

**A glioblasztóma patogenezisében és progressiójában
szerepet játszó molekuláris útvonalak feltérképezése
epigenomikai megközelítéssel**

Doktori (PhD) – értekezés



Krabóth Zoltán

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi
Kar**

Klinikai Idegtudományok Doktori Iskola (D221)

Témavezető:

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

Doktori program vezetője:

Prof. Komoly Sámuel, MD, PhD, DSc

Doktori Iskola vezetője:

Prof. Komoly Sámuel, MD, PhD, DSc

Pécs, 2021

Tartalomjegyzék

1.	Bevezető.....	4
2.	Hipotézisek és célkitűzések.....	6
3.	Anyag és módszer	7
3.1	Általános adatok	7
3.2	DNS CpG metilációs mintázatok genom-szintű elemzése kontrollokban és szekvenciális GBM mintapárokban.....	8
3.3	Négy szelektált katekolamin marker promoter+gén DNS CpG metilációjának és fehérje expressziójának mennyiségi meghatározása egyedi kontroll mintákban és szekvenciális GBM mintapárokban	9
3.4	DNS izolálás.....	9
3.5	Könyvtárkészítés	10
3.6	Bioinformatika.....	10
3.7	Immunhisztokémia (IHC).....	11
3.8	Statisztika elemzések	12
4.	Results.....	13
4.1	DNS CpG metiláció szekvenciális FFPE GBM mintákban és kontrollokban	13
4.1.1	Primer tumorok (GBM1) összehasonlítása agyi kontroll (CG2) mintákkal	13
4.1.2	A recidív daganatok (GBM2) összehasonlítása agyi kontroll (CG2) mintákkal.....	14

4.1.3	Recidiv tumorok (GBM2) összehasonlítása primer tumorokkal (GBM1).....	15
4.1.4	Locus Overlap Analysis (LOLA)	16
4.1.5	Korrelációs elemzések a patológiai és klinikai adatok között	17
4.2	A katekolamin útvonal kiválasztott markereinek promoter + gén metilációja és protein expressziója GBM mintapárokban.....	17
4.2.1	A szelektált katekolamin útvonal markerek protein expressziójának kvantitativ IHC vizsgálata GBM és kontroll mintákban	18
4.2.2	A szelektált katekolamin útvonal markerek metilációs szintje egyedi GBM és kontroll mintákban..	19
4.3	A szelektált katekolamin útvonal markerek promóter+gén régióinak metilációs szintjei a validációs adatbázis kohortban	20
5.	Diszkusszió	21
6.	Új megállapítások.....	26
7.	Referencialista:	28
8.	Köszönetnyilvánítás	32

1. Bevezető

A glioblastoma (GBM) a központi idegrendszer leggyakoribb elsődleges rosszindulatú daganata, az Egészségügyi Világszervezet (WHO) osztályozása alapján legsúlyosabb, IV. grádusú glioma. Az összes GBM 90%-a primer eredetű daganat, amely *de novo*, idősebb korban (medián 62 év) alakul ki. Ezzel szemben a GBM fennmaradó 5-10%-a másodlagos daganat, amely II-es grádusú diffúz asztrocitómákból vagy III-as grádusú anaplasztikus asztrocitómákból (5-10%), általában fiatalabb életkorban (medián 45 év) alakul ki. [1, 2]. A GBM jóváhagyott standard kezelése, a Stupp protokoll, a temozolomid (TMZ) alapú kemoterápiát és sugárterápiát foglalja magába, amelyet operálható esetekben a daganat reszekciója előz meg. A GBM prognózisa még a Stupp protokoll és a kísérleti molekuláris kezelési stratégiák mellett is rendkívül rossz. A betegség medián túlélési ideje körülbelül 15 hónap [3, 4].

A GBM-et nagyfokú szövettani és molekuláris heterogenitás jellemzi a felhalmozódó szomatikus mutációk és a tumoron belüli epigenetikai változások klonális heterogenitása folytán. A GBM mutációk és jelátviteli útvonalak első átfogó azonosítását a „The Cancer Genome Atlas” (TCGA) konzorcium írta le [5]. A TCGA integrált genomikai és transzkriptomikai adatok későbbi elemzése azt is feltárta, hogy a GBM molekuláris alcsoportokra, úgynevezett klasszikus (CL),

mezenchimális (MES) és proneurális (PN) csoportokra oszlik. [6]. A CL alcsoportot EGFR (epidermális növekedési faktor receptor) amplifikáció és EGFRvIII mutáció jellemzi, míg a MES alcsoportban az NF-1 (neurofibromin 1) gén deléciója/mutációi a leggyakoribbak. A PN alcsoportban a p53 és IDH-1/2 (izocitrát-dehidrogenáz 1/2) gének mutációi gyakoriak. Az IDH génmutációk egy hibásan működő enzimet eredményeznek, amely egy onkometabolitot termel, befolyásolva a DNS CpG metilációs genomszintű mintázatát, és így a transzkripció profilokat is. [7].

Ma már jól ismert, hogy az epigenetikai mechanizmusok, mint például a DNS CpG metilációja, kiemelkedő szerepet játszanak a GBM kialakulásában, progressziójában, kezelési rezisztenciájában és kiújulásában. A daganatokat általában a DNS CpG metiláció hipometiláció irányába való eltolódása jellemzi, amely lehetővé teszi a normál esetben inaktív onkogének transzkripcióját a transzkripció faktorok enhanszerekhez és promóterekhez való fokozott hozzáférése révén [8]. Néhány elszórt adat arra utal, hogy a katekolamin-út vonal génjeinek epigenomikus módosulásai, beleértve bizonyos monoaminok (dopamin, epinefrin, noradrenalin stb.) és receptoraik génjeit, hozzájárulhatnak a daganatképződéshez gliómák esetén [9, 10]. A neurotranszmitterek és receptoraik nemcsak az interneurális kommunikáció kulcsfontosságú közvetítői, hanem fontos szerepet játszanak a mikrokörnyezet

módosításában, valamint a daganatok kialakulásának és fejlődésének befolyásolásában.

Figyelembe véve a rendelkezésre álló információkat, vizsgálatainkat először a szekvenciális GBM minták genomszintű CpG metilációs profiljának meghatározására összpontosítottuk. Az eredmények alapján ezt követően elemeztük a katekolamin útvonal szerepét a daganatképződésben és progresszióban. A monoaminok és a kapcsolódó jelátviteli útvonalak elemzése hozzájárulhat a gliomagenezis jobb megértéséhez és potenciális új kezelési célpontok azonosításához a jövőben.

2. Hipotézisek és célkitűzések

Hipotézisek

- A DNS CpG metiláció a GBM kialakulását és fejlődését szabályozó fontos epigenomikai mechanizmus
- A DNS CpG metilációjának mintázata különbözik az elsődleges és a recidív GBM tumorokban
- A promóter és a gén metiláció szintje fordított korrelációt mutat a fehérje expresszió szintjével elsődleges és recidív GBM-ben

Célkitűzések

- A differenciáltan metilált DNS CpG helyek, gének, régiók és útvonalak genomszintű meghatározása szekvenciális GBM mintákban és normál kontrollokban
- DNS CpG helyek, gének, régiók és útvonalak metilációs profiljának összehasonlítása primer és recidív GBM mintapárokbán
- Korrelációs elemzések a kiválasztott katekolamin markerek promóter és gén CpG metilációs szintje, valamint fehérje expressziós szintje között szekvenciális GBM mintapárokbán.

3. Anyag és módszer

3.1 Általános adatok

A primer és recidív GBM minták 1997 és 2017 között kerültek a Pécsi Tudományegyetem (PTE) Orvostudományi Kar Patológiai Intézetébe hisztopatológiai feldolgozásra, majd a maradék blokkok archíválásra. Minden primer minta eltávolítása sebészeti úton történt sugárterápia és kemoterápia előtt, míg a recidív minták a kezelések után. Valamennyi itt felhasznált daganat formalin-fixált és paraffinba ágyazott (FFPE) minta volt, amely a rutin hisztopatológiai feldolgozásból maradt vissza. A minták kiválasztását HE (hematoxilin-eozin) festés alapú szövettani minőség-

ellenőrzés, és immunhisztokémia által meghatározott IDH-1 R132H mutációelemzés előzte meg. A tanulmányokat a PTE Regionális Tudományos Etikai Bizottsága (RTEB) hagyta jóvá. RTEB jóváhagyások dokumentációja: PTE RTEB 7517-2018 és -2019.

3.2 DNS CpG metilációs mintázatok genom-szintű elemzése kontrollokban és szekvenciális GBM mintapárokban

A tanulmányhoz 24 betegtől 48 FFPE blokk (24 pár elsődleges és kiújuló daganat) volt elérhető. A klinikai adatok áttekintése után 2 beteg mintáját kizártuk a vizsgálatból a betegek fiatal kora miatt, ezért végül 22 beteg 44 mintáját vontuk be a vizsgálatba. A metilációs kontrollhoz (2. kontrollcsoport – CG2) 5, epilepszia műtéten átesett beteg „reduced representation bisulfite sequencing” (RRBS) adatait használtuk fel egy nyilvánosan elérhető adatbázisból. Ugyanabból az adatbázisból származó 112 elsődleges és kiújuló GBM-mintapár RRBS-adatait teszteltük metilációs eredményeink validálására (<https://www.ebi.ac.uk/ena>, hozzáférési szám: EGAS00001002538) [11].

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

Négy kiválasztott katekolamin marker (ADRA1D - alfa-1D adrenerg receptor, ADRBK1 - adrenerg béta-receptor kináz 1, DRD2 - dopamin-D2 receptor, SLC18A2 - szinaptikus vezikula monoamin transzporter) fehérje expressziós elemzését ugyanazokból a GBM FFPE blokkokból végeztük, mint az epigenomikai elemzéseket. A minták korlátozott elérhetősége miatt azonban egy beteg anyagát ki kellett zárni ebből az elemzésből. Hat FFPE post mortem normál agyi kontrollmintát (HC) használtunk a katekolamin markerek fehérje expressziós vizsgálataiban, mivel etikai okokból nem állt rendelkezésre műtéti úton eltávolított normál agyszövet.

3.4 DNS izolálás

Az FFPE szövetblokkokból négy-öt 5 µm-es metszetet készítettünk. Paraffinmentesítés és etanolos mosás után a DNS-t QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen®) segítségével izoláltuk. Az izolált DNS minőségének ellenőrzésére fragmentanalízist végeztünk az Agilent Genomic DNA ScreenTape Assay alkalmazásával egy Agilent 4200 TapeStation System rendszeren.

3.5 Könyvtárkészítés

Biszulfittal konvertált könyvtárakat állítottunk elő az izolált DNS-ekből az RRBS kit 24x (Diagenode) segítségével, a gyártó utasításai szerint. A preanalitikai DNS-degradáció kompenzálására a kezdeti DNS mennyiségét az ajánlott 200 ng-ról 350-400 ng-ra növeltük.

Könyvtárkészítés röviden: A DNS-t MspI restrikciós endonukleázzal emésztettük, amely felismeri a CCGG helyeket, és CpG-kkel végződő fragmentumokat hoz létre. A következő lépések magukban foglalták a DNS fragmentvégek előkészítését, az adapterek ligálását és a méretszelekciót, majd a minták poolokba rendezését a biszulfid konverzióhoz. A konvertált könyvtárakat PCR-rel amplifikáltuk, és az utolsó méretszelekciós lépés után ellenőriztük a minőséget és a mennyiséget, majd egy Illumina NextSeq 550 készüléken szekvenáltuk. A nyers szekvenálási adatokat feltöltöttük a European Nucleotide Archive adatbázisba (<https://www.ebi.ac.uk/ena>, elsődleges hozzáférés: PRJEB38380, másodlagos hozzáférés: ERP121800).

3.6 Bioinformatika

A NextSeq 550 által generált nyers szekvenálási adatok minőségét FastQC-vel ellenőriztük, és a rossz minőségű szekvenciákat, valamint adaptereket TrimGalore

szoftverrel szűrtük ki. RRBS szekvenciáinkat a hg19 (GRCh37) referencia genommal vetettük össze. A biszulfid-konvertált read-eket és a potenciális metilált helyeket a Bismark programmal határoztuk meg. Az R szoftvert használtuk, kiegészítve az RnBeads beépülő modullal, a differenciálisan metilált CpG helyek, promóterek, régiók és gének azonosítására kohort szinten. A Gene Ontology (GO) analízist alkalmaztuk a differenciáltan metilált jelátviteli útvonalak azonosítására kontrollok, és primer és recidív tumorok összehasonlítása során. A négy kiválasztott katekolamin marker (ADRA1D, ADRBK1, DRD2, SLC18A2) kombinált promóter és gén régiójának metilációs szintjeit minden egyedi mintában meghatároztuk egy Script alkalmazásával, melyet bioinformatikus kollégánk készített. A Script is az R szoftver BioMethyl csomagjával futott. Egy adott minta promóter + gén régiójában a metilációs szintet úgy határozta meg, hogy először azonosította az összes metilált helyet az összes egyedi mintában, hogy megkapjuk a régióban lévő CpG-k teljes számát. Ezeknek a CpG-nek egyedi szinten meghatározta a metiláltságát, végül a metilált helyek számát elosztotta az összes lehetséges (detektált) CpG számával és megszorozta 100-zal.

3.7 Immunhisztokémia (IHC)

A négy kiválasztott katekolamin marker (ADRA1D, ADRBK1, DRD2, SLC18A2) specifikus antitestjeinek

használatát egy kísérleti IHC vizsgálatban optimalizáltuk. Az antitestek specificitását különböző szövettani eredetű daganatokban ellenőriztük, amelyekről ismert volt az adott antigének expressziója (pozitív kontroll), vagy amelyekre a kiválasztott markerek ismertén negatívak (negatív kontroll). Az elsődleges antitesteket a NovoLink Polymer Detection Systems RE-7150-K kit (Leica) segítségével mutattuk ki. Minden mintában meghatároztunk egy „region of interest”-et (ROI) HE festés alapján, hogy az a legmalignusabbnak tűnő régiókat tartalmazza, amelyekben nincs vagy nagyon alacsony a nekrosis és az érújdonképződés. Meghatároztuk a festett sejtek százalékos arányát és a festődés intenzitását a ROI-n belül, és megszoroztuk egymással, hogy megkapjuk az egyes markerek „complex score” (CS) értékét.

3.8 Statisztika elemzések

A daganatok hisztológiai jellemzőit, a betegek klinikai adatait, valamint a katekolamin markerek kvantitatív IHC-eredményeinek (CS-értékeinek) medián és interkvartilis tartományait összehasonlítottuk az alcsoportok között az SSPS v.26.0 szoftver csomag különböző statisztikai tesztjeivel. Adataink minden esetben nem-normál eloszlást követtek, ezért nem parametrikus tesztet alkalmaztunk. A Mann-Whitney U tesztet két független minta összehasonlítására, míg a Wilcoxon signed rank tesztet a függő minták

összehasonlítására használtuk. Több minta egyidejű összehasonlításakor Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk.

4. Results

4.1 DNS CpG metiláció szekvenciális FFPE GBM mintákban és kontrollokban

Első lépésként a biszulfid konverzió és szekvenálás technikai jellemzőit vizsgáltuk. A konverziós ráta 98,48% volt, ami nagy hatékonyságot tükröz. Az informatív CpG-k detektált számában trendszerű csökkenést figyeltünk meg gyengébb minőségű DNS-ek esetében. A differenciáltan metilált CpG helyek mellett az elemző program meghatározta a differenciáltan metilált CpG szigeteket, tiling régiókat, géneket és promótereket is. A tanulmányban a GBM1-CG2, GBM2-CG2 és GBM2-GBM1 összehasonlításban elsősorban a differenciáltan metilált promóterekre koncentráltunk. A CpG helyek, szigetek és tiling régiók metilációs szintjei nem mutattak különbséget a három csoport között. A GO elemzés azonban számos eltérően metilált molekuláris útvonalat tárt fel a három összehasonlítás során.

4.1.1 Primer tumorok (GBM1) összehasonlítása agyi kontroll (CG2) mintákkal

A primer tumorokban a CG2 kontrollokhoz képest hipermetilációt figyeltünk meg a neuronális

differenciálódás és morfogenezis jelátviteli útvonalaiiban, valamint a transzkripció és metabolikus folyamatok útvonalaiiban. A génpromoter metilációs státusza alapján a legjelentősebben hipermetilált útvonalakat a gasztruláció szabályozásában (OTX2) és a fibroblaszt növekedési faktorra adott sejtes válaszok (PTBP1; POLR2D; NOG) szabályozásában találtuk. Ezenkívül a nukleinsav-templátú transzkripció folyamatokban részt vevő 17 különböző gén promótere, a nukleinsav-alapú komplex metabolikus folyamatokban részt vevő 18 gén promótere és a morfogenezisben és a neuronok differenciálódásában részt vevő 19 gén promótere magasabb metilációs szintet mutatott a GBM1-ben. A GBM1-ben a CG2-vel összehasonlítva hipometilációt találtunk a szinapszis szerveződésében (GHSR; HSPA8; FZD9; SEMA3F) és képződésében (AMIGO1; NTRK1; THBS2) részt vevő útvonalak génpromótereinél, illetve az endoteliális sejtek proliferációjában (HIF1A; EGFL) és neuronok myelinizációjában szerepet játszó útvonalak génpromótereinek esetében is (NKX-6; KCNJ10; NCSTN; TENM4).

4.1.2 A recidív daganatok (GBM2) összehasonlítása agyi kontroll (CG2) mintákkal

A recidív tumorokban (GBM2) a kontrollhoz (CG2) képest szignifikáns hipermetilációt találtunk olyan génpromoterekben, melyek a transzkripció szabályozásában (pl. CEBPB; ENY2), sejtadhéziós

folyamatokban (pl. ASTN1-2; NLGN1) illetve embrionális fejlődésben szerepet játszó jelátviteli (ALX3; HOXD10; NOG; FRAS1; SALL4) útvonalakat határozzák meg. 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.

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

A génpromoterek metilációs állapota alapján a GO-elemzés a kanonikus Wnt jelátvitel, valamint a katekolamin szekréció (SYT15; SYT17; PINK1; OXTR) és a transzport (SLC18A2; TORA1) különböző funkcióiban szerepet játszó hipermetilált utakat azonosított. Emellett jelentős hipermetilációt figyeltünk meg a biológiailag fontos receptor jelátviteli útvonalakban (CACNG8; TSG101; DLG1), a sejtválaszok generálásában (NDUFA13; DROSHA; FMR1) és más jelátviteli folyamatokban (PTP4A3; FRMPF1; PRKD2; MBIP; RNF6; NOD1). A recidív tumorokban a primer tumorokhoz képest szignifikánsan alacsonyabban metiláltságú gén promótereket találtunk az immunválasz szabályozásban résztvevő jelátviteli útvonalakban. Hipometilált promótereket azonosítottunk a limfocita-mediált immunitás szabályzásában (TFRC; FOXJ1; ILR4; ILR6), a természetes ölüsejtek (NK)

(HAVCR2; SERPINB9; LAMP1; CADM1), a leukociták (ICAM1) és a T-sejtek által mediált citotoxicitás (MICA; DUSP22) szabályzásában szerepet játszó útvonalak esetében is.

4.1.4 Locus Overlap Analysis (LOLA)

LOLA elemzést használtunk, hogy azonosítsuk azokat a genomikus régiókat és szabályozó elemeket, amelyek az epigenomikai adatok funkcionális interpretálásához különösen relevánsak. A három (GBM1, GBM2, CG2) kohortban az 1000 leginkább hipometilált és hipermetilált tiling régióra összpontosítottunk.

A primer és recidív daganatok kontrollcsoporttal való összehasonlításakor a dúsítási analízis hasonló eredményeket mutatott. Mindkét esetben olyan hipometilált régiók dúsulását láttuk a tumoroknál, amelyek a normális embrionális őssejtek differenciálódásához és a differenciált vonal fenntartásához szükséges transzkripciós faktorok (pl. RUNX1; ESR1; ESR2; CTCF) és hiszton fehérjék (pl. H3K4me1; H3K4me2; H3K4me3; H3K9me3; H3K27me3) kötőhelyeiért felelősek.

A recidív és primer tumorok összehasonlításakor a recidív tumorok esetében láttuk a hipometilált régiók dúsulását, amelyek szintén különböző transzkripciós faktorok (FOXA2; ESR1; ESR2; RXR) és hiszton fehérjék

(H3K27me₃; H3K9me₃; H3K4me₁; H3K4m₂; H3K4m₃) kötőhelyeit érintették.

4.1.5 Korrelációs elemzések a patológiai és klinikai adatok között

Ezekben az elemzésekben a primer (T1) és a recidív daganatok (T2) diagnózisa között eltelt idő intervallumokat hasonlítottuk össze a betegek nemével és életkorával, valamint a daganatok morfológiai alcsoportjaival, a mitotikus rátákkal, a mikrovaszkuláris proliferáció mértékével, az infiltráló limfociták mennyiségével és a nekrosis mértékével. Ezen paraméterek között nem találtunk szignifikáns összefüggést, azonban trendszerű összefüggést találtunk a T1-T2 és a GBM1-ben a tumorba beszűrődő limfociták mennyisége között ($p = 0,08$).

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

Ebben a második tanulmányban négy kiválasztott katekolamin útvonal marker promóter+gén metilációs szintjét határoztuk meg egyedi GBM1, GBM2 és CG2 mintákban, és a CpG metilációs szinteket korreláltuk ezeknek a markereknek a fehérje expressziójával ugyanazon mintákban. A kiválasztott markerek között

van két receptor (ADRA1D; DRD2), egy receptor kináz (ADRBK1) és egy transzporter (SLC18A2), így a jelátviteli útvonal több pontjáról nyertünk információt.

4.2.1 A szelektált katekolamin útvonal markerek protein expressziójának kvantitatív IHC vizsgálata GBM és kontroll mintákban

Az expressziós tanulmányokban a kontrollcsoportot (HC) 6 posztmortem FFPE agyminta alkotta (olyan személyektől, akik nem neurológiai betegségben hunytak el). A kvantitatív IHC elvégzése után a CS (komplex pontszám) értékeket összehasonlítottuk a HC, GBM1 és GBM2 mintacsoportok között.

Az ADRA1D marker medián és IQR [interkvartilis tartomány] CS értékei szignifikánsan alacsonyabbak voltak GBM2-ben (5 [15-5]) ($p=0,005$), és tendenciózusan alacsonyabbak GBM1-ben (15 [25-5]), mint a HC-ban (30). [59-13]). Ezzel szemben az ADRBK1 expressziója mind a GBM1-ben (75 [85-30]) ($p=0,004$), mind a GBM2-ben (40 [75-20]) ($p=0,012$) szignifikánsan magasabb volt a HC-hoz képest (9 [25-4]). Bár a DRD2 esetében nem találtunk szignifikáns különbséget, a GBM1-ben (70 [80-40]) magasabb expressziós tendenciát figyeltünk meg a HC-hoz képest (45 [54-40]). A GBM2 – GBM1 összehasonlításban a kvantitatív IHC vizsgálatok szignifikánsan magasabb expressziós szintet mutattak ki a GBM1-ben az ADRBK1

(75 [85–30] vs. 40 [75–20]) ($p = 0,011$) és DRD2 esetében (70 [80–40] vs. 40 [60–20]) ($p = 0,026$). Az ADRA1D (15 [25–5] vs. 5 [15–5]) és az SLC18A2 (10 [20–5] vs. 5 [10–3]) CS-értékei csak tendenciózusan voltak magasabbak GBM1-ben, mint GBM2-ben.

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

A négy katekolamin marker promóter+gén CpG metilációs szintjeit összehasonlítottuk a GBM1 és GBM2 kohortokban, valamint a CG2 metilációs kontroll csoportban. Nem volt szignifikáns metilációs különbség a CG2 (ADRA1D: 2,56 [3,04–2,08]; SLC18A2: 1,08 [2,30–0,95]) vs. GBM1 (ADRA1D: 0 (1,44–0); SLC18A2: 0 (1,22–0)) illetve CG2 vs. GBM2 (ADRA1D: 0 (1,44–0); SLC18A2: 0,54 (1,08–0)) összehasonlítások esetén az ADRA1D és SLC18A2 promóter+gén metilációjában. Ezzel szemben az ADRBK1 és DRD2 promóter+gén régiói szignifikánsan alacsonyabb metilációs szintet mutattak 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]), amely fordítottan korrelált ezen markerek fehérje expressziós szintjeivel a GBM1 és HC csoportokban. Nem találtunk szignifikáns különbséget a négy marker promóter+gén metilációs szintje között a

GBM1 vs. GBM2 összehasonlításban, ami arra utal, hogy a fehérje expressziós szintjének szignifikáns (ADRBK1, DRD2) és trendszerű (ADRA1D, SLC18A2) csökkenése GBM2 vs. GBM1 összehasonlításban, nem köthető kizárólagosan a CpG metiláció általi epigenomikai szabályozáshoz.

4.3 A szelektált katekolamin útvonal markerek promóter+gén régióinak metilációs szintjei a validációs adatbázis kohortban

A kiválasztott katekolamin markerek saját kohortunkban megfigyelt metilációs eredményeinek megerősítésére meghatároztuk a DNS CpG metilációs szintjeit a négy marker azonos régióiban egy adatbázis-kohortban, amely 112 FFPE GBM mintapárból származó hasonló RRBS adatokat tartalmazott [11; <https://www.ebi.ac.uk/ena>, hozzáférési szám: EGAS00001002538]. A GBM1/GBM2 (112) és CG2 (5) kohortok méretbeli különbségeiből adódó statisztikai torzulás elkerülése végett csak a 112 GBM1 és GBM2 mintapár metilációs eredményeit hasonlítottuk össze. Saját kohortunkhoz hasonlóan, itt sem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a promóter+gén metilációs szintjek között, amikor ennek a validációs kohortnak a GBM1 és GBM2 csoportját hasonlítottuk össze, bár néhány marker metilációjában enyhe trendszerű növekedés volt tapasztalható a recidív mintákban a primerekhez képest (GBM1 és GBM2: 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]).

5. Diszkusszió

Első, szekvenciális FFPE daganatmintákon végzett CpG metilációs vizsgálatunk számos fontos, differenciáltan metilált jelátviteli útvonalat tárt fel, amelyek szerepet játszhatnak a GBM kialakulásában és progressziójában. Alacsonyabb metilációs szintek esetében magasabb génexpressziót és ezáltal aktivitást feltételeztünk.

A GBM1 vs. CG2 és GBM2 vs. CG2 összehasonlítása során a szinapszis szerveződésében, az endothelsejtek proliferációjában, mielinizációban, illetve az intracelluláris biológiai folyamatokban és metabolizmusokban részt vevő útvonalak alacsonyabb metilációját találtuk mind GBM1-ben, mind GBM2-ben. Ezzel szemben a gasztrulációban, a transzkripcióban és az anyagcsere folyamatokban, valamint a neuronális differenciálódásban, illetve a sejtadhézióban és az embrionális fejlődésben részt vevő útvonalak magasabb szintű metilációját detektáltuk GBM1-ben és GBM2-ben, mint CG2-ben. Összességében ezek a megfigyelések a normál sejtbiológia rendezetlen folyamatát tükrözték a gliomagenézis során.

A GBM2 vs.GBM1 összehasonlítása során alacsonyabb metilációt láttunk néhány specifikusabb sejtfunkció útvonalánál GBM1-ben. Például a kanonikus Wnt jelátviteli útvonal szabályozó elemei, ligandumai (például Wnt11) és receptorai (például Wnt11), amelyek részt vesznek az endoteliális sejt vándorlásban és a sejtadhézióban, aktívabbnak bizonyultak GBM1-ben. Ezzel szemben néhány más Wnt ligandum (például Wnt6; Wnt7b) és receptor (például Fzd1; Fzd3) promotere kevésbé volt metilált, így valószínűleg aktívabb GBM2-ben. A GO-elemzések másik figyelemre méltó eredménye a promóterek alacsonyabb metilációja GBM1-ben (feltehetően magasabb aktivitása) a katekolamin szekrécióban és szállításban részt vevő gének esetében. A glióma iniciátor sejtekben a monoamin jelátvitel részt vesz a normál fejlődési mechanizmusok elterelésében, és elősegíti a daganatképződést. A GBM mikrokörnyezetben lévő szinaptikus monoaminok pedig befolyásolják az angiogenezist és a tumor növekedését [10]. Ezen útvonalak alacsonyabb metilációja a GBM1-ben, mint a GBM2-ben, értékes molekuláris mutatója lehet a korai és késői stádiumú daganat jellemzőinek, amelyek további vizsgálatokat érdemelnek. Különböző módszertani megközelítéseket alkalmazva a tumorokkal foglalkozó irodalomban elvértve jelentek meg feljegyzések differenciáltan metilált katekolamin génekkel (pl. ADRA2c; ADRA1a; DRD5) és útvonalakkal (pl. ADRA1b, ADRA2a; DRD1) kapcsolatban [10, 12; 13;

14]. Ugyanakkor szekvenciális FFPE GBM mintákban a katekolamin útvonal változásait és elemzését a mai napig nem írták le. A katekolamin-útvonal elemeivel ellentétben az immunfolyamatokkal kapcsolatos útvonalak, beleértve a leukocita szabályozást, valamint a limfocita és NK-sejtek által közvetített immunitást, alacsonyabb metilációt mutattak GBM2-ben, mint GBM1-ben. Voltak azonban olyan immunregulációs folyamatok, mint a makrofág gyulladáshoz vezető fehérjék termelése és a CD8 + T-sejtek proliferációja, amelyek a génpromoterek alacsonyabb metilációja alapján a GBM1-ben tűntek aktívabbnak. Ezek az adatok összhangban vannak azzal a korrelációval, amelyet a GBM1 daganatokba infiltráló limfociták (TIL) mennyisége (az IHC alapján) és a GBM előfordulása és kiújulása közötti időtartam (T1 – T2) között találtunk.

Második vizsgálatunkban, hogy pontosabb információkat szerezzünk a katekolamin markerekről, és teszteljük a feltételezett fordított összefüggést a CpG metiláció és a fehérje expresszió szintjei között, először kvantitatív IHC-t végeztünk a GBM1 és GBM2 kohortok egyedeinek metszetein, melyek az epigenomikai vizsgálatokkal azonos FFPE blokkokból származtak. A fehérjék expressziós szintje szignifikánsan magasabb volt az ADRBK1 és DRD2 esetében, de csak tendenciózusan volt magasabb az ADRA1D és az SLC18A2 esetében GBM1-ben, mint a GBM2-ben. A HC csoporthoz képest az ADRA1D fehérje expressziós szintje alacsonyabb, az ADRBK1 szintje pedig magasabb volt a daganatokban. A

DRD2 és az SLC18A2 nem mutatott szignifikáns különbséget ezekben a HC vs. GBM1/2 összehasonlításokban.

Ezt követően a 4 katekolamin marker promóter+gén CpG metilációs szintjét egyedi GBM1/GBM2 mintákban is meghatároztuk, és összehasonlítottuk a metilációs kontroll csoport egyedeinek metilációs eredményeivel (CG2). Ezek az értékelések szignifikánsan vagy kissé magasabb metilációs szintet mutattak a 4 marker esetében a CG2-ben, mint a GBM1 és a GBM2. Az ADRBK1 és a DRD2 esetében a CG2 mintákban szignifikánsan magasabb metilációs szintet mutattunk ki mind a GBM1-hez, mind a GBM2-höz képest, ami fordítottan korrelált ezen markerek fehérje expressziós szintjével a HC és GBM1 összehasonlításban. Arra számítottunk, hogy a magasabb fehérje expressziós szintek esetében következetesen alacsonyabb promóter+gén metilációs szinteket találunk, azonban a GBM2 vs. GBM1 összehasonlításban nem találtunk ilyen fordított összefüggést, ahol is a fehérje expresszió eltéréseit nem kísérték inverz metilációs különbségek.

Utolsó lépésként validáltuk saját GBM1/GBM2 promóter+gén metilációs eredményeinket 112 adatbázisban található, FFPE GBM mintapárból származó RRBS adat elemzésével [11]. Összehasonlítva az elsődleges és a recidív GBM-eket, nem találtunk szignifikánsan eltérő metilációs szintet a 4 katekolamin

marker esetében, hasonlóan saját adatainkhoz. Összességében, a 4 katekolamin marker szignifikánsan vagy kissé magasabb fehérjeexpressziója GBM1-ben, melyet nem kísért inverz promóter+gén metilációs különbség a GBM2 vs. GBM1 összehasonlításban, a génexpresszió szabályozás CpG metiláción kívüli mechanizmusaira utalhat a GBM progressziója során. A fehérjeexpresszió és a promóter+gén metiláció közötti inverz korreláció GBM1 vs. CG2 összehasonlításban csak az ADRBK1 és DRD2 esetében, illetve GBM2 vs. CG2 összehasonlításban csak az ADRBK1 esetében volt megfigyelhető, ami tovább erősíti a fehérje expressziót befolyásoló egyéb tényezők szerepét a gliomagenezis során. A metilációban bekövetkező változások nemcsak egy adott gént és promóter régiót érinthetnek, hanem számos más, a génexpresszió szabályozásában szerepet játszó molekuláris elemet is. Ilyen elemek az enhancer/silencer régiók, transzkripciós faktor kötőhelyek, splice helyek vagy mikroRNS-eket és siRNS-eket kódoló régiók [15]. Ezek a mechanizmusok, legalább részben, magyarázatot adhatnak arra, hogy miért nem láttuk minden összehasonlításban a várt fordított korrelációt a marker fehérje expresszió és a promóter+gén metiláció szintje között.

Összefoglalva, vizsgálataink több differenciáltan metilált jelátviteli útvonalat azonosítottak hosszmetzeti GBM-ben, klinikai FFPE minták és egy új könyvtár-előkészítési módszer, az RRBS felhasználásával. Ez az első humán

GBM-vizsgálat, amely mélyrehatóan demonstrálja a neurotranszmitterek, nevezetesen a katekolamin-útvonal elemeinek részvételét a gliomagenezisben. Bár adataink még feltáró jellegűek, az nagyon valószínű, hogy a neurotranszmitterek, receptoraik és mediátoraik fontos moduláló szerepet játszanak a gliomagenezisben. A technikai korlátok ellenére ezek az eredmények összhangban vannak a szakirodalom eddig elérhető szórványos adataival, kiegészítik azokat, és alapot adnak további célzott kutatásokhoz.

6. Új megállapítások

Epigenomikai eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy:

- A szinapszisképződésben, a mielinizációban és az endothelsejtek proliferációjában szerepet játszó biokémiai útvonalak kevésbé metiláltak, és így transzkripciós szempontból valószínűleg aktívabbak az elsődleges GBM-mintákban, mint a normál agyi kontrollokban;
- Az alapvető sejtválaszokért, a jelátvitelért és a kommunikációért, valamint a katekolamin jelátvitelért, szekrécióért és transzportért felelős útvonalak aktívabbak az primer tumorokban a recidívákhoz képest;

- Számos immunregulációs útvonal (leukocita, limfocita és NK-sejtek által közvetített immunitás) alacsonyabb aktivitást mutat primer GBM-ben, mint a visszatérő daganatokban.

Egyedi GBM és kontroll minták promóter+gén metilációs és fehérje expressziós szintjét elemezve megállapíthatjuk, hogy:

- A kiválasztott katekolamin markerek fehérje expressziós szintje szignifikánsan (ADRB1; DRD2) vagy tendenciózusan (ADRA1D; SLC18A2) magasabb a primer tumorokban a recidívákhoz képest;
- A 4 marker promóter+gén CpG metilációs szintje szignifikánsan vagy tendenciózusan magasabb a kontroll mintákban (CG2), mint a primer vagy recidív GBM-ben, de nem tér el a két tumorcsoport között;
- A 4 marker promóter+gén metilációs szintjének hasonlóságát megerősítettük egy adatbázis független GBM1 és GBM2 kohortjában is;
- A promóter+gén régiók metilációs állapotán kívül más faktorok és folyamatok is fontos szerepet játszanak a

katekolamin génexpresszió szabályozásában a GBM progressziója során;

- A vizsgált neurotranszmitterek és receptoraik fontos, eddig feltáratlan moduláló szerepet töltenek be a gliómák molekuláris patogenezisében, és további vizsgálataik újabb lehetséges terápiás célpontokat tárhatnak fel a GBM kezelésére.

7. Referencialista:

1. 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>
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. 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>.

4. 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>
5. 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>.
6. 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>.
7. Nounshmehr 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>

8. 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>
9. 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>
10. 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>
11. Klughammer J, Kiesel B, Roetzer T, Fortelny N, Nemeš 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>
12. 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>
13. 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](https://doi.org/10.1101/gr.164707.113)

14. 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>
15. 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>

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőmnek, aki az elmúlt három év során végtelen türelemmel és támogatással egyengette az utat szakmai vezetőként, és lehetővé tette számomra, hogy idáig eljuthassak.

Köszönettel tartozom a PTE Patológiai Intézet munkatársainak, akik mindig készséggel segítették munkánkat.

Köszönöm a PTE Laboratóriumi Medicina Intézetben és a Szentágotthai János Kutatóközpont Genomikai és Bioinformatikai Intézetében dolgozó munkatársak

munkáját, különös tekintettel Urbán Péterre, akihez kérdéseimmel, problémáimmal bármikor fordulhattam.

Hálás vagyok mindazoknak a tragikus sorsú betegeknek, akiknek a rutin klinikai vizsgálatokból visszamaradt mintáit munkánk során felhasználhattuk.

Végül, de nem utolsósorban hálás vagyok családomnak, barátaimnak és páromnak, hogy kitartást, biztatást és segítséget nyújtottak tanulmányaim és munkám során.