3 percig (1x), majd denaturáció 95°C-on 15 másodpercig → kapcsolódás 60°C-on 30 másodpercig → lánchosszabítás 72°C-on 30 másodpercig (30x) → tárolás 4°C-on. Ezt követte a könyvtár végső, NGS előtti PCR amplifikációja a Pool qPCR-jából nyert CT – 1 ciklusszámmal: első denaturáció 95°C-on 5 percig (1x), denaturáció: 98°C-on 20 másodpercig → kapcsolódás: 60°C-on 15 másodpercig → lánchosszabítás 72°C-on 45 másodpercig (Pool CT-1 ciklusszámmal) → végső lánchosszabítás 72°C-on 7 percig (1x) → tárolás 4°C-on. Az amplifikált pool-okat egy utolsó tisztítási fázisnak vetettük alá az AMPure XP Bead-ek segítségével, majd elvégeztük a tisztított könyvtár DNS-ek fragmentanalízisét a 4200 TapeStation System készüléken High Sensitivity D5000 ScreenTape/Reagents kit segítségével. Végül DNS koncentrációmérést végeztünk egy Qubit 3 Fluorimeterrel. Az amplifikált könyvtárakat egy NextSeq 550 (Illumina, San Diego, CA, USA) szekvenáló készüléken NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75ciklus) segítségével szekvenáltuk meg. A nyers szekvenálási adatok a European Nucleotide Archive-ba kerültek feltöltésre (<https://www.ebi.ac.uk/ena>, Primary Accession: PRJEB38380, Secondary Accession: ERP121800).

3.3.3 Bioinformatikai elemzés

Szekvenálási adataink bioinformatikai kiértékelésének egyes lépései bioinformatikus kollégánk segítségével történtek. A NextSeq 550 által kiadott nyers szekvenálási adatok minőségét a FastQC programmal ellenőriztük, majd az alacsony minőségű szekvenciákat és adaptereket a TrimGalore szoftverrel szűrtük ki. Az RRBS szekvenciáinkat a hg19 (GRCh37) referencia genommal vetettük össze. A biszulfid konvertált read-eket és a potenciális metilációs pontokat a Bismark program segítségével határoztuk meg és értékeltük ki. Az R szoftverrel, annak RnBeads plugin-jével kiegészítve, kohort szinten azonosítottuk a differenciáltan metilált CpG helyeket, promotereket, régiókat és géneket, továbbá a Gene Ontology (GO) analízissel megvizsgáltuk a differenciáltan metilált jelátviteli útvonalakat a kontrollok, valamint a primer és recidiv GBM tumorok kohortjaiban. Az eredmények alapján szelektált katekolamin markerek metilációs szintjét és megoszlását a markerek promoter és downstream génrégiójában (a továbbiakban a rövidség érdekében a „promoter+gén régió” kifejezés használatával) magunk vizsgáltuk meg egyéni mintákban, a bioinformatikus által a tanulmányhoz szerkesztett script segítségével, melyet szintén az R szoftverben a BioMethyl

csomaggal futtattunk le. A parancssor részletei itt megtalálhatók:

<https://github.com/galikbence/MethylPatternViz>. Az általunk használt formula:

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

Ebbe behelyezve a megfelelő katekolamin marker paramétereit (kromoszóma azonosító száma, és a választott régió kromoszómán belüli start és végpontja) elemezhettük az egyéni primer és recidiv tumorpárokban az adott régió metilációs szintjét és megoszlását százalékos és grafikus formában. Egy adott minta egyedi metilációját a program úgy határozta meg, hogy a megadott régióba belül azonosította a metilált helyeket egyenként az összes mintában, majd ezeket összegezve megkaptuk a régióban azonosított CpG-k számát. Ezeknek a CpG-nek egyedi szinten meghatározta a metiláltsági fokát 0 és 100% között, végül a metilált helyek számát elosztotta az összes lehetséges (detektált) CpG számával és megszorozta 100-zal.

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

3.3.4 Immunhisztokémia

A használni kívánt elsődleges antitesteket egy pilot IHC tanulmány keretein belül optimalizáltuk, meghatároztuk az adott antitestekre legmegfelelőbb feltérési eljárást és hígítási arányt, illetve ellenőriztük az antitestek specificitását (6. Táblázat).

6. Táblázat: A kvantitatív IHC vizsgálatban használt primer antitestek paramétereit

A kvantitatív IHC tanulmány során használt primer antitestek						
Gyártó	Származási hely	Katalógusszám	Elsődleges antitest	Klonalitás	Immunogén szekvencia	Hígítás
Biorbyt	Egyesült Királyság, Cambridge	orb500970	DRD2	Poliklonális (nyúl)	KLH konjugált szintetikus peptid a humán DRD2 aa11-90 régiójából	1:250
Biorbyt	Egyesült Királyság, Cambridge	orb382461	ADRA1D	Poliklonális (nyúl)	KLH konjugált szintetikus peptid a humán ADRA1D C-terminális régió szekvenciájával	1:100
Biorbyt	Egyesült Királyság, Cambridge	orb213536	ADRBK1	Poliklonális (nyúl)	KLH konjugált szintetikus peptid a humán GRK2 C-terminális szekvenciájával	1:200
Biorbyt	Egyesült Királyság, Cambridge	orb229222	SLC18A2	Poliklonális (nyúl)	Szintetikus humán SLC18A2 peptid	1:100

Az antitestek specificitásának ellenőrzését különböző szövettani eredetű tumorokban végeztük, melyekről korábbi eredmények alapján ismert az adott antigének expressziója (pozitív kontroll), illetve amelyekben az adott markerek ismerten biztosan nem expresszálódnak (negatív kontroll). További negatív kontrollként egy technikai kontrollt is alkalmaztunk minden kísérlet során, mely esetében csak a Novolink másodlagos antitestjét és szubsztrát reakcióját alkalmaztuk az elsődleges antitest elhagyásával. Az elsődleges antitestek kötődését és expresszióját olyan GBM szövetmintákban validáltuk, amelyek nem szerepeltek a fő tanulmányban. A metszetek elkészítését egy manuális mikrotómmal végeztük Microtome Blade A35 (Feather®, Osaka, Japán) pengék segítségével. Az FFPE blokkokból 3-5 µm vastagságú metszeteket Superfrost Ultra Plus J3800AMNZ (Thermo Scientific®, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok) tárgylemezre vittünk fel és száradni hagytuk egy napig.

A kvantitativ IHC vizsgálat folyamata a következőképpen zajlott:

Első lépésként a tárgylemezre felvitt szövetmintákat körberajzoltuk egy hidrofób gyűrűt képező PAP PEN tollal (Biotium Inc. Fremont, Egyesült Államok és San Francisco, Egyesült Államok), hogy megakadályozzuk a higított antitest lefolyását a szövetről. Az elsődleges antitesteket Tween20 mentes TBS (tris-buffered-saline) pufferrel higítottuk az optimalizált koncentrációkra. A szövetmintákat 95°C-os 0.01M citrát-pufferbe merítve mikrohullámú sütőben tártuk fel. A mosási lépéseket Tween20 detergenst tartalmazó TBS pufferrel végeztük. Az elsődleges antitesteket minden esetben 100 µl térfogatban vittük fel a lemezekre, kötődésük detektálását pedig a NovoLink Polymer Detection Systems RE-7150-K (Leica Biosystems, Newcastle, Egyesült Királyság) kittel végeztük. A specifikusan kötődött antitesteket DAB-al (diamino-benzidin) tettük láthatóvá tormaperoxidáz reakció révén. Az elkészült és festett lemezekre fedőanyagként pertexet (Mitsui&Co. Ltd. Osaka, Japán) vittünk fel, majd ezt Manzel-Gläser (Thermo Scientific®, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok) tárgylemezfedővel fedtük le és hagytuk száradni.

Egy patológus szakorvos kolléga a Hematoxylin-Eosin (HE) festési alapú hisztológiai minta szelekció során, valamint az IHC készítmények áttekintése alapján meghatározta GBM metszetekben a „region of interest”-eket (ROI). Ezek a régiók azok, ahol a tumor a legmalignusabbnak látszott, magas cellularitással, intenzív mitotikus aktivitással és polimorf sejtmagokkal, de a lehető legminimálisabb nekrozissal és vaszkularitással. Ezután a kiértékelést először manuálisan végeztük a ROI-kon belüli három látótér kijelölésével és azokon belül 100-100 sejt leolvasásával. Ezekben meghatároztuk a festődött sejtek számát százalékos formában, majd a festődés intenzitását egy 0-3-ig terjedő skálán (0; +; ++; +++).

Ezek alapján számoltuk ki a „complex score”-t (CS) a festődött sejtek százalékos értékét megszorozva az intenzitás numerikus értékével. A metszeteket három független leolvasó is kiértékelte. A manuális kiértékeléshez egy Nikon Optiphot-2 (Nikon Corp. Japan) mikroszkópot használtunk. A festett lemezeinket digitalizáltuk a PTE ÁOK Patológia Intézetben található MIDI II Scannerrel és a 3DHisTech Panoramic Viewer 1.15 szoftverrel digitálisan is kiértékeljük.

3.3.5 Statisztikai elemzések

A tumorok patológiai karakterisztikáját, a betegek klinikai adatait, illetve a katekolamin markerek kvantitativ IHC eredményeinek (CS értékeinek) median és interkvartilis tartományát hasonlítottuk össze, különböző statisztikai próbák során. Minden statisztikai próbát az SSPS v.26.0 szoftvercsomag felhasználásával végeztünk el (SAGE, IBM® SPSS® Statistics v26.0). Az adataink minden esetben nem parametrikus eloszlást követtek, ezért non-parametrikus tesztek alkalmaztunk. Két független minta összehasonlítása esetén Mann-Whitney U tesztet, míg egymástól függő minták összehasonlítása esetén Wilcoxon signed rank tesztet használtunk. Több minta egyidejű összehasonlítása esetén Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk.

4. Eredmények

4.1 Genom-szintű CpG metilációs elemzések az CG2 - GBM1 - GBM2 kohortokban

4.1.1 Genomikus DNS fragmentmegoszlások összehasonlítása FFPE postmortem GBM, FFPE műtéti GBM, buffy coat és teljes vérmintákból

Tanulmányunk célja volt, hogy összehasonlítsuk a DNS CpG metiláció mintázatát „normál” agyszövetben és IDH-vad típusú GBM mintákban az első diagnózist követően (GBM1) illetve a kezelés után kiújult tumorokban (GBM2). Mivel a kontrollválasztás több oldalról is korlátokkal járt, két kontrollcsoportot mérlegeltünk: az egyik csoport 6 postmortem agymintából állt (CG1), melyek olyan betegekből származtak, akik nem neurológiai okokból hunytak el; a másik egy adatbázis kontroll csoport volt, amelyet 5 beteg epilepszia műtétekből származó agymintáinak DNS metilációs (RRBS-ből származó) adatai alkottak (CG2). Elővizsgálataink során meghatároztuk a különböző minta kohortok DNS fragmentációjának mértékét TapeStation analízissel. Az analízis 150-60000 bp-os tartományban méri a genomikus DNS fragmentek megoszlási arányát és mennyiségét. A két tumorcsoport eredményei között minimális, nem szignifikáns különbség volt csak detektálható (**7A-7B Táblázat; 6-7 ábra**).

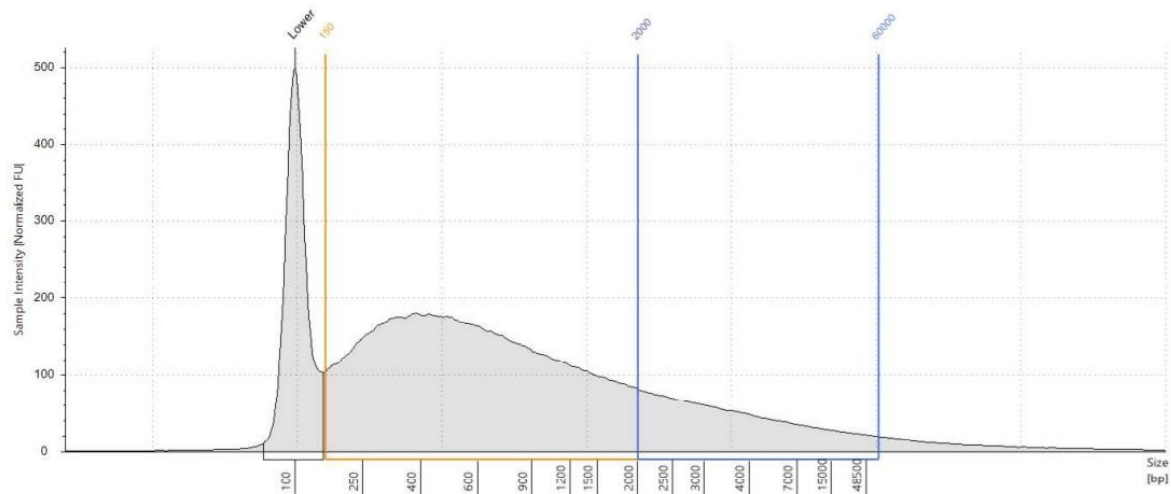
7A. Táblázat A primer GBM tumorminták DNS fragment megoszlása

GBM1	Átlagos méret 150-2000 bp között	%-os megoszlás	Átlagos méret 2000-60000 bp között	%-os megoszlás
15043/1999	558	85%	7014	10%
9501/2001	700	66%	7810	23%
11474/2001	690	77%	6688	17%
15916/2003	647	80%	6571	16%
9886/2004	745	76%	6267	20%
3094/2006	771	74%	6954	21%
5526/2007	603	80%	7446	15%
13501/2007/C1	620	84%	6073	12%
12732/2008	660	76%	7081	17%
17578/2008	583	83%	7598	13%
15466/09	810	75%	6105	22%
10379/2010A	659	79%	7003	17%
14561/2010/1	767	73%	6665	24%
2525/2011/B	813	65%	7275	28%
14642/2011/1	770	77%	6188	20%
5693/2012/1	781	79%	5699	18%
7183/2012/1	682	70%	8274	19%
6795/2013/1	815	64%	7404	26%
16189/2014	1029	44%	7410	42%
8117/2015	504	84%	7668	11%
3997/2016	887	68%	6184	28%
10776/2016	986	64%	5428	30%
13956/16/1	1057	46%	6387	44%
Átlag	745,08	72,56%	6834,43	21,44%

6. Ábra: Reprezentatív kép a fragmentanalízis eredményéről egy primer tumor mintából, TapeStation 4200 rendszerből

Peak Table

Size [bp]	Calibrated Conc. [ng/ul]	Assigned Conc. [ng/ul]	% Integrated Area	From [bp]	To [bp]	Peak Comment	Observations
100	8.50	8.50	-	65	146		Lower Marker
424	5.05	-	100.00	351	477		



Region Table

From [bp]	To [bp]	Average Size [bp]	Conc. [ng/ul]	Region Molarity [nmol/l]	% of Total	Region Comment	Color
150	2000	690	29.5	100	77.30		Orange
2000	60000	6688	7.39	3.30	19.39		Blue

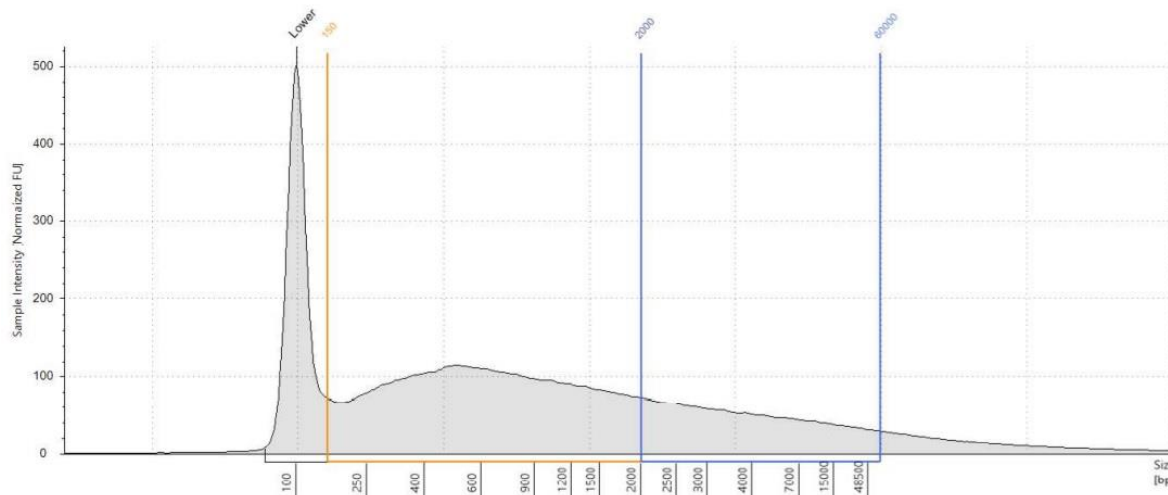
7B. Táblázat: A recidív GBM tumorminták DNS fragment megoszlása

GBM2	Átlagos méret 150-2000 bp között	%-os megoszlás	Átlagos méret 2000-60000 bp között	%-os megoszlás
9849/2000	796	66%	7548	27%
3624/2002	731	65%	8767	23%
3365/2002	756	66%	7965	27%
9527/2004	658	85%	5806	12%
15289/2004	890	59%	7378	33%
15302/2006	735	79%	6473	16%
13808/2008/1	494	85%	8538	23%
9614/2008/1	771	64%	7848	24%
17440/2010/1	685	77%	6925	18%
7779/2010/B	792	66%	6836	26%
16534/10	726	79%	6530	17%
7536/2014	699	81%	5960	16%
2315/2012/A	948	60%	6634	33%
1365/2013/1	929	59%	6834	32%
7990/2014/1	758	66%	7479	24%
612/2015/1	848	75%	5815	23%
11956/2012	783	77%	5823	21%
17545/2013	876	60%	7472	32%
16742/2015	928	65%	6769	29%
2908/2017	1040	40%	8204	43%
5120/2017	699	80%	6894	17%
2168/2017	887	57%	7231	34%
12107/17/1	965	64%	6125	29%
Átlag	799,73	68,44%	7037,13	25,19%

7. Ábra: Reprezentatív kép a fragmentanalízis eredményéről egy recidív tumor mintából, TapeStation 4200 rendszerből

Peak Table

Size [bp]	Calibrated Conc. [ng/ μ l]	Assigned Conc. [ng/ μ l]	% Integrated Area	From [bp]	To [bp]	Peak Comment	Observations
100	8.50	8.50	-	66	149		Lower Marker
516	2.59	-	98.23	415	526		
-	-	-	-	-	-		Sample Well



Region Table

From [bp]	To [bp]	Average Size [bp]	Conc. [ng/ μ l]	Region Molarity [nmol/l]	% of Total	Region Comment	Color
150	2000	756	19.8	62.9	66.14		Orange
2000	60000	7965	7.98	3.32	26.66		Blue

Szintén megvizsgáltuk a fragmentáció mértékét olyan DNS mintában, melyet friss teljes vérből vagy annak „buffy coat” komponenséből, valamint postmortem FFPE agyszövetből nyertünk. Ahogyan az várható volt, a friss teljes vérből és „buffy coat”-ból izolált DNS szignifikánsan magasabb minőségű (kevésbé fragmentált) volt, mint akár a műtéti FFPE, akár a postmortem FFPE mintákból származó izolátumé. Ez a jelentős különbség elsősorban a formalinos kezelés DNS fragmentáló hatásával magyarázható. De szignifikáns különbség volt a műtéti FFPE és a postmortem FFPE minták között is, a hosszú fixálás előtti postmortem periódus során végbemenő biológiai bomlásnak köszönhetően az utóbbiban (7C Táblázat; 8-10 Ábra).

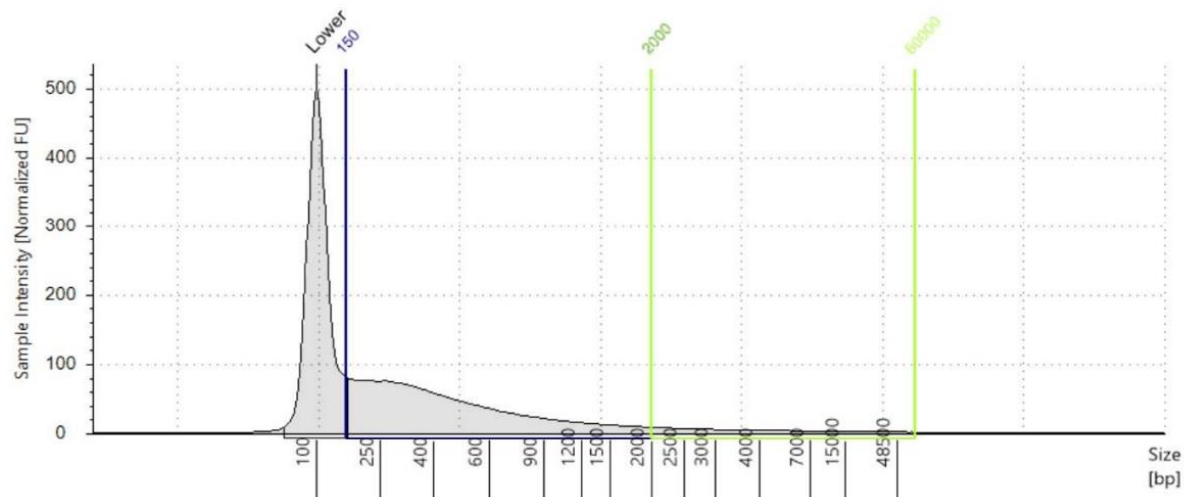
7C. Táblázat: Buffy coat, teljes vér és postmortem FFPE agyi kontrollok DNS fragment megoszlása

Kontroll	Átlagos méret 150-2000 bp között	%-os megoszlás	Átlagos méret 2000-60000 bp között	%-os megoszlás
Buffy Coat	948	5,81%	25535	70,18%
Friss, nem fixált vér	900	7,80%	15207	87,15%
CG1 (postmortem agyszövet)				
1	407	93%	7950	2,64%
2	653	89,95%	6076	9,08%
3	532	94,56%	7589	3,95%
4	613	87,65%	7513	8,97%
5	708	90,14%	6993	7,19%
6	544	90,05%	8408	3,65%
Átlag	576,16	90,89%	7421,5	5,91%

8. Ábra: Reprezentatív kép a fragmentanalízis eredményéről egy post mortem FFPE agyi kontroll minta esetében, TapeStation 4200 rendszerből

Peak Table

Size [bp]	Calibrated Conc. [ng/ul]	Assigned Conc. [ng/ul]	% Integrated Area	From [bp]	To [bp]	Peak Comment	Observations
100	8.50	8.50	-	62	155		Lower Marker
-	-	-	-	-	-		Sample Well



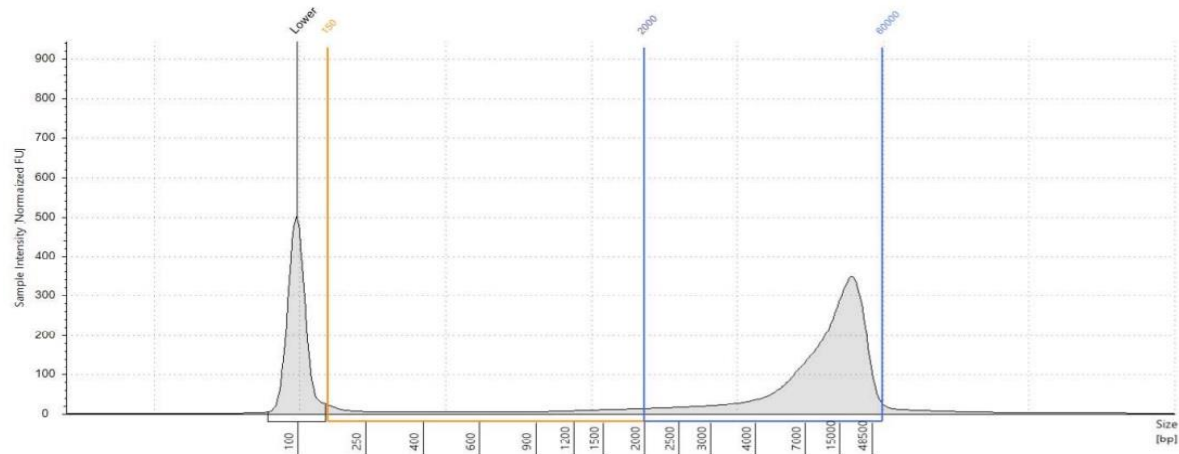
Region Table

From [bp]	To [bp]	Average Size [bp]	Conc. [ng/ul]	Region Molarity [nmol/l]	% of Total	Region Comment	Color
150	2000	506	7.90	36.4	90.63		■
2000	60000	8350	0.674	0.319	7.73		■

9. Ábra: A teljes vérből nyert kontroll DNS fragmentjeinek megoszlása

Peak Table

Size [bp]	Calibrated Conc. [ng/μl]	Assigned Conc. [ng/μl]	% Integrated Area	From [bp]	To [bp]	Peak Comment	Observations
100	8.50	8.50	-	67	146		Lower Marker
19913	16.0	-	99.26	4696	>60000		
-	-	-	-	-	-		Sample Well



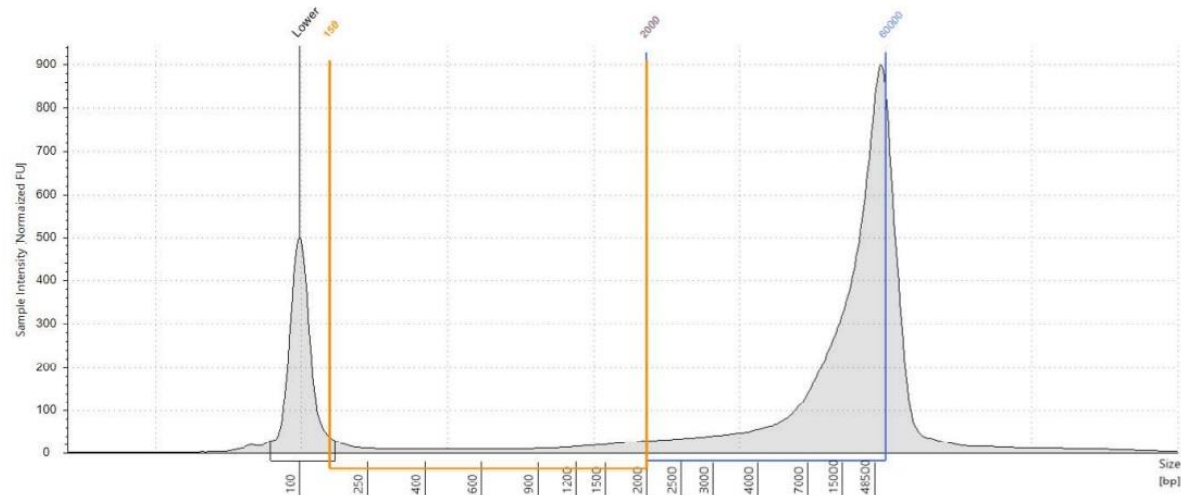
Region Table

From [bp]	To [bp]	Average Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Region Molarity [nmol/l]	% of Total	Region Comment	Color
150	2000	900	1.63	6.07	7.80		Orange
2000	60000	15207	18.2	3.15	87.15		Blue

10. Ábra: A buffy coat-ból nyert kontroll DNS fragmentjeinek megoszlása

Peak Table

Size [bp]	Calibrated Conc. [ng/μl]	Assigned Conc. [ng/μl]	% Integrated Area	From [bp]	To [bp]	Peak Comment	Observations
100	8.50	8.50	-	68	162		Lower Marker
56004	32.5	-	99.71	6221	>60000		
-	-	-	-	-	-		Sample Well



Region Table

From [bp]	To [bp]	Average Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Region Molarity [nmol/l]	% of Total	Region Comment	Color
150	2000	948	2.44	9.64	5.81		Orange
2000	60000	25535	29.4	4.16	70.18		Blue

4.1.2 Genom-szintű DNS CpG metiláció elemzés szekvenciális FFPE GBM és kontroll minták kohortjaiban

Első lépésként a biszulfid konverzió és a szekvenálás technikai eredményeit vizsgáltuk meg. A biszulfid konverzió hatásfoka megmutatja, hogy a nem metilált citozinok milyen arányban konvertálódtak uracillá a folyamat során, melyet az RRBS kit-ben foglalt ún. „spike-in control” segítségével határoztunk meg. Az így nyert konverziós arány 98,48%-volt. Az átlagos „underconversion rate” 1,32%, és az átlagos „overconversion rate” 1,70% volt. Ezek a mutatók rendkívül jó konverziós hatásfokot jeleztek. Az átlagos informatív CpG 20 741 979, a median informatív CpG 16 574 809 volt mintánként, a duplikátumok eltávolítása előtt, a nyers szekvenált adatokban. Ez az érték a várt ~2 millió CpG nagyjából tízszeresét jelentette, és a könyvtár amplifikációjával állt összefüggésben. Mivel a manuális deduplikáció a CpG reprezentáció eltolódását és adatvesztést okozhatott volna, inkább egy bioinformatikai korrekciót választottunk, mely abból állt, hogy 19 936 egymással átfedő SNP-t tartalmazó helyet és extrém magas lefedettségű CpG-t szűrtünk ki. Trendszerű csökkenést tapasztaltunk az informatív CpG-k számában az alacsonyabb minőségű DNS-ek esetében. Míg a CG2-ben, melyben epilepszia műtéti FFPE minták RRBS adatai szerepeltek, az átlagos CpG metilációs arány 47,91% volt, addig a postmortem FFPE agyi mintákból álló CG1-ben ez az érték csupán 32,31% volt, vagyis az alacsonyabb DNS minőség az informatív CpG-k csökkenésével társult. Ezeket az adatokat figyelembe véve úgy döntöttünk, hogy a további epigenomikai összehasonlításokhoz kizárólag a CG2 adatait használjuk fel.

Az alkalmazott analízis program a CpG helyek differenciált metiláltsága mellett a tiling, gén, promóter régiók és CpG szigetek differenciált metiláltságát is megjelenítette. Mi tanulmányunkban elsődlegesen a differenciáltan metilált promóterekre fókuszáltunk a GBM1-CG2, GBM2-CG2 és a GBM1-GBM2 összehasonlításokban. A CpG helyek, szigetek és „tile”-k metilációs értékei nem mutattak statisztikai különbségeket a három csoport összehasonlításakor. A gén promóterek GO analízise során azonban a három összehasonlításban számos differenciáltan metilált molekuláris útvonalat azonosítottunk.

4.1.2.1 Primer tumorok (GBM1) összehasonlítása a normál agyi kontroll (CG2) mintákkal

8. Táblázat: A génpromoterek differenciált metiláltsága alapján azonosított molekuláris útvonalak a GBM1-CG2 összehasonlításban

GBM1 vs. CG2			
Szigifikáns hipermetilációt mutató promóterek a primer tumorokban			
Azonosító	p-érték	Génpromóter	Jelátviteli útvonal
ENSG00000165588	0,0000838	OTX2 (Homeobox protein OTX2)	Gasztruláció pozitív szabályozása
ENSG00000206557	0,00038448	TRIM71 (E3 ubiquitin-protein ligase)	Fibroblaszt növekedési faktorra adott sejtválasz
ENSG0000011304	5,5163E-13	PTBP1 (Polypyrimidine tract-binding protein 1)	
ENSG00000108061	0,02560973	SHOC2 (Leucine-rich repeat protein SHOC-2)	
ENSG00000144231	6,0876E-09	POLR2D (DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB4)	
ENSG00000047315	0,00472743	POLR2B (DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2)	
ENSG00000117139	0,00035469	KDM5B (Lysine-specific demethylase 5B)	
ENSG00000183691	4,3241E-07	NOG (Noggin)	
Szigifikáns hipometilációt mutató promóterek a primer tumorokban			
ENSG00000121853	2,3218E-19	GHSR (Growth hormone secretagogue receptor type 1)	Posztszinaptikus organizáció szabályozása
ENSG00000188763	9,9113E-07	FZD9 (Frizzled-9)	
ENSG00000001617	0,00474049	SEMA3F (Semaphorin-3F)	
ENSG00000109971	6,8959E-06	HSPA8 (Heat shock cognate 71 kDa protein)	
ENSG00000196083	0,00248443	IL1RAP (Interleukin-1 receptor accessory protein)	Szinapszisok kialakulásának szabályozása
ENSG00000181754	0,04538322	AMIGO1 (Amphoterin-induced protein 1)	
ENSG00000198400	7,1184E-05	NTRK1 (High affinity nerve growth factor receptor)	
ENSG00000186340	9,8236E-21	THBS2 (Thrombospondin-2)	
ENSG00000105287	0,04155552	PRKD2 (Serine/threonine-protein kinase D2)	Endothél sejtproliferáció pozitív szabályozása
ENSG00000204217	0,00596108	BMPR2 (Bone morphogenetic protein receptor type-2)	
ENSG00000112902	0,00940633	SEMA5A (Semaphorin-5A)	
ENSG00000198435	0,00016453	NRARP (Notch-regulated ankyrin repeat-containing protein)	
ENSG00000110492	1,2433E-06	MDK (Midkine)	
ENSG00000126561	2,3218E-19	STAT5A (Signal transducer and activator of transcription 5A)	
ENSG00000172889	3,8693E-11	EGFL7 (Epidermal growth factor-like protein 7)	
ENSG00000239697	0,00038093	TNFSF12 (Tumor necrosis factor ligand superfamily member 12)	
ENSG00000168610	0,00014337	STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3)	
ENSG00000154229	0,02798642	PRKCA (Protein kinase C alpha type)	
ENSG00000100644	0,02843962	HIF1A (Hypoxia-inducible factor 1-alpha)	Myelinizáció/myelinizáció szabályozása
ENSG00000148826	0,02052103	NKX6-2 (Homeobox protein Nkx-6.2)	
ENSG00000177807	0,00649246	KCNJ10 (ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 10)	
ENSG00000162736	6,4547E-09	NCSTN (Nicastrin)	
ENSG00000106278	3,1357E-25	PTPRZ1 (Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta)	
ENSG00000149256	0,00225536	TENM4 (Teneurin-4)	

Első lépésként a primer tumorok (GBM1) promóter metilációs mintázatát hasonlítottuk össze (8. Táblázat) a kontrollcsoporttal (CG2). A hipermetilációt mutató génpromóterek alapján

számos molekuláris útvonalat azonosítottunk a primer tumorokban a kontrollhoz képest. Ezek a neuronális differenciálódás és morfogenezis, valamint transzkripciós és metabolikus folyamatok jelátviteli útvonalait érintették. A legszignifikánsabban hipermetilált génpromótereket a gasztruláció szabályzás (OTX2) és a fibroblaszt növekedési faktorra adott sejtválasz (PTBP1; POLR2D; NOG) útvonalában azonosítottuk. Ezen kívül magasfokú metilációt mutatott 17 különböző gén promótere, melyek a nukleinsav-templátú transzkripciós folyamatokban játszanak szerepet; 18 promóter, mely a nukleinbázis tartalmú összetett metabolikus folyamatokban; továbbá 19 olyan génpromóter, melyek a neuronok morfogenezisében és differenciálódásában játszanak szerepet.

A primer tumorokban (GBM1) hipometilációt láttunk olyan gének promótereinél, melyek a szinapszisok organizációjában (GHSR; HSPA8; FZD9; SEMA3F) és kialakításában (AMIGO1; NTRK1; THBS2), az endothéliális sejtek proliferációjában (HIF1A; EGFL7; TNFSF12; PRKD2) és a neuronok mielinizációjában (NKX-6; KCNJ10; NCSTN; TENM4) szerepet játszó útvonalak részeit képezik.

4.1.2.2 Recidív tumorok (GBM2) összehasonlítása normál agyi kontroll (CG2) mintákkal

9. Táblázat: A génpromóterek differenciált metiláltsága alapján azosított molekuláris útvonalak a GBM2-CG2 összehasonlításban

GBM2 vs. CG2			
Szignifikáns hipermetilációt mutató promóterek a recidív tumorokban			
Azonosító	p-érték	Génpromóter	Jelátviteli útvonal
ENSG00000156150	1,35944E-19	ALX3 (Homeobox protein aristaless-like 3)	Végtagfejlődés és függelékek morfogenezise
ENSG00000128710	4,51597E-07	HOXD10 (Homeobox protein Hox-D10)	
ENSG00000183691	6,57418E-07	NOG (Noggin)	
ENSG00000138759	6,93088E-05	FRAS1 (Extracellular matrix protein FRAS1)	
ENSG00000101115	3,99814E-05	SALL4 (Sal-like protein 4)	
ENSG00000172216	0,000235518	CEBPB (CCAAT/Enhancer Binding Protein Beta)	Transzkripció szabályozása RNS polimeráz II által
ENSG00000120533	7,14294E-05	ENY2 (Transcription And Export Complex 2 Subunit)	
ENSG00000064393	0,010855035	HIPK2 (Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2)	
ENSG00000169760	0,000365566	NLGN1 (Neuroigin-1)	Sejtadhéziós folyamatok
ENSG00000148219	0,016035457	ASTN2 (Astrotactin 2)	
ENSG00000152092	1,9538E-05	ASTN1 (Astrotactin-1)	
Szignifikáns hipometilációt mutató promóterek a recidív tumorokban			
ENSG00000156222	2,54024E-17	SLC28A1 (Sodium/nucleoside cotransporter 1)	Purin és pirimidin bázis transzport
ENSG00000147164	3,57505E-06	SNX12 (Sorting nexin-12)	Golgi transzportfolyamatok
ENSG00000141258	0,001037238	SGSM2 (Small G protein signaling modulator 2)	
ENSG00000135968	1,50238E-15	GCC2 (GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2)	
ENSG00000151360	6,74252E-11	ALLC (Probable allantoinase)	Allantoin katabolikus folyamatok

Következő lépésként összehasonlítottuk a recidív tumorok (GBM2) metilációs adatait a kontrollcsoportéval (CG2) (**9. Táblázat**). A recidív tumorokban a kontrollhoz képest szignifikánsan hipermetilált gén promótereket találtunk a transzkripció szabályozásában (pl. CEBPB; ENY2), sejtadhéziós folyamatokban (pl. ASTN1-2; NLGN1) illetve embrionális fejlődésben szerepet játszó jelátviteli útvonalak esetében (ALX3; HOXD10; NOG; FRAS1; SALL4). A recidív tumorokban szignifikánsan hipometilált gén promótereket a purin és pirimidinbázisok transzportját (SLC28A1), a Golgi transzportot (SGSM2; GCC2) illetve az allantoin katabolizmus folyamatait érintő (ALLC) jelátviteli útvonalak esetén találtunk.

4.1.2.3 Recidív tumorok (GBM2) összehasonlítása primer tumorokkal (GBM1)

Az utolsó összehasonlítás során megvizsgáltuk, hogy a differenciáltan metilált génpromóterek milyen biológiailag releváns jelátviteli útvonalakat azonosítanak, melyek feltehetően a progresszióhoz járulnak hozzá (**10. Táblázat**). A GO analízis számos fontos útvonal esetében fedett fel hipermetilált gén promótereket a recidív tumorokban, többek között a Wnt útvonal szabályozásának, valamint a katekolaminok szekréciójának (SYT15; SYT17; PINK1; OXTR) és transzportjának szabályozásában (SLC18A2; TORA1) szerepet játszó jelátviteli útvonalak elemeinél. Ezen kívül a receptorszignalizáció szabályozásában (CACNG8; TSG101; DLG1), sejtválaszok kialakításában (NDUFA13; DROSHA; FMR1) és egyéb fontos jelátvivő folyamatokban (PTP4A3; FRMPF1; PRKD2; MBIP; RNF6; NOD1) is szignifikáns hipermetilációt észleltünk. A recidív tumorokban a primer tumorokhoz képest szignifikánsan alacsonyabban metiláltságú génpromótereket találtunk az immunválasz szabályozásban résztvevő jelátviteli útvonalakban. Hipometilált promótereket azonosítottunk a limfocita-mediált immunitás szabályozásában (TFRC; FOXJ1; ILR4; ILR6), a természetes ölősejtek (NK) (HAVCR2; SERPINB9; LAMP1; CADM1), a leukociták (ICAM1) és a T-sejtek által mediált citotoxicitás (MICA; DUSP22) szabályozásában szerepet játszó útvonalak esetében. Végül, de nem utolsó sorban, fontos megjegyezni, hogy ugyan nem olyan erős szignifikanciával (átlag $p=0.0098$), de 11 hipometilált promótert találtunk a sejtproliferációért felelős útvonalak esetében is.

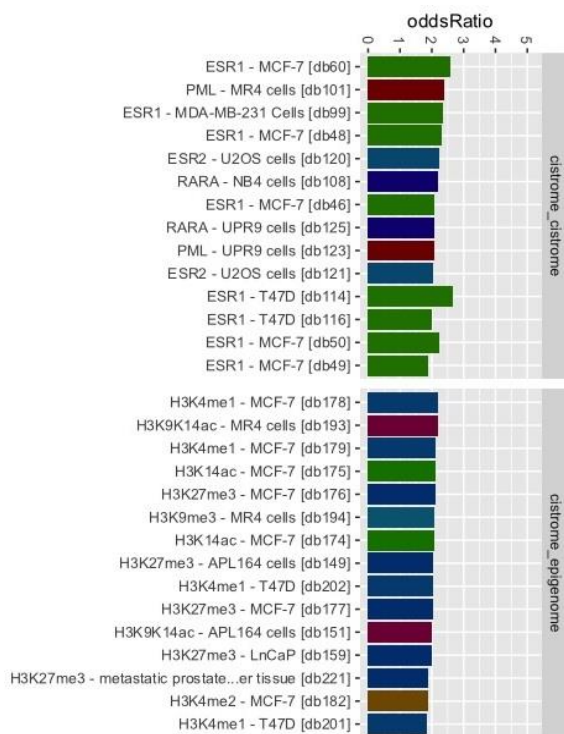
10. Táblázat: A génpromóterek differenciált metiláltsága alapján azonosított molekuláris útvonalak a GBM2-GBM1 összehasonlításban

GBM2 vs. GBM1			
Szignifikáns hipermetilációt mutató promóterek a recidív tumorokban			
Azonosító	p-érték	Génpromóter	Jelátviteli útvonal
ENSG00000158828	0,002719316	PINK1 (Serine/threonine-protein kinase PINK1)	Dopamin szekréció pozitív szabályozása
ENSG00000067715	0,031832946	SYT1 (Synaptotagmin-1)	
ENSG00000204176	1,05384E-14	SYT15 (Synaptotagmin-15)	
ENSG00000103528	0,000234594	SYT17 (Synaptotagmin-17)	
ENSG00000135312	0,04842484	HTR1B (5-hydroxytryptamine receptor 1B)	Norepinephrine szekréció szabályozása
ENSG00000101180	0,0115853	HRH3 (Histamine H3 receptor)	
ENSG00000180914	2,33603E-07	OXTR (Oxytocin receptor)	
ENSG00000184160	0,031326709	ADRA2C (Alpha-2C adrenergic receptor)	Dopamin transzport
ENSG00000165646	0,00760607	SLC18A2 (Synaptic vesicular amine transporter)	
ENSG00000136827	0,001570669	TOR1A (Torsin-1A)	AMPA receptor aktivitás szabályozása
ENSG00000166862	0,001924207	CACNG2 (Voltage-dependent calcium channel gamma-2 subunit)	
ENSG00000142408	6,77281E-09	CACNG8 (Voltage-dependent calcium channel gamma-8 subunit)	
ENSG00000251322	0,010966803	SHANK3 (SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 3)	
ENSG00000183454	0,042392416	GRIN2A (Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2A)	NMDA glutamát receptor aktivitás szabályozása
ENSG00000196730	1,85592E-10	DAPK1 (Death-associated protein kinase 1)	
ENSG00000196338	0,037556266	NLGN3 (Neuroigin-3)	
ENSG00000133216	0,031902844	EPHB2 (Ephrin type-B receptor 2)	
ENSG00000075711	0,000147776	DLG1 (Disks large homolog 1)	Intrinsic apoptotikus jelátviteli útvonal negatív szabályozása
ENSG00000186010	3,22261E-12	NDUFA13 (NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 13)	
ENSG00000113360	3,06444E-08	DROSHA (Ribonuclease 3)	Gyulladásra adott válasz szabályozása
ENSG00000181929	0,000514043	PRKAG1 (5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-1)	p53 jelátviteli útvonal szabályozása
ENSG00000081913	0,003736561	PHLPP1 (PH domain leucine-rich repeat-containing protein phosphatase 1)	MAPK kaskád szabályozása
ENSG00000102081	2,44046E-07	FMR1 (Synaptic functional regulator FMR1)	DNS sérülésre adott válasz szabályozása
ENSG00000184489	2,26742E-09	PTP4A3 (Protein tyrosine phosphatase type IVA 3)	Endothéliális növekedési faktor szignalizáció szabályozása
ENSG00000070601	0,016127523	FRMPD1 (FERM and PDZ domain-containing protein)	G-protein kapcsolt szignalizáció szabályozása
ENSG00000186318	0,009377187	BACE1 (Beta-secretase 1)	Szinaptikus vezikulák exocitózisának szabályozása
ENSG00000136111	1,8296E-05	TBC1D4 (TBC1 domain family member 4)	Vezikulum fúzió negatív szabályozása
Szignifikáns hipometilációt mutató promóterek a recidív tumorokban			
ENSG00000077238	8,84314E-05	IL4R (Interleukin 4 Receptor)	Limfocita mediált immunitás szabályozása
ENSG00000160712	0,035119682	IL6R (Interleukin 6 receptor)	
ENSG00000072274	5,46225E-06	TFRC (Transferrin receptor protein 1)	
ENSG00000129654	5,84315E-05	FOXJ1 (Forkhead box protein J1)	
ENSG00000028137	0,000531496	TNFRSF1B (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B)	Leukocita mediált citotoxicitás szabályozása
ENSG00000090339	0,00604749	ICAM1 (Intercellular adhesion molecule 1)	
ENSG00000204520	0,004568456	MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A)	T-sejt mediált citotoxicitás pozitív szabályozása
ENSG00000112679	1,01551E-07	DUSP22 (Dual specificity protein phosphatase 22)	
ENSG00000182985	0,005797413	CADM1 (Cell adhesion molecule 1)	Natural killer sejtek által mediált citotoxicitás
ENSG00000185896	0,009537192	LAMP1 (Lysosome-associated membrane glycoprotein 1)	
ENSG00000135077	0,002975803	HAVCR2 (Hepatitis A virus cellular receptor 2)	
ENSG00000170542	0,00020509	SERPINB9 (Serpin B9)	

4.1.2.4 Locus Overlap Analysis (LOLA) a GBM1-CG2, GBM2-CG2 és GBM2-GBM1 epigenomikai adatok összevetése nyomán

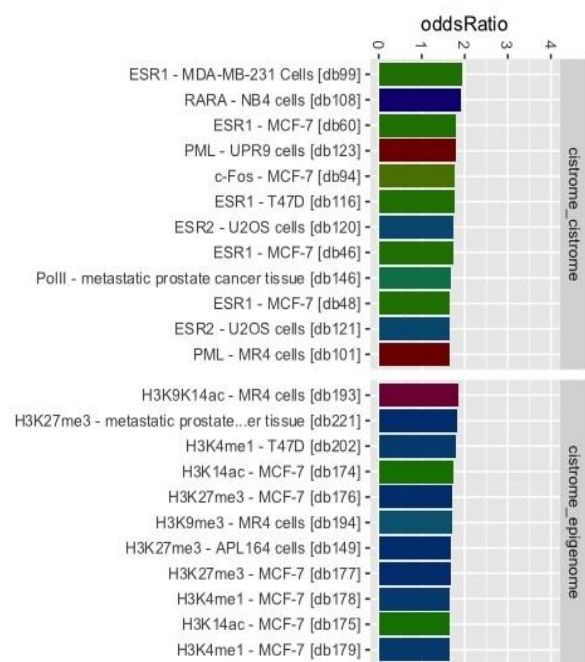
LOLA elemzés célja az volt, hogy azonosítsuk azokat a genomi régiókat és szabályozó elemeket, amelyek az epigenomikai adatok funkcionális interpretálásához különösen relevánsak. E célból az 1000 leghipometiláltabb és hipermetiláltabb „tiling” régióra fókuszáltunk (11a és 11b ábra). A primer és recidiv tumorok kontroll csoporttal történő összevetése esetén a dúsítási elemzés hasonló eredményeket mutatott. Mindkét esetben a hipometilált régiók dúsulását láttuk a tumoroknál, melyek olyan transzkripció faktorok (pl. RUNX1; ESR1; ESR2; CTCF) és hiszton fehérjék kötőhelyeiért (pl. H3K4me1; H3K4me2; H3K4me3; H3K9me3; H3K27me3) felelősek, amelyek elengedhetetlenek a normális embrionális őssejtek differenciálódásához és a differenciált vonal fenntartásához.

11a Ábra: LOLA elemzés eredményei a GBM1-CG2 összevetésből



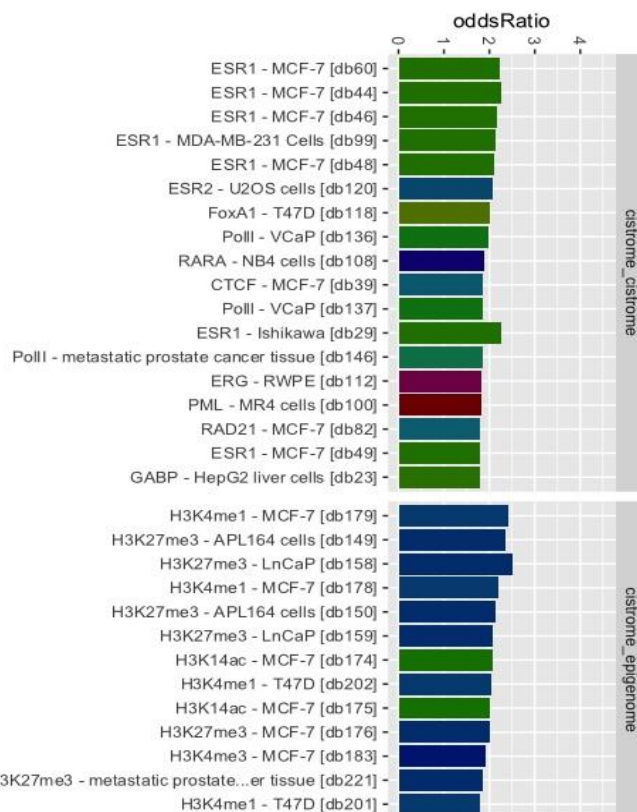
11a ábra: LOLA elemzés eredményei a GBM1-CG2 összevetésből.

11b Ábra: LOLA elemzés eredményei a GBM2-CG2 összevetésből



11b ábra: LOLA elemzés eredményei a GBM2-CG2 összevetésből.

12. Ábra: LOLA elemzés eredményei a GBM2-GBM1 összevetésből



12. ábra: LOLA elemzés eredményei a GBM2-GBM1 összevetésből.

A recidív és primer tumorok összehasonlításakor (**12. Ábra**) a recidív tumoroknál láttuk a hipometilált régiók dúsulását, melyek szintén különböző transzkripciós faktorok (FOXA2; ESR1; ESR2; RXR) és hiszton fehérjék (H3K27me3; H3K9me3; H3K4me1; H3K4m2; H3K4m3) kötőhelyeit érintették.

4.1.3 Korrelációs elemzések a patológiai és klinikai adatok között

Mivel több beteg halálának időpontja etikai engedélyünk korlátai között nem volt megszerezhető, a teljes túlélés helyett a primer tumor diagnosztizálása (T1) és a recidív tumor megjelenése (T2) között eltelt időt vetettük össze a betegek nemével és korával, valamint a tumorok morfológiai alcsoportjával, mitotikus rátájával, mikrovaszkuláris proliferációjával, a tumorba infiltrálódó limfociták mennyiségével, illetve a nekrosis mértékével mindkét műtétből származó tumorcsoportban. Ezen korrelációs vizsgálatok során a T1-T2 és a nem, kor, mitotikus ráta, morfológiai alcsoport, microvascularis proliferáció és nekrosis között nem

találtunk szignifikáns összefüggést. Trendszerű összefüggést tapasztaltunk azonban a T1-T2 és a tumorba infiltrálódó limfociták mennyisége között a primer tumorok (GBM1) esetében ($p=0,08$), de a recidív tumorok esetében itt sem volt összefüggés ($p=0,737$). Továbbá kíváncsiak voltunk, hogy a tumorba infiltrálódó limfociták mennyisége összefüggésben áll-e a mitotikus rátával, de sem Mann-Whitney, sem Pearson korrelációs analízis nem mutatott ki korrelációt.

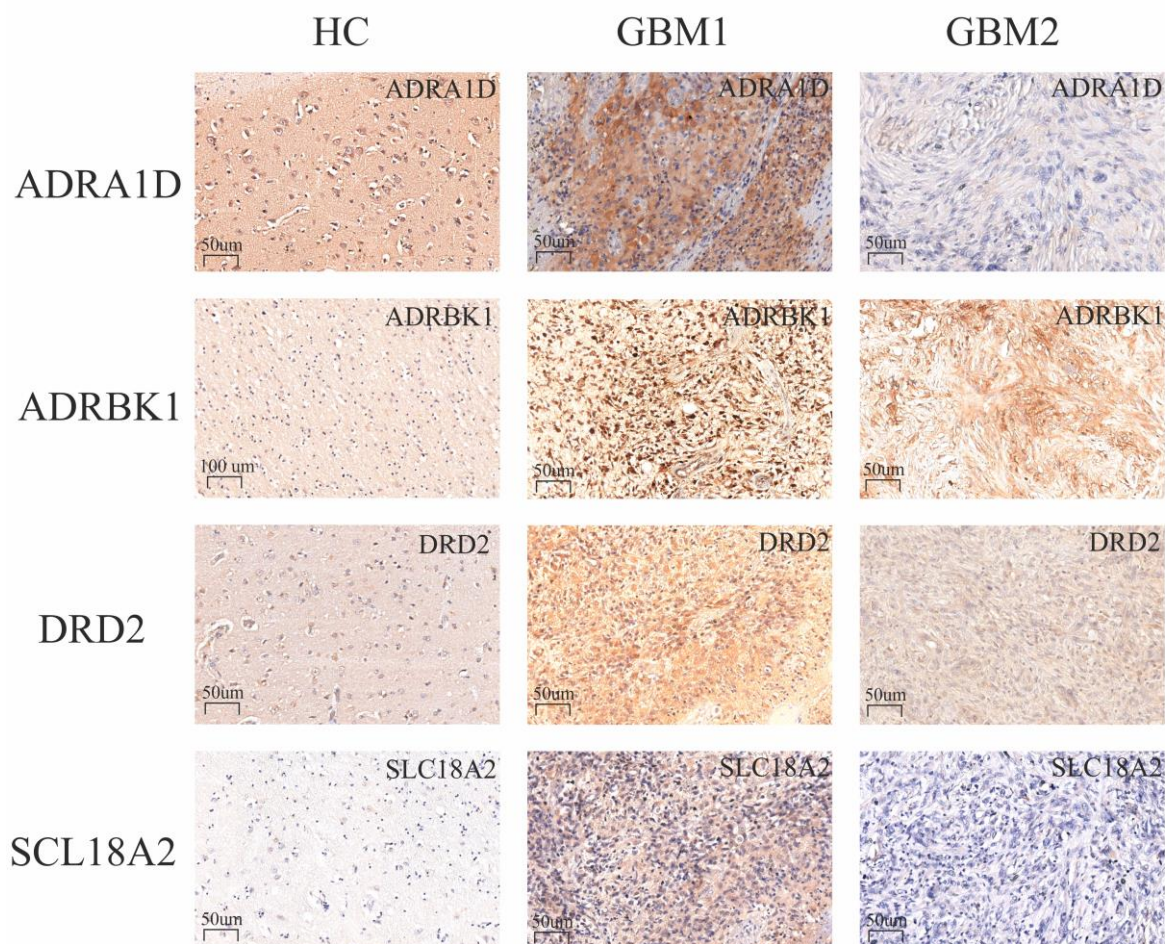
4.2 A katekolamin útvonal kiválasztott markereinek promóter + gén metilációja és protein expressziója GBM mintapárokban

A szekvenciális GBM mintapárok kohortjainak genom szintű CpG metilációs elemzéseiből (4.1 fejezet) kiderült, hogy a katekolamin útvonal bizonyos elemei differenciáltan metiláltak (**11. Táblázat**) primer és recidív tumorokban. Hogy pontosabb információt kapjunk és egyben teszteljük a feltételezett inverz kapcsolatot, ebben a tanulmányban négy kiválasztott katekolamin útvonal marker promóter+gén metilációját és fehérje expresszióját mennyiségileg határoztuk meg a szekvenciális (GBM1 és GBM2) kohort egyedi mintáiban. Mivel egy beteg blokkja már nem volt elégséges az IHC vizsgálatra, ezt a tanulmányt 21 mintapáron végeztük el az eredeti 22 mintapár helyett. A vizsgált markerek között szerepel két receptor (ADRA1D – alfa-1D adrenerg receptor; DRD2 – dopamin-D2 receptor), egy receptor kináz (ADRBK1/GRK2 – adrenerg béta-receptor-kináz 1/G-protein kapcsolt receptor kináz 2) és egy transzporter (SLC18A2/VMAT2 – Solute carrier family 18 member A2/ szinaptikus vezikulum monoamin transzporter), így a jelátviteli útvonal több pontján szerepet játszó elemet is vizsgáltunk. Az expressziós vizsgálatokban a kontrollcsoportot (HC) 6 postmortem FFPE agyi minta képviselte (olyan személyektől, akik nem neurológiai betegségben hunytak el), míg a metilációs elemzésekben a metilációs kontrollt (CG2) a kohort szintű epigenomikai elemzésekben is használt, 5 epilepszia műtéti minta RRBS adata képezte.

11. Táblázat: A négy kiválasztott katekolamin útvonal marker metilációs adatai a genom-szintű GBM2 vs. GBM1 kohort elemzésekből

Szignifikánsan hipometilált katekolamin útvonal promóterek GBM2 vs. GBM1			
Azonosító	Lokáció	Génpromóter	P érték
ENSG00000149295	chr11	DRD2	0,001125403
ENSG00000173020	chr11	ADRBK1	7,27E-20
ENSG00000171873	chr20	ADRA1D	0,005170001
ENSG00000165646	chr10	SLC18A2	0,007072815

13. Ábra: A négy szelektált katekolamin marker (ADRA1D, ADRBK1, DRD2, SLC18A2) reprezentatív IHC képe



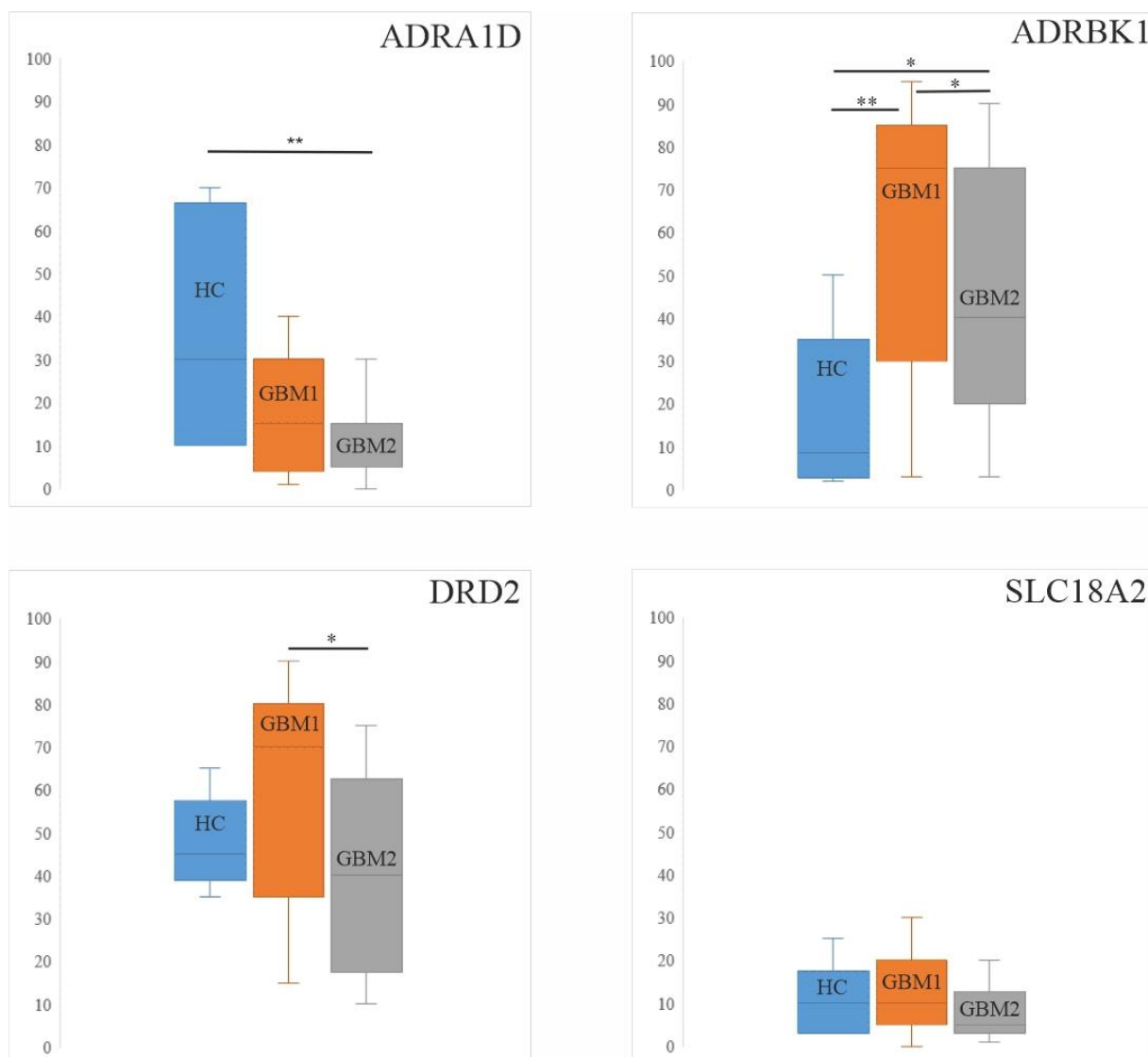
Az IHC alapján kvantitatív fehérje expressziós elemzéseket végeztünk egyedi HC, GBM1 és GBM2 mintákban.

4.2.1 A szelektált katekolamin útvonal markerek protein expressziójának kvantitatív IHC vizsgálata

Először a markerek protein expressziójának szintjét vizsgáltuk meg a 21 GBM mintapárban és a hisztológiai kontrollokban. A kvantitatív IHC elvégzése után a CS (complex score) értékeket összevetettük a HC, GBM1 és GBM2 mintacsoportok között (**14. Ábra**). Az ADRA1D marker medián és IQR [interkvartilis range] CS értékei szignifikánsan alacsonyabbak voltak a GBM2-ben (5 [15-5]) ($p = 0,005$) és tendenciálisan alacsonyabbak voltak GBM1-ben (15 [25-5]) a HC-

hoz képest (30 [59-13]). Ezzel szemben az ADRBK1/GRK2 expressziója szignifikánsan magasabb volt mind a GBM1 (75 [85-30]) ($p = 0.004$), mind a GBM2 (40 [75-20]) ($p = 0,012$) esetében a HC-hoz képest (9 [25-4]). A DRD2 esetében ugyan nem találtunk szignifikáns különbséget, de a magasabb expressziós trendje volt látható GBM1-ben (70 [80-40]) a HC-hoz képest (45 [54-40]). A szekvenciális GBM1-GBM2 összehasonlítás esetében a kvantitativ IHC vizsgálatok szignifikánsan magasabb expressziós szintet mutattak GBM1-ben az ADRBK1/GRK2 (75 [85-30] vs. 40 [75-20]) ($p = 0,011$) és a DRD2 (70 [80-40] vs. 40 [60-20]) ($p = 0,026$) esetében, mint a GBM2-ben. Az ADRA1D (15 [25-5] vs. 5 [15-5]) és az SLC18A2/VMAT2 esetében (10 [20-5] vs. 5 [10-3]) a CS értékek csupán tendencia jelleggel voltak magasabbak a GBM1-ben mint a GBM2-ben, de statisztikai szignifikanciát nem mutattak.

14. Ábra: A katekolamin útvonal markereinek expressziós mintázata a HC, GBM1 és GBM2 mintákban



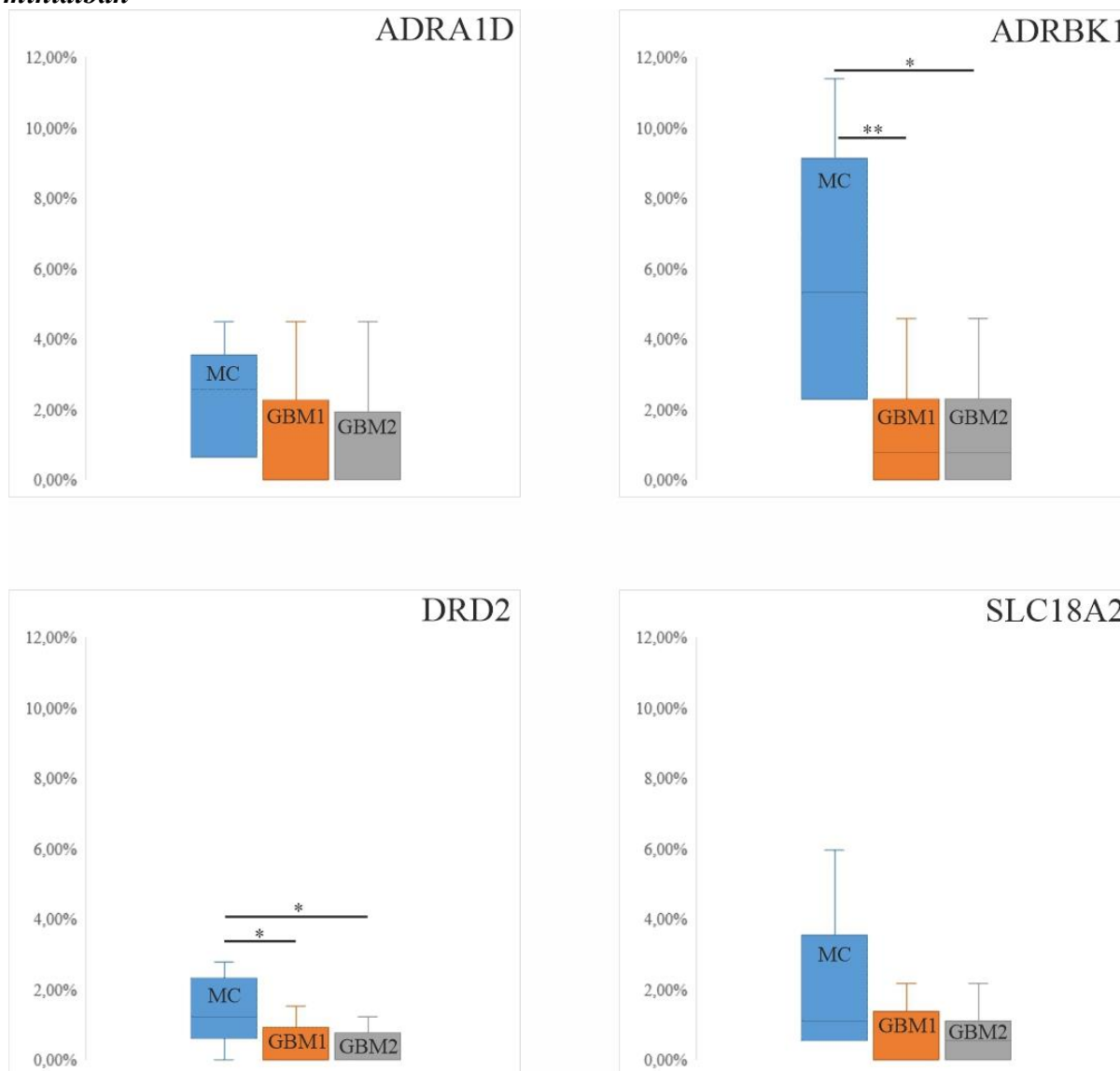
Az ábra Y tengelye a markerek egyedi mintákból nyert CS értékeinek mediánját és IQR tartományát mutatja. Mann-Whitney teszt (HC vs. GBM1; HC vs. GBM2) és Wilcoxon páros előjeltesz (GBM1 vs. GBM2).

4.2.2 A szelektált katekolamin útvonal markerek metilációs szintje egyedi GBM és kontroll mintákban

Eredetileg a négy katekolamin marker promóter régióinak metiláltságát (metilált CpG / össz CpG a régióban) céloztuk megvizsgálni egyedi primer és recidiv tumorokban. A promóterek 2000bp hosszúságú szakaszában azonban az FFPE mintákból származó DNS fragmentáltsága miatt egyedi szinten nem tudtunk statisztikai elemzéshez elégséges számú CpG-ről információt kapni. Ezért úgy döntöttünk, hogy a metilált CpG-eket nagyobb DNS szegmensekben, a

promóter + gén régiókban együttesen határozzuk meg a Script segítségével. Ezt követően a négy katekolamin marker promoter+gén DNS CpG metilációját összevetettük a metilációs kontrollcsoport (ugyanaz, mint a korábbi CG2) és a primer és recidív (GBM1, GBM2) tumorsoportok között (**15. ábra**). Az ADRA1D (medián 2,56 [3,04-2,08]) és az SLC18A2/VMAT2 (medián 1.08 [2,30-0,95]) esetében nem találtunk szignifikánsan differenciált metilációt a GBM1-CG2 (0 [1,22-0] vs 0 [1,44-0]) illetve az GBM2-CG2 (0,54 [1,08-0] vs. 0 [1,44-0]) összehasonlításokban. Az ADRBK1 és DRD2 ellenben szignifikánsan alacsonyabb metilációs szintet mutatott a GBM1-ben (ADRBK1: 0,76 [1,33-0]; $p = 0,006$; DRD2: 0 [0,46-0]; $p = 0,041$) és a GBM2-ben (ADRBK1: 0,76 [1,71-0]; $p = 0,01$; DRD2: 0 [0,15-0]; $p = 0,019$), mint a CG2-ben (ADRBK1: 5,31 [7,97-4,56]; DRD2: 1,22 [2,06-1,22]), mely inverz kapcsolatban volt a GBM1 és HC csoportokban talált protein expressziós szintekkel. Nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a négy marker metilációs szintje között a GBM1 vs. GBM2 összehasonlításban, mely azt jelezte, hogy a szignifikáns (ADRBK1, DRD2) és tendenciális (ADRA1D, SLC18A2) csökkenés a protein expresszióban a GBM2-ben a GBM1-hez képest nem kizárólag a CpG metilációhoz köthető.

15. Ábra: A négy szelektált catekolamin útvonal marker promóter+gén CpG metiláció szintjei a CG2 metilációs kontrollok, valamint a GBM1 és GBM2 tumorok egyedi mintáiban



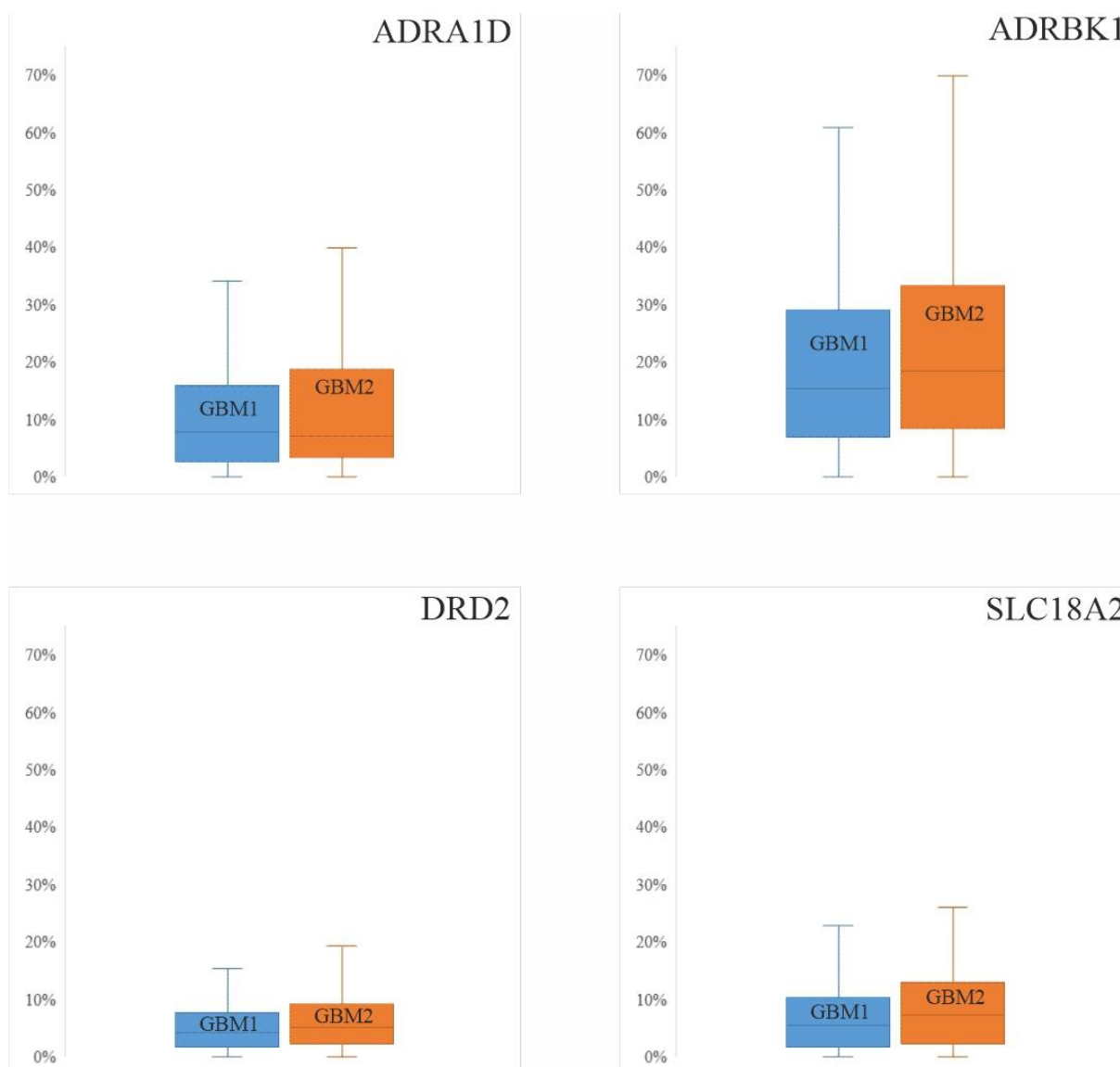
A négy szelektált catekolamin útvonal marker promóter+gén CpG metilációjának %-os medián és IQR értékei láthatók az Y tengelyen. (Mann-Whitney-U test (CG2 vs. GBM1, CG2 vs. GBM2), Wilcoxon signed rank test (GBM1 vs. GBM2))

4.2.3 A szelektált catekolamin útvonal markerek promóter+gén régióinak metilációs szintjei a validációs adatbázis egyedi primer és recidív mintáiban

Hogy a szelektált catekolamin markerek promóter+gén régióinak saját mintáinkban nyert metilációs eredményeit validáljuk, a Script használatával ugyanezen régiók DNS CpG metilációs meghatározását egy adatbázis 112 FFPE GBM mintapár egyedi mintáinak RRBS adataiban is elvégeztük (59, <https://www.ebi.ac.uk/ena>, hozzáférési szám: EGAS00001002538) (16. ábra). Mivel a Script az egyedi mintákban talált metilált CpG-k alapján határozza meg az

adott régióban levő össz CpG számot, félrevezető lenne összehasonlítani a módszerrel méretben jelentősen különböző kohortokat, mint pl. az 5 CG2 és 112 GBM1 / GBM2. Hogy elkerüljük a kohort méret különbségéből adódó statisztikai torzulásokat, itt kizárólag a 112 GBM1 és GBM2 tumorpár egyedeinek metilációs eredményeit hasonlítottuk össze. Az elemzés során a saját

16. Ábra: A négy szelektált katekolamin marker promóter+gén CpG metilációs szintje az adatbázis 112 GBM1 vs. GBM2 mintapárjának egyedeiben



*A négy szelektált katekolamin marker promóter+gén CpG metilációjának %-ban megadott medián és IQR értékei az Y tengelyen (Wilcoxon signed rank test (GBM1 vs. GBM2), * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)*

mintáink eredményéhez hasonlóan a validációs adatbázis GBM1 vs. GBM2 mintái között sem találtunk szignifikáns különbséget, csupán egy enyhe trendszerű emelkedést a katekolamin markerek metilációját illetően (ADRA1D: 8,33 [16,66-3,84] vs. 8,01 [19,38-3,84]; ADRBK1:

17,46 [28,85-8,35] vs. 18,98 [33,40-9,87]; DRD2: 4,59 [7,95-2,14] vs. 5,96 [9,17-2,75]; SLC18A2: 5,96 [11,37-3,25] vs. 7,58 [13,00-3,25]) a GBM2 mintákban a GBM1-hez képest.

5. Diszkusszió

A GBM a központi idegrendszert érintő rendkívül agresszív és végzetes kimenetelű tumor. Az utóbbi évtizedekben számos kutatócsoport és nemzetközi konzorcium átfogó vizsgálatokat végzett a GBM molekuláris feltérképezése, etiológiájának meghatározása és potenciális terápiás célpontjainak azonosítása végett. A hisztológiai heterogenitás mellett, fény derült a GBM nagyfokú genomikai, epigenomikai, transzkriptomikai és proteomikai heterogenitására, valamint megtörtént a tumor kialakulását és fejlődését befolyásoló legfontosabb jelátviteli útvonalak azonosítása. A genomikus DNS vizsgálata whole genome sequencing (WGS), whole exome sequencing (WES) és targeted exome sequencing (TES) módszerekkel fontos adatokat ad a tumorok molekuláris elváltozásairól (pontmutáció, inszerció-delécio, génkópia változás, gén átrendeződés, strukturális kromoszómaváltozások) és evolúciójáról, valamint progressziójáról [60; 61]. A keresztmetszeti transzkriptom és metilom elemzések nyomán ma már azonosíthatjuk a GBM molekuláris alcsoportjait, míg a hosszmetzeti (pl. diagnóziskor és recidívkor végzett) elemzések fontos információt adhatnak a tumor progresszióját meghatározó génexpressziós változásokról [25]. Az utóbbi pár évben a „bulk” transzkriptom vizsgálatokat a single-cell RNS szekvenálás (scRNS-seq) egészítette ki, mely segítségével egyedi sejtek populációiban hasonlíthatjuk össze a transzkriptom jellegzetességeit, és mélyebb betekintést nyerhetünk a molekuláris és szignalizációs intratumor heterogenitás kialakulásának folyamatába [62; 15]. A legfrissebb tanulmányok pedig már single-cell multiomics vizsgálatokat végeznek (genom, epigenom és transzkriptom szinten párhuzamosan), mely eredményei jelzik a tumorkutatás jövőbeli irányát [63]. Az epigenomikai megközelítések közül a mai napig legkiterjedtebb a DNS CpG szigetek metilációs meghatározása. Azonban kevés olyan epigenomikai tanulmány született, melyet szekvenciális mintapárokra végeztek, a GBM rövid túlélése és a műtéti minták korlátozott hosszmetzeti elérhetősége miatt. Szintén viszonylag korlátozott volt mostanáig a klinikai FFPE minták genomikai / epigenomikai kutatásban történő feldolgozása a könyvtárkészítés sikerének DNS minőségi függése miatt. A nemrég elérhetővé vált RRBS technológia azonban lehetővé tette FFPE gliomák DNS-ének metilációs elemzéseit, ezzel új utakat nyitva a több dimenziós (pl. szimultán klinikai, képalkotó, patológia, hisztológiai és molekuláris / epigenomikai) tumorkutatásban [51]. Tanulmányunkban mi is az RRBS technológiára építettünk, hogy meghatározzuk primer és recidív GBM tumorokban a DNS CpG differenciált metiláció génjeit és útvonalait. Tanulmányunkkal

egyidejűleg, Klughammer és kutatócsoportja [59] szintén az RRBS módszert alkalmazta gliómákban. A differenciáltan metilált szignáltranszdukciós útvonalak feltárása mellett, ez a csoport sikeresen elkülönítette a TCGA által javasolt GBM transzkripció alcsoportokat [25], jelezvén, hogy ez az epigenomikai megközelítés nagy biztonsággal alkalmazható a transzkripció vizsgálatok helyettesítésére, jó minőségű RNS nélkül.

Az első, genom-szintű, kohortok összehasonlítására épülő RRBS tanulmányaink kiegészítéseként, egy második tanulmányban fókuszáltan elemeztük 4 szelektált katekolamin útvonalhoz köthető marker promóter és downstream génrégió metilációját kohortjaink egyedeiben, amit összevetettünk ugyanezen szekvenciális GBM minták IHC-val meghatározott fehérjeexpressziós változásaival.

5.1 Genom-szintű CpG metilációs elemzések a CG2 – GBM1 – GBM2 kohortokban

Első lépésként az egész genomra kiterjedően elemeztük a DNS CpG metilációs mintázatokat, hogy következtethessünk a GBM-ben legkritikusabb jelátviteli útvonalakat meghatározó gének expressziós szabályozására. Annak ellenére, hogy a sebészi úton eltávolított FFPE GBM mintákból származó DNS-minták lényegesen jobban fragmentálódtak, mint a friss vérből vagy buffy coat-ból nyert DNS-é (2000 bp feletti fragmentek buffy coatban: 70,18%; teljes vér: 87,15%; GBM1: 21,65% és GBM2: 25,1%), ezek a minták jól működtek az RRBS módszerrel. Mivel műtéti normál agy minta etikai okokból nem elérhető, és a post mortem kontroll mintákból (CG1) származó DNS minősége jelentősen gyengébb volt (2000 bp feletti fragmentek 5,91%), a CG1-et elhagytuk és minden elemzést a CG2, GBM1 és GBM2 kohortokra összpontosítottunk. A CG2 öt epilepszia műtéten átesett beteg DNS CpG metilom adatait tartalmazta [59]. Ezt a döntést az is alátámasztotta, hogy saját elemzéseinkből és más tanulmányokból is ismertük, hogy a fragmentáció növekedésével csökken a detektálható CpG metilációs helyek detektálhatósága [59, 64, 65]. Bár a CG2 kontroll alkalmazása is magába foglalt potenciális problémákat, hiszen a normál állományt és degeneratív változásokat is hordozó epilepsziás felnőtt agyrezekátum heterogén sejtpopulációkat tartalmaz a GBM transzformálódott gliális klónjaival szemben, csak ez a műtéti eredetű, nem tumoros agyi kontroll volt elérhető számunkra. Felmerült gliasejtvonalak kontroll DNS-forrásként való használata, azonban az ilyen kontroll más hiányosságokkal párosulhatott volna, mint például az *in vitro* (genomikai és epigenomikai) módosulások felhalmozódása és az *in vivo* mikrokörnyezet hatásainak a hiánya. Mivel mindent összevetve nincs ideális normál agyi kontroll minta GBM-hez, azokkal a kontrollokkal dolgoztunk, melyeket más hasonló tanulmányban is sikeresen (és rutinszerűen) alkalmaztak [47; 59; 66]. Mint ahogyan

tumorokban általánosságban ismert [67; 68; 69; 70], GBM mintáinkban is a DNS genom szintű teljes metilációját tekintve megfigyeltünk egyfajta eltolódást a hipometiláció felé, amikor a CG2 (átlag metilációs ráta 47,91%), GBM1 (41,34%) és GBM2 (31,6%) csoportokat hasonlítottuk össze. Az RnBeads elemzések nem mutattak szignifikáns p-értéket a CpG helyek és régiók metilációs szintjében a három csoport (CG2-GBM1-GBM2) egyik összehasonlítása során sem. Azonban a GO analízisek számos differenciáltan metilált, tumor biológiailag releváns jelátviteli útvonalat azonosítottak.

5.1.1 Primer tumorok (GBM1) összehasonlítása az agyi kontroll (CG2) mintákkal

A GBM1 vs. CG2 összehasonlítás során jelentős (valószínűsíthetően gén aktivációt jelző) hipometilációt találtunk az endothél sejtproliferáció pozitív szabályozásának útvonalában, mely hozzájárul az angiogenezis folyamatához, ezáltal elősegítve a GBM növekedését [71]. Ez nem volt váratlan, hiszen a vaszkuláris endothéliális növekedési faktor (VEGF) szerepére már fény derült GBM-ben, és az anti-angiogén (bevacizumab) terápiát is alkalmazzák a klinikai tünetek enyhítésére és a progressziómentes túlélés meghosszabbítására [72; 73]. Ugyanebben a GBM1 vs. CG2 összehasonlításban (valószínűsíthetően gén repressziót jelző) hipermetilációt találtunk a nukleinsav templált transzkripció útvonalaiban, valamint számos gént magába foglaló, nukleobázist tartalmazó anyagcsere folyamatokban, amelyek abnormális működése megváltoztatja a sejtfunkciót és meghatározza a sejt differenciálódás irányát [74; 75]. A legszembetűnőbb hipermetilációt a neuronális differenciálódáshoz kapcsolódó útvonalak, míg a legjelentősebb hipometilációt a szinapszisképződéshez és a mielinizációhoz köthető útvonalakban tapasztaltunk. Azt feltételezzük, hogy ez utóbbi megfigyelések a normál neuronális differenciálódás elemeinek megzavart egyensúlyát tükrözik, melyek mögött a mások által is megfigyelt torz fejlődési mintázatok állnak a GBM rákos őssejtjeiben (CSC /GSC) [66; 76].

5.1.2 Recidív tumorok (GBM2) összehasonlítása az agyi kontroll (CG2) mintákkal

A GBM2 vs. CG2 differenciáltan metilált génpromótereit összehasonlítva a hipometilált útvonalak elsősorban az intracelluláris funkciókkal és transzporttal voltak összekapcsolhatóak, kiemelve ezeket, mint potenciális új kísérleti terápiás célpontokat [77]. A hipermetiláció jelentős volt a transzkripció szabályozást, sejtadhéziót és embrionális fejlődést érintő jelátviteli útvonalak esetében, melyek egyensúlyzavara szintén hozzájárulhat a normál neuronális differenciálódás torzulásához és a pluripotens neuroepithéliális sejtek rendellenes proliferációjához [66; 78].

5.1.3 Recidív tumorok (GBM2) összehasonlítása primer tumorokkal (GBM1)

A GBM2 vs. GBM1 differenciáltan metilált útvonalainak összehasonlítása számos változást tárt fel alapvető sejtfunkciók tekintetében. Alacsonyabb metilációs szint alapján magasabb géneexpressziót és ezáltal aktivitást feltételezünk a szignalizációért és kommunikációért felelős sejtválaszokban GBM1-ben a GBM2-höz képest. A kanonikus Wnt szignalizációs útvonal egyes elemei (endothél sejt migrációért és sejtadhézióért felelős gének), köztük bizonyos Wnt receptorok (pl. Fzd8) és ligandok (pl. Wnt11), aktívabbnak tűntek GBM1-ben. Ezzel szemben néhány Wnt ligand (pl. Wnt6; Wnt7b) és receptor (pl. Fzd1; Fzd3) promótere GBM2-ben volt kevésbé metilált, ezáltal aktívabb. A Wnt útvonal elemeinek mélyebb elemzését kutatócsoportunk egy másik tanulmány keretein belül végezte tovább [79]. A GO elemzések másik figyelemreméltó eredménye a promóterek alacsonyabb metilációja (feltehetően magasabb aktivitása) a GBM1-ben olyan gének esetében, melyek a katekolamin szekrécióban és transzportban játszanak szerepet. A glióma kiindulását képező sejtekben a monoamin szignalizáció részt vesz a normál fejlődési mechanizmusok eltérítésében és elősegíti a tumor kialakulását. A GBM mikrokörnyezetében lévő szinaptikus monoaminok befolyásolják az angiogenezist és a tumor növekedését [58]. A megfigyelés, hogy ezek az útvonalak hipometiláltabbak és valószínűleg aktívabbnak a GBM1-ben, mint GBM2-ben, tükrözi a korai és késői stádiumú daganatok egy korábban még nem publikált jellegzetességét, mely további kutatásokat érdemel. Korábbi tanulmányok más módszertani megközelítéssel már tettek említést bizonyos differenciáltan metilált katekolamin útvonal génekről (pl. ADRA2c; ADRA1a; DRD5) és neurotranszmitter útvonalokról (ADRA1b, ADRA2a; DRD1) [66; 67]. Így a közelmúltban felmerült ezen monoaminok és receptoraik terápiás manipulálása is [58; 80]. Azonban a katekolamin útvonal változásainak elemzése szekvenciális műtéti FFPE GBM mintákban eddig nem került leírásra.

A katekolamin útvonal elemeivel szemben számos immunútvonal elemeinek, többek között a leukocita szabályozásban, limfocita és NK sejt mediált immunitásban funkciót betöltő molekuláknak a génpromótereik GBM2-ben voltak hipometiláltabbak. Voltak azonban olyanok immunregulátoros folyamatok, mint a makrofág gyulladáshoz szükséges fehérjetermelés és CD8+ T sejtek proliferációja, melyek a GBM1-ben tűntek hipometilációjuk alapján aktívabbnak. Ezek az adatok konzisztensek azzal a korrelációval, melyet a GBM1-be infiltráló limfociták (TIL) IHC-vel meghatározott mennyisége, valamint a primer és recidív tumor kialakulása közt eltelt idő (T1-T2) között találtunk. Az immunregulátoros útvonalak általunk GBM1-ben észlelt hipometilációja szintén egyetértésben van a GBM fejlődése (és progressziója) során mások által

leírt, különböző immunútvonalak eltérő aktivitására vonatkozó megfigyeléseivel [59; 66; 81; 82]. Habár az immunterápiák alkalmazása GBM-ben nem volt eddig olyan hatékony, mint más szolid tumorokban, számos új módszer létezik, melyek elősegíthetik az immunmodulátorok vér-agy gáton történő átjutását, és erősebb citotoxicitását (pl. vakcinák, monoklonális antitestek, módosított T-sejtek és őssejtek, immun checkpoint inhibitorok, RNS alapú terápiák, onkolitikus vírusok). Ezek a terápiás eszközök remélhetőleg felülkerekednek majd a tumorok immunelkerülő mechanizmusain, és specifikusan megcélözzák a daganatot vagy annak mikrokörnyezetét [73; 83].

5.1.4 Cross-platform (szekvenálás vs. microarray) metilom adatok összevetése saját és TCGA szekvenciális GBM mintapárokbán

Következő lépésként a TCGA adatbázisából elérhető 12 szekvenciális GBM mintapár microarray alapú DNS CpG metilációs adatait hasonlítottuk össze az általunk használt metilációs kontrollokkal (CG2) [59]. Az első (TCGA GBM vs. CG2) analízis eredménye szerint az embrionális fejlődés, immunszabályzás és Wnt szignalizáció útvonalak génpromóterei hipometiláltabbak (feltehetően aktívabbak) voltak a TCGA GBM mintáiban, mint a CG2-ben. A második analízis (TCGA GBM2 vs. GBM1) hipometiláltabb (feltehetően aktívabb) génpromótereket mutatott az őssejt proliferációban és sejt differenciálódásban, metabolikus folyamatokban, apoptózis negatív szabályozásában, sejtadhézióban, sejt migrációban és T-sejtek polarizációjában funkciót betöltő jelátviteli útvonalak esetében a TCGA recidív tumorjaiban a primerekhez képest. Ezzel szemben az endothéliális sejtek proliferációjában, T-sejtek proliferációjában, sejt-sejt szignalizációban, neuronális differenciálódásban, G-protein mediált szignalizációban (neurotranszmitter, katekolamin és bizonyos Wnt receptor szignalizációja) szerepet játszó útvonalak génpromóterei a TCGA primer tumorjaiban voltak hipometiláltabbak (aktívabbak). Az interpretációt nehezítő technikai körülményeket is figyelembe véve (különböző platformok adatainak összehasonlítása, kis elemszámú kohortok), a TCGA minták analízisének eredménye átfedésben van a saját eredményeinkkel, így további megerősítést nyújtanak a következtetéseinkre.

5.1.5 Locus Overlap Analysis (LOLA) a GBM1-CG2, GBM2-CG2 és GBM2-GBM1 epigenomikai adatok összevetése nyomán

Utolsó lépésként a LOLA analízist végeztük el, hogy azonosítsuk azokat a genomi régiókat és szabályozó elemeket, melyek az epigenomikai adatok funkcionális interpretálásában relevánsak. A GO analízisből származó 1000 leghipometiláltabb és leghipermetiláltabb tiling régióra fókuszáltunk. A GBM1-CG2 és GBM2-CG2 összehasonlításokból származó analízis

olyan hipometilált régiókra mutatott rá, melyek a rákos őssejtek differenciálódásában és a GBM kialakulásában is jelentős szereppel bíró transzkripciós faktor kötőhelyeit (pl. ESR1, ESR2, CTCF, RUNX1) és hiszton fehérjéket (pl. H3K27me3, H3K4me1, H3K4me3) reprezentáltak, már szerzők eredményeivel egyetértésben [59; 84; 85]. Továbbá a LOLA analízis dúsulást mutatott transzkripciós faktorok hipometilált kötőhelyeire (pl. ESR1, ESR2, FOXA2) és hisztonfehérjékre (pl. H3K4m1, H3K4m2, H3K4m3, H3K27m3, H3K9m3) a GBM2-ben a GBM1-hez képest, melyeknek szerepe van a tumor túlélésében és további progressziójában [86; 87].

5.1.6 Korrelációs elemzések a klinikai és patológiai adatok között

Végső lépésként a patológiai és klinikai adatok közötti korrelációk elemzését végeztük el Kruskal-Wallis és Mann-Whitney U tesztekkel. Sajnálatos módon több beteg halálának időpontja az etikai engedélyünk korlátai között nem volt megszerezhető, így a primer tumor diagnosztizálása (T1) és a recidív tumor megjelenése (T2) között eltelt időt használtuk fel korrelációs elemzéseink során, a teljes túlélés helyett. T1-T2 között eltelt időt összevetettük a betegek nemével, korával, tumorok morfológiai alcsoportjával, mitotikus rátájával, a mikrovaszkuláris proliferáció mértékével, nekrozis mértékével, illetve a tumorba infiltrálódó limfociták mennyiségével mindkét tumorcsoport esetében. Korrelációs vizsgálataink egyetlen esetben fedtek fel trendszerű összefüggést a T1-T2 és a tumorba infiltrálódó limfociták mennyisége között a GBM1 kohortban, mely azt mutatta, hogy az emelkedett limfocita mennyisége a tumor mikro környezetében általában későbbi recidívával jár együtt. Szignifikáns p-értéket egyik összehasonlításban sem kaptunk, mely részben a kis kohort mérettel állhatott összefüggésben.

5.2 A katekolamin útvonal kiválasztott markerei

A katekolaminok és receptoraik a fiziológiás interneuronális kommunikáció kulcselemei. Az utóbbi időben azonban egyre több adat utal arra, hogy ezek a molekulák a neurális őssejtekre (NSC), a progenitor sejtekre (NPC) és a GBM őssejtekre is hatnak, ezáltal serkentve a sejtproliferációt és differenciálódást a normál szövetekben és daganatokban, így GBM-ben is [88; 89; 90]. A 22 pár szekvenciális GBM mintapáron kivitelezett, genomszintű RRBS DNS CpG metilációs tanulmányunk GO analízise felfedezett számos differenciáltan metilált génpromótert a katekolamin szekréció és transzport jelátviteli útvonalának elemeiben (hipometiláció a primer tumorokban a recidívákhoz képest). Ez a megfigyelés azt jelezte, hogy a katekolaminok túlnyomórészt a GBM kialakulásának korai stádiumában játszhatnak nagyobb szerepet. Mivel az 5.1 fejezetben leírt tanulmány nem specifikusan egyes markereket jelzett

individuális tumor mintákban, hanem útvonalakat azonosított kohortjainkban, további vizsgálatokkal szeretnénk volna pontosabb képet kapni bizonyos katekolamin markerek promóter és gén régióinak CpG metilációjáról és párhuzamosan azok protein expressziós szintjeiről egyedi mintáinkban. Az RRBS adataink alapján kiválasztottunk 4 katekolamin markert, melyek kohorszinten szignifikánsan alacsonyabb metilációs szintet mutattak primer tumorokban. Ezek között a markerek között szerepelt az ADRA1D, ADRBK1/GRK2, DRD2 illetve az SLC18A2/VMAT2. ADRA1D a G-protein-kapcsolt receptorok (GPCR) családjába tartozik, mely a sejtmembránokba ágyazódva található meg az egész szervezetben. Fő ligandja a NE, mely sok más egyéb hatása mellett (simaizom sejtek összehúzódásának szabályozása, inzulin termelés szabályozása, vérnyomás szabályozás stb.) tumorbiológiai szempontból is fontos az intracelluláris folyamatokban betöltött szerepe, a ciklikus AMP szint szabályozása, illetve a sejtproliferációban kulcs szerepű G1-S tranzíció gátlása által [91; 92]. Más ráktípusokban már feljegyezték, hogy a NE és az E is képes sejt migrációt indukálni [93; 94], továbbá az adenoreceptorok farmakológiai aktiválása elősegíti a daganat kialakulását például a grasztrointesztinális traktusban vagy a májban [91; 95]. A DRD2 szintén G-fehérjéken keresztül fejti ki hatását és a MAPK/ERK vagy PI3K/Akt szignalizációs útvonalon át befolyásolja a sejt differenciálódás, tumor növekedés, metabolizmus és apoptózis folyamatát [96]. A központi idegrendszerben a katekolamin mennyiségének 80%-át a dopamin adja és normál körülmények között egyéb funkciók mellett (mint lokomóció, memória és emocionális folyamatok) a GABAerg interneuronok fejlődésének szabályozásában is részt vesz, továbbá serkenti az új neuronok kialakulását a hippocampusban. Ezek a megfigyelések azt jelzik, hogy a dopamin nagy valószínűséggel serkenti a NSC-k és NPC-k proliferációját és a differenciálódását. ADRBK1/GRK2 egy szignalizációs (kináz) modulátor, mely expressziójának vagy aktivitásának megváltozása esetén onkogenikus GPCR funkciókat idézhet elő [97]. GBM-et csökkent GRK3 expresszió jellemzi, mely a sejt növekedés negatív regulációját eredményezi, illetve emelkedett GRK5 expresszió jellemzi, mely agresszívabb tumor tulajdonságokat eredményez, főként a recidívák esetében [97; 98]. GRK-k nem csak gliómákban, hanem más tumor típusokban is onkogén szerepet játszhatnak [99]. A negyedik marker az SLC18A2/VMAT2, ami egy transzmembrán transzporter. Funkciójáról viszonylag kevés információ áll rendelkezésre. Ami biztos, hogy ez a molekula az integráns membránfehérjék csoportjába tartozik, melyek normál körülmények között citoszolikus anyagokat (dopamint, NE-t, szerotonint és hisztamint) szinaptikus vezikulákba csomagolva juttatnak a szinaptikus résbe és mediálják azok újrafelvételét [100]. Ezen fehérjék

preszinaptikus expressziójának megváltozása befolyásolhatja a monoaminok kibocsátását és újrafelvételét, ezáltal a posztszinaptikus szignalizációjukat is [101; 102].

5.2.1 A katekolamin útvonal kiválasztott markereinek promoter + gén metilációja és protein expressziója kontroll, GBM1 és GBM2 mintákban

Hogy pontosabb információt kapjunk a katekolamin markerekről és teszteljük a feltételezett inverz kapcsolatot a CpG metiláció és fehérjeexpresszió szintek között, első lépésben kvantitatív IHC vizsgálatokat végeztünk ugyanazon kohort FFPE mintablokkjain, mint amelyeken a CpG metilációs vizsgálatokat végeztük az első körben. A fehérjeexpresszió szintjei az ADRBK1/GRK2 és a DRD2 esetében szignifikánsan, ADRA1D és VMAT2 esetében viszont csupán tendenciálisan voltak magasabbak GBM1-ben mint GBM2-ben. A GBM mintákat a HC csoporttal összehasonlítva az ADRA1D szintje alacsonyabb, ADRBK1 szintje viszont magasabb volt a tumorokban. DRD2 és SLC18A2/VMAT2 nem mutatott szignifikáns különbséget ezekben a kontroll és GBM1/GBM2 összehasonlításokban.

Ezt követően meghatároztuk a 4 marker promóter+gén régióinak CpG metilációs szintjeit egyedi mintákban és ezeket összehasonlítottuk a metilációs kontrollcsoport egyedi adataival (CG2). Ezek az értékelések szignifikánsan vagy tendenciálisan magasabb metilációs szintet mutattak a 4 marker esetében a CG2-ben a GBM1 és GBM2-höz hasonlítva. Az ADRBK1 és DRD2 esetében mind a CG2vs.GBM1, mind a CG2vs.GBM2 összehasonlításban szignifikáns eredményt kaptunk, melyek inverz korrelációban voltak a HC és GBM1 összehasonlításból származó protein expressziós szintekkel. Arra számítottunk, hogy GBM párok esetén alacsonyabb promóter+gén metilációs szintet fogunk kimutatni abban az esetben, ha a fehérje expressziós szintje magas. Azonban GBM1 és GBM2 összehasonlításban ilyen összefüggést nem tapasztaltunk, hiszen nem találtunk szignifikáns különbséget metilációs szintek között a GBM1 és GBM2 összevetése esetén, holott a fehérje expresszióban igen.

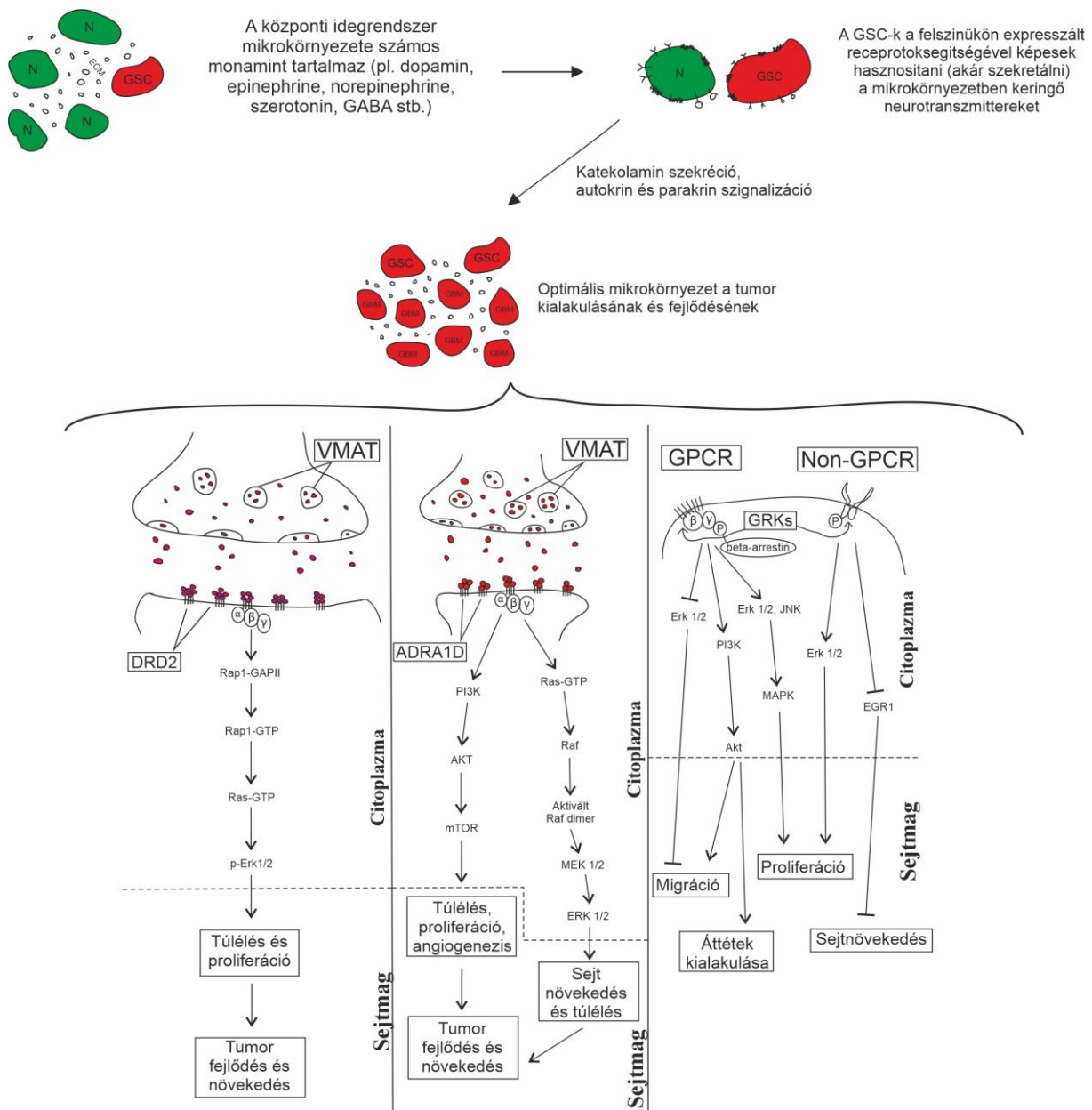
Végső lépésként validáltuk a 4 markerünk promóter+gén régiójában mért metilációs eredményeket egy másik, RRBS elemzésből származó FFPE GBM kohortban, mely 122 szekvenciális GBM mintapárból állt és egyedi eredményei elérhetőek voltak egy adatbázisban [59, <https://www.ebi.ac.uk/ena>, hozzáférési szám: EGAS00001002538]. A markáns kohortméret különbség miatti torzulás elkerülése végett csak a 122 GBM mintapár metilációs adatait hasonlítottuk össze egymással, de az 5 mintából álló CG2 egyedei adataival nem. Ennek magyarázata az, hogy az FFPE mintákból származó (fragmentált) DNS RRBS szekvencia eredményeinek vizsgálatakor, minél több egyén van a kohortban, annál magasabb a detektált

metilált CpG-k száma, és így a számított össz-CpG a vizsgált régióban. Ezért ha az összehasonlított kohortok mérete nagymértékben különbözik, a CpG metilációs különbségek torz eredményt adhatnak. Az adatbázis GBM1/GBM2 mintáinak összehasonlítása során, mind a 4 marker esetében kissé alacsonyabb metilációs szintet találtunk a primer tumorokban, mint a recidívákban, azonban ez a kis különbség egyik esetben sem volt statisztikailag szignifikáns. A 4 marker esetében nem detektált inverz promóter+gén metiláció és fehérje expresszió (nevezetesen a magasabb fehérje expresszió nem társult a várt promóter+gén hipometilációval) GBM1-ben GBM2-höz képest, a génexpresszió szabályozásának alternatív mechanizmusaira utalhat. Inverz korreláció a fehérjeexpresszió és a promóter+gén metiláció között szintúgy csak az ADRBK1 és DRD2 esetében volt megfigyelhető a GBM1 vs. CG2 összehasonlításban, illetve az ADRBK1 esetében a GBM2 vs. CG2 összehasonlításban, ami tovább erősíti más fehérjeexpressziót befolyásoló tényezők szerepét is a promóter+gén metiláción kívül. Metilációs változások nem csak egy adott gént és promóter régiót érinthetnek, hanem számos génexpresszió szabályozásában részt vevő molekulát, mint az enhancer / silencer régiókat, transzkripció faktorok kötőhelyeit, splice helyeket vagy microRNS-eket és siRNS-eket kódoló régiókat is [103]. Ezen felül az újonnan szerzett szomatikus kromoszóma strukturális változások, a génkópiaszám-variációk vagy a hiszton módosulások változásai szintén befolyásolhatják a fehérje expressziós mintázatot szekvenciális tumorokban [104]. Ezek a mechanizmusok, ha nem is teljesen, részben magyarázatot adhatnak arra, hogy miért nem láttuk mindenhol a várt inverz korrelációt a fehérjeexpresszió és a metilációs adatok között a kontroll, GBM1 és GBM2 kohortjaink egyedi mintáiban. Mindazonáltal adataink alátámasztják, hogy a katekolaminok eltérő szerepet játszanak progresszív GBM-ben, mint a nem tumoros agyszövetekben. A neuronok monoaminokat szintetizálnak és azokat a szinaptikus résbe juttatják, ahonnan számos molekula kidiffundál és a kibocsátó neuron felszínén vagy a környező asztrocitákon és oligodendrocitákon autoreceptorokat aktiválnak [105; 106]. A központi idegrendszer tumorkeltővé transzformálódott sejtjei szintén ki vannak téve a neurotranszmittereknek. A DRD2 mRNS és fehérje szintjét magasabbnak mérték humán neoplasztikus szövetekben, mint normál agyi sejtekben [107; 108], valamint a DRD2 szintje magasabb volt a mi tanulmányunk primer és recidív tumoraiban a kontrollokhoz képest. Ezek a megfigyelések megerősítik azt a hipotézist, hogy a dopaminnak hatása van a gliómák kialakulására és fejlődésére. Miközben ezek az adatok azt sugallják, hogy a dopamin a DRD2-n keresztül pro-proliferatív tulajdonságai révén hozzájárulhat a karcinogenezishez, hatásai összetettebbek. Az exogén dopamin képes csökkenteni az angiogenezist és a tumornövekedést emlő-és vastagbélrákban a vaszkuláris növekedési faktor (VEGF) által kiváltott VEGFR2

foszforilációjával és a downstream útvonal blokkolásával egerekben [109]. Ezek az ellentétes hatások megnehezítik a dopamint célzó gyógyszerek tumorok elleni lehetséges alkalmazását. A mi GBM és kontrollmintákra vonatkozó adataink sem mutattak egyértelmű irányt a DRD2 expressziós változásaiban, ami arra utal, hogy további kutatásokra van szükség a dopamin komplex szerepének pontosabb feltárásához a gliómagenezis és a progresszió folyamatában.

A GRK-k (beleértve az ADRBK1-et is) a protein kinázok családját alkotják, amelyek foszforilálják a GPCR-ek intracelluláris doménjeit, és ezáltal szabályozzák a downstream G-protein jelátviteli útvonalakat. GRK3-ról már tudjuk, hogy a GBM egy negatív regulátora, míg a GRK5 az agresszívabb növekedéshez és a gyógyszerek elleni rezisztencia kialakulásához járul hozzá [97]. Bár a GRK2-vel kapcsolatban GBM-ben nem állnak rendelkezésre konkrét adatok, számos GRK-ról ismert, különböző tumorfajtákban, hogy pozitívan befolyásolják a sejtproliferációt és a tumorok növekedését [99]. Mivel a GPCR deszenzitizáció függ a GRK expresszió szintjétől, azok a sejtek, amelyekben magas a GRK2 expressziója, alacsony agonista koncentráció mellett nagy valószínűséggel elindítanak GRK-mediált jelátviteli útvonalakat [110]. Ezek a megfigyelések felvetik annak lehetőségét, hogy az ADRBK1/GRK2 és a GPCR-ek, mint például a DRD2, elősegíthetik a sejtproliferációt és a tumornövekedést GBM-ben. Az adrenerg neurotranszmitterek (NE, E) ismertén elősegítik a sejtmigrációt és inváziót különböző ráktípusokban [93; 94], és abnormális aktivációjuk esetén (pl. GRK feedback vagy gyógyszerek hatására) indukálhatják a tumor kialakulását [91; 95]. Bár az ADRA1D magasabb expressziós szintjét találtuk a HC csoportban, mint a GBM csoportokban, nem zárhatjuk ki annak lehetőségét, hogy e molekula expressziójában bekövetkező változások befolyásolhatják a tumor kialakulását.

17. Ábra: A vizsgált katekolamin markerek potenciális szerepe a tumorok kialakulásában és progressziójában



GSC: glioma stem cell; VMAT: vezikuláris monoamine transzporter; DRD2: dopamin receptor D2; ADRA1D: adrenerg receptor alpha 1D; GPCR: G-protein kapcsolt receptor; GRK: G-protein kapcsolt receptor kináz

A vezikuláris monoamin transzporterek az agy dopaminerg, szerotonerg és noradrenerg neuronjaiban expresszálódnak, és így felelősek lehetnek az összes monoamin tárolásáért és szállításáért a központi idegrendszerben. Az SLC18A2/ VMAT2-t expresszáló egérvonalakban kimutatták, hogy dopaminerg méreggel történő kezelés után az alacsony VMAT2 szint

katekolaminerg sejtpusztulást okozott, míg a magas VMAT2 szint növelte a dopamin felszabadulását és megvédte a sejteket [111]. A monoaminok kiürülésének hatásai állatmodellekben és humán tanulmányokban végzett kognitív kísérletekből (pl. depresszió, döntéshozatal stb.) már jól ismertek [112; 113], azonban az exogén módon beadott vagy kimerített monoaminok *in vivo* vagy *in vitro* hatásaira vonatkozó adatok GBM/glióma sejtvonalakban kevésbé egyértelműek.

Összegezve, saját eredményeink és a szakirodalom eddig elérhető viszonylag korlátozott adatai arra utalnak, hogy a neurotranszmittereket, különösképpen a katekolaminokat, a GBM saját hasznára és növekedésére fordítja (**17. ábra**). Ez a megfigyelés új irányt jelöl ki a komplementer kezelési stratégiák kutatásában. Fontos megjegyezni, hogy a katekolaminok gliómában betöltött szerepével kapcsolatban alig áll rendelkezésünkre adat *in vivo* tanulmányokból, és egyetlen korábbi klinikai tanulmány sem mutatta ki, hogy a katekolamin hatású vagy receptor moduláló gyógyszerek adagolása (ami meglehetősen gyakori a populációban) ezen a jelátviteli útvonalon keresztül befolyásolná a GBM természetes lefolyását. Az egész genomra kiterjedő korábbi transzkriptom vagy scRNS szekvenálási elemzések bár számos útvonalat és génterméket azonosítottak a GBM-mel kapcsolatban [114; 115; 116], nem emelték ki ennek az útvonalnak a jelentőségét. Tekintettel a GBM inter- és intratumor heterogenitásának zavaró hatásaira, valamint a tumorsejtek és mikro környezetük közötti kölcsönhatások összetettségére, a katekolamin aktiválás glióma növekedésére gyakorolt hatásának *in vivo* vagy *ex vivo* pontos meghatározása nem egyszerű. Csak „bulk” szöveti és egyedi sejtek OMICS vizsgálatainak integrált eredményeivel, valamint ligandok, receptorok és jelátviteli molekulák célzott *in vitro* manipulálásával kiegészített képalkotás hozhat közelebb bennünket annak eldöntéséhez, hogy ennek az útvonalnak az elemei hasznosíthatók-e terápia célpontokként humán kezeléseknél.

6. Következtetések

A szekvenciális FFPE tumor mintákon végzett CpG metilációs tanulmány számos fontos differenciáltan metilált jelátviteli útvonalat mutatott ki, melyek szerepet játszhatnak a GBM kialakulásában és progressziójában. Azok az útvonalak, amelyek a szinapszis formációban, mielinizációban és endothél sejtek proliferációjában játszanak szerepet aktívabbak voltak GBM1-ben mint CG2-ben, feltehetően a tumorigenezisben hibásan megvalósuló szövetképződés és angiogenezis jeleként. A normál neurogenesisben résztvevő elemek elnyomása szintén támogathatja a torz őssejtdifferenciálódást GBM-ben. Az alapvető sejtválasz, jelátvitel és kommunikáció, valamint a katekolamin jelátviteli útvonalak aktívabbnak tűntek a GBM korai, mint késői fázisában a kohortszintű GO analízis alapján. Hasonlóképpen az immunszabályozásban résztvevő útvonalak különböző elemei is eltérően tűntek aktívnak primer és recidiv GBM-ekben.

A szelektált katekolamin markerek protein expressziós szintjének kvantitatív IHC vizsgálata során mindegyik marker esetében szignifikánsan (DRD2, ADRBK1/GRK2) vagy tendenciálisan (ADRA1D, SLC18A2) magasabb fehérje expressziót láttunk GBM1-ben mint GBM2-ben. Összehasonlítva a kiválasztott markerek promóter + génszegmenseinek CpG metilációs adatait, a CG2 kohort mintáiban szignifikánsan (ADRBK1, DRD2), vagy tendenciózusan (ADRA1D, SLC18A2) magasabb metilációs szintet tapasztaltunk a GBM1/GBM2 mintákhoz képest, ami valószínűleg az alapja, legalábbis részben, a GBM1 vs. HC összehasonlításban kimutatott inverz fehérje expresszióknak. Az qIHC által jelzett marker expressziós változásokat nem kísérték inverz változások a promóter + gén metilációs szintekben a GBM1 és a GBM2 összehasonlításban, ami arra utal, hogy a CpG metiláción kívül más szabályozó mechanizmusok is érintettek lehetnek a GBM progressziója során. A saját GBM1 és GBM2 mintáinkban tapasztaltakhoz hasonlóan, az adatbázis szekvenciális GBM kohortjának nagyszámú egyedi mintáiban is a DNS CpG metilációs szintek a vizsgált promoterekben azonosak voltak [59].

Összességében ezek a tanulmányok számos differenciáltan metilált jelátviteli útvonalat azonosítottak hosszmetzeti GBM-ben, klinikai rutinban használt FFPE minták és egy új módszer, az RRBS alkalmazása, valamint az adatok kohortszintű bioinformatikai elemzése során. Megállapíthatjuk, hogy első humán GBM tanulmányként kimutattuk a neurotranszmitterek, azon belül is a katekolamin útvonal elemeinek, tumorbiológiában betöltött részvételét. Bár eddigi adataink egyelőre exploratív jellegűek, nagy valószínűséggel állíthatjuk, hogy a neurotranszmitterek receptorai, ligandjai és mediátorai moduláló szerepet játszhatnak a

gliómagenezisben. A technikai korlátok ellenére, ezek az eredmények konzisztensek az eddigi, bár egyelőre szórványos adatokkal, és egyben ki is egészítik azokat, alapot adva további fókuszált kutatásoknak.

7. Új megállapítások

- A szinapszisok kialakulásában, mielinizációban és endotheliális sejtproliferációban szerepet játszó biokémiai útvonalak hipometiláltabbak, így feltehetően aktívabbak a primer GBM mintákban a kontrollokhoz képest
- Az alapvető sejtválaszokért, szignalizációért és kommunikációért, valamint a katekolamin szignalizációért, szekrécióért és transzportért felelős útvonalak hipometiláltabbak, így valószínűleg aktívabbak a primer GBM tumorokban a recidívakkal összehasonlítva
- Számos immunszabályzó útvonal (leukocita, limfocita és NK sejt mediált immunitás) magasabb metiláltsági szintet, így alacsonyabb aktivitást mutat primer GBM mintákban a recidív tumorokhoz képest
- A célzottan kiválasztott katekolamin markerek fehérje expressziós szintje szignifikánsan (ADRB1; DRD2) vagy tendenciálisan (ADRA1D; SLC18A2) magasabb a primer GBM mintákban, mint a recidív tumorokban
- A DNS CpG metiláció elemzése szignifikánsan vagy tendenciálisan magasabb metilációs szintet mutatnak mind a 4 marker esetében a metilációs kontrollcsoportban a primer és recidív tumorokhoz képest, viszont nem mutatnak különbséget a két tumorcsoport között
- A validációs adatbázis kohort metilációs elemzése nem mutatnak szignifikáns különbséget a 4 marker metilációs szintjében a primer és recidív GBM minták összehasonlítása esetén
- A vizsgált markerek promotor+gén régióinak metilációs státuszán kívül más folyamatok is szerepet játszanak a katekolamin markerek expressziójának szabályozásában
- A vizsgált neurotranszmitterek és kapcsolódó receptoraik fontos szerepet játszanak a gliómák molekuláris patogenezisében, így további célzott vizsgálatuk új potenciális terápiás célpontokkal szolgáltat

8. Referencialista

1. Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., Von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., ... & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta neuropathologica*, 131(6), 803-820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
2. 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>.
3. Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., ... & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro-oncology*, 23(8), 1231-1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
4. 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>.
5. Internetes hivatkozás: <https://rakliga.hu/agydaganat/> (Elérés dátuma: 2021.10.09)
6. 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).
7. Weller M, Cloughesy T, Perry JR, Wick W (2012) Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma—are we there yet? *NeuroOncol* 15(1):4–27. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos273>
8. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg DM, Lhermitte B, Toms S, Idubai A, Ahluwalia MS, Fink K, di Meco F, Lieberman F, Zhu JJ, Stragliotto G, Tran DD, Brem S, Hottinger AF, Kirson ED, Lavy-Shahaf G, Weinberg U, Kim CY, Paek SH, Nicholas G, Bruna J, Hirte H, Weller M, Palti Y, Hegi ME, Ram Z (2017) Effect of tumor-treating fields plus maintenance temozolomide vs maintenance temozolomide alone on survival in patients with glioblastoma: a randomized clinical trial. *JAMA* 318(23):2306–2316. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.18718>
9. 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>.

10. Kim H, Zheng S, Amini SS, Virk SM, Mikkelsen T, Brat DJ et al (2015) Whole-genome and multisector exome sequencing of primary and post-treatment glioblastoma reveals patterns of tumor evolution. *Genome Res* 25(3):316–327. doi:10.1101/gr.180612.114
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. Network CGAR (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455(7216):1061–1068. <https://doi.org/10.1038/nature07385>
15. Patel AP, Tirosch I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, Cahill DP, Nahed BV, Curry WT, Martuza RL, Louis DN, Rozenblatt-Rosen O, Suva ML, Regev A, Bernstein BE (2014) Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 344(6190):1396– 1401. <https://doi.org/10.1126/science.1254257>
16. Gill BJ, Pisapia DJ, Malone HR, Goldstein H, Lei L, Sonabend A et al (2014) MRI-localized biopsies reveal subtype-specific differences in molecular and cellular composition at the margins of glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 111(34):12550–12555. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405839111>
17. Nagy, Á., Garzuly, F., Padányi, G., Szűcs, I., Feldmann, Á., Murnyák, B., ... & Kálmán, B. (2019). Molecular subgroups of glioblastoma—an assessment by immunohistochemical markers. *Pathology & Oncology Research*, 25(1), 21-31. DOI 10.1007/s12253-017-0311-6
18. Birbrair A, Sattiraju A, Zhu D, Zulato G, Batista I, Nguyen VT, Messi ML, Solingapuram Sai KK, Marini FC, Delbono O, Mintz A (2017) Novel peripherally derived neural-like stem cells as therapeutic carriers for treating glioblastomas. *Stem Cells Transl Med* 6(2):471–481. <https://doi.org/10.5966/sctm.2016-0007>

19. Orzan F, De Bacco F, Crisafulli G, Pellegatta S, Mussolin B, Siravegna G et al (2017) Genetic evolution of glioblastoma stemlike cells from primary to recurrent tumor. *Stem Cells* 35(11):2218– 2228. <https://doi.org/10.1002/stem.2703>
20. 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>.
21. Huang PH, Xu AM, White FM. Oncogenic EGFR signaling networks in glioma. *Sci Signal*. 2009;2:re6. <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.287re6>
22. Sugawa, N., Ekstrand, A. J., James, C. D., & Collins, V. P. (1990). Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(21), 8602-8606. Koul D. PTEN signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biol Ther*. 2008;7:1321–5. <http://dx.doi.org/10.4161/cbt.7.9.6954>
23. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. Malignant astrocytic glioma: Genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev*. 2007;21:2683–710. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1596707>
24. Shangary S, Wang S. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: A novel approach for cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2009;49:223–41. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094723>
25. 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>.
26. 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>.
27. Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*, 21(3), 381-395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
28. Kooistra, S. M., & Helin, K. (2012). Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(5), 297-311. <https://doi.org/10.1038/nrm3327>
29. Kozono, D., Li, J., Nitta, M., Sampetean, O., Gonda, D., Kushwaha, D. S., ... & Chen, C. C. (2015). Dynamic epigenetic regulation of glioblastoma tumorigenicity through

- LSD1 modulation of MYC expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(30), E4055-E4064. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501967112>
30. Ene, C. I., Edwards, L., Riddick, G., Baysan, M., Woolard, K., Kotliarova, S., ... & Fine, H. A. (2012). Histone demethylase Jumonji D3 (JMJD3) as a tumor suppressor by regulating p53 protein nuclear stabilization. *PloS one*, 7(12), e51407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051407>
 31. Bradshaw, R. A., & Dennis, E. A. (Eds.). (2009). *Handbook of cell signaling*. Academic press.
 32. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, 116(2), 281-297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
 33. He, L., & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews genetics*, 5(7), 522-531. <https://doi.org/10.1038/nrg1379>
 34. Tang H, Liu X, Wang Z, She X, Zeng X, Deng M, et al. Interaction of hsa-miR-381 and glioma suppressor LRRC4 is involved in glioma growth. *Brain Res*. 2011 May 16;1390:21–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2011.03.034>
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.03.034>
 35. Rinn, J. L., & Chang, H. Y. (2020). Long noncoding RNAs: molecular modalities to organismal functions. *Annual review of biochemistry*, 89, 283-308. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012708>
 36. DeSouza, P. A., Qu, X., Chen, H., Patel, B., Maher, C. A., & Kim, A. H. (2021). Long, noncoding RNA dysregulation in glioblastoma. *Cancers*, 13(7), 1604. <https://doi.org/10.3390/cancers13071604>
 37. Okano, M., Xie, S., & Li, E. (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nature genetics*, 19(3), 219-220. <https://doi.org/10.1038/890>
 38. Lyko, F. (2018). The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nature Reviews Genetics*, 19(2), 81-92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.80>
 39. Bian, E. B., Zong, G., Xie, Y. S., Meng, X. M., Huang, C., Li, J., & Zhao, B. (2014). TET family proteins: new players in gliomas. *Journal of neuro-oncology*, 116(3), 429-435. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1328-7>
 40. Ferrer, A. I., Trinidad, J. R., Sandiford, O., Etchegaray, J. P., & Rameshwar, P. (2020). Epigenetic dynamics in cancer stem cell dormancy. *Cancer and Metastasis Reviews*, 39(3), 721-738. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09882-x>

41. Bae, S., & Lesch, B. J. (2020). H3K4me1 distribution predicts transcription state and poising at promoters. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 289.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00289>
42. Horgan RP, Kenny LC (2011) ‘Omic’ technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *Obstet Gynecol* 13(3): 189–195.
<https://doi.org/10.1576/toag.13.3.189.27672>
43. Cadieux, B., Ching, T. T., VandenBerg, S. R., & Costello, J. F. (2006). Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation. *Cancer research*, 66(17), 8469-8476. **DOI:** 10.1158/0008-5472.CAN-06-1547
44. Laird, P. W. (2003). The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Reviews Cancer*, 3(4), 253-266. <https://doi.org/10.1038/nrc1045>
45. Haberle, V., & Stark, A. (2018). Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(10), 621-637.
<https://doi.org/10.1038/s41580-018-0028-8>
46. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, De Tribolet N, Weller M 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>
47. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, Pan F, Pelloski CE, Sulman EP, Bhat KP, Verhaak RG, Hoadley KA, Hayes DN, Perou CM, Schmidt HK, Ding L, Wilson RK, van den Berg D, Shen H, Bengtsson H, Neuvial P, Cope LM, Buckley J, Herman JG, Baylin SB, Laird PW, Aldape K, Cancer Genome Atlas Research Network (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>
48. de Souza CF, Sabedot TS, Malta TM, Stetson L, Morozova O, Sokolov A, Laird PW, Wiznerowicz M, Iavarone A, Snyder J, deCarvalho A, Sanborn Z, McDonald KL, Friedman WA, Tirapelli D, Poisson L, Mikkelsen T, Carlotti CG Jr, Kalkanis S, Zenklusen J, Salama SR, Barnholtz-Sloan JS, Noushmehr H (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>

49. Boilly B, Faulkner S, Jobling P, Hondermarck H. Nerve dependence: from regeneration to cancer. *Cancer Cell*. 2017;31: 342–54.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.02.005>
50. Entschladen F, Palm D, Niggemann B, Zaenker KS. The cancer's nervous tooth: considering the neuronal crosstalk within tumors. *Semin Cancer Biol*. 2008;18:171–5.
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2007.12.004>
51. Sarkar C, Chakroborty D, Basu S. Neurotransmitters as regulators of tumor angiogenesis and immunity: the role of catecholamines. *J NeuroImmune Pharmacol*. 2013;8:7–14. <https://doi.org/10.1007/s11481-012-9395-7>
52. Sood AK, Armaiz-Pena GN, Halder J, Nick AM, Stone RL, Hu W, et al. Adrenergic modulation of focal adhesion kinase protects human ovarian cancer cells from anoikis. *J Clin Investig*. 2010;120:1515–23 doi:10.1172/JCI40802.
53. Magnon C, Hall SJ, Lin J, Xue X, Gerber L, Freedland SJ, et al. Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression. *Science*. 2013;341:1236361. DOI: 10.1126/science.1236361
54. Renz BW, Takahashi R, Tanaka T, Macchini M, Hayakawa Y, Dantes Z, et al. Beta2 adrenergic-neurotrophin feedforward loop promotes pancreatic cancer. *Cancer Cell*. 2018;33:75–90 e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.11.007>
55. Zahalka AH, Arnal-Estape A, Maryanovich M, Nakahara F, Cruz CD, Finley LWS, et al. Adrenergic nerves activate an angiometabolic switch in prostate cancer. *Science*. 2017;358:321–6 DOI: 10.1126/science.aah5072
56. Hondermarck H, Jobling P. The sympathetic nervous system drives tumor angiogenesis. *Trends Cancer*. 2018;4:93–4.
<https://doi.org/10.1016/j.treacan.2017.11.008>
57. Jiang, S. H., Hu, L. P., Wang, X., Li, J., & Zhang, Z. G. (2020). Neurotransmitters: emerging targets in cancer. *Oncogene*, 39(3), 503-515. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1006-0>
58. Caragher, S. P., Hall, R. R., Ahsan, R., & Ahmed, A. U. (2018). Monoamines in glioblastoma: complex biology with therapeutic potential. *Neuro-oncology*, 20(8), 1014-1025. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox210>
59. Klughammer J, Kiesel B, Roetzer T, Fortelny N, Neme A, Nenning KH, Furtner J, Sheffield NC, Datlinger P, Peter N, Nowosielski M, Augustin M, Mischkulnig M, Ströbel T, Alpar D, Ergüner B, Senekowitsch M, Moser P, Freyschlag CF, Kerschbaumer J, Thomé C, Grams AE, Stockhammer G, Kitzwoegerer M,

- Oberndorfer S, Marhold F, Weis S, Trenkler J, Buchroithner J, Pichler J, Haybaeck J, Krassnig S, Mahdy Ali K, von Campe G, Payer F, Sherif C, Preiser J, Hauser T, Winkler PA, Kleindienst W, Würtz F, Brandner-Kokalj T, Stultschnig M, Schweiger S, Dieckmann K, Preusser M, Langs G, Baumann B, Knosp E, Widhalm G, Marosi C, Hainfellner JA, Woehrer A, Bock C (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>
60. Wang J, Cazzato E, Ladewig E, Frattini V, Rosenbloom DI, Zairis S et al (2016) Clonal evolution of glioblastoma under therapy. *Nat Genet* 48(7):768–776. <https://doi.org/10.1038/ng.3590>
61. 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 U.S.A* 110(10):4009–4014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219747110>
62. Chen X, Wen Q, Stucky A, Zeng Y, Gao S, Loudon WG, Ho HW, Kabeer MH, Li SC, Zhang X, Zhong JF (2018) Relapse pathway of glioblastoma revealed by single-cell molecular analysis. *Carcinogenesis* 39(7):931–936. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy052>
63. Chaligne, R., Gaiti, F., Silverbush, D., Schiffman, J. S., Weisman, H. R., Kluegel, L., ... & Landau, D. A. (2021). Epigenetic encoding, heritability and plasticity of glioma transcriptional cell states. *Nature Genetics*, 53(10), 1469-1479. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00927-7>
64. Kraboth, Z., Galik, B., Tompa, M., Kajtar, B., Urban, P., Gyenesei, A., ... & Kalman, B. (2020). DNA CpG methylation in sequential glioblastoma specimens. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 146(11), 2885-2896. <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03349-w>
65. Gillio-Meina, C., Zielke, H. R., & Fraser, D. D. (2016). Translational research in pediatrics IV: solid tissue collection and processing. *Pediatrics*, 137(1). <https://doi.org/10.1542/peds.2015-0490>
66. Etcheverry, A., Aubry, M., De Tayrac, M., Vauleon, E., Boniface, R., Guenot, F., ... & Mosser, J. (2010). DNA methylation in glioblastoma: impact on gene expression and clinical outcome. *BMC genomics*, 11(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-701>

67. Nagarajan, R. P., Zhang, B., Bell, R. J., Johnson, B. E., Olshen, A. B., Sundaram, V., ... & Costello, J. F. (2014). Recurrent epimutations activate gene body promoters in primary glioblastoma. *Genome research*, *24*(5), 761-774. doi:10.1101/gr.164707.113
68. Brothman, A. R., Swanson, G., Maxwell, T. M., Cui, J., Murphy, K. J., Herrick, J., ... & Rohr, L. R. (2005). Global hypomethylation is common in prostate cancer cells: a quantitative predictor for clinical outcome?. *Cancer genetics and cytogenetics*, *156*(1), 31-36. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2004.04.004>
69. Ehrlich, M. (2009). DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*, *1*(2), 239-259. <https://doi.org/10.2217/epi.09.33>
70. Hansen, K. D., Timp, W., Bravo, H. C., Sabunciyan, S., Langmead, B., McDonald, O. G., ... & Feinberg, A. P. (2011). Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nature genetics*, *43*(8), 768-775. <https://doi.org/10.1038/ng.865>
71. Fischer I, Gagner JP, Law M, Newcomb EW, Zagzag D (2005) Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. *BrainPathol* *15*(4):297–310. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2005.tb00115.x>
72. Khasraw, M., Ameratunga, M. S., Grant, R., Wheeler, H., & Pavlakis, N. (2014). Antiangiogenic therapy for high-grade glioma. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (9). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008218.pub3>
73. Roth, P., Hottinger, A. F., Hundesberger, T., Läubli, H., Schucht, P., Reinert, M., ... & Weller, M. (2020). A contemporary perspective on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas in adults. *Swiss medical weekly*, *150*, w20256. <https://doi.org/10.5167/uzh-191417>
74. 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. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(24), 20164-20175. DOI:<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.337196>
75. Marziali, G., Signore, M., Buccarelli, M., Grande, S., Palma, A., Biffoni, M., ... & Ricci-Vitiani, L. (2016). Metabolic/proteomic signature defines two glioblastoma subtypes with different clinical outcome. *Scientific reports*, *6*(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/srep21557>
76. 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. In *Oncogenomics* (pp. 141-163). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811785-9.00010-7>

77. Fallacara, A. L., Zamperini, C., Podolski-Renić, A., Dinić, J., Stanković, T., Stepanović, 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*, *11*(6), 848. <https://doi.org/10.3390/cancers11060848>
78. Bradshaw, A., Wickremesekera, A., Brasch, H. D., Chibnall, A. M., Davis, P. F., Tan, S. T., & Itinteang, T. (2016). Cancer stem cells in glioblastoma multiforme. *Frontiers in surgery*, *3*, 48. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2016.00048>
79. Tompa, M., Kalovits, F., Nagy, A., & Kalman, B. (2018). Contribution of the Wnt pathway to defining biology of glioblastoma. *Neuromolecular medicine*, *20*(4), 437-451. <https://doi.org/10.1007/s12017-018-8514-x>
80. Caragher, S. P., Shireman, J. M., Huang, M., Miska, J., Atashi, F., Baisiwala, S., ... & Ahmed, A. U. (2019). Activation of dopamine receptor 2 prompts transcriptomic and metabolic plasticity in glioblastoma. *Journal of Neuroscience*, *39*(11), 1982-1993. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1589-18.2018>
81. Greaves, M., & Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature*, *481*(7381), 306-313. <https://doi.org/10.1038/nature10762>
82. Wang, Q., Hu, B., Hu, X., Kim, H., Squatrito, M., Scarpace, L., ... & Verhaak, R. G. (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>
83. Lucifero, A. G., Luzzi, S., Brambilla, I., Trabatti, C., Mosconi, M., Savasta, S., & Foadelli, T. (2020). Innovative therapies for malignant brain tumors: The road to a tailored cure. *Acta Bio Medica: Atenei Parmensis*, *91*(Suppl 7), 5. [10.23750/abm.v91i7-S.9951](https://doi.org/10.23750/abm.v91i7-S.9951)
84. Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., ... & Lander, E. S. (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>
85. Hyun, K., Jeon, J., Park, K., & Kim, J. (2017). Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Experimental & molecular medicine*, *49*(4), e324-e324. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.11>
86. Kondo, Y., Shen, L., Yan, P. S., Huang, T. H. M., & Issa, J. P. J. (2004). Chromatin immunoprecipitation microarrays for identification of genes silenced by histone H3

- lysine 9 methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(19), 7398-7403. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306641101>
87. Steward, M. M., Lee, J. S., O'Donovan, A., Wyatt, M., Bernstein, B. E., & Shilatifard, A. (2006). Molecular regulation of H3K4 trimethylation by ASH2L, a shared subunit of MLL complexes. *Nature structural & molecular biology*, 13(9), 852-854. <https://doi.org/10.1038/nsmb1131>
88. Ligon, K. L., Huillard, E., Mehta, S., Kesari, S., Liu, H., Alberta, J. A., ... & Rowitch, D. H. (2007). Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. *Neuron*, 53(4), 503-517. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.009>
89. Zheng, H., Ying, H., Yan, H., Kimmelman, A. C., Hiller, D. J., Chen, A. J., ... & DePinho, R. A. (2008). p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature*, 455(7216), 1129-1133. <https://doi.org/10.1038/nature07443>
90. Natsume, A., Kinjo, S., Yuki, K., Kato, T., Ohno, M., Motomura, K., ... & Wakabayashi, T. (2011). Glioma-initiating cells and molecular pathology: implications for therapy. *Brain tumor pathology*, 28(1), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s10014-010-0011-3>
91. Fitzgerald, P. J. (2009). Is norepinephrine an etiological factor in some types of cancer?. *International journal of cancer*, 124(2), 257-263. <https://doi.org/10.1002/ijc.24063>
92. Michelotti, G. A., Brinkley, D. M., Morris, D. P., Smith, M. P., Louie, R. J., & Schwinn, D. A. (2007). Epigenetic regulation of human α 1d-adrenergic receptor gene expression: a role for DNA methylation in Spl-dependent regulation. *The FASEB Journal*, 21(9), 1979-1993. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7118com>
93. Entschladen, F., Drell IV, T. L., Lang, K., Joseph, J., & Zaenker, K. S. (2004). Tumour-cell migration, invasion, and metastasis: navigation by neurotransmitters. *The lancet oncology*, 5(4), 254-258. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(04\)01431-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(04)01431-7)
94. Schuller, H. M. (2007). Neurotransmitter receptor-mediated signaling pathways as modulators of carcinogenesis. *Neuronal Activity in Tumor Tissue*, 39, 45-63. <https://doi.org/10.1159/000100045>
95. Adissu, H. A., & Schuller, H. M. (2004). Antagonistic growth regulation of cell lines derived from human lung adenocarcinomas of Clara cell and aveolar type II cell

- lineage: Implications for chemoprevention. *International journal of oncology*, 24(6), 1467-1472. <https://doi.org/10.3892/ijo.24.6.1467>
96. Mishra, A., Singh, S., & Shukla, S. (2018). Physiological and functional basis of dopamine receptors and their role in neurogenesis: possible implication for Parkinson's disease. *Journal of experimental neuroscience*, 12, 1179069518779829. <https://doi.org/10.1177/1179069518779829>
97. Woerner, B. M., Luo, J., Brown, K. R., Jackson, E., Dahiya, S. M., Mischel, P., ... & Rubin, J. B. (2012). Suppression of G-protein–Coupled Receptor Kinase 3 Expression Is a Feature of Classical GBM That Is Required for Maximal Growth. *Molecular Cancer Research*, 10(1), 156-166. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0411
98. Kaur, G., Kim, J., Kaur, R., Tan, I., Bloch, O., Sun, M. Z., ... & Parsa, A. T. (2013). G-protein coupled receptor kinase (GRK)-5 regulates proliferation of glioblastoma-derived stem cells. *Journal of Clinical Neuroscience*, 20(7), 1014-1018. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2012.10.008>
99. Yu, S., Sun, L., Jiao, Y., & Lee, L. T. O. (2018). The role of G protein-coupled receptor kinases in cancer. *International journal of biological sciences*, 14(2), 189. doi: 10.7150/ijbs.22896
100. Hu, C., Tao, L., Cao, X., & Chen, L. (2020). The solute carrier transporters and the brain: Physiological and pharmacological implications. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 15(2), 131-144. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2019.09.002>
101. Omote, H., Miyaji, T., Hiasa, M., Juge, N., & Moriyama, Y. (2016). Structure, function, and drug interactions of neurotransmitter transporters in the postgenomic era. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 56, 385-402. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124816>
102. Lawal, H. O., & Krantz, D. E. (2013). SLC18: Vesicular neurotransmitter transporters for monoamines and acetylcholine. *Molecular aspects of medicine*, 34(2-3), 360-372. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.005>
103. Li, Z., & Rana, T. M. (2012). Molecular mechanisms of RNA-triggered gene silencing machineries. *Accounts of chemical research*, 45(7), 1122-1131. <https://doi.org/10.1021/ar200253u>
104. Moarii, M., Boeva, V., Vert, J. P., & Reyal, F. (2015). Changes in correlation between promoter methylation and gene expression in cancer. *BMC genomics*, 16(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1994-2>

105. Xie, Z., Westmoreland, S. V., Bahn, M. E., Chen, G. L., Yang, H., Vallender, E. J., ... & Miller, G. M. (2007). Rhesus monkey trace amine-associated receptor 1 signaling: enhancement by monoamine transporters and attenuation by the D2 autoreceptor in vitro. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *321*(1), 116-127. DOI: <https://doi.org/10.1124/jpet.106.116863>
106. Perea, G., Navarrete, M., & Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in neurosciences*, *32*(8), 421-431. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.05.001>
107. Li, J., Zhu, S., Kozono, D., Ng, K., Futralan, D., Shen, Y., ... & Chen, C. C. (2014). Genome-wide shRNA screen revealed integrated mitogenic signaling between dopamine receptor D2 (DRD2) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in glioblastoma. *Oncotarget*, *5*(4), 882. doi: 10.18632/oncotarget.1801
108. Hottinger, A. F., Stupp, R., & Homicsko, K. (2014). Standards of care and novel approaches in the management of glioblastoma multiforme. *Chinese journal of cancer*, *33*(1), 32. doi: 10.5732/cjc.013.10207
109. Sarkar, C., Chakroborty, D., Chowdhury, U. R., Dasgupta, P. S., & Basu, S. (2008). Dopamine increases the efficacy of anticancer drugs in breast and colon cancer preclinical models. *Clinical Cancer Research*, *14*(8), 2502-2510. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1778
110. Mundell, S. J., & Kelly, E. (1998). The effect of inhibitors of receptor internalization on the desensitization and resensitization of three Gs-coupled receptor responses. *British journal of pharmacology*, *125*(7), 1594-1600. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702234>
111. Lohr, K. M., Chen, M., Hoffman, C. A., McDaniel, M. J., Stout, K. A., Dunn, A. R., ... & Miller, G. W. (2016). Vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) level regulates MPTP vulnerability and clearance of excess dopamine in mouse striatal terminals. *Toxicological Sciences*, *153*(1), 79-88. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw106>
112. Berman, R. M., Sanacora, G., Anand, A., Roach, L. M., Fasula, M. K., Finkelstein, C. O., ... & Charney, D. S. (2002). Monoamine depletion in unmedicated depressed subjects. *Biological psychiatry*, *51*(6), 469-473. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(01\)01285-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01285-9)
113. Schweimer, J., Saft, S., & Hauber, W. (2005). Involvement of catecholamine neurotransmission in the rat anterior cingulate in effort-related decision

- making. *Behavioral neuroscience*, 119(6), 1687. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.119.6.1687>
114. Neftel, C., Laffy, J., Filbin, M. G., Hara, T., Shore, M. E., Rahme, G. J., ... & Suvà, M. L. (2019). An integrative model of cellular states, plasticity, and genetics for glioblastoma. *Cell*, 178(4), 835-849. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.024>
115. Park, J., Shim, J. K., Yoon, S. J., Kim, S. H., Chang, J. H., & Kang, S. G. (2019). Transcriptome profiling-based identification of prognostic subtypes and multi-omics signatures of glioblastoma. *Scientific reports*, 9(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47066-y>
116. Yuan, J., Levitin, H. M., Frattini, V., Bush, E. C., Boyett, D. M., Samanamud, J., ... & Sims, P. A. (2018). Single-cell transcriptome analysis of lineage diversity in high-grade glioma. *Genome medicine*, 10(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0567-9>



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 / Published online: 10 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 GbmH, 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; FOXP1; 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

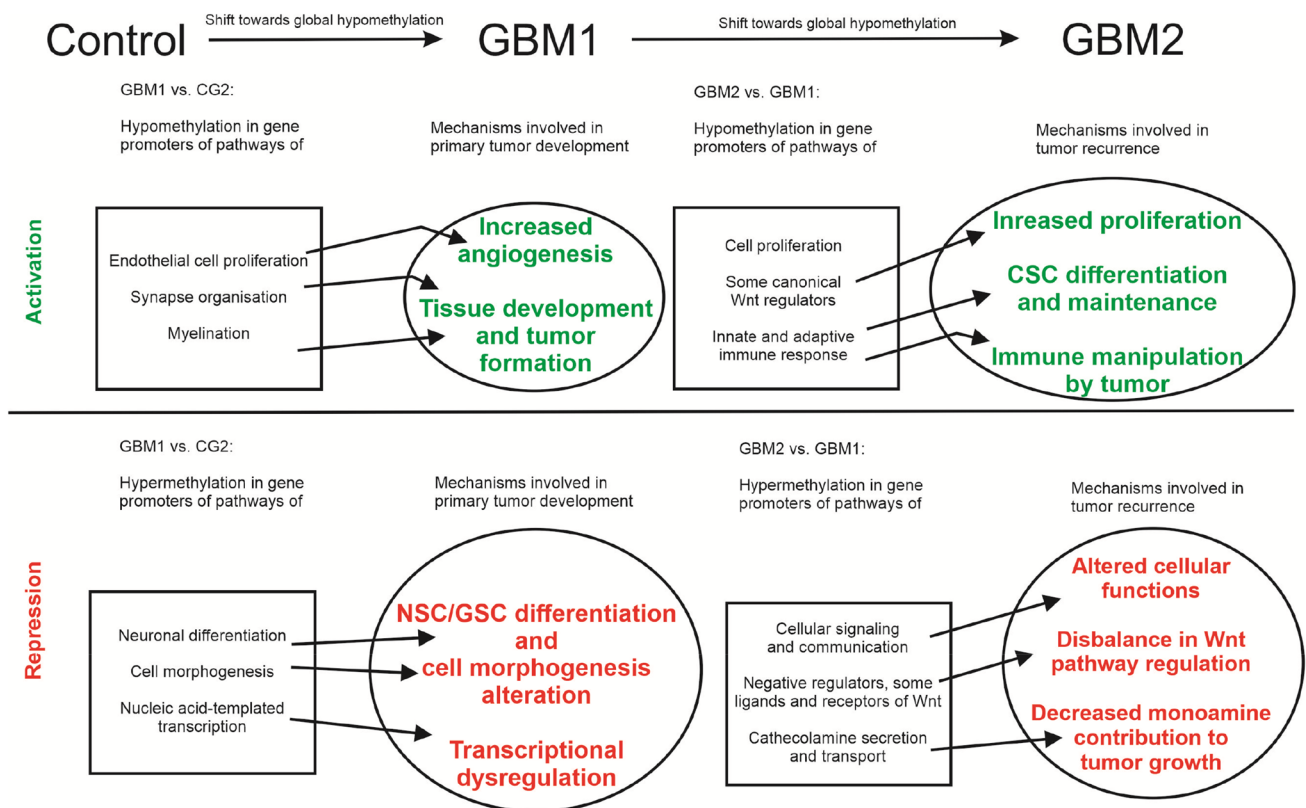


Fig. 1 Mechanisms of GBM development and recurrence revealed by DNA CpG methylation. This figure provides a schematic depiction of molecular pathways and potential mechanisms contributing to

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 (Klughammer 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 (Klughammer

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 Klughammer 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 (Klughammer 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, Sabunciyan 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, Berman 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.

Article

Involvement of the Catecholamine Pathway in Glioblastoma Development

Zoltán Kraboth ^{1,2}, Bela Kajtar ³, Bence Gálik ^{2,4}, Attila Gyenesei ^{2,4}, Attila Miseta ¹ and Bernadette Kalman ^{1,2,*}

¹ Institute of Laboratory Medicine, School of Medicine, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary; zoltankraboth@gmail.com (Z.K.); miseta.attila@pte.hu (A.M.)

² Szentagotai Research Center, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary; galik.bence@pte.hu (B.G.); gyenesei.attila@pte.hu (A.G.)

³ Institute of Pathology, School of Medicine, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary; kajtar.bela@pte.hu

⁴ Department of Clinical Molecular Biology, Medical University of Białystok, 15-267 Białystok, Poland

* Correspondence: bernadette.kalman@pte.hu; Tel.: +36-72-501-500 (ext 29205)

Abstract: Glioblastoma (GBM) is the most aggressive tumor of the central nervous system (CNS). The standard of care improves the overall survival of patients only by a few months. Explorations of new therapeutic targets related to molecular properties of the tumor are under way. Even though neurotransmitters and their receptors normally function as mediators of interneuronal communication, growing data suggest that these molecules are also involved in modulating the development and growth of GBM by acting on neuronal and glioblastoma stem cells. In our previous DNA CpG methylation studies, gene ontology analyses revealed the involvement of the monoamine pathway in sequential GBM. In this follow-up study, we quantitated the expression levels of four selected catecholamine pathway markers (alpha 1D adrenergic receptor—ADRA1D; adrenergic beta receptor kinase 1 or G protein-coupled receptor kinase 2—ADRBK1/GRK2; dopamine receptor D2—DRD2; and synaptic vesicle monoamine transporter—SLC18A2) by immunohistochemistry, and compared the histological scores with the methylation levels within the promoters + genes of these markers in 21 pairs of sequential GBM and in controls. Subsequently, we also determined the promoter and gene methylation levels of the same markers in an independent database cohort of sequential GBM pairs. These analyses revealed partial inverse correlations between the catecholamine protein expression and promoter + gene methylation levels, when the tumor and control samples were compared. However, we found no differences in the promoter + gene methylation levels of these markers in either our own or in the database primary–recurrent GBM pairs, despite the higher protein expression of all markers in the primary samples. This observation suggests that regulation of catecholamine expression is only partially related to CpG methylation within the promoter + gene regions, and additional mechanisms may also influence the expression of these markers in progressive GBM. These analyses underscore the involvement of certain catecholamine pathway markers in GBM development and suggest that these molecules mediating or modulating tumor growth merit further exploration.

Keywords: DNA CpG methylation; gene expression; catecholamine pathway; sequential glioblastoma

Citation: Kraboth, Z.; Kajtar, B.; Galik, B.; Gyenesei, A.; Miseta, A.; Kalman, B. Involvement of the Catecholamine Pathway in Glioblastoma Development. *Cells* **2021**, *10*, 549. <https://doi.org/10.3390/cells10030549>

Academic Editor: Marco G. Paggi

Received: 15 February 2021

Accepted: 1 March 2021

Published: 4 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most aggressive and the most prevalent CNS tumor in adults, with a median survival of 15 months [1]. With the current standard of care (surgical removal with broad margins, radiation and chemotherapy), GBM invariably recurs and develops resistance to therapy. A better understanding of the molecular determinants of GBM is essential in the development of more efficient therapies.

Recently, we carried out a reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) study to determine DNA CpG methylation genome-wide in 22 pairs of sequential GBM samples [2]. Gene ontology (GO) analysis revealed differential methylation in promoters and genes of several pathways, including hypomethylation in pathways of catecholamine secretion and transport in the primary compared to the recurrent tumor cohort. This observation suggested that catecholamines may predominantly contribute to early stages of GBM development. Based on the information from our RRBS methylome, here we selected four catecholamine markers differentially methylated at the cohort level (alpha 1D adrenergic receptor—ADRA1D; adrenergic beta receptor kinase 1 or G protein-coupled receptor kinase 2—ADRBK1/GRK2; dopamine receptor D2—DRD2; and synaptic vesicle monoamine transporter—SLC18A2; Supplementary Table S1a) [2], and analyzed further their involvement in GBM.

Catecholamines and their receptors are key elements of physiological interneuronal communication. However, a growing body of evidence suggests that these molecules also act on neuronal stem cells (NSC), progenitor cells (NPC) and glioblastoma stem cells (GSC), thereby promoting cell proliferation and differentiation in normal tissues and tumors such as GBM [3–5]. Nevertheless, data regarding the involvement of individual catecholamine markers are somewhat limited in GBM.

Of the four selected markers, ADRA1D is a member of the G protein-coupled receptor (GPCR) superfamily embedded in cell membranes in various organs. Its main ligand, norepinephrine (NE), is predominantly secreted by the locus coeruleus in the brain and by adrenal glands in the periphery. The alpha-1 adrenergic receptors activate the enzyme phospholipase C by G-protein dissociation, which hydrolyzes phosphatidylinositol 1,2-bisphosphate, producing inositol trisphosphate (IP3) and diacylglycerol. These second messengers mediate intracellular Ca²⁺ release and activate protein kinase C, while also activating elements of other signaling pathways (e.g., voltage-dependent and independent calcium channels, arachidonic acid release, phospholipase A2, phospholipase D, and mitogen-activated protein kinase) [6]. The engagement of NE with ADRA1D initiates signals through these pathways in the sympathetic nervous system, modulates the contractions of the vascular smooth muscle cells, has trophic effects on endothelial cells [7–9], reduces insulin production [10], modulates the activity of lymphocytes [11], maintains tonic vessel tone and diverts blood flow to essential organs during fight-or-flight situations. These receptors are also important pharmacological targets in blood pressure management and regulation of urinary voiding [12]. In addition, ADRA1D engagement with NE also activates intracellular processes (e.g., by modulating the level of cyclic AMP) and regulates cell proliferation (e.g., by inhibiting mitogen-induced G1-S transition) [7,12–14]. In the periventricular germinal niches of the CNS, however, NE can determine the proliferative capacity of NPCs and negatively regulates periventricular neurogenesis [15]. NE and epinephrine (E) may promote cell migration and invasion in various cancers [16,17]. Activation of adrenoreceptors even by drugs can promote the development of certain cancers (e.g., gastrointestinal tract, liver) [7,18].

DRD2 also mediates its effects through G-proteins and induces pathways such as the mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases (MAPK/ERK) or the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathways involved in cell differentiation, growth, metabolism and apoptosis [19]. This receptor is localized in both the presynaptic and postsynaptic terminals [20,21]. Outside of the CNS, dopamine functions as a paracrine messenger, inhibits NE release and dilates blood vessels [22]. In the CNS, dopamine is predominantly secreted in the substantia nigra, ventral tegmental area and the arcuate nucleus of the hypothalamus [23]; it constitutes about 80% of the catecholamine content in brain. Under normal circumstances, dopamine participates in reward-motivated behavior, locomotion, memory, emotion and neuroendocrine control, and plays important roles in the brain circuitries involved in motor control [24,25]. Dysfunction in the dopaminergic neurotransmission caused by autoimmune, neurodegenerative or other pathologies, causes neurological and psychiatric disorders (e.g.,

Parkinson's disease, Huntington's disease, schizophrenia, dystonia, chorea) [19,26]. In addition, dopamine also regulates the development of γ -aminobutyric acidergic interneurons in the cerebral cortex and increases the production of new neurons in the hippocampus. These observations suggest that dopamine may promote proliferation and differentiation of the NSC and NPC populations [27,28]. Using a genome-wide shRNA screen, Li et al. [29] showed that the pathways of neurotransmitter receptor (i.e., DRD2) signaling are involved in GBM growth. DRD2 signaling may also induce functional changes and influence cell growth through an autocrine process in GBM [30,31].

ADRBK1/GRK2, like other G protein-coupled receptor kinases (GRK), is a modulator of signaling [32,33] through phosphorylation of GPCR, followed by the binding of arrestin proteins and uncoupling the receptors from G proteins, which lead to a clathrin-mediated receptor endocytosis and recycling [34,35]. GRKs, and GRK2 in particular, are expressed in different tissues (e.g., heart, liver, vessels) and influence numerous biological processes (e.g., insulin sensitivity, vasodilatation and vasoconstriction, lipogenesis and lipolysis, inflammation etc.) [36]. In addition to its classical role in promoting the desensitization and internalization of GPCRs, GRK2 may regulate non-GPCRs (e.g., through a direct association of GRK2 with the G beta-gamma complex [G β γ], leading to desensitization of certain ion channels, or through GRK2-induced desensitization of the sphingosine-1-phosphate receptor [S1PR] that regulates lymphocyte migration into sites of infection). GRK2 also serves as a negative regulator of immune response via direct association with certain MAPK kinases (e.g., MEK) [37]. Further, GRK2 is capable of responding to non-receptor substrates to participate in cellular responses in a phosphorylation-independent manner (e.g., regulating microtubule assembly and agonist-induced GPCR internalization, thereby inducing actin cytoskeleton reorganization, inhibiting transforming growth factor-beta-mediated [TGF] cell growth arrest and apoptosis). [37–39]. By these functions, GRKs are involved in different signaling pathways contributing to angiogenesis, proliferation, migration and invasion of malignant tumors [40,41]. Changes in GRK expression or activity may promote oncogenic GPCR function [42]. Compared to low grade gliomas, GBM exhibits decreased GRK3 expression, resulting in a negative regulation of cell growth, and increased GRK5 expression, resulting in more aggressive tumor properties, particularly at recurrence [42,43]. GRKs, however, not only influence the biology of gliomas, but also have roles in other cancers [44].

The fourth marker involved in this study is SLC18A2 (also called the synaptic vesicle monoamine transporter [VMAT2]), a member of the solute carriers (SLCs). This is the largest family of transmembrane transporters; nevertheless, little is known about its exact function. What has been thus far established, is the involvement of these integral membrane proteins in the exchange of various nutrients, ions, metabolites and drugs across biological membranes [45]. In normal circumstances, SLC18A2/VMAT2 packages its cytosolic cargos (dopamine, norepinephrine, serotonin and histamine) into synaptic vesicles, releases them into the synaptic cleft and mediates their uptake. Differential expression distributions of SLC18A2/VMAT2 have been noted in various cell types (e.g., neurons vs. neuroendocrine cells). SLC18A2/VMAT2 has a neuroprotective effect to dopaminergic neurons in toxicity models by activating sequestration and removal of oxidized, neurotoxic dopamine molecules from the cytoplasm. Thus, SLC18A2 is essential for dopamine signaling by enabling exocytosis, but also maintaining cellular health [46]. Based on the example of dopamine signaling, changes in the presynaptic expression of these transporter proteins (e.g., due to their inhibition by drugs) can influence the release and reuptake of monoamines and their postsynaptic signaling [47,48].

Altogether, these data and our previous observations [2] confirm the involvement of catecholamine pathway molecules in GBM. Since our previous epigenomic analysis did not specifically focus on individual catecholamine markers in individual tumor samples and had no expression assessments, in the present study, we aimed to analyze further the involvement of the four selected markers (ADRA1D, ADRBK1/GRK2, DRD2 and SLC18A2) in GBM, by zooming into their promoter and gene CpG methylation data in

comparison with their protein expression levels in sections dissected from the same blocks of sequential GBM specimens.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects of the Study

The study was approved by the Regional Clinical Research Committee (Number: 7517 PTE 2018 and 2019) and was compliant with the Declaration of Helsinki. All patients passed away prior to the initiation of the study and the samples were left over from routine histological evaluations.

GBM and control samples were obtained between 1999 and 2017 at the Department of Pathology, School of Medicine, University of Pecs. The formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) GBM blocks were surgically removed sequential specimens, while the histological controls (HC) included postmortem FFPE normal brain specimens (obtaining surgically removed normal control brain specimens are not feasible; other neurological control brain tissue FFPE specimens are also not available at our center). The histopathological diagnosis of GBM was established according to the recent World Health Organization guidelines [49] and samples were subjected to several rounds of quality selection [2]. These GBM specimens were also included in our previous DNA CpG methylation study [2]. However, of the 22 tumor pairs in the epigenomic analyses, only 21 pairs could be used here, because one pair of blocks had insufficient amount of tissue for the execution of immunohistochemistry (IHC).

Thus, the GBM cohort included 21 pairs of primary (GBM1) and recurrent GBM (GBM2). All tumors were isocitrate dehydrogenase-1 R132H (IDH1 R132H) mutation-negative de novo GBMs, from 14 male and 7 female patients (Supplementary Table S1b). The GBM1 samples were surgically obtained after the diagnosis, while the GBM2 tumor samples were removed at recurrence, after rounds of chemo- and irradiation therapy. All but one patient received temozolomide-based chemo- and radiation therapy after the first surgery. In the IHC study, six post-mortem FFPE samples from patients who died of non-neurological reasons were used (HC). Due to the high DNA fragmentation rates of these post-mortem samples (Supplementary Table S1c), we could not use them as controls in the DNA CpG methylation analyses. Therefore, in the epigenomic analyses methylation data of five brain specimens obtained during epilepsy surgery were included as the methylation controls (MC), by downloading the RRBS sequences from the EBI European genome–phenome archive (accession number: EGAS00001002538) [50].

2.2. DNA Isolation, Library Preparation, CpG Methylation Profiling and Bioinformatic Analyses

The DNA isolation and methylation profiling procedures were previously described in detail [2]. In brief, five 3–5 μm -thick cuts per FFPE block were used for DNA extraction with the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen GbmH, Hilden, Germany). DNA quantitation was carried out by using the Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) on a Qubit 3 Fluorimeter (Invitrogen, Carlsbad, USA). Bisulfite converted libraries were prepared from DNA by using the Premium Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) kit 24x (Premium RRBS Kit 24x, Diagenode SA, Seraing, Belgium). The amplified libraries were sequenced using the NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 cycles) (Illumina, San Diego, CA, USA) on a NextSeq 550 machine (Illumina, San Diego, CA, USA). After quality checking and filtering, the bisulfite-treated reads were aligned to the hg19 reference genome. After methylation calls by Bismark [51], RnBeads were used to identify the differentially methylated sites, regions and pathways in the control and GBM cohorts. Biological interpretation of data was assisted by the BioMethyl R package.

To assess in individual tumor and control samples the DNA CpG methylation levels within the promoters and genes of the markers selected based on the previous RnBeads GO analysis results [2], an in-house R script was applied. As the CpG methylation data in

the promoter regions only (appr. 2kb) were insufficient for statistical analyses of differential methylation in samples (due to the quality of DNA from the FFPE blocks), we decided to examine the level of methylation in the promoter and gene region together (see the method in the Statistics section).

2.3. Immunohistochemistry (IHC)

From each of the 21 pairs of FFPE GBM blocks, 3–5 μm -thick sections were made. First, we determined the ROI in the tumor center based on hematoxylin–eosin staining, aiming to include (1) as much of the malignant tumor region as possible, defined by high degrees of cellularity, polymorphic nuclei and mitotic rates; and (2) little or no necrosis and vascularity. In a pilot study, we optimized the parameters for the retrieval of antigens and dilutions of the primary antibodies for the four catecholamine markers (Supplementary Table S1d). Secondary antibodies and the substrate diaminobenzidin (DAB) were used for labeling the primary antibody binding, all included in the Novolink Polymer Detection System RE7150-CE kit (Leica Biosystems, Newcastle, UK). For visualization of cell-nuclei, hematoxylin counter-staining was performed.

The quantitative evaluation of IHC preparations was carried out manually, complemented by automated reading. Manual evaluations were made by three independent readers (the first, second and last authors), using a 1:200 magnification objective of a Nikon Optiphot-2 microscope. Within the ROI, we defined the intensity of staining on a scale of 0, +, ++ and +++ (in a numerical scale of 0, 1, 2 and 3), and the percentage of stained neoplastic cells. The complex score (CS) was derived by multiplying the numerical values of the staining intensities by the percentage of positive cells. Figure 1 presents representative images of the IHC staining for the four catecholamine markers.

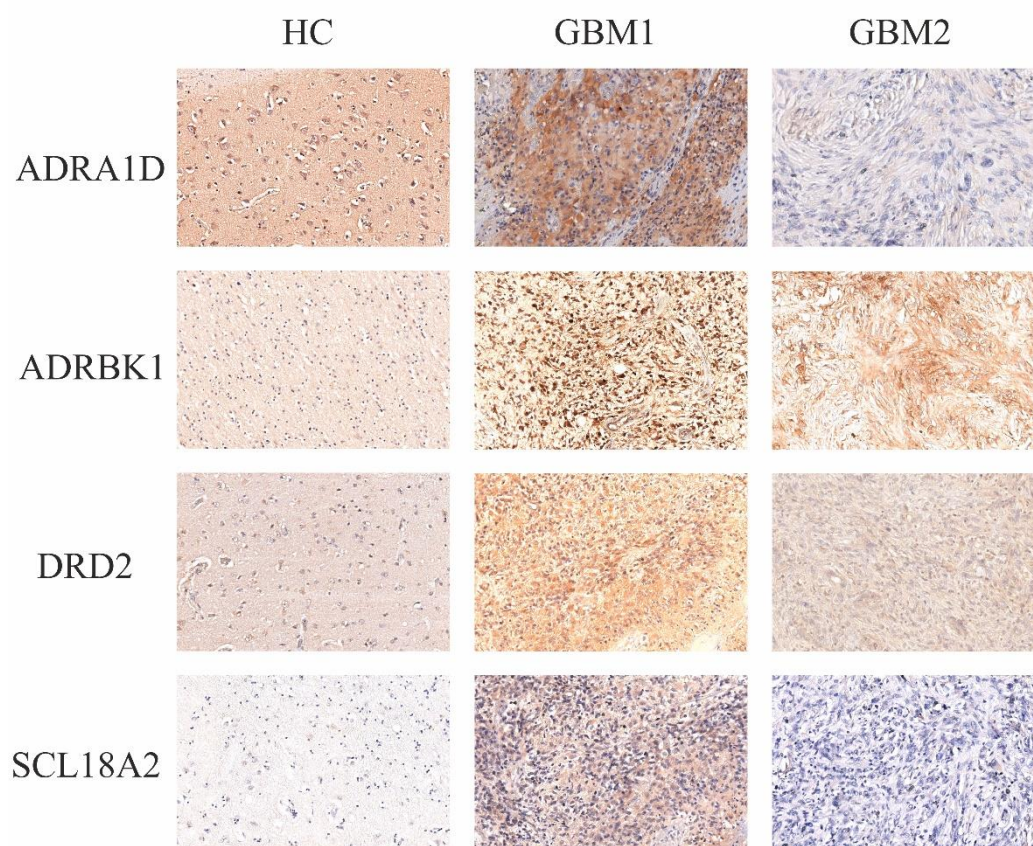


Figure 1. Representative staining for each marker. This figure shows representative images of the IHC preparations with the four selected markers, namely, ADRA1D, ADRBK1, DRD2 and SLC18A2, from the controls and a GBM sample (sample numbers 315 vs. 16534; 7442 vs. 16534; 7244 vs. 16534; 7166 vs. 16534, respectively). The GBM sample was a recurrent GBM).

2.4. Statistics and Bioinformatics

For the intergroup comparisons of IHC CSs and CpG methylation data of the controls and GBM1 and GBM2, we applied the Mann–Whitney U test, while in cases of GBM pair comparisons, we used the Wilcoxon signed rank test. These statistical tests were ran using the SPSS v.26.0 package (SAGE, IBM® SPSS® Statistics v26.0). Bioinformatic analyses of DNA CpG methylation in sequential GBM has been detailed in our previous publication by Kraboth et al. [2], where the identification of the differentially methylated pathways was revealed at the cohort level. In short, FastQC was used in the quality control step, followed by filtering the sequences to remove low quality bases and adapters by Trim-Galore applying RRBS specific parameters. Reads were aligned to the hg19 (GRCh37) reference genome and methylation calls were performed by Bismark. RnBeads was run to identify the differentially methylated pathways. In the present study, the quantitative methylation data of the four selected catecholamine markers in individual samples were extracted from the methylome data [2] using an in-house-generated R script. In brief, the script uses the individual data extracted from the Bismark methylation results and the human GRCh37 chromosome as inputs. Custom genomic ranges can be specified by the *chr*, *start* and *end* parameters. There is an option to define a prefix name in the output files and plots according to the genomic region of interest (gROI). There also is an option for paired samples, where the methylation patterns will be plotted as sample pairs. During the analysis, the first CpG data based on the defined gROI were extracted for all samples from the input files. Next, all possible CpG sites were identified within the gROI using the reference genome. Finally, the methylation levels in each sample are expressed in percentages, which were calculated from the captured number of methylated sites divided by all possible CpG sites detected within the gROI and multiplied by 100. Regions that contain 0 for all samples were removed from the results in order to simplify the plots. At the end, the script visualizes the methylation patterns for each sample or sample pair in PNG format, and separate tables contain the corresponding raw methylation data and methylation pattern data that were used for the visualization.

3. Results

3.1. Protein Expression Levels of the Four Catecholamine Markers in Paired GBM Samples and Controls

We assessed the protein expression levels of the four catecholamine markers (ADRA1D, ADRBK1, DRD2 and SLC18A2) in 21 pairs of GBM1 and GBM2, and in 6 HC samples. Figure 1 shows representative IHC staining with the four markers in GBM and HC. In Figure 2, we present median and Q3–Q1 interquartile range (IQR) values of CS in HC, GBM1 and GBM2. In the control and GBM comparisons, ADRA1D was significantly lower in GBM2 (5 (15–5)) ($p = 0.005$) and tendentially lower in GBM1 (15 (25–5)) compared to the HCs (30 (59–13)). In contrast, ADRBK1 was significantly higher in both GBM1 (75 (85–30)) ($p = 0.004$) and GBM2 (40 (75–20)) ($p = 0.012$) than in the HCs (9 (25–4)). There was a strong trend, which however, did not reach statistical significance, towards a higher expression of DRD2 in GBM1 (70 (80–40)) than in the HCs (45 (54–40)).

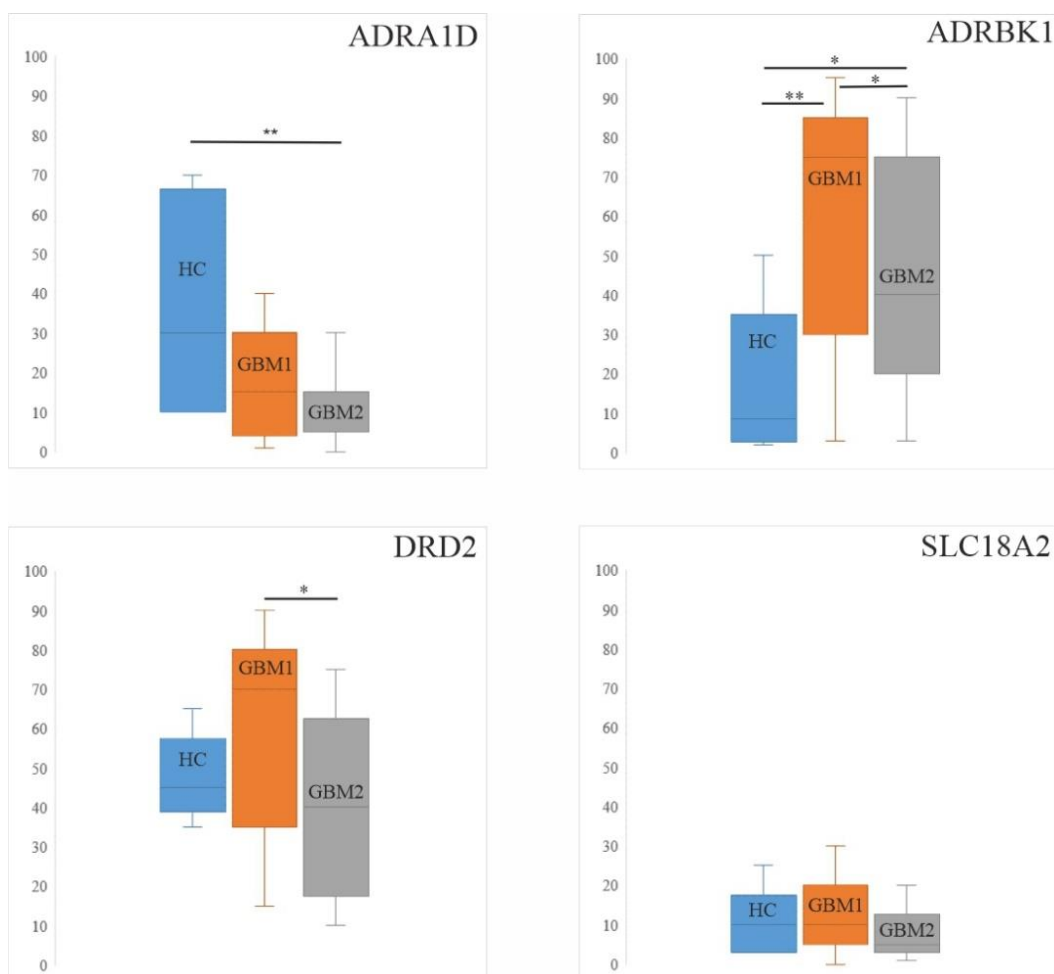


Figure 2. IHC complex score (CS) values of the markers in HC, GBM1 and GBM2. This figure shows the median and interquartile range values of the IHC complex scores (CSs) of selected markers in the healthy control (HC), GBM1 and GBM2 groups. The Wilcoxon signed rank test (GBM1 vs. GBM2) and Mann–Whitney–U test (HC vs. GBM1 or GBM2) p -values are indicated (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

In the comparisons of the sequential GBM pairs, the IHC evaluations showed significantly higher expressions of ADRBK1 (75 (85–30) vs. 40 (75–20)) ($p = 0.011$) and DRD2 (70 (80–40) vs. 40 (60–20)) ($p = 0.026$) in GBM1 compared to GBM2, respectively. ADRA1D (15 (25–5) vs. 5 (15–5)) and SLC18A2 (10 (20–5) vs. 5 (10–3)) HSs were tendentially, but not significantly higher in GBM1 than in GBM2, respectively (Figure 2).

3.2. Promoter and Gene Methylation Profiles of the Four Catecholamine Markers in Individual GBM and Control Samples

First, we investigated the methylation levels within only the promoters of the selected four markers (ADRA1D, ADRBK1, DRD2 and SLC18A2) in the MC samples (from the cohort of Klughammer et al. [50]) and GBM1 and GBM2 samples, but could not get sufficient CpG coverage due to the DNA quality in the FFPE specimens. Therefore, we next assessed DNA CpG methylation in the combined promoter and gene regions for these markers, which did provide sufficient data for statistical analyses (Figure 3). No significant differential methylation levels were seen in cases of ADRA1D (2.56 (3.04–2.08)) and SLC18A2 (1.08 (2.30–0.95)) in the MC and GBM1 (0 (1.44–0) and 0 (1.22–0)) or GBM2 (0 (1.44–0) and 0.54 (1.08–0)) comparisons. However, both ADRBK1 and DRD2 showed significantly lower methylation levels in GBM1 (ADRBK1: 0.76 (1.33–0); $p = 0.006$; DRD2: 0 (0.46–0); $p = 0.041$) and GBM2 (ADRBK1: 0.76 (1.71–0); $p = 0.01$; DRD2: 0 (0.15–0); $p = 0.019$) than in the MC (ADRBK1: 5.31 (7.97–4.56); DRD2: 1.22 (2.06–1.22)), in an inverse

relationship with the protein expression in GBM1 and HC, respectively. No significant differences were found in the methylation levels of the four markers in GBM1 and GBM2, suggesting that their significantly (ADRBK1 and DRD2) or tendentially (ADRA1D and SLC18A2) decreasing expressions in GBM2 compared to GBM1 may be related to mechanisms other than changes in CpG methylation (Figure 3).

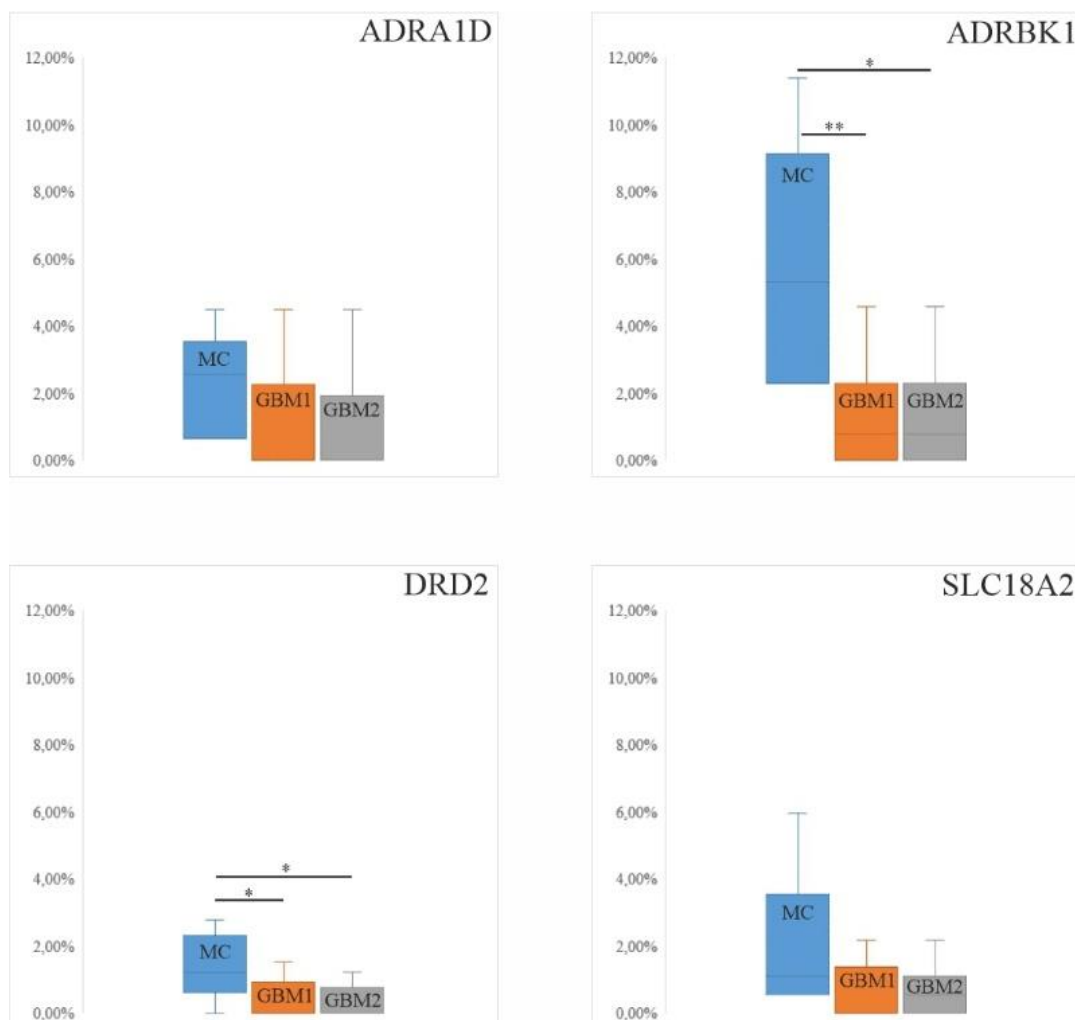


Figure 3. Promoter and gene methylation levels of the four markers in MC, GBM1 and GBM2. This figure presents the median and interquartile range values of the DNA CpG methylation levels in the promoters and genes of the selected markers in the methylation control (MC) (from Klughammer et al. 2018 [50]) and the GBM1 and GBM2 groups. The Wilcoxon signed rank test (GBM1 vs. GBM2) and Mann–Whitney-U test (HC vs. GBM1 or GBM2) p -values are indicated (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3.3. DNA CpG Methylation Levels in Promoter and Gene Regions of Catecholamine Markers in a Database GBM Cohort (Figure 4)

To validate our observations, we evaluated the same four catecholamine promoter and gene regions from the RRBS sequencing data of another sequential GBM cohort [50] (<https://www.ebi.ac.uk/ena>, Primary Accession: PRJEB38380, Secondary Accession: ERP121800). We could not compare DNA CpG methylation in the six controls and 122 GBM pairs because, by our method, the number of captured methylated CpG sites depended on the size of the cohort. To eliminate biases related to marked cohort size differences, we only compared the methylation data between the pairs of GBM. Similar to our own data, no differences were detected in the promoter and gene DNA CpG methylation levels when the primary and recurrent GBM pairs were compared (ADRA1D: 8.33 (16.66–3.84) and 8.01 (19.38–3.84); ADRBK1: 17.46 (28.85–8.35) and 18.98 (33.40–9.87); DRD2: 4.59

(7.95–2.14) and 5.96 (9.17–2.75); SCL18A2: 5.96 (11.37–3.25) and 7.58 (13.00–3.25)) (Figure 4). This observation strengthens the notion that the differential protein expression levels detected by IHC in GBM1 and GBM2 are likely related to regulatory mechanisms beyond promoter and gene methylation.

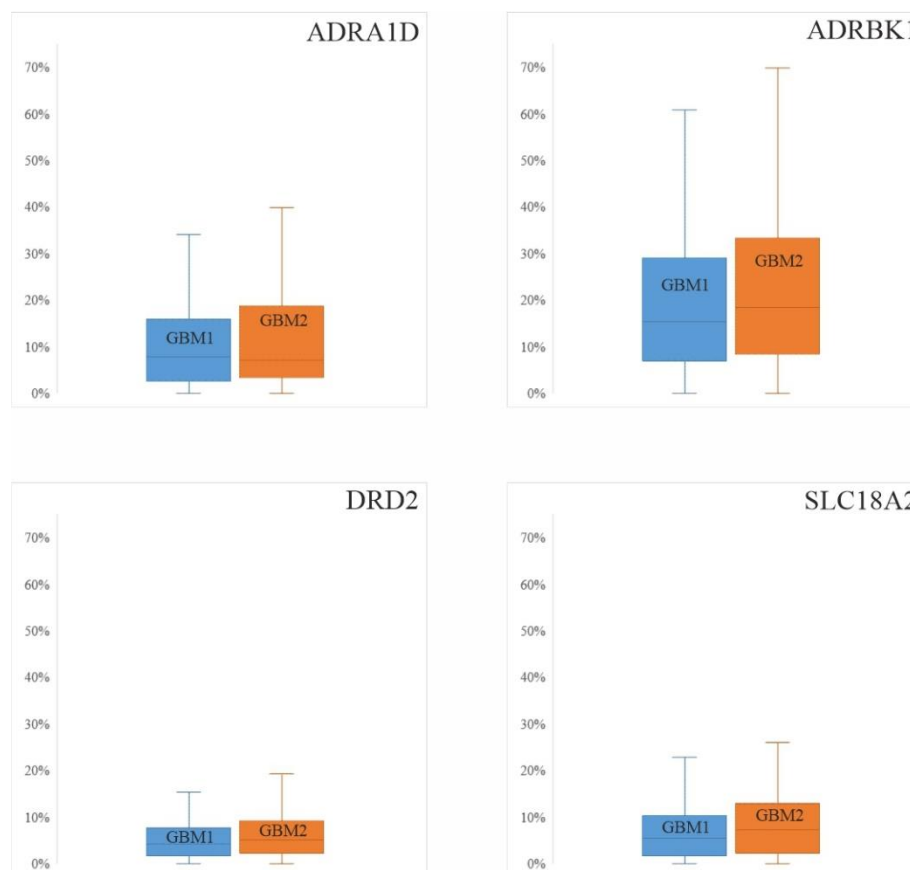


Figure 4. Promoter and gene methylation levels of the four markers in the database sequential GBM cohort. This figure depicts the median and interquartile range values of the DNA CpG methylation levels in the promoters and genes of the selected markers in a database of 112 sequential GBM pairs (Klughammer et al. 2018 [50]).

4. Discussion

This study is a follow-up to our recent DNA CpG methylation analyses [2] revealing lower promoter and gene methylation in the pathways of catecholamine secretion and transport in primary compared to recurrent GBM at the cohort level. As CpG hypo- or unmethylation allows the binding of transcription factors, and thereby the initiation of gene transcription and expression, our epigenomic observations suggested the involvement of this signaling pathway in GBM, but without identifying the involvements of individual markers and their expression levels. While several *in vitro* studies on various cancer and glioma cell lines have investigated the involvement of this pathway in tumorigenesis, we could not find related studies on human brain-derived GBM specimens where tumor cells had been under the influence of their microenvironment. These observations prompted us to determine here the protein expression and promoter + gene methylation levels of four selected catecholamine markers in individual samples of primary and recurrent GBM [2].

First, we performed quantitative IHC analyses of the four selected markers (Figure 2), which revealed that the levels of protein expression were either significantly (ADRBK1, DRD2) or tendentially (ADRA1D, SCL18A2) higher in primary (GBM1) compared to recurrent tumors (GBM2). Comparing GBMs to HCs, ADRA1D decreased, while ADRBK1

increased in the tumors, and DRD2 and SLC18A2 did not show statistical differences in these comparisons. Second, we assessed the promoter + gene CpG methylation levels for the four selected markers in individual samples of the 21 GBM1 and GBM2 pairs, and also compared these figures to those of the MC group (five individuals) (Figure 3). We opted to determine the methylation levels of the corresponding promoter and gene regions together, instead of only the promoter regions of the markers, because of the compromised quality of DNA derived from the FFPE specimens. These analyses showed either significantly or tendentially higher methylation levels of all four markers in the MC compared to the GBM1 and GBM2 samples. In cases of ADRBK1/GRK2 and DRD2, the differences were significant in both the MC vs. GBM1 and MC vs. GBM2 comparisons, in inverse correlations with the protein expressions of these markers in the HC and GBM1 comparisons. While we also expected to detect lower promoter + gene methylation levels when the protein expression levels were higher for the markers in the sequential GBM pairs, our data did not show such correspondence in the GBM1 and GBM2 comparisons (Figures 2 and 3). In fact, there was no difference in methylation levels when the GBM1 and GBM2 samples were compared. Third, we wanted to validate our observation on the promoter + gene methylation levels in another cohort. Therefore, we assessed the methylation levels of the promoter + gene segments of the four markers in the RRBS sequence data of the sequential GBM pairs published by Klughammer et al. [50]. To avoid biases related to the marked cohort size differences, we only compared the 122 GBM pairs to each other, but not to the 5 MCs (in the RRBS sequence data, the cohort size greatly influences the detection of the number and methylation status of CpGs in a given region; when the sizes of compared cohorts greatly differ, biased outcome may be gained regarding CpG methylation differences) (Figure 4). These analyses showed no differences in the methylation levels of the four markers in the primary and recurrent GBM comparison in concordance with the outcome of our own sequential GBM1 and GBM2 comparisons.

The lack of lower promoter + gene methylation accompanying the significantly or tendentially higher protein expression levels of the four markers in GBM1 compared to GBM2 may be explained by alternative mechanisms of gene expression regulation. Similarly, inverse correlations between protein expression and promoter + gene methylation measures were only observed for ADRBK1 and DRD2 in the GBM1 vs. control comparisons and for ADRBK1 in the GBM2 vs. control comparisons, further underscoring the involvement of other mechanisms besides promoter + gene CpG methylation in protein expression regulation. Methylation changes may affect not only a particular gene and promoter region, but also numerous molecules involved in gene expression regulation, binding sites of transcription factors, splice sites, or coding regions of microRNA and siRNA molecules [52]. Furthermore, newly acquired somatic structural chromosomal alterations, gene copy number variations, or changes in histone modification may also influence the protein expression patterns in sequential tumors [53]. This short list of various mechanisms influencing gene expression regulation may explain, at least in part, the lack of expected inverse relations between the detected protein expression and methylation data in our control, GBM1 and GBM2 cohorts. While this mechanistic complexity provides a strict control for gene expression regulation, it also makes it more difficult to achieve a targeted manipulation of critical molecules involved in pathological conditions such as tumorigenesis.

Nevertheless, our data support that catecholamines are differentially involved in progressive GBM samples compared to each other and to non-tumorous brain tissues. Figure 5 depicts signaling and potential effects of the studied markers in GBM. Catecholamines, including dopamine, epinephrine and norepinephrine, are important physiological neurotransmitters, mediating a variety of CNS functions (e.g., motor control, cognition, endocrine modulation) [54]. Neurons synthesize monoamines and deliver them to the synaptic cleft, from where many molecules diffuse out and activate autoreceptors on the surface of the emitting neurons or on the surrounding astrocytes and oligodendrocytes

[55,56]. CNS cells transformed into tumor-initiating cells are also exposed to neurotransmitters. The higher DRD2 mRNA and protein levels in human neoplastic tissues than in normal brain controls [29,57], and the higher DRD2 levels in primary than in recurrent GBM (in the present study) support the hypothesis that dopamine has an influence on glioma formation and growth [29]. Single-cell RNA sequence data revealing an increased expression in the PI3K-Akt pathway genes that code for signaling molecules downstream to DRD2 provide indirect support to these observations in GBM, as the PI3K-Akt pathway is associated with increased cell differentiation and growth [58]. While these data suggest that dopamine may contribute to or modulate carcinogenesis by its pro-proliferative properties through DRD2, its effects are more complex. Exogenous administration of dopamine was reported to reduce angiogenesis and tumor growth in breast- and colon-cancer by inhibiting vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced phosphorylation of VEGFR2 and its downstream pathway in mice [59]. Similarly, dopamine inhibited tumor growth, while levodopa, its precursor, increased the survival time of rats with C6 glioma [60]. Further, the repression of DRD2 signaling by an upstream regulator named repressor element-1 silencing transcription factor (REST) resulted in GSC-mediated tumorigenesis [61]. These observed opposing effects complicate the potential use of dopamine-targeting drugs in cancer. Our data on the GBM and control samples also did not reveal unequivocal direction of DRD2 expression changes, suggesting that further research is needed to better dissect the complex role of dopamine during gliomagenesis and progression in the setting of intra- and intertumor heterogeneity. GRKs (including ADRBK1) are a family of protein kinases that phosphorylate the intracellular domains of the GPCRs and thereby regulate the downstream G-protein signaling pathways. GRK3 is a known negative regulator of GBM, whereas GRK5 contributes to its more aggressive growth and drug resistance [42,43]. While specific data are unavailable about the role of GRK2 or ADRBK1 in GBM, several GRKs are known to influence cell proliferation and tumor growth in other types of cancers [44]. Although GRK2 knockdown slowed cell growth and proliferation, and enhanced apoptosis in UW228-2 medulloblastoma cell lines [62], its enhanced expression increased the sensitivity of adenosine A_{2A} receptor (ADORA2A) to desensitization in a mouse neuroblastoma x rat glioma construct [63]. As GPCR desensitization depends on the level of GRK expression, cells that express high levels of GRK2 are likely to trigger GRK-mediated pathways at low agonist concentrations [63]. These observations raise the possibility that ADRBK1/GRK2 and GPCRs (e.g., DRD2) may promote cell proliferation and tumor growth in GBM. Adrenergic neurotransmitters (NE, E) are known to promote cell migration and invasion in various types of cancer [16,17], and an abnormal activation of adrenoreceptors (e.g., by GRK feedback or drugs) may promote cancer development [7,18]. Further, ERK1/2 in U373 MG cells is also activated by several mitogenic GPCRs, including alpha-adrenergic receptors [64]. Although we found higher expression levels of ADRA1D in the HC group than in the GBM groups, we cannot rule out the possibility that changes in its expression may influence tumor formation. The vesicular monoamine transporters are expressed in dopaminergic, serotonergic and noradrenergic cells in the brain, and thus may be responsible for the storage and transport of all monoamines in the CNS [65,66]. While these transporters have roles in the regulation of neurotransmitter release and post-synaptic signaling, and their altered expression may confer risk for some neuropsychiatric disorders, their involvement in cancer remains equivocal at the present time [48]. Experiments with VMAT2 expressing mouse lines demonstrated that, following treatment with a dopaminergic toxicant (e.g., MPTP), the low level of VMAT2 caused catecholaminergic cell loss, while the high level of VMAT2 increased dopamine release and protected cells, observations that may predict what role this transporter plays in cancer [67]. While the effects of monoamine depletion in animal models and human studies on cognition (e.g., depression, decision making, etc.) are well defined [68,69], the data concerning the in vivo or in vitro effects of exogenously administered or depleted monoamines in GBM/glioma cell lines are less unequivocal.

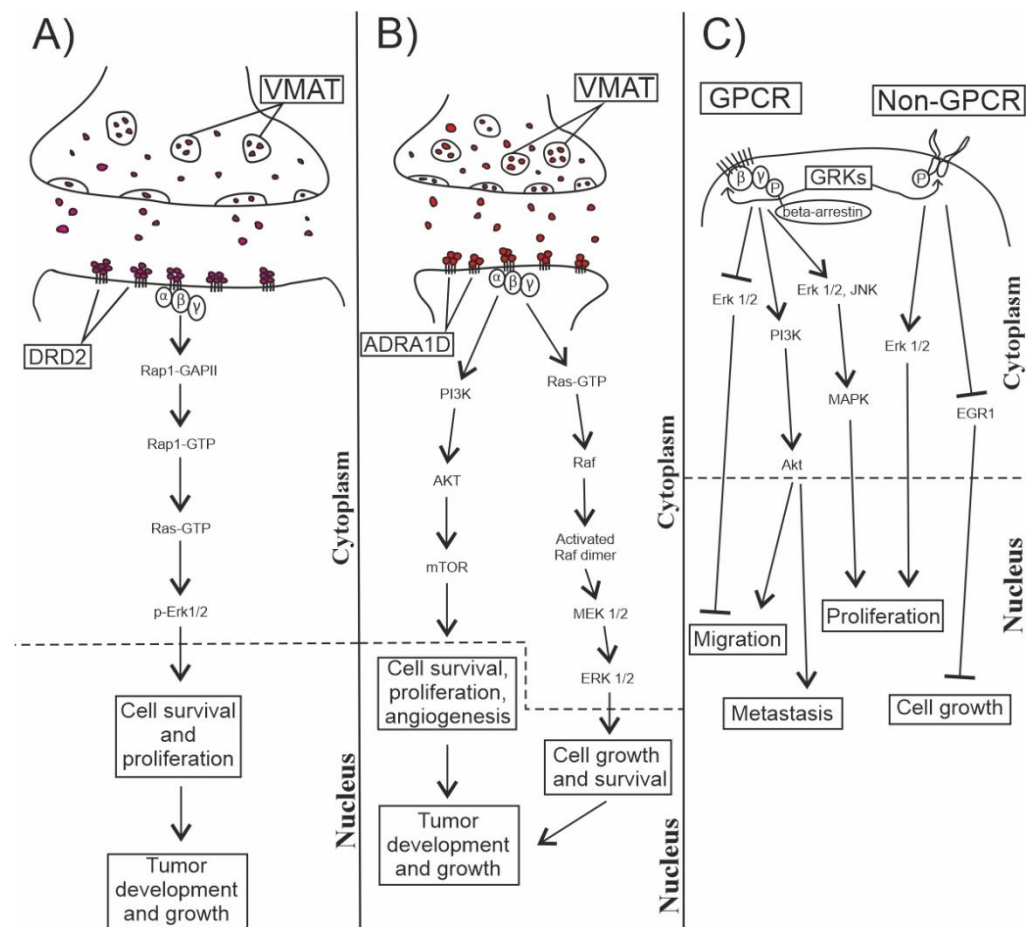


Figure 5. Involvements of the studied neurotransmitters in tumor development. This schematic figure illustrates as to how the signal transduction pathways of catecholamines and their associated receptors contribute to tumorigenesis. (A) Signaling pathway of dopamine via DRD2; (B) signaling pathway of norepinephrine or epinephrine via ADRA1D; and (C) interaction of GRKs with GPCRs and non-GPCRs to regulate cell biology and gliomagenesis. VMAT2 = vesicular monoamine transporter 2; GPCR = G protein-coupled receptor; GRK = G protein-coupled receptor kinase; DRD2 = dopamine receptor D2; ADRA1D = alpha-1D adrenoceptor.

As the currently approved Stupp protocol [70] only prolongs patients' life, but does not cure GBM, research on additional potential treatment targets are essential. In this line, a combined application of temozolomide and DRD2 antagonists was shown to have synergistic effects in inhibiting the proliferation of glioma cells [71]. Further, the epidermal growth factor receptor (EGFR), Ras-GTP, Erk1 and Erk2 pathway is positively modulated by dopamine signaling [29]. While targeting EGFR by monoclonal antibodies or tyrosine kinase inhibitors have been extensively studied, a combined blockade of the EGFR and DRD2 pathways remains to be tested. GRK2 has not been characterized or targeted in GBM, but is known to promote tumorigenesis and chemotherapy-induced apoptosis in breast [72] and medulloblastoma cells [62]. The modulation of the ADRA1D signaling in tumors also remains to be better explored. Some data show that inhibition of the ADRA1D, MAPK and PI3K-Akt pathway leads to increased death in myoblast cells [73], suggesting a contribution of ADRA1D to tumor cell survival; however, we could not find previous data about its role in GBM. Abnormal expression of SLC18A2 may also affect GBM cells and deserve further exploration as a treatment target. Recent observations support that neuronal activity fosters glioma cell malignancy by non-synaptic paracrine and autocrine mechanisms as well as by functional synapses between neurons and glioma cells [74,75]. These electrochemical connections can induce proliferation and progression of tumor cells involving neurotransmitters [75]. Altogether, our data and observations in the

literature suggest that neurotransmitters, particularly catecholamines, are hijacked by GBM for its own benefit and growth, indicating a new direction for research on complementary treatment approaches (Figure 5). However, it is important to note that *in vivo* data concerning the roles of catecholamines in gliomas are scarce, and no previous human study had shown that this signaling pathway has a key importance in GBM development. Genome-wide transcriptome or single-cell RNA sequencing analyses, although identified numerous pathways and gene products in association with GBM [76–78], have not highlighted the importance of this pathway. Given the confounding effects of GBM inter- and intratumor heterogeneity, and the complexity of interactions between tumor cells and their microenvironment, *in vivo* or *ex vivo* capturing the impacts of the catecholamine pathway activation on glioma growth is not straightforward. Only integrated results of bulk tissue and single cell OMICS and imaging complemented by *in vitro* manipulation of ligands, receptors and signaling molecules may bring us closer to define if elements of this pathway may become worthy of therapeutic targeting in humans.

The strength of this study is that our cohort contained sequential GBM samples, and the DNA CpG methylation and protein expression levels were compared in the same specimens. While this study provides new and important information about the potential role of catecholamine pathway markers in GBM, it also has weaknesses. First, the relatively small size of the sequential GBM cohort posed limitations in the statistical analyses. However, due to the aggressiveness of the tumor, higher numbers of GBM pairs are seldom available even at major university centers. Second, the quality of the human clinical samples was greatly influenced by the FFPE procedure that yielded chemically compromised DNA. Fortunately, the availability of a newer technology based on RRBS allowed us to obtain useful information even from FFPE specimens. Third, obtaining surgically removed normal or non-tumorous brain tissues for the controls is not feasible. Using post-mortem brain controls in IHC and epilepsy surgery controls in the CpG methylation studies was a compromise commonly taken in similar studies. Despite all the quantitative and qualitative obstacles associated with human brain tissue and tumor studies, we believe that our observations represent valid data on the roles of catecholamines in GBM development, and open new avenues for future research on their mechanistic involvement in gliomagenesis or tumor-microenvironment communication.

5. Conclusions

This study has demonstrated that all four of the selected catecholamine pathway markers have higher expression at the protein level, either tendentially (ADRA1D, SLC18A2) or significantly (DRD2, ADRBK1/GRK2) in GBM1 compared to GBM2. Comparing the CpG methylation data of the promoter + gene segments of the selected markers, higher methylation levels were seen either significantly (ADRBK1, DRD2) or tendentially (ADRA1D, SLC18A2) in the MC cohort compared to the GBMs, likely underlying, at least in part, the inverse protein expression detected in GBM1 vs. HC. However, the marker expression changes assessed by IHC were not accompanied by inverse changes in the promoter + gene methylation levels when GBM1 and GBM2 were compared, suggesting the involvement of regulatory mechanisms other than CpG methylation alone. The lack of methylation differences for the markers in our GBM1 and GBM2 cohorts was supported by similar data when the larger sequential cohort of Klughammer et al. [50] was tested. Altogether, these observations suggest that neurotransmitters, their receptors and mediators play important roles in gliomagenesis, likely driving onset, development and growth of GBM, and offer novel approaches to identify supplementary therapeutic targets. Despite the technical limitations, we believe that our results from human GBM are consistent with, but also extend, the existing data, and provide grounds for new research directions.

Supplementary Materials: www.mdpi.com/2073-4409/10/3/549/s1. The following are available online: Supplementary Table S1a: GO analysis; Table S1b: GBM Cohort; Table S1c: Fragmentation data; Table S1d: Antigens. <https://szkk.pte.hu/hu/file/1609/download?token=fldUHgUY>.

Author Contributions: Conceptualization: B.K. (Bernadette Kalman); material preparation, data collection and analyses: Z.K., B.K. (Bela Kajtar), B.G., A.G. and B.K. (Bernadette Kalman); writing—original manuscript draft preparation: Z.K. and B.K. (Bernadette Kalman); financial support: B.K. (Bernadette Kalman), A.G. and A.M.; edited manuscript: all co-authors; reading and approval of the final version of the manuscript: all co-authors. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was supported by Hungarian state funds administered through the graduate studies program of the University of Pecs, the 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. 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. Bioinformatics infrastructure was supported by ELIXIR Hungary (<http://elixir-hungary.org>). 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.

Institutional Review Board Statement: The study was approved (Number: 7517 PTE 2018 and 2019) by the Regional Clinical Research Committee, University of Pecs, following the Declaration of Helsinki code of ethics.

Informed Consent Statement: Patient consent was waived because 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; No identifiable patient or patient's data are included.

Data Availability Statement: 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.

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

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>.

References

1. Alifieris, C.; Trafalis, D.T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *152*, 63–82, doi:10.1016/j.pharmthera.2015.05.005.
2. Kraboth, Z.; Galik, B.; Tompa, M.; Kajtar, B.; Urban, P.; Gyenesi, A.; Kalman, B. DNA CpG methylation in sequential glioblastoma specimens. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2020**, *146*, 2885–2896, doi:10.1007/s00432-020-03349-w.
3. Ligon, K.L.; Huillard, E.; Mehta, S.; Kesari, S.; Liu, H.; Alberta, J.A.; Anderson, D.J. Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. *Neuron* **2007**, *53*, 503–517, doi:10.1016/j.neuron.2007.01.009.
4. Zheng, H.; Ying, H.; Yan, H.; Kimmelman, A.C.; Hiller, D.J.; Chen, A.J.; Stommel, J.M. p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature* **2008**, *455*, 1129–1133, doi:10.1038/nature07443.
5. Natsume, A.; Kinjo, S.; Yuki, K.; Kato, T.; Ohno, M.; Motomura, K.; Wakabayashi, T. Glioma-initiating cells and molecular pathology: Implications for therapy. *Brain Tumor Pathol.* **2011**, *28*, 1–12.
6. Lennarz, W.J.; Lane, M.D. *Encyclopedia of Biological Chemistry*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2013; ISBN:978-0-12-378630-2.
7. Fitzgerald, P.J. Is norepinephrine an etiological factor in some types of cancer? *Int. J. Cancer* **2009**, *124*, 257–263, doi:10.1002/ijc.24063.
8. Filippi, S.; Parenti, A.; Donnini, S.; Granger, H.J.; Fazzini, A.; Ledda, F. α 1D-adrenoceptors cause endothelium-dependent vasodilatation in the rat mesenteric vascular bed. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *296*, 869–875.
9. Vinci, M.C.; Bellik, L.; Filippi, S.; Ledda, F.; Parenti, A. Trophic effects induced by α 1D-adrenoceptors on endothelial cells are potentiated by hypoxia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2007**, *293*, H2140–H2147, doi:10.1152/ajpheart.00390.2007.

10. Underland, L.J.; Mark, E.R.; Katikaneni, R.; Heptulla, R. The impact of dopamine on insulin secretion in healthy controls. *Indian J. Crit. Care Med. Peer Rev. Off. Publ. Indian Soc. Crit. Care Med.* **2018**, *22*, 209, doi:10.4103/ijccm.IJCCM_175_17.
11. Sarkar, C.; Basu, B.; Chakroborty, D.; Dasgupta, P.S.; Basu, S. The immunoregulatory role of dopamine: An update. *Brain Behav. Immun.* **2010**, *24*, 525–528, doi:10.1016/j.bbi.2009.10.015.
12. Michelotti, G.A.; Brinkley, D.M.; Morris, D.P.; Smith, M.P.; Louie, R.J.; Schwinn, D.A. Epigenetic regulation of human $\alpha 1$ -adrenergic receptor gene expression: A role for DNA methylation in Spl-dependent regulation. *FASEB J.* **2007**, *21*, 1979–1993, doi:10.1096/fj.06-7118com.
13. Calzada, B.C.; De Artiñano, A.A. Alpha-adrenoceptor subtypes. *Pharmacol. Res.* **2001**, *44*, 195–208, doi:10.1006/phrs.2001.0857.
14. Meyer, J.S.; Quenzer, L.F. *Psychopharmacology: Drugs, the Brain, and Behavior*; Sinauer Associates: Sunderland, MA, USA, 2005.
15. Weselek, G.; Keiner, S.; Fauser, M.; Wagenführ, L.; Müller, J.; Kaltschmidt, B.; Storch, A. Norepinephrine is a negative regulator of the adult periventricular neural stem cell niche. *Stem Cells* **2020**, doi:10.1002/stem.3232.
16. Entschladen, F.; Drell IV, T.L.; Lang, K.; Joseph, J.; Zaenker, K.S. Tumour-cell migration, invasion, and metastasis: Navigation by neurotransmitters. *Lancet Oncol.* **2004**, *5*, 254–258, doi:10.1016/S1470-2045(04)01431-7.
17. Schuller, H.M. Neurotransmitter receptor-mediated signaling pathways as modulators of carcinogenesis. In *Neuronal Activity in Tumor Tissue*; Karger Publishers: Berlin, Germany, 2007; Volume 39, pp. 45–63, doi:10.1159/000100045.
18. Adissu, H.A.; Schuller, H.M. Antagonistic growth regulation of cell lines derived from human lung adenocarcinomas of Clara cell and aveolar type II cell lineage: Implications for chemoprevention. *Int. J. Oncol.* **2004**, *24*, 1467–1472, doi:10.3892/ijo.24.6.1467.
19. Mishra, A.; Singh, S.; Shukla, S. Physiological and functional basis of dopamine receptors and their role in neurogenesis: Possible implication for Parkinson's disease. *J. Exp. Neurosci.* **2018**, *12*, doi:10.1177/1179069518779829.
20. Burnett, B.A.; Womeldorff, M.R.; Jensen, R. Meningioma: Signaling pathways and tumor growth. In *Handbook of Clinical Neurology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2020; Volume 169, pp. 137–150, doi:10.1016/B978-0-12-804280-9.00009-3.
21. Quintana, C., & Beaulieu, J. M. (2019). A fresh look at cortical dopamine D2 receptor expressing neurons. *Pharmacological research*, *139*, 440–445. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.12.001>
22. Armando, I.; Villar, V.A.M.; Jose, P.A. Dopamine and renal function and blood pressure regulation. *Compr. Physiol.* **2011**, *1*, 1075–1117, doi:10.1002/cphy.c100032.
23. Hegarty, S.V.; Sullivan, A.M.; O'Keefe, G.W. Midbrain dopaminergic neurons: A review of the molecular circuitry that regulates their development. *Dev. Biol.* **2013**, *379*, 123–138, doi:10.1016/j.ydbio.2013.04.014.
24. Alcaro, A.; Huber, R.; Panksepp, J. Behavioral functions of the mesolimbic dopaminergic system: An affective neuroethological perspective. *Brain Res. Rev.* **2007**, *56*, 283–321, doi:10.1016/j.brainresrev.2007.07.014.
25. Berridge, K.C. The debate over dopamine's role in reward: The case for incentive salience. *Psychopharmacology* **2007**, *191*, 391–431, doi:10.1007/s00213-006-0578-x.
26. Ramanathan, S.; Al-Diwani, A.; Waters, P.; Irani, S.R. The autoantibody-mediated encephalitides: From clinical observations to molecular pathogenesis. *J. Neurol.* **2019**, *1*–19, doi:10.1007/s00415-019-09590-9.
27. Takamura, N.; Nakagawa, S.; Masuda, T.; Boku, S.; Kato, A.; Song, N.; Kusumi, I. The effect of dopamine on adult hippocampal neurogenesis. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2014**, *50*, 116–124, doi:10.1016/j.pnpbp.2013.12.011.
28. Ohira, K. Dopamine as a growth differentiation factor in the mammalian brain. *Neural Regen. Res.* **2020**, *15*, 390, doi:10.4103/1673-5374.266052.
29. Li, J.; Zhu, S.; Kozono, D.; Ng, K.; Futralan, D.; Shen, Y.; Carter, B.S. Genome-wide shRNA screen revealed integrated mitogenic signaling between dopamine receptor D2 (DRD2) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in glioblastoma. *Oncotarget* **2014**, *5*, 882, doi:10.18632/oncotarget.1801.
30. Caragher, S.P.; Shireman, J.M.; Huang, M.; Miska, J.; Atashi, F.; Baisiwala, S.; Lesniak, M.S. Activation of dopamine receptor 2 prompts transcriptomic and metabolic plasticity in glioblastoma. *J. Neurosci.* **2019**, *39*, 1982–1993, doi:10.1523/JNEUROSCI.1589-18.2018.
31. Bartek, J.; Hodny, Z. Dopamine signaling: Target in glioblastoma. *Oncotarget* **2014**, *5*, 1116, doi:10.18632/oncotarget.1835.
32. Métayé, T.; Gibelin, H.; Perdrisot, R.; Kraimps, J.L. Pathophysiological roles of G-protein-coupled receptor kinases. *Cell. Signal.* **2005**, *17*, 917–928, doi:10.1016/j.cellsig.2005.01.002.
33. Komolov, K.E.; Benovic, J.L. G protein-coupled receptor kinases: Past, present and future. *Cell. Signal.* **2018**, *41*, 17–24, doi:10.1016/j.cellsig.2017.07.004.
34. Ferguson, S.S. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: The role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 1–24.
35. Ribas, C.; Penela, P.; Murga, C.; Salcedo, A.; García-Hoz, C.; Jurado-Pueyo, M.; Mayor, F., Jr. The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: Role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2007**, *1768*, 913–922, doi:10.1016/j.bbamem.2006.09.019.
36. Murga, C.; Arcones, A.C.; Cruces-Sande, M.; Briones, A.M.; Salaces, M.; Mayor, F., Jr. G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) as a potential therapeutic target in cardiovascular and metabolic diseases. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 112, doi:10.3389/fphar.2019.00112.
37. Evron, T.; Daigle, T.L.; Caron, M.G. GRK2: Multiple roles beyond G protein-coupled receptor desensitization. *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 154–164, doi:10.1016/j.tips.2011.12.003.
38. Sun, W.Y.; Wu, J.J.; Peng, W.T.; Sun, J.C.; Wei, W. The role of G protein-coupled receptor kinases in the pathology of malignant tumors. *Acta Pharmacol. Sin.* **2018**, *39*, 1699–1705, doi:10.1038/s41401-018-0049-z.

39. Penela, P.; Murga, C.; Ribas, C.; Lafarga, V.; Mayor, F., Jr. The complex G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) interactome unveils new physiopathological targets. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *160*, 821–832, doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00727.x.
40. Lymperopoulos, A.; Bathgate, A. Pharmacogenomics of the heptahelical receptor regulators G-protein-coupled receptor kinases and arrestins: The known and the unknown. *Pharmacogenomics* **2012**, *13*, 323–341, doi:10.2217/pgs.11.178.
41. Nogués, L.; Palacios-García, J.; Reglero, C.; Rivas, V.; Neves, M.; Ribas, C.; Mayor, F., Jr. G protein-coupled receptor kinases (GRKs) in tumorigenesis and cancer progression: GPCR regulators and signaling hubs. In *Seminars in Cancer Biology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2018; Volume 48, pp. 78–90, doi:10.1016/j.semcancer.2017.04.013.
42. Woerner, B.M.; Luo, J.; Brown, K.R.; Jackson, E.; Dahiya, S.M.; Mischel, P.; Rubin, J.B. Suppression of G-protein-Coupled Receptor Kinase 3 Expression Is a Feature of Classical GBM That Is Required for Maximal Growth. *Mol. Cancer Res.* **2012**, *10*, 156–166, doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0411.
43. Kaur, G.; Kim, J.; Kaur, R.; Tan, I.; Bloch, O.; Sun, M.Z.; Parsa, A.T. G-protein coupled receptor kinase (GRK)-5 regulates proliferation of glioblastoma-derived stem cells. *J. Clin. Neurosci.* **2013**, *20*, 1014–1018, doi:10.1016/j.jocn.2012.10.008.
44. Yu, S.; Sun, L.; Jiao, Y.; Lee, L.T.O. The role of G protein-coupled receptor kinases in cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **2018**, *14*, 189, doi:10.7150/ijbs.22896.
45. Hu, C.; Tao, L.; Cao, X.; Chen, L. The solute carrier transporters and the brain: Physiological and pharmacological implications. *Asian J. Pharm. Sci.* **2020**, *15*, 131–144, doi:10.1016/j.ajps.2019.09.002.
46. Mulvihill, K.G. Presynaptic regulation of dopamine release: Role of the DAT and VMAT2 transporters. *Neurochem. Int.* **2019**, *122*, 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.11.004>
47. Omote, H.; Miyaji, T.; Hiasa, M.; Juge, N.; Moriyama, Y. Structure, function, and drug interactions of neurotransmitter transporters in the postgenomic era. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2016**, *56*, 385–402, doi:10.1146/annurev-pharmtox-010814-124816.
48. Lawal, H.O.; Krantz, D.E. SLC18: Vesicular neurotransmitter transporters for monoamines and acetylcholine. *Mol. Asp. Med.* **2013**, *34*, 360–372, doi:10.1016/j.mam.2012.07.005.
49. Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; Von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ellison, D.W. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 803–820, doi:10.1007/s00401-016-1545-1.
50. Klughammer, J.; Kiesel, B.; Roetzer, T.; Fortelny, N.; Nemc, A.; Nanning, K.H.; Nowosielski, M. The DNA methylation landscape of glioblastoma disease progression shows extensive heterogeneity in time and space. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 1611–1624, doi:10.1038/s41591-018-0156-x.
51. Krueger, F.; Andrews, S.R. Bismark: A flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 1571–1572, doi:10.1093/bioinformatics/btr167.
52. Li, Z.; Rana, T.M. Molecular mechanisms of RNA-triggered gene silencing machineries. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1122–1131, doi:10.1021/ar200253u.
53. Moarii, M.; Boeva, V.; Vert, J.P.; Reyat, F. Changes in correlation between promoter methylation and gene expression in cancer. *BMC Genom.* **2015**, *16*, 1–14, doi:10.1186/s12864-015-1994-2.
54. Kobayashi, K. Role of catecholamine signaling in brain and nervous system functions: New insights from mouse molecular genetic study. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **2001**, *6*, 115–121, doi:10.1046/j.0022-202x.2001.00011.x.
55. Xie, Z.; Westmoreland, S.V.; Bahn, M.E.; Chen, G.L.; Yang, H.; Vallender, E.J.; Miller, G.M. Rhesus monkey trace amine-associated receptor 1 signaling: Enhancement by monoamine transporters and attenuation by the D2 autoreceptor in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *321*, 116–127, doi:10.1124/jpet.106.116863.
56. Perea, G.; Navarrete, M.; Araque, A. Tripartite synapses: Astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* **2009**, *32*, 421–431, doi:10.1016/j.tins.2009.05.001.
57. Hottinger, A.F.; Stupp, R.; Homicsko, K. Standards of care and novel approaches in the management of glioblastoma multiforme. *Chin. J. Cancer* **2014**, *33*, 32, doi:10.5732/cjc.013.10207.
58. Pang, B.; Xu, J.; Hu, J.; Guo, F.; Wan, L.; Cheng, M.; Pang, L. Single-cell RNA-seq reveals the invasive trajectory and molecular cascades underlying glioblastoma progression. *Mol. Oncol.* **2019**, *13*, 2588–2603, doi:10.1002/1878-0261.12569.
59. Sarkar, C.; Chakroborty, D.; Chowdhury, U.R.; Dasgupta, P.S.; Basu, S. Dopamine increases the efficacy of anticancer drugs in breast and colon cancer preclinical models. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 2502–2510, doi:10.1158/1078-0432.
60. Qin, T.; Wang, C.; Chen, X.; Duan, C.; Zhang, X.; Zhang, J.; Yang, J. Dopamine induces growth inhibition and vascular normalization through reprogramming M2-polarized macrophages in rat C6 glioma. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2015**, *286*, 112–123, doi:10.1016/j.taap.2015.03.021.
61. Marisetty, A.L.; Lu, L.; Veo, B.L.; Liu, B.; Coarfa, C.; Kamal, M.M.; Majumder, S. REST-DRD2 mechanism impacts glioblastoma stem cell-mediated tumorigenesis. *Neuro-oncology* **2019**, *21*, 775–785, doi:10.1093/neuonc/noz030.
62. Pathania, A.S.; Ren, X.; Mahdi, M.Y.; Shackleford, G.M.; Erdreich-Epstein, A. GRK2 promotes growth of medulloblastoma cells and protects them from chemotherapy-induced apoptosis. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–15, doi:10.1038/s41598-019-50157-5.
63. Mundell, S.J.; Kelly, E. The effect of inhibitors of receptor internalization on the desensitization and resensitization of three Gs-coupled receptor responses. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *125*, 1594–1600, doi:10.1038/sj.bjp.0702234.
64. Yamaguchi, K.; Kugimiya, T.; Miyazaki, T. Substance P receptor in U373 MG human astrocytoma cells activates mitogen-activated protein kinases ERK1/2 through Src. *Brain Tumor Pathol.* **2005**, *22*, 1–8, doi:10.1007/s10014-005-0178-1.
65. Eiden, L.E.; Weihe, E. VMAT2: A dynamic regulator of brain monoaminergic neuronal function interacting with drugs of abuse. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2011**, *1216*, 86, doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05906.x.

66. Fei, H.; Krantz, D.E. Vesicular neurotransmitter transporters. In *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2009.
67. Lohr, K.M.; Chen, M.; Hoffman, C.A.; McDaniel, M.J.; Stout, K.A.; Dunn, A.R.; Miller, G.W. Vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) level regulates MPTP vulnerability and clearance of excess dopamine in mouse striatal terminals. *Toxicol. Sci.* **2016**, *153*, 79–88, doi:10.1093/toxsci/kfw106.
68. Berman, R.M.; Sanacora, G.; Anand, A.; Roach, L.M.; Fasula, M.K.; Finkelstein, C.O.; Charney, D.S. Monoamine depletion in unmedicated depressed subjects. *Biol. Psychiatry* **2002**, *51*, 469–473, doi:10.1016/S0006-3223(01)01285-9.
69. Schweimer, J.; Saft, S.; Hauber, W. Involvement of catecholamine neurotransmission in the rat anterior cingulate in effort-related decision making. *Behav. Neurosci.* **2005**, *119*, 1687, doi:10.1037/0735-7044.119.6.1687.
70. Stupp, R.; Mason, W.P.; Van Den Bent, M.J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M.J.; Curschmann, J. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 987–996, doi:10.1056/NEJMoa043330.
71. Liu, Z.; Jiang, X.; Gao, L.; Liu, X.; Li, J.; Huang, X.; Zeng, T. Synergistic suppression of glioblastoma cell growth by combined application of temozolomide and dopamine D2 receptor antagonists. *World Neurosurg.* **2019**, *128*, e468–e477, doi:10.1016/j.wneu.2019.04.180.
72. Nogués, L.; Reglero, C.; Rivas, V.; Salcedo, A.; Lafarga, V.; Neves, M.; Zhou, X.Z. G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) promotes breast tumorigenesis through a HDAC6-Pin1 axis. *EBioMedicine* **2016**, *13*, 132–145, doi:10.1016/j.ebiom.2016.09.030.
73. Saini, A.; Al-Shanti, N.; Stewart, C. C2 skeletal myoblast survival, death, proliferation and differentiation: Regulation by Adra1d. *Cell. Physiol. Biochem.* **2010**, *25*, 253–262, doi:10.1159/000276559.
74. Venkataramani, V.; Tanev, D.I.; Strahle, C.; Studier-Fischer, A.; Fankhauser, L.; Kessler, T.; Horstmann, H. Glutamatergic synaptic input to glioma cells drives brain tumour progression. *Nature* **2019**, *573*, 532–538, doi:10.1038/s41586-019-1564-x.
75. Venkatesh, H.S.; Morishita, W.; Geraghty, A.C.; Silverbush, D.; Gillespie, S.M.; Arzt, M.; Woo, P.J. Electrical and synaptic integration of glioma into neural circuits. *Nature* **2019**, *573*, 539–545, doi:10.1038/s41586-019-1563-y.
76. Neftel, C.; Laffy, J.; Filbin, M.G.; Hara, T.; Shore, M.E.; Rahme, G.J.; Suvà, M. An integrative model of cellular states, plasticity, and genetics for glioblastoma. *Cell* **2019**, *178*, 835–849, doi:10.1016/j.cell.2019.06.024.
77. Park, J.; Shim, J.K.; Yoon, S.J.; Kim, S.H.; Chang, J.H.; Kang, S.G. Transcriptome profiling-based identification of prognostic subtypes and multi-omics signatures of glioblastoma. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–11, doi:10.1038/s41598-019-47066-y.
78. Yuan, J.; Levitin, H.M.; Frattini, V.; Bush, E.C.; Boyett, D.M.; Samanamud, J.; Sims, P.A. Single-cell transcriptome analysis of lineage diversity in high-grade glioma. *Genome Med.* **2018**, *10*, 1–15, doi:10.1186/s13073-018-0567-9.