

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Géczi Dóra Anikó

**A miRNS-ek szerepének vizsgálata a glioblastoma
diagnosztikájában és a tumorprogresszió
meghatározásában**

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2025

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A miRNS-ek szerepének vizsgálata a glioblastoma
diagnosztikájában és a tumorprogresszió
meghatározásában**

Gécsi Dóra Anikó

Témavezető: Hádáné Dr. Birkó Zsuzsanna



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2025

Tartalomjegyzék

1. Fontosabb rövidítések	- 5 -
2. Bevezetés	- 7 -
3. Epidemiológia	- 8 -
4. Glioblastoma szakirodalmának áttekintése	- 10 -
4.1. A glioblastoma WHO szerinti besorolása	- 10 -
4.2. A glioblastoma kialakulása és tünetei	- 11 -
4.3. A glioblastoma diagnosztizálása	- 13 -
4.4. A glioblastoma kombinált onkoterápiája	- 17 -
4.5. Temozolomide rezisztencia.....	- 20 -
5. MikroRNS-ek (miRNS-ek)	- 24 -
5.1. A miRNS-ek biogenezise.....	- 24 -
5.2. A miRNS-ek szerepe az epigenetikai szabályozásban.....	- 27 -
5.2.1. MiRNS-ek szerepe a poszttranszkripció szabályozásban	- 28 -
5.3. MiRNS-ek alkalmazási lehetőségei a tumordiagnosztikában	- 30 -
6. Biopsziák	- 32 -
6.1. Szövetbiopszia	- 32 -
6.2. Folyadékbiopszia	- 33 -
7. Célkitűzések	- 35 -
8. Betegek és módszerek	- 36 -
8.1. Felhasznált agyszövetminták	- 36 -
8.1.1. Totál RNS izolálás agyszövetmintából	- 37 -
8.1.2. Új generációs RNS (miRNS és mRNS) szekvenálás	- 40 -
8.1.3. Az új generációs szekvenálással nyert adatok bioinformatikai analízise.....	- 43 -
8.1.4. In silico miRNS célgén-predikció, fehérje-fehérje kölcsönhatáson alapuló hálózatok építése, gén ontológiai, funkcionális annotációs és útvonal analízis.....	- 43 -
8.1.5. A miRNS szekvenálás eredményeinek validálása RT-qPCR módszerrel.....	- 44 -
8.1.6. Az mRNS szekvenálás eredményeinek validálása RT-qPCR módszerrel.....	- 48 -
8.1.7. Statisztikai analízis.....	- 51 -
8.2. Felhasznált vérplazmaminták.....	- 52 -
8.2.1. Totál RNS izolálás vérplazmából.....	- 53 -
8.2.2. Eltérő mértékben expresszáldott miRNS-ek azonosítása NanoString analízissel.....	- 56 -
8.2.3. Az eltérő mértékben expresszáldott miRNS-célpontok in silico predikciója.....	- 58 -
8.2.4. A NanoString analízissel kapott eredmények validálása RT-qPCR módszerrel	- 58 -
8.2.5. Statisztikai analízis.....	- 60 -
9. Eredmények	- 61 -

9.1. Eltérő mértékű expressziót mutató miRNS-ek azonosítása a glioblastomás és a kontrollcsoport szövetmintáiból	- 61 -
9.1.1. Új generációs szekvenálás	- 61 -
9.1.2. Hierarchikus klaszterezés és főkomponens elemzés	- 61 -
9.1.3. Eltérő mértékben expresszáldott miRNS gének azonosítása	- 63 -
9.1.4. A miRNS-ek rangsorolása hálózat-alapú elemzéssel	- 65 -
9.1.5. A miRNS célpontok gén ontológiai és útvonalelemzése	- 66 -
9.1.6. A szövetmintákban eltérő mértékben expresszáldott miRNS-ek validálása RT-qPCR módszerrel	- 70 -
9.2. Eltérő mértékű expressziót mutató mRNS-ek azonosítása a glioblastomás betegek és a kontrollcsoport szövetmintáiban	- 74 -
9.2.1. Új generációs szekvenálás	- 74 -
9.2.2. Hierarchikus klaszterezés és főkomponens elemzés	- 74 -
9.2.3. Eltérő mértékben expresszáldott mRNS gének azonosítása	- 76 -
9.2.4. A deregulált mRNS-ek fehérje-fehérje interakciós (PPI) hálózatának elemzése	- 77 -
9.2.5. Az mRNS molekulák gén ontológiai (GO) és útvonal-dúsulási elemzése.....	- 79 -
9.2.6. A szövetmintákban eltérő mértékű expressziót mutató mRNS-ek validálása RT-qPCR módszerrel	- 83 -
9.2.7. Az új generációs szekvenálással (NGS) meghatározott miRNS és mRNS expresszió közötti korreláció megállapítása.....	- 85 -
9.3. Eltérő mértékben expresszáldott miRNS-ek azonosítása GBM-es betegek és egészséges kontroll egyének plazmamintáiból NanoString nCounter Analízis alapján	- 87 -
9.3.1. Az eltérő mértékben expresszáldott miRNS-ek plazmamintákból történő azonosítása RT-qPCR módszerrel.....	- 90 -
9.3.2. A miRNS-ek rangsorolása hálózat-alapú elemzéssel, targetgén predikció	- 92 -
9.3.3. A miRNS-targetek gén ontológiai és útvonal-dúsulási elemzése.....	- 93 -
9.3.4. A miRNS-targetek fehérje-fehérje interakciós (PPI) hálózatának elemzése.....	- 96 -
10. Diszkusszió	- 103 -
10.1. Eltérő mértékű expressziót mutató miRNS-ek és mRNS-ek azonosítása glioblastomában szenvedő betegek szövetmintáiban gén ontológiai és útvonal dúsulási elemzéssel kombinálva -	104 -
10.2. Az eltérő mértékű expressziót mutató miRNS-ek validálása RT-qPCR módszerrel szövetmintákban.....	- 105 -
10.3. Az eltérő mértékű expressziót mutató mRNS-ek validálása RT-qPCR módszerrel szövetmintákban.....	- 107 -
10.4. A miRNS és mRNS expresszió közötti korreláció meghatározása új generációs szekvenálás (NGS) eredményei alapján	- 109 -
10.5. Eltérő mértékben expresszáldott miRNS-ek azonosítása glioblastomás betegek és egészséges kontroll egyének plazmamintáiban	- 110 -
10.5.1. NanoString analízis és az eltérő mértékben expresszáldott miRNS-ek azonosítása -	110 -

10.5.2.	Az eltérő mértékben expresszáldott miRNS-ek validálása RT-qPCR módszerrel...	- 111 -
10.5.3.	A miRNS-ek rangsorolása, target gén predikció.....	- 112 -
10.5.4.	A miRNS célpontok gén ontológiai (GO) és útvonal dúsulási elemzése.....	- 113 -
10.5.5.	A miRNS targetek fehérje-fehérje interakciós (PPI) analízise	- 113 -
11.	Összefoglalás	- 115 -
12.	Summary	- 116 -
13.	Értekezés új megállapításai	- 117 -
14.	Irodalomjegyzék	- 118 -
15.	Tárgyszavak	- 147 -
16.	Keywords	- 148 -
17.	Köszönetnyilvánítás	- 149 -

1. Fontosabb rövidítések

AUC	görbe alatti terület (Area Under the ROC curve)
cDNS	komplementer DNS (complementary DNA)
CSF	cerebrospinális folyadék (cerebrospinal fluid)
CNS	központi idegrendszer (Central Nervous System)
CT	komputertomográfia (Computed Tomography)
dNTP	dezoxiribonukleotid-trifoszfát (deoxynucleotide triphosphate)
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor (Epidermal Growth Factor Receptor)
FDA	Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (Food and Drug Administration)
FDR	Hamis felfedezési arány (False Discovery Rate)
FLAIR	folyadék-attenuált inverzió recovery MRI technika (Fluid-Attenuated Inversion Recovery)
GBM	glioblastoma
GO_BP	biológiai folyamat alapú gén ontológia (Gene Ontology Biological Processes)
GO_MF	molekuláris funkció alapú gén ontológia (Gene Ontology Molecular Function)
IDH	izocitrát dehidrogenáz enzim (Isocitrate Dehydrogenase)
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
MGMT	O ⁶ -metilguanin-DNS-metiltranszferáz (O ⁶ -Methylguanine-DNA-Methyltransferase)
miRNS	mikroRNS (microRNA)
MRI	mágneses rezonancia képalkotás (Magnetic Resonance Imaging)
mRNS	hírvivő RNS (messenger RNS)
ncRNS	nem-kódoló RNS (Non-coding RNA)
NSAIDs	nem szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek (Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs)
PCA	főkomponens analízis (Principal Component Analysis)
PGE2	prostaglandin E2 (prostaglandin E2)
PPI	fehérje-fehérje kölcsönhatás (Protein-Protein Interaction)
pri-miRNS	primer-miRNS (primary miRNA)
pre-miRNS	prekurzor-miRNS (precursor miRNA)

PTEN	foszfataáz és tenzin homológ (Phosphatase and Tensin Homolog)
RISC	RNS-indukálta csendesítő komplex (RNA-induced silencing complex)
ROC	Receiver Operating Characteristic curve
RT-qPCR	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction)
TCGA	The Cancer Genome Atlas Program
TMZ	Temozolomid (Temozolomide)
TP53	Tumor Protein P53
UTR	nem-transzlálódó régió (Untranslated Region)
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (Vascular Endothelial Growth Factor)
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)

2. Bevezetés

A központi idegrendszert (CNS) érintő rosszindulatú daganatos elváltozásokról általánosan elmondható, hogy kezelésük igen nehezen megvalósítható, melyből fakadóan az esetek túlnyomó többségében kedvezőtlen általános túléléssel társulnak. A CNS daganatok igen jól ismert képviselője az astrocyta eredetű glioblastoma multiforme (GBM), melyet 1863-ban Rudolf Virchow német patológus azonosított a glióma egyik formájaként [Boccellato et al., 2022]. A GBM az egyik legagresszívabb rosszindulatú neoplasztikus elváltozás, egyben az agy és a központi idegrendszer leggyakoribb malignus primer daganata, amely az összes központi idegrendszert érintő tumor 14,5%-át, valamint a rosszindulatú CNS daganatok 48,6%-át teszi ki [Grochans et al., 2022]. Az elmúlt néhány évtizedben az idegsebészeti technikák javulása, a hatékony kemoterápiás szerek kifejlesztése, a sugárterápia fejlődése, valamint az átfogó genomi profilalkotás és molekuláris jellemzés ellenére a GBM-ben szenvedő betegek átlagos túlélési ideje továbbra is rendkívül csekély maradt, mindössze 9-16 hónap. Továbbá az 1 éves túlélési arány 37,2%-ra, míg az 5 éves 5,1%-ra tehető, mely alapján a GBM az egyik legmagasabb mortalitású daganatos megbetegedésnek tekinthető [Yao et al., 2018; Taylor et al., 2019; Wang et al., 2021].

Ezen ismeretek alapján elmondható, hogy elengedhetetlen a betegség patofiziológiájának még mélyebb megértése, illetve olyan új molekuláris markerek azonosítása, melyek segítségével egyrészt szélesebb körű tudományos ismeretekre tehetünk szert, másrészt lépéseket tehetünk a betegség prognosztikáját és diagnosztikáját illetően, valamint közelebb kerülhetünk egy hatékonyabb kezelési stratégia kidolgozásához.

Ilyen potenciális marker molekulák lehetnek a mikroRNS-ek (miRNS), melyek az utóbbi évek molekuláris biológiai kutatásai során egyre inkább az érdeklődés középpontjába kerültek. A miRNS-ekről rendelkezésre álló eddigi tudásunk szerint elmondható, hogy ezek a rövid, 20-25 nukleotidból álló, fehérjét nem kódoló molekulák meghatározó szerepet játszanak a génexpresszió posztranszkripcionális szintű finomhangolásában, valamint a fehérjét kódoló gének közel 90%-a áll regulációs hatásuk alatt [Jámbor et al., 2019]. Ezenfelül ismert, hogy ezek a makromolekulák onkogén és tumorszupresszor funkcióval is rendelkeznek, valamint alapvető sejtélettani folyamatok (például sejtproliferáció, szignál transzdukció, apoptózis) nélkülözhetetlen résztvevői. Normál egyensúlyuk felborulása, valamint expressziós szintjük változása kétségtelenül döntő szerepet játszik számos betegség, például különböző daganatok kialakulásában. Így elmondható, hogy a miRNS expressziós mintázat jellemzése GBM-ben potenciális diagnosztikai és/vagy prognosztikai eszközként alkalmazható, továbbá az

azonosított miRNS-ek és azok igazolt célpontjai a jövőben hasznosak lehetnek a megfelelő terápia megválasztását illetően.

3. Epidemiológia

Általánosságban elmondható, hogy a CNS daganatok magasabb előfordulási gyakorisága figyelhető meg a nyugati és fejlett országokban, a keleti és kevésbé fejlett országokkal szemben. Ezen daganatok közül a GBM előfordulása jelentős eltérést mutat az életkor, a nem és az etnikai hovatartozás tekintetében [Shieh et al., 2021]. A betegség éves előfordulási gyakorisága hozzávetőleg 35/1 millió egyén, kialakulása az életkor előrehaladtával növekedést mutat és 65-75 év között a legmagasabb, a férfiak és a nők aránya pedig 1,6:1. [Slika et al., 2023; Colopi et al., 2023]. Az etnikai hovatartozás szerepét vizsgálva az eddigi tanulmányok arra jutottak, hogy a betegség előfordulása magasabb a kaukázusi népcsoportokban, míg alacsonyabb a fekete bőrű nők körében [Wu et al., 2021; John et al., 2024]. A női nem alacsonyabb érintettsége esetében a szakirodalmi adatok alapján elmondható, hogy a nemi hormonok protektív hatással bírnak a GBM kialakulásának tekintetében [Grochans et al., 2022]. Ugyanis a női nemi hormonok és a gliómák előfordulási gyakoriságának vizsgálata során leírásra került, hogy e daganatok kialakulásának fokozott kockázata volt észlelhető a menopauza időszakában lévő nők körében, illetve azok esetében, akiknél késői első menstruáció jelentkezett. Míg csökkent kockázatot figyeltek meg az orális hormonális fogamzásgátló és hormonpótló terápiát használók körében [Cowppli-Bony et al., 2011]. A nemi hormonok mellett a GBM-hoz köthető egyéb protektív faktorok is azonosításra kerültek már. Ilyen például a nem szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek (nonsteroidal anti-inflammatory drugs - NSAIDs) potenciális védőhatása agydaganatokban, mely vélhetően a prosztaglandin E2 (PGE2) szintézisére gyakorolt gátló hatásuknak köszönhető. Ugyanis a PG, mint hormonhatással rendelkező molekula a közvetlen mutagén hatások mellett szerepet játszhat a tumornövekedés, az invázió, a metasztázis képzés, az immunszuppresszió és az angiogenezis folyamataiban. Ezt a feltételezést alátámasztja és a PGE2 potenciális szerepét bizonyítja az a megfigyelés, mely szerint a rosszindulatú agydaganatokkal összefüggő emelkedett PGE2-szint a malignus agydaganat műtéti eltávolítását követően csökkenő tendenciát mutat [Loh et al., 2002; Grochans et al., 2022]. A NSAIDs csoportjába tartozó másik, igen gyakran alkalmazott medikáció, az aszpirin és metabolitjainak GBM sejtekre gyakorolt hatása szintén leírásra került már. Altinoz és kutatócsoportja megfigyelte, hogy az acetilszalicilsav metabolitja, a gentizinsav blokkolja a

fibroblaszt növekedési faktor kötődését a receptorához, míg a szulfonát metabolit, a dobezilsav pedig a C6 GBM sejtvonal sejtjeinek növekedését gátolja in vivo [Altinoz et al., 2018]. Emellett Scheurer és munkatársai, összevetve a GBM kialakulásának kockázatát a NSAIDs alkalmazásával, 20%-os kockázat csökkenést írtak le. A kialakult gliómában szenvedő páciensek kevésbé számoltak be rendszeres aszpirin használatáról a múltban [Scheurer et al., 2011]. Az NSAIDs GBM fejlődésre gyakorolt védőhatásának molekuláris okait tekintve a publikációk eredményei azonban eltéréseket mutatnak, melynek oka vélhetően a potenciális zavaró változók, valamint a rendelkezésre álló, sokszor alacsony GBM esetszám lehet. Ezenkívül szintén eltéréseket eredményezhet a GBM nagymértékű heterogenitása és komplexitása - amelyet a Cancer Genome Atlas (TCGA) rögzít - mely befolyásolhatja a különböző tumoraltípusok NSAIDs-re adott eltérő válaszait. Mindemellett egyre több epidemiológiai adat bizonyítja, hogy az atópiás betegségek, úgymint az allergia, asztma, ekcéma csökkentik a glióma kialakulásának kockázatát [Ilyasova et al., 2009; Cahoon et al., 2014; Lin et al., 2021]. Ennek bizonyítására több kutatás is történt, melyek kimutatták, hogy amennyiben a páciens atópiás állapotban van, a glióma kockázata 30-40%-kal csökken [Schlehofer et al., 1999; Linos et al., 2007; Lin et al., 2021]. Megfigyelték továbbá azt is, hogy az allergia típusainak és a tünetek intervallumának növekedésével a glióma kockázata még tovább redukálódik [McCarthy et al., 2011]. Ennek hátterében vélhetően az atópiás állapotokban megfigyelhető fokozott immunállapot állhat, mely az immunmonitoring serkentésével megszünteti a rákmegelőző sejteket [Lin et al., 2021].

A védőfaktorok mellett különböző rizikótényezők is leírásra kerültek már, melyek feltételezhetően hozzájárulhatnak a GBM kialakulásának fokozott kockázatához. Ilyen, mondhatni első helyen említhető kockázati tényező az ionizáló sugárzás, mely egyike azon kevés és ismert kockázati tényezőknél, amelyekről igazolták, hogy kétségtelenül fokozzák a glióma kialakulásának kockázatát. Továbbá az is megfigyelésre került már, hogy az ionizáló sugárzás következtében kifejlődött GBM többnyire évekkel egy másik daganatos kórkép vagy állapot terápiája részeként alkalmazott sugárkezelést követően jelenik meg [Davis, 2016]. További, ugyancsak előkelő helyen szereplő rizikófaktor a dohányzás, ugyanis a cigarettafüstben megtalálható dohányspecifikus nitrozaminok és policiklikus aromás szénhidrogének képesek áthatolni a vér-agy gáton (BBB; blood-brain barrier), ami elősegítheti a CNS daganatok kialakulását. Erről azonban igen változatos eredmények állnak rendelkezésre, így alátámasztásuk vagy elvetésük további vizsgálatokat igényel. A dohányzás mellett a második leggyakoribb káros szenvedélynek tekinthető az alkoholfogyasztás, mely szintén a BBB-n történő átjutásán keresztül képes hatást gyakorolni a gliasejtekre. Továbbá az alkohol

lebontása során keletkező acetaldehid és reaktív oxigénfajták toxikus hatással bírhatnak a sejtekre, ezzel elősegítve azok malignus elfajulását dózis-válasz összefüggés alapján [Baglietto et al., 2011; Grochans et al., 2022]. Ennek ellenére Qi és munkatársai metaanalízisük eredményeként nem találtak alapvető összefüggést az alkoholfogyasztás és a glióma kialakulásának kockázata között [Qi et al., 2014]. Ezen megállapítást nemrégiben Cote és munkatársai is megerősítették, akik a glióma csökkent kockázatáról számoltak be alacsony vagy mérsékelt alkoholfogyasztás esetén [Cote et al., 2021]. Ezek mellett ugyancsak jelentős problémát jelent az elhízás, mely akárcsak a GBM, a fejlett országokban fordul elő nagyobb számban. A fokozott tápanyagbevitel nem csak a zsírszövet növekedésével jár. A zsírszövet tároló funkciója mellett képes olyan anyagokat, hormonokat kiválasztani, mint például az ösztrogének és különböző gyulladáskeltő anyagok, melyek a GBM mellett egyéb daganatok kialakulásának is kedvezhetnek [Nelson et al., 2001; Little et al., 2013].

4. Glioblastoma szakirodalmának áttekintése

4.1. A glioblastoma WHO szerinti besorolása

A kezdeti klasszifikációs irányelvekre visszatekintve láthatjuk, hogy az agydaganatokat elsősorban morfológiai tulajdonságaik alapján osztályozták. Az idő előrehaladtával azonban folyamatosan finomításra került ez a besorolási módszer, mely a molekuláris osztályozáson alapuló klasszifikációig vezetett el.

A CNS-ben előforduló daganatokat az Egészségügyi Világszervezet (WHO) malignitásuk, valamint mitotikus aktivitásuk alapján különböző fokozatokba, úgynevezett grádusokba sorolja [Louis et al., 2016; Oronsky et al., 2021]. A klasszifikáción belül négy grádust különböztethetünk meg, melyek közül az I. és a II. az alacsony proliferációs potenciállal rendelkező gliómákat, míg a III. és a IV. a magas proliferációs rátával, valamint agresszív fenotípussal jellemezhető gliómákat foglalja magába. Az I.-II. csoport képviseli az úgynevezett alacsony malignitási fokozatú, míg a III.-IV. a magas malignitási fokozatú gliómák csoportját. Ezek alapján a GBM, mint a legagresszívabb és leginvazívabb differenciálatlan daganattípus a IV. grádusba sorolható [Oronsky et al., 2021]. Megjegyzendő, hogy ezt a nomenklatúrát a WHO CNS daganatok osztályozásának negyedik kiadásában (WHO CNS4) felülvizsgálták, és a „multiforme” kifejezést eltörölték, tehát már csak glioblastomaként említik, melynek rövidítése, a „GBM” széles körben használatos [Louis et al., 2016; Boccellato et al., 2022]. Ez az osztályozás legutóbb 2021-ben került revízióra (WHO CNS5). Az új változatban a diffúz

gliómákat elsősorban felnőtt- és gyermek-típusra bontják, melyek közül a „gyermek-típus” főként a fiatal felnőttek körében jelentkezik, míg a „felnőtt-típus” megjelenése ritkán fordul elő a gyermekek körében. A revízió során az új kiadást a szövettani jellemzők mellett specifikus molekuláris markerekkel is kiegészítették, az optimális kezelési eljárás és a prognosztikai előrejelzés mellett a diagnosztikai kategóriák és a grádusba sorolás könnyebb meghatározása érdekében [Louis et al., 2021; Boccellato et al., 2022; Guo et al., 2023]. A WHO 2021-es CNS5 daganatok besorolásának frissített változata szerint a jelenleg érvényben lévő klasszifikáció nagymértékben függ az izocitrát dehidrogenáz 1/2 (IDH 1/2) mutációtól, valamint ezzel együtt az 1p/19q kodeléciós státuszától. E két paraméter segítségével 3 betegcsoportot tudunk elkülöníteni. Ezek az 1.) IDH mutáns, 1p/19q kodeléciós oligodendroglióma 2.) az IDH mutáns, nem kodeléciós asztrocitóma és 3.) az IDH vad típusú GBM [Whitfield et al., 2022]. A GBM-ek altípusait tekintve elmondható, hogy a korábbi osztályozás során 4 altípust különítettek el transzkripciós sajátágaik szerint [Verhaak et al., 2010]. Ezek a klasszikus, neurális, proneurális és mesenchymális altípusok. Azonban a közelmúltban a gliómák átfogó transzkriptomikai elemzése módosított az altípusok fent említett elkülönítésén. Ugyanis Wang és munkatársai az analízis során a korábbi elveken változtatva, a daganathoz köthető, nem malignus sejtek transzkriptomjának elemzését kivonták a vizsgálatból. Ezzel kizárva a neurális altípust, mely vélhetően a normál idegszövet fokozott kontaminációja miatt került korábban azonosításra. Így az elemzés eredményeként a klasszikus, proneurális és mesenchymális altípusokban figyeltek meg számottevő dúsulást, mely alátámasztja a GBM-altípusok plaszticitásának létét [Sidaway 2017; Wang et al., 2018; Oronsky et al., 2021].

4.2. A glioblastoma kialakulása és tünetei

A CNS-ben kialakuló primer agydaganatok súlyosságukat tekintve, a nagyon ritkán kialakuló, műtétilag gyógyítható, nem invazív pilocytás asztrocitómáktól, az igen súlyos, agresszív, gyakorlatilag gyógyíthatatlannak minősíthető GBM-ig terjednek [Teraiya et al., 2023]. Az egyes CNS daganatok elnevezése a kiindulási sejtre, illetve szövetre enged következtetni, melyek a gliómák esetében az agyállomány támasztószövetét alkotó támasztósejtek, másnéven gliasejtek (astrocyta, mikroglia, oligodendroglia, radiális glia, ependyma), valamint azok különféle formái.

Kialakulási helyét tekintve a GBM legnagyobb gyakorisággal a hemiszfériumokban, azon belül is a supratentoriális régiót alkotó homlok-, nyakszirti-, fali- és halántéklebenyben

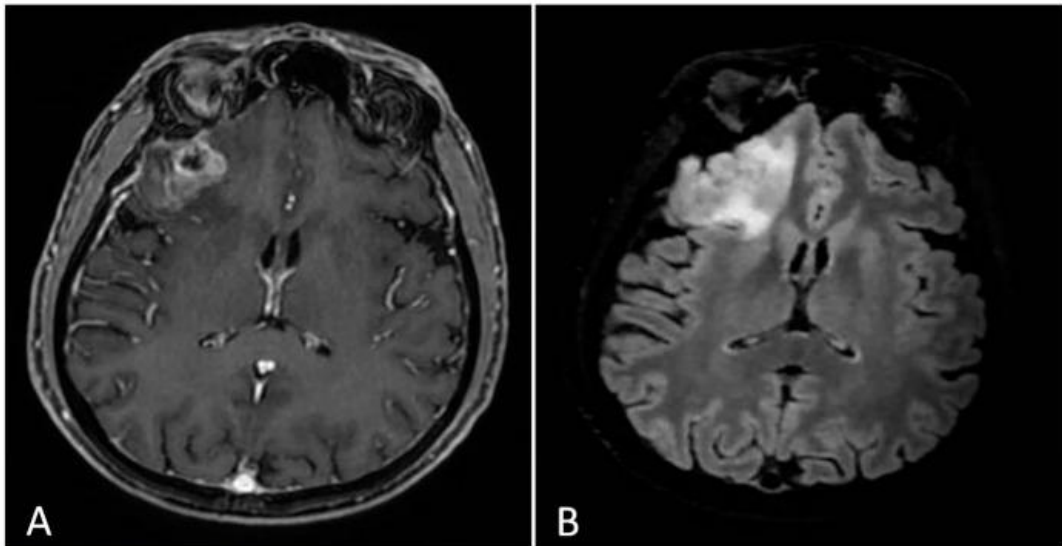
figyelhető meg, elvértve pedig a kisagyban, az agytörzsben és a gerincvelőben is előfordulhat [Urbańska et al., 2014; Tamimi et al., 2017; Oronsky et al., 2021; Boccellato et al., 2022]. A GBM kialakulhat de novo (primer GBM), valamint alacsonyabb grádusú diffúz astrocytómák, illetve anaplasztikus astrocytómák malignus transzformációja (szekunder GBM) révén [Oronsky et al., 2021]. Az esetek túlnyomó többségét (~90%) a de novo forma teszi ki, mely főként az idős betegekben fordul elő és igen gyors kialakulás jellemzi. Ez a forma jellemzően a gliális őssejtek prekursor sejtjeiből fejlődik ki, különböző mutációk hatására. Ezzel szemben a szekunder változatok a fiatalabb egyéneknél manifesztálódnak, elsősorban a homlokleányban lokalizálódnak és jelentősen jobb prognózissal társulnak. E típus az érett gliális sejtek (GBM esetében astrocytákból) mutációinak következtében fejlődik ki [Ohgaki et al., 2013; Kanderi et al., 2024]. Napjainkra nagy előrelépések történtek a gliómagenézis mélyebb megértése terén. A legfrissebb tanulmányok arra a feltevésre világítanak rá, hogy a GBM gliális őssejtekből és gliális prekursorsejtekből (úgy mint oligodendrocita vagy astrocyta) ered, valamint a sejtvonal a fő meghatározója a GBM molekuláris altípusának. Az előző alfejezetben említett klasszikus, proneurális és mesenchymális altípusok közül a mesenchymális típus sejtjes eredete továbbra sem egyértelmű. Azonban Ah-Pine és munkatársai tanulmánya felveti a fibroblaszt-szerű mesenchymális sztróma sejtek potenciális szerepét a GBM létrejöttében, különös tekintettel a mesenchymális altípusra [Ah-Pine et al., 2023]. Szöveti szempontból nézve az elsődleges és másodlagos GBM-ek gyakorlatilag megkülönböztethetetlenek, azonban genetikai és epigenetikai profiljukban mutatnak olyan különbségeket, melyek megkönnyítik az elkülönítésüket. Ilyen döntő, az elsődleges GBM-ekre jellemző genetikai markerek az IDH mutáció hiánya, valamint az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) amplifikáció és a foszfatáz és tenzin homológ (PTEN) mutáció, míg a másodlagos GBM-ek esetében megfigyelhető az EGFR amplifikáció hiánya, valamint a tumor protein P53- (TP53) és IDH1 mutáció, amely hipermetilációs fenotípushoz társul [Kleihues et al., 1999; Olar & Aldape, 2014; D'Alessio et al., 2019].

Az újonnan diagnosztizált GBM igen változatos klinikai megjelenéssel társulhat, amit nagymértékben befolyásol a daganat nagysága és elhelyezkedése. A GBM ilyen figyelemfelkeltő, nem-specifikus tünetei közé sorolhatóak a görcsrohamok, a kognitív diszfunkció, valamint a koponyaűri nyomásfokozódásból adódó panaszok, úgy mint a fejfájás, szédülés, hányinger, hányás, letargia vagy épp a memóriazavar. Ezek mellett súlyosabb és specifikusabb tünetek is felhívhatják a figyelmet a betegség jelenlétére, mint például a

személyiségváltozás vagy a fokális neurológiai eltérések (például afázia vagy látótér kiesés) [Young et al., 2015].

4.3. A glioblastoma diagnosztizálása

Napjainkban az elsődleges agydaganatok diagnosztizálása és kezelése egyaránt komplex stratégiák alkalmazásával valósul meg. A standard diagnosztikai eljárások közé tartozik az idegrendszeri képalkotó vizsgálat, valamint a hisztopatológiai és molekuláris osztályozás [Bjorland et al., 2021]. A fent említett eljárások közül először a képalkotó eljárásokra térnek ki, majd a molekuláris osztályozás során alkalmazott markereket tárgyalom részletesebben. Az alkalmazott radiológiai vizsgálmódszerek közül a komputertomográfia (CT) és a mágneses rezonancia képalkotás (MRI) központi szerepet játszik a GBM diagnosztizálásában, jellemzésében és terápiás monitorozásában. Emellett mindkét eljárás rendkívül hasznos a daganat osztályozásában, valamint a grádusbesorolásban egyaránt [Abd-Elghany AA et al., 2019]. E két módszer közül a MRI eljárás széleskörben alkalmazott a betegek diagnosztizálása során és kezelésüket követően [Shukla et al., 2017]. Nagy felbontású, többsíkú szerkezeti információt és lényegesen jobb szöveti karakterizálást biztosít a CT-vizsgálathoz képest [Abd-Elghany AA et al., 2019]. Ez a módszer továbbá a GBM és egyéb koponyaűri elváltozások megkülönböztetésére is alkalmas [Bjorland et al., 2021]. A GBM az MR felvételen legtöbbször jellegzetes képet mutat. Infiltratív, heterogén intraparenchymális léziókból áll, amelyek a fehérállományból indulnak ki és azon belül terjednek. Ezen felül gyakori a corpus callosum érintettsége is. A GBM a felvételen rosszul körülhatárolt, nem rendelkezik éles határral és a széli részén kontrasztfokozódást mutat, mely vélhetően a BBB károsodását jelzi. T1 súlyozott képeken a lézió központi része a nekrosis következtében hypointenz (**1. (A) ábra**), mely elváltozást agyödéma vesz körül, amely a T2 súlyozott és „Fluid-Attenuated Inversion Recovery” (FLAIR) képeken hiperintenzitást mutat (**1. (B) ábra**) [Rockne et al., 2019]. Az újabb multimodális MRI technikák, úgymint a diffúziós, illetve perfúziós szekvenciák értékes kiegészítő információkat nyújtanak magának a lézióknak a jellemzőiről, így pontosabb diagnózist tesznek lehetővé. Az így nyert adatok hasznosak az invázió peritumorális fokának felmérésére, továbbá iránymutatásként szolgálnak a biopszia kivitelezéséhez, valamint a betegség terápiát követő kiújulásának nyomon követéséhez [Gilard et al., 2021].



1. ábra: Az ábra „A” szegmensén egy T1 súlyozott felvétel látható a GBM-ről, ahol megfigyelhető a daganat központi részének nekrozisa. A „B” képkockán egy FLAIR szekvencia látható, melyen a GBM hiperintenzitást mutat [Broggi et al., 2023].

A képalkotó eljárásokon túl a betegség precíz és pontos meghatározásához különböző genetikai és molekuláris markermolekulákat is szükséges identifikálni. Ezen molekulák segítségével a diagnózison túl megjósolható többek között a betegség progressziója, valamint az egyes betegek terápiára adott válasza is [Louis et al., 2021]. Jelenleg a kórszövettan képezi a daganatdiagnosztika elsőrendű ágát, mely nagymértékben hozzájárul a megbízható diagnózis felállításához. A kutatásunk során felhasznált intraoperatív gyorsfagyasztott szövetminták molekuláris osztályozása a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Pathológia Intézetében történt. A kórszövetteni vizsgálathoz a beérkezett szövetminták formalinban fixált paraffinba ágyazott (FFPE) mintákká történő alakítását a mikrotommal készített metszetek vizsgálata követi mikroszkóp segítségével, majd a szövettani vizsgálatot kiegészítve immunhisztokémiai eljárással. Ez utóbbi módszer a daganatos sejtek molekuláris összetételéről szolgáltat információt specifikus antigén-antitest kölcsönhatás révén [Magaki et al., 2019]. E folyamat során anti-IDH, anti-ATRX, anti-EGFR, anti-p53, valamint anti-Ki67 antitestek segítségével történik a GBM diagnózisának megerősítése. A WHO a CNS daganatok osztályozásának 2016-os revíziója óta az immunhisztokémiai eljárással igazolt komponenseket tekinti a diagnózis elementáris faktoraként, melyek ma már szignifikáns prognosztikai információt szolgáltathatnak [Louis et al., 2021; Priambada et al., 2023]. A fentebb felsorolt markerek közül a diffúz gliómák besorolását illetően az egyik legesszenciálisabb paraméter az **IDH** státusz

meghatározása. Az emberi szervezetben az IDH enzimek 3 izoformája különíthető el, melyek közül az IDH1 a citoplazmában és a peroxiszómában, míg az IDH2 és IDH3 a mitokondriális mátrixban lokalizálódik. Az alacsony grádusú gliómák és a másodlagos GBM-ek esetében az IDH 1/2 enzimet érintő mutáció az egyik legjellegzetesebb és legkorábbi tumorgenezist indukáló genetikai történésnek tekinthető [Kayabolen et al., 2021]. Ez az enzim fiziológiai körülmények között a Krebs-ciklus egyik résztvevőjeként az izocitrát α -ketoglutaráttá történő irreverzibilis átalakításáért felel, CO_2 és NAD(P)H keletkezése mellett. Amennyiben az enzim mutációt szenved, nem a tipikus metabolikus mutációkra jellemző funkcióvesztés figyelhető meg, hanem ezzel ellentétben új enzimatis funkcióra tesz szert [Garrett et al., 2018]. Leggyakrabban az $\text{IDH1}^{\text{R132H}}$ kodont érintő missense mutációt láthatjuk, melynek következményeként az eredeti termék helyett 2-D-hidroxi-glutarát elnevezésű onkometabolit keletkezik, mely az egészségesen működő sejtekben nem található meg, viszont a mutációt hordozó daganatos sejtekben nagymértékű felhalmozódást mutat. Ezen metabolit hatására a DNS és a hisztonok hipermetilációját és aberráns génextpressziót figyelhetünk meg, amit a daganatképződés irányító mechanizmusának vélnek [Cohen et al., 2013; Alzial et al., 2022; Solomou et al., 2023]. A gliómák molekuláris osztályozásának másik, legkritikusabb markere az **alfa thalassémia/mentális retardáció, X kromoszómához kötött (ATRX)** státusz, tekintve, hogy a leggyakoribb mutációt elszenvedő génként ismert a humán daganatos megbetegedésekben, különös tekintettel a gliómákra [Nandakumar et al., 2017; Aguilera et al., 2023]. Az ATRX nagyszámú, meghatározó biológiai útvonalban vesz részt. Terméke az SWI/SNF családba tartozó kromatin remodelláló fehérje, mely a telomer régióban fejti ki hatását a DAXX chaperon fehérjével heterodimert alkotva. Ez a kölcsönhatás játszik szerepet a H3.3 hisztonvariáns beépülésében a pericentromerikus kromatin, a telomerek és egyéb transzkripcionálisan nem aktív, ismétlődő genomi régiókba [Valenzuela et al., 2021]. Következésképpen megállapítható, hogy az ATRX gén funkcióvesztő mutációja és/vagy az ATRX kofaktorának a DAXX-nak a „hiánya” limitálja a H3.3 hiszton beépülését a telomer genomi régiójába, melynek hiányában a DNS károsodásán, valamint a tartós telomerkohézió keresztül általános genomiális instabilitást eredményez. E jelenség vélhetően az ATRX mutációt hordozó daganatos betegségek hajtóereje [Dyer et al., 2017]. Az egészséges sejtek irányított, pontosan meghatározott útvonalak által vezényelt növekedésével szemben a daganatos sejtek esetében a növekedésszabályozás működési zavara figyelhető meg, melynek következtében konstitutív módon, több útvonalon keresztül aktiválódik növekedésük. Ezen folyamat egyik legjelentősebb képviselője az **EGF receptor (EGFR)**, mely szervrendszerünk zömében, köztük a központi idegrendszerben is kulcsfontosságú szerepet tölt be a sejtek

növekedési folyamatában, ezáltal a daganatképződésben [Choi et al., 2013]. Az EGFR vagy másnéven ErbB-1 az ErbB családba tartozó transzmembrán régióban lokalizálódó tirozin kináz receptor, mely feladatát a megfelelő, aktiváló hatású liganddal történő receptor-ligand kölcsönhatást követően fejeti ki [Lin et al., 2022]. A receptor aktiváció az inaktív állapotban monomerként jelen lévő EGFR homo- vagy heterodimerizációját váltja ki az ErbB család többi tagjával, majd különböző downstream útvonalak, mint például a MAPK, a PI3K, valamint a STAT3 citoplazmatikus autofoszforilációján keresztül végül az mTOR jelátviteli útvonalon át szabályozza a sejtproliferációt, az angiogenezist és a migrációt [Ezzati et al., 2024]. Eddigi ismereteink alapján elmondható, hogy az EGFR-hoz köthető jelátvitel nélkülözhetetlennek tűnik a GBM progresszióját, valamint inváziós tulajdonságát tekintve, ugyanis a gliómák megközelítőleg 50%-ában konstitutívan aktív EGFR amplifikáció figyelhető meg [Pudełek et al., 2020]. A daganatos betegségek, köztük a GBM esetében is rendszerint megfigyelhető genetikai alteráció a tumorszupresszor gének inaktivációja, valamint az onkogének aktivációja. Ezek a genetikai változások - más módon ugyan - növekedési előnyt biztosítanak a sejteknek a kontrollálatlan sejtosztódás folyamatát elősegítve. Ilyen, igen jól ismert, a GBM-ben gyakran mutációt elszenvedő, a „genom őrszemeként” is emlegetett tumorszupresszor gén a **TP53**, amelynek p53 fehérjeterméke részt vesz a sejtciklus és az apoptózis szabályozásában, a DNS-t érintő károsodás(ok) helyreállításának iniciálásában, valamint kulcsfontosságú feladatot lát el a genetikailag sérült sejtek proliferációjából következő tumorgenezist gátlásában. Ezen létfontosságú feladatait transzkripciós faktorként látja el a génexpresszió szabályozásán keresztül [Liu et al., 2024; Meel et al., 2024]. Nélkülözhetetlen funkcióin túl a **TP53** gén funkcionális mutációjának immunhisztokémiai azonosítása kiemelkedő jelentőséggel bír és kitüntetett figyelmet érdemel a GBM diagnosztizálásában, ugyanis a betegség rosszabb kimenetelével és a kezelésében alkalmazott Temozolomide (**TMZ**) kemoterapeutikummal szembeni csökkent kemoszenzitivitással társítható [Roshandel et al., 2019]. A **TP53** mellett a **Ki-67 index** egy másik immunhisztokémiai marker, mely információt szolgáltat a betegség progressziójáról, valamint az intrakraniális tumorsejtek proliferációjának mértékéről egyaránt. A tumor növekedési frakciói egyszerűen meghatározhatóak Ki-67 antitesttel, ugyanis a Ki-67 fehérje a sejtciklus csaknem összes fázisában (G1, S, G2, M) kifejeződik. Magas expressziója fokozott recidíva hajlammal és rossz prognózissal társítható [Armocida et al., 2020; Familiari et al., 2023]

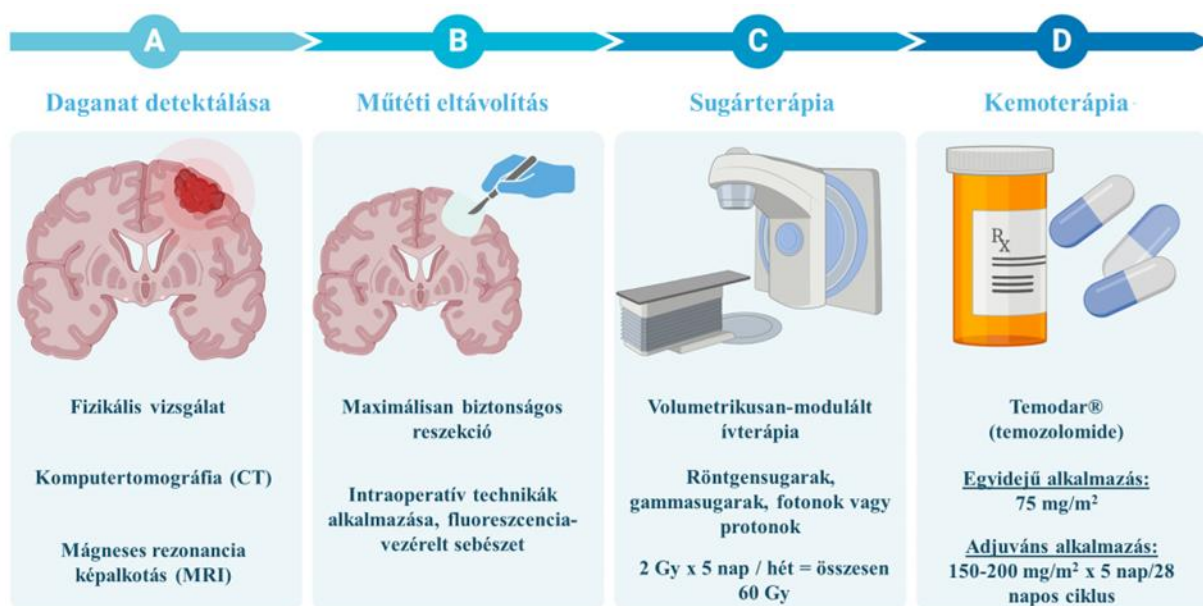
A fejlett diagnosztikai és terápiás stratégia ellenére is elmondható, hogy a GBM korai diagnosztizálása, ezáltal sikeres kezelése még ma is meglehetősen nagy kihívást jelent az

egészségügyi ellátórendszer számára. Ugyanis a betegség kezelésének eredményességét vélhetően az is befolyásolhatja, hogy az idegrendszeri képalkotó vizsgálatok az esetek nagy részében a betegség előrehaladott stádiumában történnek. A késői diagnosztizálás elsősorban az agydaganatokra jellemző lassú disszeminációs folyamatra vezethető vissza, melynek következtében még a daganat agyszövetbe való behatolásának kifejezett morfológiai jelei esetén is előfordulhat, hogy a klinikai manifesztációja teljesen hiányzik [Silantsev et al., 2019]. A jelenleg alkalmazott kezelési protokoll multimodális terápiás stratégiákon (műtéti reszekció, sugárterápia, kemoterápia) alapul, melyek szinergizmusban fejtik ki hatásukat a daganat megsemmisítése érdekében. A hatásosság eléréséhez az említett stratégiákat személyre szabottan szükséges kidolgozni a betegek funkcionális állapota, életminősége, a betegség progressziójának üteme, valamint a képalkotó vizsgálat és a klinikai diagnózis alapján [Rocha Pinheiro et al., 2023]. A hatékony terápia megtalálásának nehézségei elsősorban négy okra vezethetők vissza: a daganat nagymértékű heterogenitására, valamint invazív tulajdonságára, emellett az alkalmazott radio-kemoterápiával szemben mutatott rezisztenciakészség gyors kifejlődésére, továbbá a BBB jelenlétére, amelyen a legtöbb terapeutikum nem képes átjutni, azonban a 400 Da-nál kisebb molekulatömegű lipofil molekulák igen. Ilyen, a GBM kezelésére használt első vonalbeli terápiás készítmény a TMZ, melyet a kereskedelmi forgalomban Temodal™ néven értékesítenek Európában [Teraiya et al., 2023].

4.4. A glioblastoma kombinált onkoterápiája

Az elmúlt évtizedben számos különféle kezelési stratégiát vizsgáltak meg a betegség sikeres gyógyítása érdekében, azonban ezek minimális sikerrel zárultak. A GBM terápiájának fő kihívása a daganat lokalizációjával és az összetett, heterogén biológiai jellemzőivel hozható összefüggésbe [Kesari et al., 2011; Hanif et al., 2017]. Az újonnan diagnosztizált GBM ellátásának jelenlegi standardja a megalkotója után elnevezett Stupp protokoll, mely magában foglalja a tumoros szövet sebészi reszekcióját, valamint az azt követő kemoradioterápiát (**2. ábra**) [Stupp et al., 2005; Bjorland et al., 2021]. A protokoll gerincét a tumor lehető legteljesebb és legbiztonságosabb, sebészi úton történő eltávolítása képezi, ugyanis a reszekció a daganatos tömeg, valamint a parenchymális kompressziós szimptomák csökkentésén túl a daganat genetikai vizsgálatát, továbbá a szövettani diagnózis felállítását is lehetővé teszi. Azonban a GBM nem gyógyítható csupán műtéti beavatkozással, mivel szinte minden esetben recidivál. Ennek elsődleges oka a daganat infiltratív tulajdonsága, melynek köszönhetően képessé válik

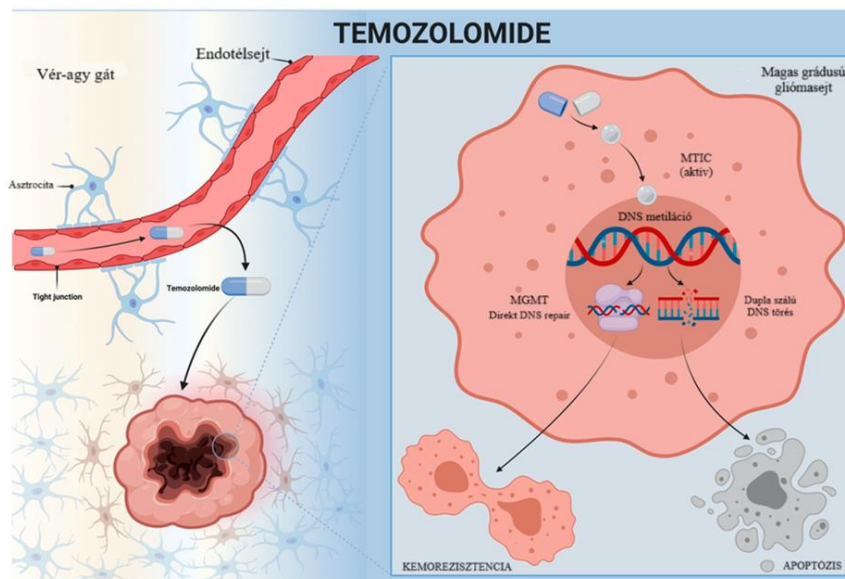
az ép agyszövetbe történő beszűrődésre, így teljes mértékű eltávolítása gyakorlatilag lehetetlen [Rocha Pinheiro et al., 2023]. A terápia másik nélkülözhetetlen pillére a kemoterápiával egyidejűleg alkalmazott radioterápia, melyet monoterápiában alkalmazott TMZ adminisztráció követ. A 6 hétig tartó konkuráló fázisban (TMZ+radioterápia) a betegek naponta összesen 60 gray (Gy) – 30x2 Gy lebontásban – sugárkezelést kapnak, melyet napi 75 mg/m² per os TMZ adásával egészítenek ki. Ezt követően 6 cikluson át tartó TMZ monoterápiában részesülnek. Minden ciklus 28 napból áll, mely ciklusok első 5 napjában történik a TMZ adminisztráció kezdetben 150 mg/m², a továbbiakban pedig 200 mg/m² dózisban. Ez a monoterápia jó tumorkontroll esetén akár 12 ciklusig is tovább folytatható [Gilbert et al., 2013; Fasano et al., 2024; Kovács, 2024; Rodgers et al., 2024]. Stupp és munkatársai hatékonysági és biztonságossági szempontból összevetették az önmagában alkalmazott radioterápiát, a sugárkezeléssel egyidejűleg alkalmazott TMZ kemoterapeutikummal történő kemoterápiát, illetve a sugárterápiát követő TMZ terápiát. Vizsgálatuk eredményeként megállapították, hogy az önmagában alkalmazott radioterápiával szemben a TMZ-dal kiegészített sugárkezelés klinikailag jelentős és statisztikailag szignifikáns (medián túlélési idő 12,1 hónapról 14,6 hónapra emelkedett; $p < 0,001$) túlélési előnyt eredményezett az újonnan diagnosztizált GBM esetében, a toxicitás minimális emelkedése mellett [Stupp et al., 2005]. Ezen eredményeket Feng és munkatársai szintén alátámasztották egy metaanalízis keretén belül, mely szerint a kombinált terápia hatására a medián túlélés 13,4–19,0 hónapnak adódott, szemben a 7,7–17,1 hónappal, melyet az önmagában alkalmazott radioterápiával kezelt csoport mutatott [Feng et al., 2017]. Ez a terápiás stratégia azonban a beteg életkora, a beteg általános állapotát kifejező Karnofsky-index (0-halott - 100-panaszmentes), az O⁶-metilguanin-DNS-metiltranszferáz (MGMT) javító enzim promóter metilációs státusza és a daganat kiújulása alapján változik, ugyanis a TMZ sem képes megakadályozni ennek bekövetkezését [Rocha Pinheiro et al., 2023].



2. ábra: A glioblastoma (GBM) kombinált onkoterápiája a Stupp protokoll alapján. [Kovács, 2024; Rodgers et al., 2024]

A TMZ egy második generációs imidazotetrazin, mely az imidazolgyűrűvel rendelkező új típusú alkiláló szerek osztályába tartozik [Ghosh et al., 2018; Teraiya et al., 2023]. Megkülönböztetünk monofunkcionális alkiláló szereket, melyek adduktumot képeznek a DNS-sel, illetve olyan típusúakat, amelyek a DNS láncok keresztkötését okozzák. A TMZ egy monofunkcionális DNS alkiláló szer, mely, mint prodrug, önmagában inaktív és savas pH ($\text{pH} < 5$) értéken stabil. Az aktív vegyület, a 3-metil-(triazén-1-yl)imidazol-4-karboxamid (MTIC) létrejöttéhez nem igényel hepatikus metabolizációt, ugyanis az aktív metabolit fiziológiás pH ($\text{pH} > 7$) értéken spontán átalakulással jön létre [Lee, 2016; Arora et al., 2019]. Ezt követően az MTIC tovább hidrolizál 5-amino-imidazol-4-karboxamiddá (AIC) és metil-diazóniummá, amely reakcióba lép a DNS-sel (**3. ábra**). A folyamat során a negatív töltésű DNS nukleofilként működik, melynek következtében a metil-diazónium-ion metilcsoportja átkerül a DNS purinbázisaira [Zhang et al., 2012; Singh et al., 2021]. A TMZ hatására a DNS-ben keletkező leggyakoribb változás a guanin N⁷ (>70%) pozíciójában bekövetkező metiláció, amit az adenin N³ (9%) és a guanin O⁶ (6%) pozíciójában létrejövő metiláció követ. Ezen módosítások által fejtvé ki citotoxikus hatását [Friedman et al., 2000; Teraiya et al., 2023]. A felsoroltak közül a legjelentősebb a guanin O⁶ pozíciójában lévő metiláció, mely a bázispár mismatch előidézésén, valamint annak sikertelen javításán keresztül egy- és kétszálú DNS töréseket okoz, valamint a sejtciklus leállítását indukálja a G2/M átmenetnél, majd ezek

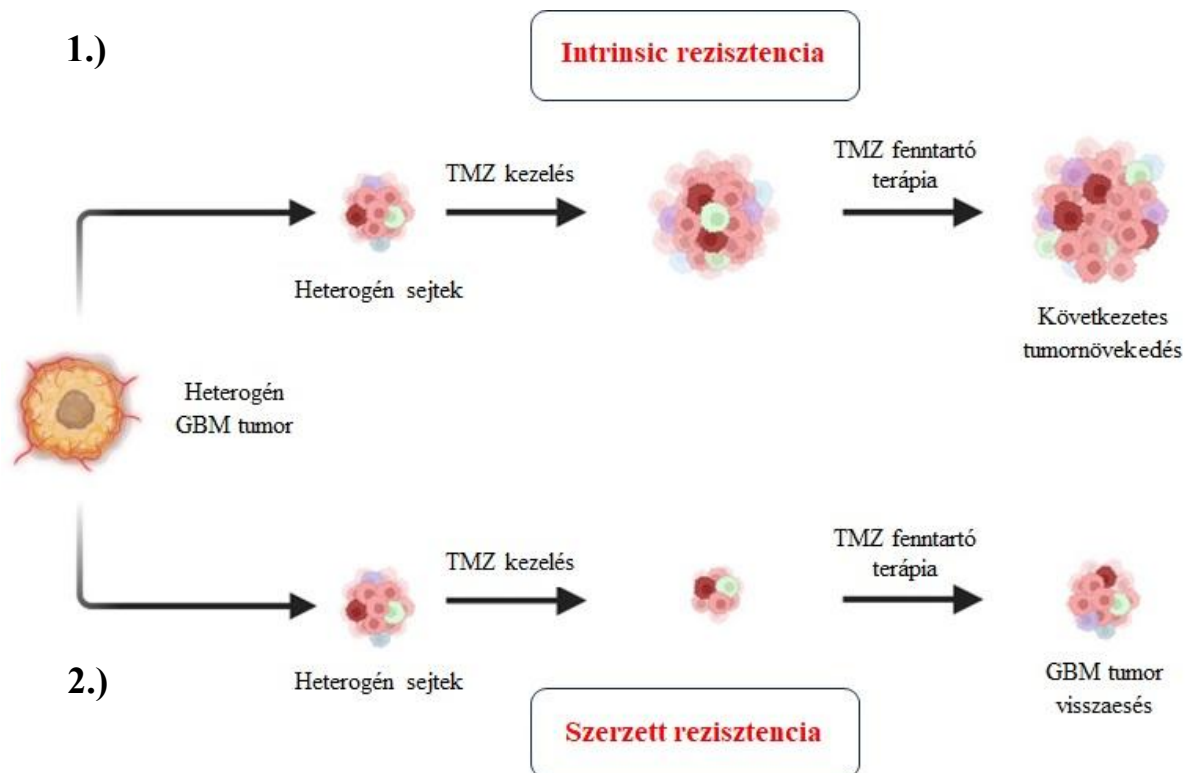
következményeként a sejt(ek) apoptózisához vezet [Kanzawa et al., 2004; Zhang et al., 2012; Hu et al., 2020].



3. ábra: A TMZ hatásmechanizmusa és átalakulása aktív vegyületté [Giotta & Luzzi, 2021].

4.5. Temozolomide rezisztencia

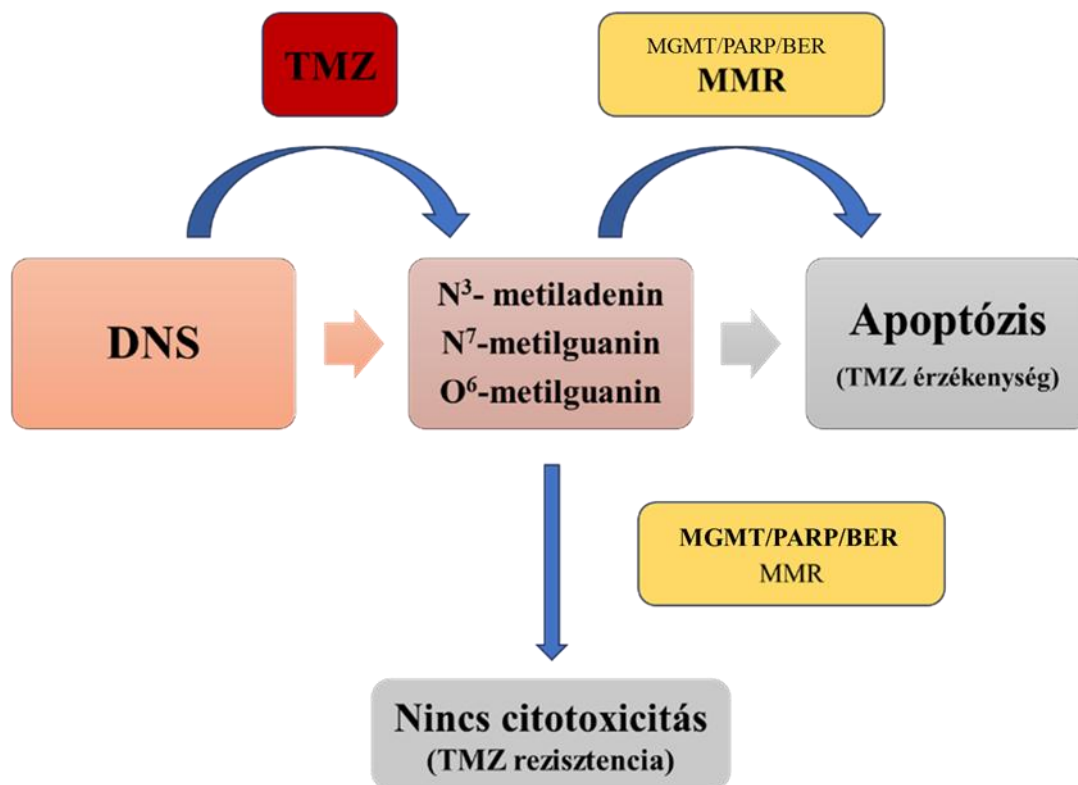
Annak ellenére, hogy a radioterápiával kombinált TMZ kezelés nagyban hozzájárult a betegek átlagos, illetve progressziómentes túlélési idejéhez, sajnálatos módon igen sok esetben tapasztalható az alkalmazott kemoterápiával szemben fellépő rezisztencia jelensége. Megkülönböztetünk természetes, azaz intrinsic, valamint szerzett rezisztenciát (**4. ábra**). Amennyiben a GBM sejtek specifikus tumorigén szubpopulációja intrinsic rezisztenciával jellemezhető, abban az esetben ezek a sejtek kontrollálatlan sejtproliferációt tartanak fenn a terápiás kezelést megelőzően, a terápia időtartama alatt, illetve azt követően egyaránt. Ennek köszönhetően a tumor tömege folyamatos növekedést mutat. Szerzett rezisztencia esetén azonban a sejtek egy adott populációja válik ellenállóvá a terápiával szemben (beleértve a radio- és kemoterápiát is) genetikai mutációk következtében, vagy a sejtekben zajló jelátviteli útvonalak rendellenes megváltozása révén. A szerzett rezisztencia esetében általában elmondható, hogy kezdetben a kezelés klinikai előnyei megfigyelhetők, és a daganat tömege csökken, azonban egy bizonyos kezelési idő eltelte után az ellenállóképesség megszerzése miatt ez a tendencia hanyatlik [Teraiya et al., 2023].



4. ábra: A TMZ rezisztencia kialakulásának két fő típusa. 1.) Természetes rezisztencia 2.) Szerzett rezisztencia. [Teraiya et al., 2023]

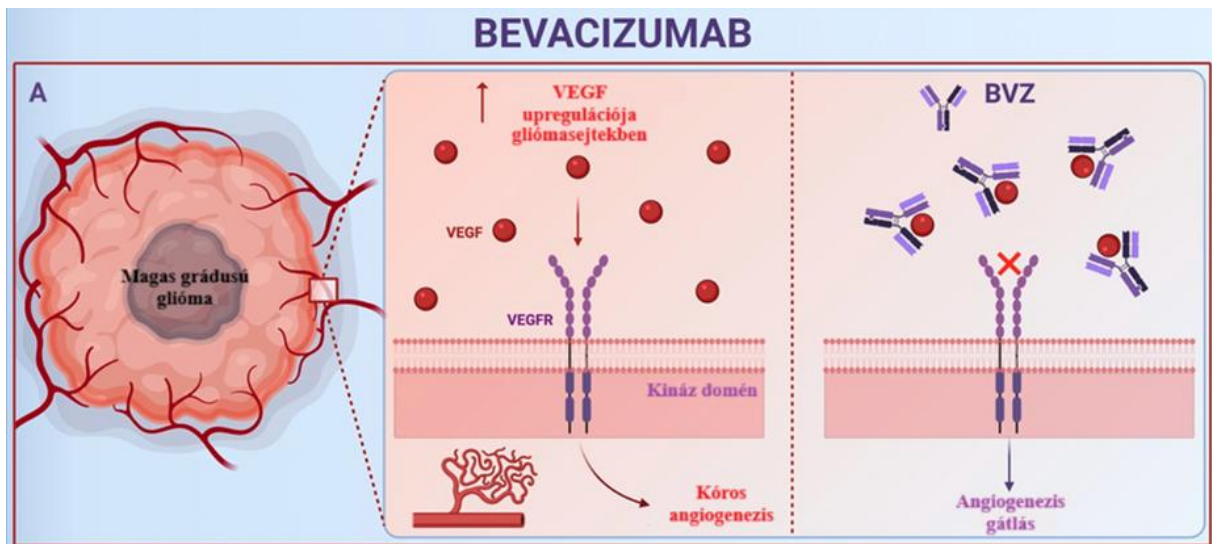
A TMZ az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatalának (FDA) 2005-ös jóváhagyása óta használatos a GBM elsővonalbeli DNS-metiláló ágenseként. Citotoxicitását tekintve ezidáig sem írtak le olyan készítményt, amely ilyen hatékonynak bizonyult volna [Teraiya et al., 2023]. Ennek ellenére az eddigi tapasztalatok azt mutatják, hogy a TMZ-dal kezelt betegek hozzávetőleg 50%-a nem reagál megfelelően a terápiára. Ennek oka elsősorban a GBM sejtekben fellépő O⁶-metilguanin-metiltranszferáz (MGMT) enzim túlzott expressziójában és/vagy a DNS repair rendszerének hiányában keresendő [Lee, 2016]. Azonban azok a GBM sejtek, melyek nagyfokú DNS hibajavításra képesek megfordíthatják a TMZ metilációs hatékonyságát, ezáltal rezisztenciát fejlesztve ki a készítménnyel szemben [Teraiya et al., 2023]. A TMZ rezisztencia kialakulásáért az alábbi DNS-javító mechanizmusok felelnek: O⁶-metilguanin-DNS metiltranszferáz (MGMT), a mismatch DNS-hibajavítási mechanizmus (MMR), a bázis kivágásos DNS javítás (BER, a poli-ADP-ribóz polimeráz (PARP) útvonal) (5. ábra) [Zhang et al., 2012; Teraiya et al., 2023].

A felsoroltak közül az MGMT enzim játssza a legfontosabb szerepet a rezisztencia kialakulásában, ugyanis ez az endogén hibajavító enzim direkt módon képes a DNS alkilációs károsodásának kiegyenlítésére, ezáltal pedig a genomi stabilitás fenntartására. Javító funkciója során eltávolítja az O⁶-metilguaninhoz kapcsolt metilcsoportot, ezáltal semlegesíti a TMZ hatására kialakult DNS károsodást, így csökkentve a készítmény általános hatékonyságát. A TMZ kezelésre adott válaszban kiemelkedő szerepe van az MGMT gén promóter régió CpG metilációs státuszának. Az MGMT promóter hipermetilációja az enzim csökkent kifejeződését eredményezi, amely jól korrelál a GBM-es betegek hosszabb túlélési idejével [Singh et al., 2021].



5. ábra: A sejtek TMZ érzékenységében, illetve rezisztenciájában szerepet játszó útvonalak. MGMT - O⁶-metilguanin-DNS metiltranszferáz, APNG – Alkilpurin-DNS-N-glikoziláz, BER - bázis kivágásos DNS javítás, MMR – mismatch repair.

Amennyiben TMZ rezisztencia lép fel, úgy a kezelési protokoll szerint meghatározott, úgynevezett „második vonalbeli” terápiás készítmény, a bevacizumab (Avastin®; Genentech, Inc., South San Francisco, CA) jön számításba. Az FDA által, a GBM kezelésében jóváhagyott bevacizumab olyan, a TMZ-től eltérő támadásponttal és hatásmechanizmussal jellemezhető humán monoklonális IgG1 antitest, mely az angiogenezis gátlásán keresztül fejt ki daganatellenes hatását. Hatásmechanizmusa során a keringő vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) molekulákhoz kapcsolódik, melynek hatására a VEGF nem képes kötődni receptorához, így az érújdonképződés redukciója miatt romlik a daganatos szövet vérellátása (**6. ábra**) [Kazazi-Hyseni et al., 2010; Giotta & Luzzi, 2021]. A malignus gliómákról, amilyen a GBM is, köztudott, hogy nagy mennyiségben expresszálják a VEGFR-t a sejtfelszínükön, ami előrejelezheti a betegség kedvezőtlenebb prognózisát [Ghiaseddin & Peters, 2015].



6. ábra: A bevacizumab hatásmechanizmusa [Giotta & Luzzi, 2021].

5. MikroRNS-ek (miRNS-ek)

5.1. A miRNS-ek biogenezise

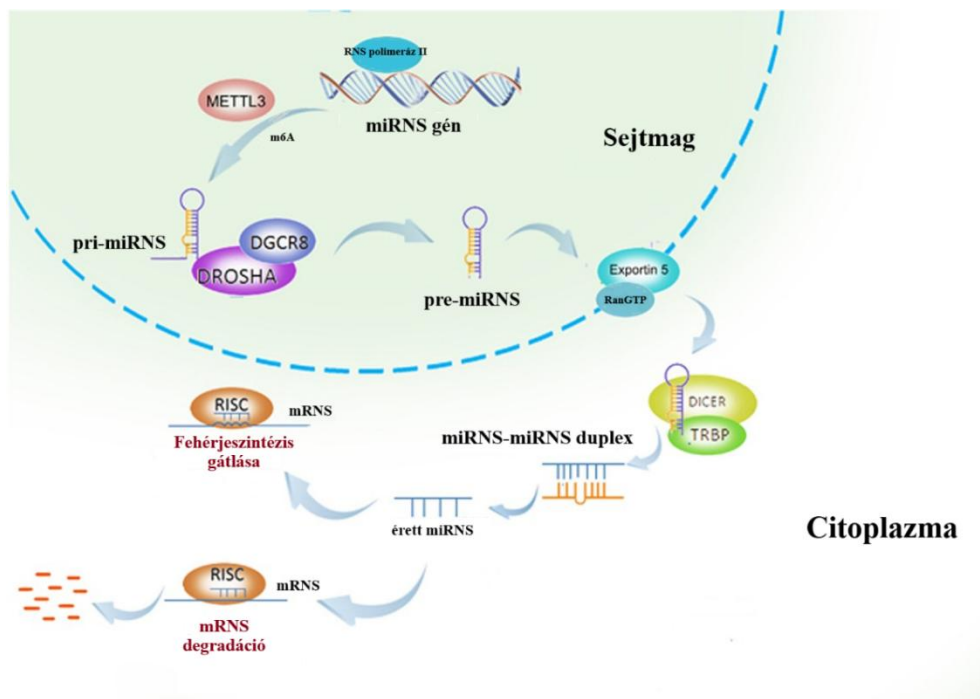
Az elmúlt évtizedek során az emberi szervezet teljes genetikai anyagának legnagyobb mértékben tanulmányozott részét a fehérjét kódoló gének szekvenciái adták. A humán genom egyre nagyobb mértékű megértésével egyidejűleg azonban világossá vált, hogy ezeknek a géneknek a kódoló régiói (exonok) a genomnak mindössze 1,5-2%-át teszik ki. Ezen információk mellett az évek előrehaladtával egyre nyilvánvalóbbá vált, hogy a genom fehérjét nem kódoló része is kulcsfontosságú funkcionális jelentőséggel bír fejlődéstani, fiziológiai, valamint a betegségek szempontjából egyaránt. A fehérjét nem kódoló genomi szakaszok funkcionális relevanciája kiváltképp nyilvánvaló a kis nem kódoló RNS-ek (ncRNS-ek) egyik osztályát képező úgynevezett miRNS-ek esetében [Esteller, 2011].

A miRNS-ek felfedezése a jelenkori molekuláris biológia egyik legjelentősebb mérföldkövének tekinthető, melynek köszönhetően a genetikai információ kifejeződésével összefüggésben álló, újabb finomhangolási lépés leírása valósult meg [Shukla et al., 2011]. Az első miRNS, a lin-4 1993-ban került leírásra *Caenorhabditis elegans*-ban, mely felfedezés forradalmasította a molekuláris biológia területét. Azóta különböző állatmodell-rendszerekben mutatták ki sikeresen a miRNS-eket és némelyekről igazolták, hogy a fajok között erősen konzerváltak. Jelen állás szerint a miRBase adatbázis alapján körülbelül 1917 prekursor-miRNS és közel 2654 érett miRNS került eddig azonosításra [miRBase (<https://www.mirbase.org>); Plotnikova et al., 2023]. Ez a szám a jövőben növekvő tendenciát fog mutatni, ugyanis az új miRNS-ek azonosítása napjainkban is töretlenül zajlik.

A miRNS-ek kis, 20-25 nukleotidból álló RNS molekulák, amelyek nem kódolnak fehérjéket, de szabályozzák azok expressziós szintjét poszttranszkripció reguláció révén [Ohtsuka et al., 2015]. Ez a szabályozási mechanizmus a specifikus messenger RNS (mRNS) molekulák gátlásán keresztül valósul meg, azáltal, hogy az mRNS-en megtalálható, általában a 3' nem transzlálódó régióban (3' UTR) elhelyezkedő komplementer szekvenciákhoz kötődnek, ami az mRNS destabilizálásához és transzlációs teljesítményének csökkenéséhez vezet [Tat et al., 2016]. Egyetlen UTR régió több, különböző miRNS kötőhelyét is tartalmazhatja, illetve több kötőhelyet egyetlen miRNS számára, amely a génexpresszió komplex poszttranszkripcionális szabályozására utal [Shukla et al., 2011]. Az ezidáig azonosított humán miRNS lókuszok mintegy fele intragenikus lokalizációt mutat, és többnyire intronokból,

valamint fehérjét kódoló génekben található exonokból processzálódnak az RNS polimeráz II közreműködésével [Kim et al., 2007]. A gazdagéneken belül, azonos orientációban elhelyezkedő intronikus miRNS-eket az elsődleges transzkriptum mellett ugyanaz a promóter írja át [Macfarlane et al., 2010]. Míg a fennmaradó rész intergenikus és a gazdagéntől függetlenül íródik át, mely folyamatot saját promótereik szabályozzák [O'Brien et al., 2018]. Azonban néha előfordul, hogy a miRNS gének egyetlen hosszú, úgynevezett policisztronos transzkriptumként íródnak át, amelyet klaszternek nevezünk [Khan et al., 2019]. A klaszteren belül hasonló „seed” régióval rendelkezhetnek, mely esetben miRNS családnak tekintjük őket [Tanzer et al., 2004; O'Brien et al., 2018]. A miRNS-ek biogenezisét tekintve kanonikus és nem kanonikus (nonkanonikus) útvonalakat különböztetünk meg, melyek közül az előbbi a miRNS-ek érésének fő útvonala [Brown, 2022]. A miRNS hatásának kanonikus mechanizmusa, a 3'UTR-rel való kölcsönhatás, a szekvencia komplementaritáson alapul [Ohtsuka et al., 2015]. A hagyományos miRNS biogenezis folyamata egy nukleáris és egy citoplazmatikus hasítási lépésből áll. Léteznek azonban alternatív biogenezis utak is, amelyek különböznek a hasítási események és a résztvevő enzimek számában. A kanonikus útvonalon az elsődleges miRNS-ek (pri-miRNS-ek) átíródnak génjeikből, melyeket két RNáz III típusú enzim a DROSHA és a DICER hasít prekursor-miRNS-ekké (pre-miRNS). Ezen enzimek két egymást követő processzási eseményt katalizálnak a sejtmagban, illetve a citoplazmában. Az érett miRNS a fent említett hosszú pri-miRNS-ből jön létre, melynek jellemző struktúrája az 5' 7-metil-guanozin sapka és a 3' poliadenilált régió. A pri-miRNS egy úgynevezett hajtúszerkezetet tartalmaz, amelynek hossza több száztól több ezer bázispárig terjedhet. A processzási folyamat során a pri-miRNS a hajtúszerkezet szaránál elhasad, amely egy ~60-70 nukleotid hosszúságú hajtústruktúra felszabadulásához vezet, amit pre-miRNS-nek neveznek [Lao et al., 2020]. Ezt a sejtmagban lejátszódó folyamatot a mikroprocesszor komplex katalizálja, amely a nukleáris RNáz III típusú Drosha fehérjét és kofaktorát, a DGCR8 (DiGeorge-szindróma kritikus régiója 8) fehérjét tartalmazza [Michlewski et al., 2019]. Ezt követően a szár-hurok szerkezetű pre-miRNS további feldolgozás céljából a Ran/GTP/Exportin-5 fehérje komplex közreműködésével a sejtmagból a citoplazmába exportálódik, ahol egy másik RNáz III típusú enzim, a Dicer processzálja tovább ~20-22 nukleotidból álló miRNS/miRNS* duplexé (a * szimbólum az utasszálat jelöli a duplexben, a másik szál az úgynevezett érett vagy vezető szál). Ezt követően az érett miRNS szál beépül az RNS-indukálta csendesítő komplexbe (RISC), mely a target mRNS-hez történő irányításért felelős [Peng et al., 2016]. A RISC részeként az Argonauta fehérjék is részt vesznek a miRNS érési folyamatában, valamint rögzítési helyeket is biztosítanak számukra a génexpresszió szabályozásához a citoplazmában. Az Argonauta fehérje másik fő funkciója a

vezető szál felismerése és kiválasztása, melyet a termodinamikai aszimmetria szabálya szerint hajt végre, amit az utasszál hasítása és kilökődése követ. Ennek mechanizmusa azonban még mindig nem teljesen feltárt [Wu et al., 2020]. A miRNS azon szála (-5p vagy -3p szál) amely degradálódik (utas szál) vagy beépül a RISC komplexbe (vezető szál), meghatározza a cél-mRNS-ek csoportját. A RISC mRNS-ekkel szembeni specifitása nagymértékben függ az mRNS-en lévő úgynevezett miRNS-válaszelemek (MRE), valamint a miRNS-szálon lévő „seed” szekvencia közötti komplementaritástól [Correia et al., 2019]. A vezető szál és az mRNS target között fennálló komplementaritás mértéke határozza meg, hogy melyik génexpressziót szabályozó mechanizmus érvényesül; a cél mRNS hasítása, majd ezt követő lebontása vagy a transzláció gátlása [Macfarlane et al., 2010]. Előbbi mechanizmus teljes komplementaritás esetén valósul meg, míg részleges komplementaritás meglétekor a fehérjeszintézis gátlása jön létre (7. ábra). Ez utóbbi fordul elő leginkább az emlősökben, köztük az emberi szervezetben is. Ezen általános mechanizmus mellett azonban megfigyelték azt is, hogy ugyan ritkán, de előfordulhat, hogy a cél mRNS 3' UTR régiója helyett az 5' UTR régióval vagy akár génpromóterekkel alakul ki kötődés a komplementaritásnak köszönhetően, mely kapcsolat ellentétes hatást, nevezetesen a génexpresszió aktiválását hozhatja létre [Xiao et al., 2017; Correia et al., 2019].



7. ábra: A miRNS érési folyamatának és működésének sematikus ábrája [Peng & Croce, 2016].

5.2. A miRNS-ek szerepe az epigenetikai szabályozásban

Az emberi szervezet genetikai anyaga, összefoglaló néven genomja számos mechanizmuson keresztül szabályozza a sejtek homeosztázisát és belső funkcióit, úgymint a DNS replikációt és a környezeti jelekre adott választ. Míg a genomot a DNS kódolja, addig a genomból származó összetett biológiai folyamatok számtalan kölcsönhatásban lévő és együttműködő RNS-molekulát, valamint különböző fehérjestruktúrát foglalnak magukban [Liu et al., 2014].

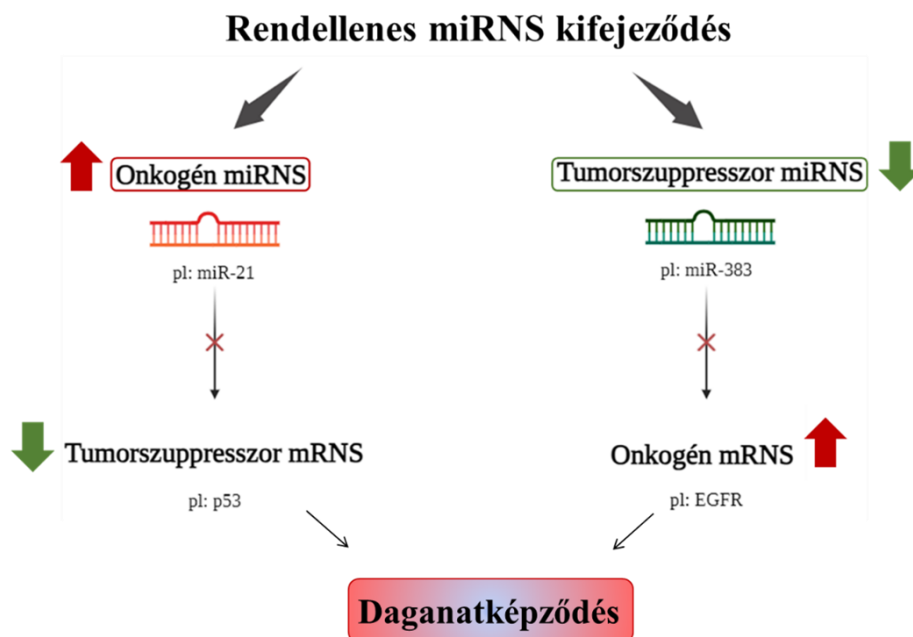
A miRNS-ek napjainkban a transzlációs medicina intenzíven kutatott szegmenseként szerepelnek a génexpresszióra gyakorolt hatásuk, valamint a szövetekben és a testfolyadékokban megfigyelhető és igazolható jelenlétüknek köszönhetően, melynek következtében a különböző betegségek potenciális biomarker jelöltjeit képviselhetik [Hill et al., 2021]. A közelmúltban megannyi tanulmány bizonyította az epigenetika és a miRNS-ek összehangolt működését különféle sejt folyamatokban és többek között olyan összetett betegségekben is, mint a rák [Arif et al., 2020]. A miRNS-ek epigenetikai szabályozó funkcióját tekintve elmondható, hogy olyan változásokat hoznak létre, melyek nem járnak együtt a DNS szekvencia megváltozásával. Sokrétű biológiai szerepük abban áll, hogy a transzkripció és transzláció folyamatának pozitív szabályozásán túl specifikus mRNS szekvenciák felismerésén keresztül képesek akár több száz, eltérő mRNS targethez is kötődni, valamint egy adott mRNS különböző regulátor molekuláiként is működni [Tregub et al., 2023]. Ismeretes továbbá, hogy a miRNS-ek olyan epigenetikai szabályozó molekulák kifejeződését kontrollálják, mint a DNS-metiltranszferázok, a hiszton-metiltranszferázok vagy a hiszton-deacetilázok, melynek következtében befolyásolják a teljes epigenomot. Továbbá a komplementaritás elvén alapulva bizonyos gének promótereikhez kapcsolódva specifikus fehérjekomplexek létrehozásán keresztül képesek a kromatin szerkezetét megváltoztatva szabályozni a génkifejeződés folyamatát [Pajares et al., 2021]. Azonban a miRNS-ek is szabályozás alá kerülhetnek epigenetikai folyamatok révén. Ilyen regulációs mód például a DNS-metiláció, amely során egy metilcsoport kapcsolódik kovalens kötéssel általában a CpG szigetekben megtalálható adott citozin nukleotidhoz, 5-metil-citozint létrehozva. Ezeknek a CpG-szigeteknek valamivel több, mint 50%-a a gének promóter régióiban található. Ezeken a helyeken a DNS-metiláció a transzkripció represszióját eredményezi, lehetővé téve ezzel a represszor fehérjék bekötődését és gátolva a transzkripció faktorok és a DNS molekula közötti interakciót [Antequera, 2003; Pajares et al., 2021]. A miRNS-ek ily módon történő epigenetikai szabályozásának bizonyítékát

Saito és munkatársai írták le először a miR-127 esetében 2006-ban [Saito et al., 2006]. Azóta meglehetősen sok, a miRNS-ek hozzávetőleg 50%-ában azonosították a promóter régiójukban található CpG-szigetek metilációjával kapcsolt epigenetikai szabályozásnak való kitettségüket [Tuna et al., 2016]. Az eddigi ismereteink azt sugallják, hogy a miRNS-ek és az epigenetikai szabályozás között fennálló kapcsolat egy olyan szabályozó kört hoz létre, mely a teljes génexpressziós profilért felel [Ilango et al., 2020].

5.2.1. MiRNS-ek szerepe a poszttranszkripció szabályozásban

Ahogy az már a 5.1. alfejezetben is tárgyalásra került, a miRNS-ek specifikusan szabályozzák a target-mRNS molekulájuk stabilitását és translációját poszttranszkripcionális szinten. A miRNS-ek első, 1993-ra datálható leírása óta mára már olyan mélyreható információkkal rendelkezünk mind a biológiai funkcióikat, mind a génszabályozásban betöltött komplex szerepüket illetően, melyek hozzásegítettek minket a daganatos betegségek kialakulásában betöltött nélkülözhetetlen szerepük megértéséhez [Shi et al., 2021]. Ismeretes, hogy az emlősök génjeinek hozzávetőleg 1-2%-át teszik ki ezek a molekulák, melyek mindegyike több száz célponttal rendelkezik, így a fehérjét kódoló gének tetemes részét tartják ellenőrzésük alatt. Ez alapján kijelenthetjük, hogy voltaképpen az összes biológiai folyamatunk miRNS-függő szabályozás alá esik, melynek fényében elmondható, hogy az emberi szervezetben betöltött szerepük kétségbevonhatatlan. Továbbá kiderült, hogy a miRNS-ek és azok célpontjai rendszerint evolúciós konzerváltságot mutatnak, mely ugyancsak alátámasztja ezen molekulák funkcionális relevanciáját [Vidigal & Ventura, 2015]. A különböző sejtleletani folyamatok megfelelő szabályozását normál expressziójuk esetén képesek ellátni. Amikor azonban diszregulációjuk következtében ez a balansz felborul, patológias folyamatok elindítására képesek olyan mechanizmusok révén, mint a proliferatív jelátvitel fenntartása, az apoptózis és növekedésgátlás elkerülése, vagy az invázió és az angiogenezis aktiválása [Peng & Croce, 2016]. A miRNS-ekről ma már tudjuk, hogy szövetspecifikus kifejeződést mutatnak, mely expressziós mintázat segítséget nyújthat a különböző tumoros elváltozások diagnosztikájában, prognózisuk meghatározásában vagy akár a gyógyításukat célzó terápia hatásosságának nyomon követésében is [Nagy et al., 2018]. A daganatképződésben betöltött szerepük alapján onkogén (onkomiR) és tumorszupresszor miRNS-eket különböztetünk meg. Az onkomiR-ek a tumorszupresszor génekről átíródó mRNS-ek gátlásán keresztül a tumorképződés folyamatát segítik elő. A daganatos betegségekben ezen miRNS-ek fokozott

kifejeződése, azaz upregulációja figyelhető meg. Míg ezzel ellentétben a tumorszupresszor miRNS-ek csökkent kifejeződésük, tehát downregulációjuk mellett az onkogének mRNS molekuláinak kisebb mértékű gátlásával járulnak hozzá a tumorgenezis folyamatához (**8. ábra**) [Otmani et al., 2022]. A miRNS-ek humán daganatokban betöltött szerepének első bizonyítékait a B-sejtes krónikus limfocitás leukémiában Croce és kutatócsoportja írta le. Kutatásuk során a 13-as kromoszóma hosszú karjának 14-es régiójában megtalálható tumorszupresszor géneket vizsgálták és azt találták, hogy ez, a B-sejtes leukémiában gyakran deletálódó régió két miRNS (miR-15a és miR-16-1) gént tartalmaz, melyek törlődése vagy downregulációja összefüggésbe hozható a betegséggel. E két miRNS tumorszupresszor mivoltát további kutatások is alátámasztották, melyek szerint a Bcl-2 repressziója révén apoptózist váltanak ki a malignus, nem osztódó B-sejtekben [Cimmino et al., 2005; Calin et al., 2008; Peng & Croce, 2016]. Az onkogén miRNS-ek igen jól ismert képviselője a miR-21, melyet számtalan tanulmány leírt már a GBM-en kívül egyéb daganatokban is. Úgy mint az emlődaganatban, melynek esetében a tropomiozin 1 (TPM1) tumorszupresszor gén gátlásán keresztül fejti ki onkogén hatását [Zhang et al., 2007]. Továbbá ugyancsak onkogén miRNS-ekként ismertek a miR-20 és a miR-106, melyeknek a retinoblasztóma (*RBI*) és a transzformáló növekedési faktor béta-receptor 2 (*TGFBR2*) tumorszupresszor gének a célpontjaik különböző szolid tumorokban [Volinia et al., 2006]. Összességében elmondható, hogy a miRNS-ek diszregulációjának következménye az általuk szabályozott tumorszupresszor gének és onkogének aktivitásának kiegyensúlyozatlansága.



8. ábra: A tumorszupresszor és onkogén miRNS-ek működése.

5.3. MiRNS-ek alkalmazási lehetőségei a tumordiagnosztikában

A miRNS-ek tudományos felfedezése óta terjedelmes ismeretanyag áll rendelkezésünkre normál- illetve tumorgenezist indukáló funkciójukat illetően. Fiziológias körülmények között az emberi szervezetben fellelhető onkogén és tumorszupresszor miRNS-ek kifejeződése úgymond egyensúlyi állapotban van. Azonban egyes miRNS-ek diszregulációja különböző kórképek, köztük daganatos megbetegedések kialakulásához vezethet a sejtproliferáció, az invázió és angiogenezis folyamatának aktiválásán keresztül [Peng et al., 2016; Jámbor et al., 2019]. Diszregulációjuk kialakulásáért a biogenezisük során fellépő processzálni hiba, illetve kromoszóma rendellenességek mellett főként a miRNS géneket érintő mutációs események, valamint epigenetikai módosulások tehetők felelőssé, melyek szorosan összefüggésbe hozhatóak a daganat kialakulásával [Calin & Croce, 2006; D'Angelo et al., 2016]. Ezek alapján kijelenthető, hogy a miRNS-ek alkalmas biomarkerek lehetnek a különböző daganatok diagnosztizálásának folyamatában, valamint emellett fontos szerepet tölthetnek be a prognózis becslésében és az alkalmazott terápiák hatékonyságának monitorozásában. Az első miRNS-alapú diagnosztikai teszt, miRview™ néven a 2000-es évek végén került kereskedelmi forgalomba a Rosetta Genomics Ltd. (Rehovot, Israel) fejlesztése által, mely 97%-os szenzitivitással és 91%-os specificitással képes elkülöníteni a laphámsejtes és nem-laphámsejtes nem kissejtes tüdődaganatban szenvedő betegeket [Gilad et al., 2012]. További ilyen, forgalomban lévő tesztek például a bizonytalan eredetű pajzsmirigy göbök meghatározására használt Afirma® Thyroid és a ThyGeNEXT® + ThyraMIR® molekuláris genetikai platformok. Ez utóbbinak különlegessége, hogy az új generációs szekvenálási panelt kombinálja a miRNS expressziót osztályozó pannellel, melynek köszönhetően 98%-os szenzitivitással és specificitással működik [Yang et al., 2025]. Mindkét panel jelentős segítséget nyújt a szükségtelen pajzsmirigy műtétek csökkentésében, melyek közül az Afirma® Thyroid platform kiemelkedő értékkel, 75%-kal csökkentette a beavatkozások számát [Kandil et al., 2023]. Ez a néhány példa igazán jól szemlélteti, hogy milyen potenciállal rendelkeznek a miRNS-ek a daganat diagnosztika területén, melynek a technológia rohamos fejlődésének köszönhetően a közeljövőben ugrásszerű növekedése figyelhető majd meg.

5.4. Glioblastomában azonosított miRNS-ek

Ismerve a miRNS-ek sokrétű szabályozó funkcióját és szövetspecifikus kifejeződésük tényét, nem véletlen, hogy számtalan daganat kapcsán leírásra kerültek már. Úgymint vastagbél-, gyomor-, tüdő-, petefészek-, hasnyálmirigy-, mell-, vagy épp a prosztatadaganat [Di Leva et al., 2014]. Sok esetben megfigyelhető azonban ellentétes irányú kifejeződésük a különböző daganattípusokban, melynek köszönhetően tumorspecifikus miRNS-eket vagyunk képesek azonosítani. A GBM esetében is leírásra került már jónéhány ilyen specifikus marker miRNS. A fokozott expresszióval jellemezhető miRNS-ek közül az első számú, leginkább tanulmányozott GBM-re jellemző molekula a hsa-miR-21, mely igen magas upregulációval jellemezhető, melynek következtében fokozza a tumorsejtek inváziós képességét, valamint részt vesz mind a sugár-, mind a kemoterápiával szemben kialakuló rezisztencia folyamatában [Aloizou et al., 2020]. További, GBM-ben ismert upregulált miRNS-ek a hsa-miR-15b, a hsa-miR-93 és a hsa-miR-221/222, melyek közül a hsa-miR-15b-t meglehetősen hasznos diagnosztikai és prognosztikai markerként írtak le, mivel a különböző testfolyadékokban, mint a szérumban, plazmában, cerebrospinális folyadékban és a vérben is kimutatható [Ordóñez-Rubiano et al., 2024]. Emellett a VEGF-on túl más, az érújdonképződés folyamatát támogató molekula, a hsa-miR-93 is ismert GBM-ben, mely oncomiR-ként funkcionálva elősegíti a daganat túlélését és növekedését [Banelli et al., 2017]. Továbbá bizonyítottan GBM specifikus molekulák még a hsa-miR-221/222, melyek kulcsfontosságú szerepet töltenek be az apoptózis folyamatának gátlásában, valamint részt vesznek a sejtciklus és a sejtproliferáció szabályozásában is, így kifejtve onkogén hatásukat [Makowska et al., 2023]. A GBM-ben fontos tumorszupresszor miRNS-ek is leírásra kerültek már, úgymint az Ahmed és munkatársai által azonosított hsa-miR-181, mely a GBM sejtek növekedésének gátlásán és az apoptózis indukálásán keresztül fejt ki hatását, valamint prognosztikai markerként tartják számon a betegségben. Emellett további tumorszupresszor miRNS-eket is azonosítottak, mint a hsa-miR-302-367, a -Cdh4, a -378a-3p, a -342, a -153, a -940, a -7-5p, a -101 és a -338 melyek az anti-apoptotikus gének gátlása mellett különböző transzkripciós faktorok és szignalizációs útvonalak inhibitoraként funkcionálnak a GBM növekedésének elnyomása érdekében [Ahmed et al., 2021].

6. Biopsziák

6.1. Szövetbiopszia

A különböző szolid daganatok felderítése a már korábban említett hagyományos képalkotó technikákkal történik, úgymint a CT, MRI, pozitronemissziós tomográfia (PET) és ultrahang (UH). Ezek az eljárások a daganat lokalizációját és anatómiai kapcsolatait hivatottak jellemezni, viszont korlátozottan alkalmazhatóak a tumor grádusba sorolása és molekuláris jellemzése tekintetében. Ennélfogva a daganatos állományból történő közvetlen mintavétel szükséges mind a szövettani, genomi és molekuláris jellemzéshez, valamint a pontos diagnózis felállításához és a szükséges terápia hatékony megtervezéséhez [Desroches et al., 2018].

A jelenkori daganatdiagnosztika a szövettani mintanyerés mellett a molekuláris és genomiális tumorelemzést egyaránt magába foglalja. A tumormintavétel egyik leggyakoribb, gold standard módszere az úgynevezett célzott, sztereotaxiás túbiopsziás eljárás, amit olyan esetekben végeznek, amikor a daganat elhelyezkedése (például az agyi állományban mélyen elhelyezkedő) és kiterjedése miatt túl nagy a műtéti úton történő részleges vagy teljes eltávolítás kockázata [Di Bonaventura et al., 2021]. Szintén elterjedt technika a sebészi tumorreszekció, melynek teljes vagy részleges megvalósítása újonnan diagnosztizált betegek esetében prognosztikai értékkel bír, mindazonáltal hatékonysága függ az érintett agyi terület lokalizációjától, illetve a daganat stádiumától is [Scott et al., 2011; Arneth et al., 2018; Hanif et al., 2017]. A primer magas grádusú gliómák esetében, mint amilyen a GBM is retrospektív vizsgálattal sikeresen alátámasztották, hogy mind az általános, mind a progressziómentes túlélést számottevően befolyásolja a tumorreszekció mértéke, mely hangsúlyozza a maradéktalan reszekció horderejét a progressziómentes túlélést illetően [Yang et al., 2023]. Ezen analízis keretében ugyanis meghatározták a teljes reszekcióval és a „szubtotális reszekció” - val nyert adatokat, melyek összevetése egyértelműen kimutatta, hogy a „szubtotális” eljárással szemben a teljes reszekció magasabb túlélési arányt mutatott az 1 éves nyomon követés során [Brown et al., 2016]. Utóbbi technikának köszönhetően a túlélési idő 20-25 hónapig is növekedhet az eddigi 15-18 hónapos medián túlélési idővel összevetve. Ennek ellenére mindkét reszekciós eljárás a GBM diagnosztikájának és terápiájának egyik sarokkövét jelenti. A teljes reszekció által nyújtott javuló túlélési tendencia ellenére sajnálatos módon a GBM esetében ennek megvalósítása komoly akadályokba ütközik a daganat diffúz infiltratív jellegének köszönhetően, melynek eredményeképp a környező ép agyszövetbe is képes behatolni, így komplett eltávolítása gyakorlatilag lehetetlen [Roh et al., 2023]. Ezek alapján érthető a GBM-

et jellemző gyors rekurrencia jelensége, mely a sebészeti eltávolítást követően a marginális zónában hátra maradt daganatsejtekből kiindulva úgynevezett minimális reziduális betegségként jelentkezik [Qazi et al., 2022; Garcia-Diaz et al., 2023].

6.2. Folyadékbiopszia

Évtizedekre visszamenőleg és jelenleg is elsősorban a szöveti mintavétel képezi a daganatdiagnosztika gerincét. Azonban egyre nagyobb teret hódít a különböző testfolyadékokból nyert biológiai adatok felhasználása a tumoros betegségek azonosítására és a terápiás stratégia kidolgozására irányulóan. Jelenleg ez az úgynevezett folyadék biopsziás eljárás nem képezi szerves részét a rutindiagnosztikai folyamatnak, azonban a közelmúltban nagy előrelépés történt az onkológia területén az EGFR mutációs státusz első véralapú, FDA által 2016-ban engedélyezett tesztjének köszönhetően [Gatto et al., 2021]. Napjainkban világszerte számtalan kutatócsoport végez egyre intenzívebb kutatásokat, és ér el egyre figyelemreméltóbb eredményeket ezen az „új generációs” területen.

A szöveti biopsziával összevetve a folyadékbiopsziás eljárás egyik legnagyobb előnye, hogy jelentős mértékben képes redukálni a betegeket érintő mintavételből fakadó, sokszor igen magas kockázati tényezőket. További előnyként említhető, hogy minimálisan invazív metódusként a mintanyeréshez elegendő csupán egy tűszúrás, ezáltal bármilyen időpontban könnyedén megismételhető, melynek nagy hasznát veheti az egészségügyi ellátó személyzet például egy daganatterápia időtartama alatt. Ezzel egyidőben megbízható információt szolgáltat a páciensek kezelésre adott válaszáról, a betegség progressziójáról vagy akár a már korábban említett minimális reziduális betegség jelenlétéről [Adhit et al., 2023]. Az esetek zömében a vérplazma és a vérszérum képezi a folyadékbiopsziás vizsgálatok kiindulási mintatípusát, melyekből daganatsejtek, vagy az azokból származó nukleinsavak - például keringő tumor DNS (ctDNS), keringő mitokondriális DNS (cmtDNS), sejtmentes DNS (cfDNS) vagy akár nem-kódoló RNS molekulák (ncRNS), mint a miRNS és a hosszú nem-kódoló RNS (lncRNS) -, fehérjék, illetve extracelluláris vezikulák, úgymint az exoszómák kimutatása valósítható meg [Birkó et al., 2020]. A folyadékbiopszia kezdeti alkalmazása elsősorban a keringő tumorsejtek (CTC – circulating tumor cells) és a sejtmentes frakciók, úgymint a ctDNS kimutatására irányult. A későbbiekben a cfDNS és a miRNS-ek bevonásával szélesítették a palettát, ezáltal kialakítva egy többmarkeres diagnosztikai, prognózis becslő és terápiás stratégiát. A vizsgálatok kezdetén megfigyelték, hogy más extrakraniális daganattípusokkal szemben a gliómák esetében a ctDNS molekula jelenléte a vérben

meglehetősen ritka, ezért érdekesebb annak kimutatását, illetve analizisét cerebrospinális folyadékból (CSF) végezni, mely szintén egyik jól ismert mintatípusa a folyadékbiopsziás vizsgálatoknak [Finotti et al., 2018; Otsuji et al., 2024]. A CSF minták tumor DNS kimutatására irányuló hasznosíthatóságát az a tény is alátámasztja, hogy a BBB jelentős mértékben korlátozza ezen nukleinsav molekulák vérkeringésbe történő bekerülését, ilyen formán akadályozva a véralapú analizist.

A folyadékbiopsziával nyert különböző testfolyadékok analizise egyre intenzívebben kutatott területté nőtte ki magát, így a rutindiagnosztikába történő biztonságos integrálása reményeink szerint nem várat sokáig magára. Ennek kiemelten nagy jelentősége lenne az agydaganatok, főként a gliómák (beleértve a GBM-et is) esetében, ugyanis hatékony megoldást tudna nyújtani azokra a problémákra, melyek a tumorszövetek molekuláris jellemzésére irányuló erőfeszítések esetében felmerülnek. Ilyen, a teljesség igénye nélkül jelen lévő problémák a daganat sok esetben megközelíthetetlen elhelyezkedése, a gliómák jól ismert intratumorális heterogenitása és a betegség longitudinális monitorozásának szükségessége [Orzan et al., 2023].

7. Célkitűzések

Doktori munkám során célul tűztem ki a glioblastoma (GBM), mint a leggyakoribb és legagresszívabb felnőttkori agydaganat molekuláris genetikai vizsgálatát. Témaválasztásunk jelentőségét a betegség igen magas morbiditási és mortalitási mutatói mellett a mai napig tartó töretlen próbálkozások ellenére sem megoldott korai diagnosztikai és hatékony terápiás stratégiák hiánya indokolja. Ezek mellett szándékunkban állt egy „újszerű” genetikai és módszertani megközelítéssel eredményre jutni a betegség jellemzése és molekuláris hátterének mélyebb megértése érdekében. Ehhez a miRNS-ekre, mint fehérjét nem kódoló, kisméretű, poszttranszkripcionális szintű szabályozó molekulákra esett a választásunk, melyek az utóbbi évtizedek molekuláris biológiai kutatásainak úgymond forrópontjává váltak.

Kutatásom fókuszában elsősorban új generációs technikák ötvözése (Új generációs szekvenálás (NGS), NanoString technológia) állt a miRNS-ek leghatékonyabb és legmegbízhatóbb kimutatása érdekében. Másodsorban alapvető célunk volt a miRNS-ek körében olyan új diagnosztikai és prognosztikai markereket azonosítani, melyek a klinikai gyakorlatban jelenleg alkalmazott molekuláris markereket kiegészítve lehetővé tennék a betegség megbízhatóbb diagnosztizálását, valamint progressziójának pontosabb meghatározását. Ezen felül további célunk volt az azonosított miRNS-ek bioinformatikai elemzése, majd az ily módon prediktált miRNS targetek és azok valós funkciójának mélyrehatóbb vizsgálata, illetve megerősítése mRNS szekvenálás segítségével. Végezetül pedig a kapott transzkriptomikai eredmények összevetését céloztuk meg folyadék biopsziás mintavételi eljárással nyert plazmaminták bevonásával.

Céljaink megvalósításához a Debreceni Egyetem Idegsebészeti Klinikájával, Dr. Klekner Álmos Péter idegsebész szakorvossal működünk együtt. A kollaboráció keretén belül rendelkezésünkre bocsátott GBM-es betegektől és a kontrollcsoportnak definiált alacsonyabb grádusú gliómás betegek peritumorális agyi területéről származó szövetminták, valamint a két csoportba sorolható páciensektől vett plazmaminták egyaránt rendelkezésemre álltak.

8. Betegek és módszerek

8.1. Felhasznált agyszövetminták

A munkánk első felében felhasznált intraoperatív gyorsfagyasztott szövetminták mindegyike a Debreceni Egyetem Idegsebészeti Klinika Agydaganat és Szövetbankjából származtak, melyek vizsgálatához a kutatásba bevont összes egyén írásos beleegyezését adta. A kutatásunk során használt mintákat kollaborációs partnerünk, Dr. Klekner Álmos Péter bocsátotta rendelkezésünkre. A gyűjtési folyamat során a szövetminták a műtéti eltávolítást követően még a műtőben azonnal folyékony nitrogénbe kerültek. A gyorsfagyasztás történhet egyrészt abból az okból, hogy a szövetminta sürgősséggel a patológiai laborba kerüljön kórszövetteni elemzés céljából, másrészt azért, hogy a további kutatási cézzal történő feldolgozásig hatékonyan megóvható legyen és stabil maradjon a különböző biológiai adatok kinyeréséig. Esetünkben ez utóbbi ok szolgált a gyorsfagyasztás alapjául. A szövetek hosszabb távú tárolása pedig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ – os ultramélyhűtőben történt.

Kutatásunk első fázisában a fent említett szövet-pool-ból 5-5 db szövetmintát használtunk fel az új generációs RNS (miRNS és mRNS) szekvenáláshoz. Az egyik csoportot a GBM-ből származó, a másikat pedig a kontrollcsoportként használt alacsonyabb grádusú gliómák (1-2 grádus) peritumorális régiójából származó minták képezték. A páciensek demográfiai és klinikai adatait a vonatkozó kórlapok áttekintéséből gyűjtöttük össze (**1. táblázat**). A GBM-es betegek átlagéletkora 63 év, míg a kontrollcsoport résztvevőie 64 év volt. Ezen kontrollként alkalmazott szövetek mindegyike esetén hisztopatológiai vizsgálat segítségével került megerősítésre, hogy egyértelműen peritumorális, tehát tumorsejtektől mentes agyállományról van szó. A kontrollok mellett a betegcsoportba tartozó minták is szövetteni megerősítés után kerültek felhasználásra. A GBM csoportban résztvevő egyének kiválasztása során ügyeltünk arra, hogy egyikük se részesüljön kemoterápiában és/vagy sugárterápiában a kutatásba történő bevonást megelőzően.

Kutatásunkat az Egészségügyi Minisztérium Orvostudományi Kutatási Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága, Budapest, Magyarország az alábbi engedéllyel jóváhagyta: ETT TUKEB; projektazonosító kód: IV/1753-/2021/EKU.

1. táblázat: Az új generációs RNS szekvenálásokhoz felhasznált 5 kontroll- és 5 GBM-es beteg nemére (F – férfi, N – nő), életkorára és immunhisztokémiai jellemzőire vonatkozó adatok.

Minták	Nem	Kor	Immunhisztokémiai jellemző
Kontroll_1	F	70	-
Kontroll_2	F	52	-
Kontroll_3	F	52	-
Kontroll_4	N	71	-
Kontroll_5	N	80	-
GBM_1	F	65	IDH vad típus
GBM_2	F	57	IDH vad típus
GBM_3	F	70	IDH vad típus
GBM_4	N	60	IDH vad típus
GBM_5	N	56	IDH vad típus

8.1.1. Totál RNS izolálás agyszövetmintából

Az új generációs miRNS és mRNS szekvenáláshoz szükséges miRNS frakciót is tartalmazó totál RNS-ek tisztítása a 8.1. fejezetben említett 5-5 db szövetmintából a miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Németország) felhasználásával történt. Ez az izoláló kit a fenol/guanidin alapú lízist és a szilika membrán alapú tisztítást egyesítve lehetőséget nyújt a sejtenyészetek és a különféle állati szövetek mellett az emberi szövetből történő totál RNS és egyéb kis RNS molekulák magas kihozatalú tisztítására. Emellett számunka fontos sajátossága, hogy a mondhatni nehezen izolálható szövetekből is - amilyen az agyszövet is - kimagasló effektivitással képes az RNS molekulák kinyerésére. Kísérletünk megtervezése során ez a tulajdonsága jelentette kiválasztásának egyik okát, továbbá az a tény, hogy a miRNS-ekkel végzett kutatáshoz a Qiagen egy teljes „workflow” - t alkotott meg, melynek a miRNeasy Mini Kit az egyik tagja.

Az izolálás során mind a tíz agyszövetmintából egyaránt 30 mg került felhasználásra a kapott eredmények minél precízebb összevethetősége érdekében. A szövetek előkészítése, felaprítása jégre helyezett és előzetesen hűtött tárgylemezeken történt meg. Ezt követően a felaprított szövetek a lehető legrövidebb időn belül QIAzol lízis reagensbe kerültek, melyből megelőzően 700 µl került kimérésre a mintaszámmal megegyező mennyiségű 2 ml-es gyűjtőcsövekbe. Ez a lépés jelenti az izolálás egyik legkritikusabb részét, ahol nem

késlekedhetünk az RNS minőségének megőrzése érdekében. Ugyanis ez a lízis reagens a fenol és guanidin-tiocianát tartalmából adódóan a DNS molekulák és a fehérjék nagy részének eltávolítása mellett a szövetek lízisének megkönnyítésével és az RNázok gátlásával elősegíti a mintában lévő RNS molekulák kijutását, valamint azok degradációtól való védelmét. A szövetminták feltárásának hatékonyságát a QIAzol oldat mellett fizikálisan, 1-1 db rozsdamentes acélgyöngy hozzáadásával is elősegítettük. Ezt követően történt meg a tényleges feltárási folyamat, amely 5 percen át 2000 xg sebességgel zajlott MagNa Lyser készülék segítségével. Ezt egy rövid inkubálási lépés (4°C-on 3 percig) követte az esetlegesen fellépő habosodás megszüntetése céljából. Az inkubációt követően a keletkezett lizátum viszkozitásának csökkentése érdekében a mintáinkat 2 percen át ugyancsak 2000 xg sebességgel homogenizáltuk. Ez szintén egy kritikus lépése az izolálási folyamatnak, ugyanis inkomplett homogenizáció fennállásakor a tisztítani kívánt RNS molekulák nem képesek megfelelően kötődni a tisztító oszlop szilika membránjához, amely nagymértékben redukálja a kinyerhető RNS mennyiségét.

A feltárási és homogenizálási lépést szobahőmérsékleten (RT) történő inkubáció (4-5 perc) követte. Ezután vegyi fülke alatt 140 µl kloroformot adtunk az egyes mintákhoz, majd 15 mp-en át erősen ráztuk őket, amit újabb, 2-3 perces RT-n történő inkubáció követett. Az inkubálás után a homogenizátumokat 15 percen át 4°C-on, 12.000 xg sebességgel centrifugáltuk a fázisszeparáció elősegítése céljából. A centrifugálást követően 3 fázisra váltak szét a mintáink; a felső vizes-, a középső inter-, és az alsó szerves fázisokra, melyek közül a számunkra fontos RNS molekulákat a vizes fázis tartalmazta, így a továbbiakban ezzel a fázissal folytattuk tovább az izolálási folyamatot. Az interfázisban DNS molekulák, míg a szerves fázisban fehérjék találhatóak, mely utóbbiak az interfázisban is előfordulhatnak. Így a további lépések során rendkívül lényeges volt a vizes fázis pontos eltávolítása, az esetleges fehérje vagy DNS „szennyeződés” elkerülése végett.

A fázisok szétválását követő mosási és centrifugálási lépések mindegyike RT-n történt.

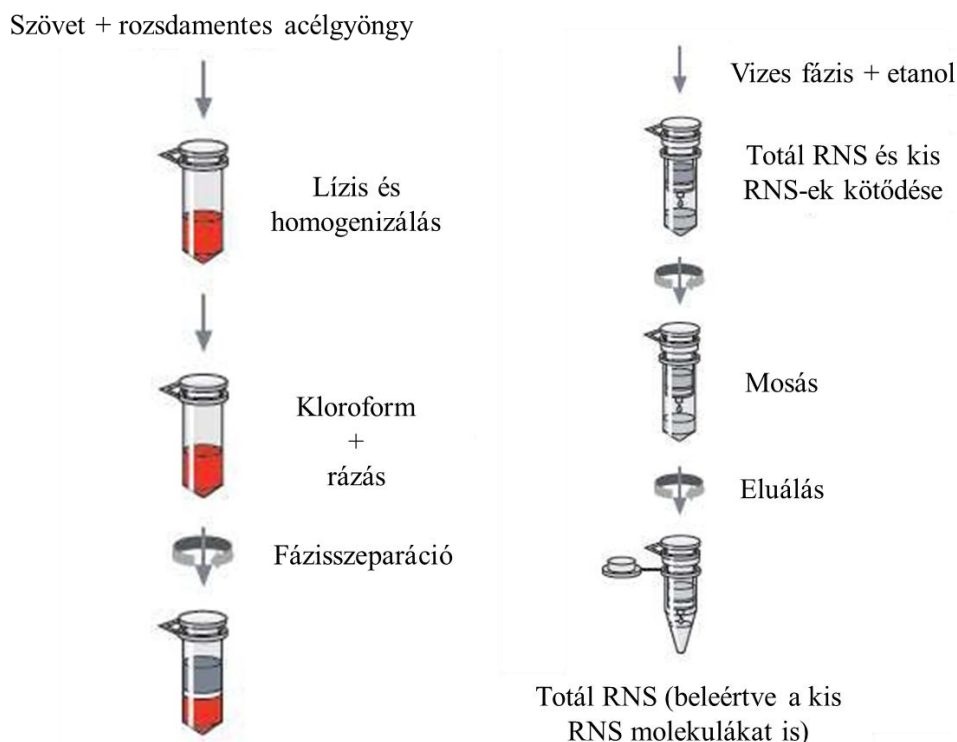
A vizes fázisból 350 µl mennyiséget mértünk át egy, a kit-ben lévő új gyűjtőcsőbe, majd 1,5 térfogatnyi (525 µl) 100%-os etanollal vegyítettük a mintákat többszöri fel-le pipettázással, mellyel biztosítottuk a 18 nukleotidtól nagyobb méretű RNS molekulák membránhoz történő kötődésének megfelelő körülményeit, valamint a fenol és egyéb szennyeződések eltávolítását a mintákból. Ettől a mosási lépéstől fogva a kit-ben lévő szilika membránt tartalmazó RNeasy Mini oszlopokkal folytattuk a tisztítási folyamatot, melynek során két részre osztva adtuk a mintákat az oszlophoz és mindkét alkalommal 12.000 xg sebességgel, 15 mp-ig centrifugáltuk

őket. A protokoll következő, DNáz emésztésre vonatkozó lépése ez esetben kihagyásra került, ugyanis szekvenálásra izoláltunk és így biztosítottuk annak zavartalan kivitelezhetőségét.

Azonban amikor a szekvenálás eredményének validálásához történt a totál RNS izolálása, akkor ez a lépés beiktatásra került. Ennek során az RNase-Free DNase Set (DNase I törzsoldat + RDD puffer) felhasználásával végeztük el a DNS molekulák emésztését, melynek érdekében először 350 µl RWT puffert mértünk az oszlopra mosás céljából, majd 15 másodpercig 12.000 xg sebességgel centrifugáltuk és a keletkezett átfolyót kiöntöttük. Ezt követően mintánként 80 µl DNáz I Mix-et készítettünk 10 µl DNáz I törzsoldat és 70 µl RDD puffer felhasználásával, majd ezt a mixet közvetlenül az oszlop membránjára pipettáztuk, figyelve, hogy ne sértsük meg a membránt. Így inkubáltuk a mintáinkat 15 percen át, majd 350 µl RWT pufferrel mostuk az oszlopot és 15 másodpercig 12.000 xg sebességgel centrifugáltuk, majd az átfolyót kiöntöttük.

A továbbiakban 2 x 500 µl RPE pufferrel folytattuk az oszlop mosását, a két lépés közötti centrifugálási lépést beiktatva (12.000 xg sebességgel, 15 mp-ig, átfolyó kiöntése). A mosási lépéseket követően az RNeasy Mini oszlopot egy új gyűjtőcsőbe helyezve, maximális sebességgel centrifugáltuk 1 percen át a membrán teljes megszáradása érdekében. Végezetül a kit-ben lévő új 1,5 ml-es gyűjtőcsövekbe helyeztük az oszlopokat és 30 µl RNáz – mentes vizet pipettáztunk közvetlenül az oszlop membránjára. Ezt követően 2 percen át RT-n inkubáltuk, majd az RNS eluálásához 12.000 xg sebességgel 1 percig centrifugáltuk a csöveket (**9. ábra**).

A protokoll befejezéseként Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) spektrofotométer segítségével, az A260/A280 és A260/A230 abszorbancia arányok alapján nyertünk információt az izolált RNS mintáink koncentrációjáról és minőségéről. Az eluátumok ezt követő tárolását a további felhasználásuk határozta meg. Az izolálást követő komplementer DNS (cDNS) szintézis, majd RT-qPCR mérés esetén jégen, későbbi felhasználás esetén pedig - 80 °C-on történt tárolásuk.



9. ábra: A miRNeasy Mini Kit-tel történő totál RNS izolálás protokolljának főbb lépései. (Forrás: <https://www.qiagen.com/>; miRNeasy Mini Kit Handbook).

8.1.2. Új generációs RNS (miRNS és mRNS) szekvenálás

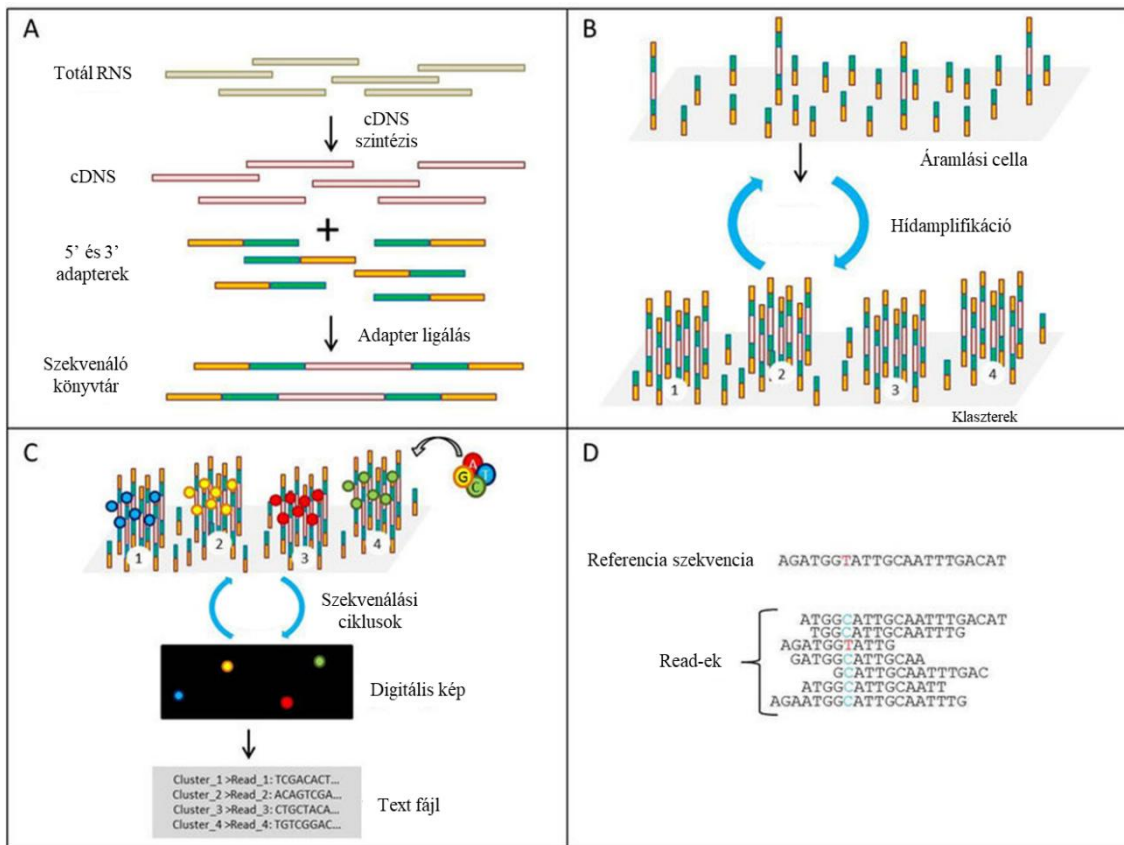
Az elmúlt néhány évtized technológiai fejlődésének köszönhetően ma már meglehetősen rövid idő alatt, a korábbi technikához képest nagyobb pontossággal és költséghatékonyan vagyunk képesek a teljes emberi genom nukleotid sorrendjének meghatározására. Ez az ugrásszerű fejlődés nemcsak az alapkutatásokat tette hatékonyabbá, hanem az orvostudomány fejlődése felé is új kapukat nyitott meg. Ennek a folyamatnak az alapkövét az 1996-ban induló, majd 2001-ben lezárult Humán Genom Projekt rakta le. Az új generációs szekvenálási (NGS) technikák lehetőséget teremtenek nagyszámú biológiai minta úgynevezett „high throughput” – azaz nagy áteresztőképességgel végzett paralel vizsgálatára. Ennek során egyidőben több száz (akár milliányi) rövid, néhány száz bázispáros DNS szakasz meghatározása zajlik, melyeket végül a referencia genomhoz történő illesztés után értékelnek ki.

Az NGS egyik, esetünkben is alkalmazott típusa a kis RNS szekvenálás („Small RNA-Seq”), melynek segítségével a vizsgált mintákban egyidőben jelenlévő és expressziós változást mutató RNS molekulákról tudunk információt nyerni. Ennek köszönhetően képesek vagyunk

tájékozódni többek között egy adott patológiás állapot során kialakuló és abban részt vevő gének fiziológiástól eltérő kifejeződéséről. Így átfogó képet kaphatunk a teljes transzkriptomról, mely ismeret a továbbiakban különböző kutatások alapjául szolgálhat.

A kutatásunk során alkalmazott kis RNS szekvenálás lépéseit a könyvtárkészítéstől a nyers adatok elemzéséig a Debreceni Egyetem Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriuma (Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék) végezte Illumina NextSeq 500 készülékkel, szintézisen alapuló „paired-end” szekvenálási módszert alkalmazva. A folyamat első lépéseként az általunk izolált totál RNS molekulák SDS poliakrilamid gélelektroforézissel történő fázisszeparációját követően kiválogatták a kis (17-25 nt) RNS frakciót, majd 3' és 5' adaptereket ligáltak az RNS fragmentek végeihez. Az ezt követő reverz transzkripciójuk és PCR amplifikációjuk után egy szilárd hordozó felszínén (flow cell) lévő, adaptervégződéseikkel komplementer oligonukleotid horgonyokhoz rögzítették őket, majd a hordozó felületén megtörtént az adott fragmentek klonális amplifikációja úgynevezett hídamplifikációs eljárással. Ennek során a kihorgonyzott DNS szálakat megszintetizálták, majd azok szabad adaptervégződésüknél fogva hídszerűen meghajolva hozzákapcsolódtak a szilárd hordozón lévő komplementer oligonukleotid primerekhez, majd az amplifikációs lépést követően a reverz szálakat kimosták a rendszerből. Végezetül ezeken a klonálisan felamplifikált szálakon zajlott a szekvenálás, melyhez fluoreszcens jelöléssel ellátott dezoxi-ribonukleotid-trifoszfátokat (dNTP) használtak, melyek detektálása az egyes nukleotidok bekötődésével párhuzamosan zajlott (**10. ábra**). Az általunk izolált RNS minták szekvenálást megelőző minőségellenőrzését Agilent Bioanalyzer készülék és Eukaryotic Total RNA Nano Kit segítségével végezték a gyártó utasításait követve. A genomi könyvtárkészítéshez azon RNS minták kerültek kiválasztásra, amelyek esetében az úgynevezett RIN érték (RNS integritás szám) magasabb volt, mint 7. Maga a könyvtárkészítési folyamat a NEBNext Multiplex Small RNA Prep Set for Illumina (1-48) 96 rxn kit (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) alkalmazásával 1 µg totál RNS felhasználásával valósult meg. Az RNS szekvenálási könyvtárak elkészítéséhez a felhasznált mintákból a NEBNext® rRNA Depletion és az Ultra II RNA Sample Prep Kit (New England BioLabs) segítségével kerültek eltávolításra a riboszómlis RNS (rRNS) molekulák. Az elkészített könyvtárak fragmentum méretének eloszlása és molaritása (anyagmennyiség-koncentráció) Agilent Bioanalyzer DNA 1000 chip-en került ellenőrzésre (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

A szekvenálás végeztével a kapott nyers adatokat (fastq) a miRNS-ek esetében a Novoalign, míg az mRNS-ek esetében a HISAT2 algoritmus segítségével illesztették a humán referencia genomhoz (GRCh38). Ezt követően BAM – fájlokat generáltak, melyek további elemzését és az adatok normalizálását a StrandNGS 2.8 szoftver (Strand Life Sciences, Bangalore, India) DESeq2 algoritmusával végezték.



10. ábra: Az új generációs RNS szekvenálási folyamat főbb lépései (Juarez, 2017). Az „A” képkockán a könyvtárkészítésnek, a „B”-n a hídamplifikációval történő klaszterképzésnek, míg a „C”-n a szintézissel történő szekvenálásnak és az azzal párhuzamosan zajló fluoreszcens jelek detektálásának, majd a kapott eredmények kiértékelésének („D”) folyamata látható.

8.1.3. Az új generációs szekvenálással nyert adatok bioinformatikai analízise

A szekvenálások eredményeként nyert eltérő mértékben expresszáladott miRNS-ek és mRNS-ek normalizált eredményeit használtuk fel a transzkriptomban bekövetkezett változások mértékének megállapításához a GBM-kontrollcsoport összehasonlításban. Ezen adatok bioinformatikai kiértékelésére az iDEP.96 integrált webes programot használtuk (<http://bioinformatics.sdstate.edu/idep96>). Az analízis úgymond előszűrési lépéseként az alacsony, vagy expressziós változást nem mutató miRNS-eket és mRNS-eket a program segítségével kiszűrtük (\geq CPM 1 minden könyvtárban), így csak a biológiailag releváns eltérésekkel dolgoztunk tovább. Az ezt követő elemzési lépések során hierarchikus és k-közép klaszterezést, valamint főkomponens elemzést végeztünk. Továbbá azonosítottuk az eltérő mértékben expresszáladott géneket ($FC \geq 2$ és $FDR \leq 0,05$ beállítások mellett) a program DESeq2 csomagjának segítségével.

8.1.4. In silico miRNS célgén-predikció, fehérje-fehérje kölcsönhatáson alapuló hálózatok építése, gén ontológiai, funkcionális annotációs és útvonal analízis

Az eltérő mértékű expressziót mutató miRNS-ek lehetséges target génjeit a web-alapú miRNet és miRNA Enrichment Analysis and Annotation (miEAA) programokkal azonosítottuk, melyek a miRTargetLink 2.0 adatbázis alapján végezték a célpontok predikcióját. Az analízis során kizárólag a kísérletesen validált célgéneket vettük figyelembe, melyek más kutatócsoportok által, különböző molekuláris biológiai módszerekkel (reporter assay, western blott, qPCR) korábban már megerősítésre kerültek. Ezek alapján a miRNet segítségével miRNS-target hálózatot alkottunk, melyben a top miRNS-ek a „degree centrality” (fokszám-központiság) értékük alapján kerültek meghatározásra, mely érték az adott csomópontba beérkező és/vagy abból kiinduló kapcsolatok számát határozza meg.

Emellett a NetworkAnalyst 3.0 vizuális analitikai platform segítségével átfogó fehérje-fehérje interakciós (PPI) hálózatokat hoztunk létre a top 50 up- és downregulált mRNS, illetve miRNS felhasználásával, ahol a hub, azaz központi fehérjéket az előbb leírtakhoz hasonlóan „degree centrality” értékük szerint rangsoroltuk. Ezt követően ugyancsak a NetworkAnalyst 3.0 platform használatával hálózat-alapú, biológiai folyamatokat leíró gén ontológiát (GO), valamint funkcionális dúsulási és útvonalelemzést végeztünk a platform Kyoto Encyclopedia

of Genes and Genomes (KEGG) adatbázisának útvonal-dúsító opciójával. Az elemzés során a $<0,05$ p -értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

8.1.5. A miRNS szekvenálás eredményeinek validálása RT-qPCR módszerrel

A szekvenálással kapott eredmények megerősítését nagyobb mintaszám bevonásával végeztük el, melyhez 28 kontroll és 30 GBM szövetmintát használtunk fel. A méréshez szükséges totál RNS izolálása a 8.2. fejezetben részletezett miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Németország) gyártó által meghatározott protokollja alapján történt úgyszintén 30 mg szövetminta felhasználásával. A tisztított RNS koncentrációját és minőségét Nanodrop spektrofotométerrel (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) mértük.

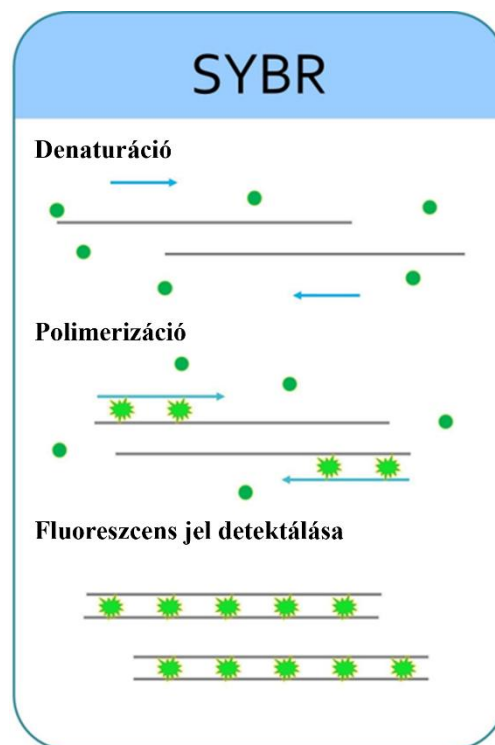
A validálási folyamat valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR) módszerrel, LightCycler® 96 (Roche, Pleasanton, Kalifornia, USA) készülék segítségével zajlott, amely 96 minta egyidejű analizisét teszi lehetővé nagy pontossággal és meglehetősen rövid idő alatt (~1,5 óra). Gyorsasága többek között annak köszönhető, hogy a készülék kevesebb, mint 1 másodperc alatt képes mind a 96 well szimultán detektálására.

Mivel ez a módszer kiindulási mintaként DNS-t igényel, így először el kellett végeznünk a miRNS frakciót is tartalmazó totál RNS mintáink cDNS-sé való átírását reverz transzkripció segítségével. Ehhez a miRCURY LNA RT Kit-et (Qiagen, Hilden, Németország) használtuk, melynek komponenseivel az alábbi 10 μ l végtérfogatú reakció mix-et állítottuk össze mintánként:

- 2 μ l miRCURY RT Probe Reaction puffer
- 5 μ l RNáz-mentes víz
- 2 μ l templát RNS (előzetesen 5 ng/ μ l koncentrációra hígított)
- 1 μ l 10x miRCURY RT Enzyme Mix

Az ezt követő cDNS szintézis során a reakcióelegyet először 60 percen át 42 °C-on, majd további 5 percig 95 °C-on inkubáltuk a reverz transzkriptáz enzim deaktiválása céljából. Az így kapott reverz transzkripció reakciókat az RT-qPCR reakció kivitelezéséig jégen tartottuk. Hosszabb távú tárolásuk pedig -80 °C-on történt.

Az RT-qPCR méréseket a miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Németország) felhasználásával végeztük, mely tartalmazta a reakció során keletkezett DNS mennyiség meghatározására alkalmas SYBR Green festéket, mely a nem-specifikus detektáláshoz leggyakrabban használt interkalálódó festéktípus. A SYBR Green a DNS molekula két szála közé beékelődve és rögzülve nagyon jó fluorofórrá válik, ugyanis ebben az állapotában emissziós szintje számottevően megnő (akár 100-200x-osára), mely tulajdonsága lehetővé teszi az egyes ciklusokban keletkezett PCR termékek valós idejű számszerűsítését (**11. ábra**).



11. ábra: A SYBR Green festék interkalációjának folyamata az RT-qPCR polimerizációs lépése során. Az ábrán látható, hogy kötött állapotban jelentősen megnő a festék emissziós szintje. (Forrás: SMOBIO Technology, Inc., <https://www.smobio.com/faq-real-time-pcr>)

A validálni kívánt érett miRNS-ek kimutatására és mennyiségük meghatározására kereskedelmi forgalomban kapható primereket (miRCURY LNA miRNA PCR Assay-t (Qiagen, Hilden, Németország)) használtunk fel, így részünkről ez külön tervezési lépést nem igényelt. Referencia génként a stabil és konstitutív expresszióval jellemezhető hsa-miR-103a-3p-t használtuk, melynek kiválasztásához a szakirodalomban elérhető ismeretek szolgáltattak alapot.

Az RT-qPCR reakcióhoz szükséges „Master Mix” - hez az alábbi komponenseket mértük össze mintánként:

- 5 µl 2x miRCURY SYBR Green Master Mix
- 3 µl cDNS templát (a protokoll alapján előzetesen 60x-osára hígított)
- 1 µl RNáz mentes víz

Végül a kapott elegyből 9-9 µl-t adtunk a PCR plate megfelelő well-jeibe, majd mindegyikhez egységesen 1-1 µl specifikus primer mixet mértünk.

A RT-qPCR reakció körülményeit a következőképpen állítottuk be (**12. ábra**):

Kezdeti denaturációs lépés: 95 °C, 120 másodperc.

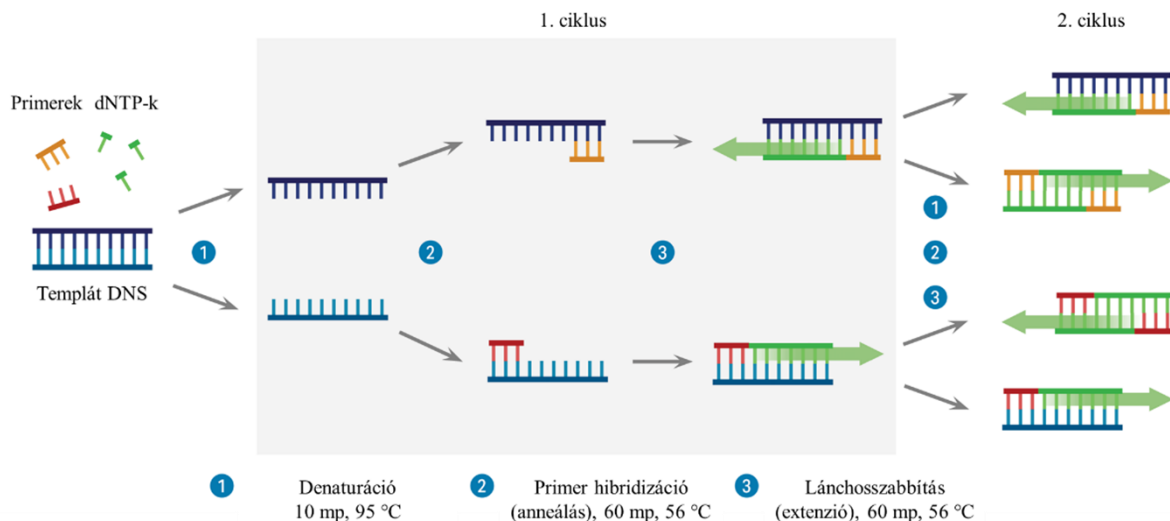
A 2. ciklustól a 40. ciklusig:

- Denaturációs lépés: 95 °C, 10 másodperc - a DNS szálak szétválását eredményezi.
- Primer hibridizáció (anneálás) és lánchosszabbítás (elongáció): 56 °C, 60 másodperc - a primerek megfelelő helyre történő bekötődése után a DNS polimeráz enzim megszintetizálja a komplementer DNS szálát.

Olvadási görbe (melting curve) analízis:

- 95 °C, 20 másodperc
- 40 °C, 20 másodperc
- 85 °C, 1 másodperc

Hűtési lépés: 37 °C, 30 másodperc

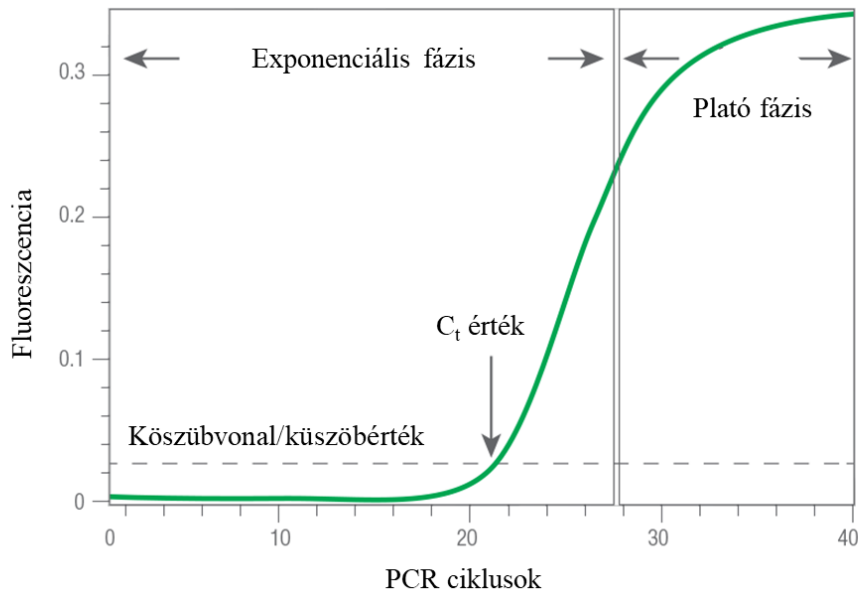


12. ábra: Az RT-qPCR reakció főbb lépései (Forrás: <https://www.aatbio.com/>).

A 40 PCR ciklus során keletkező termék mennyiségének és a fluoreszcens jel intenzitásának korrelációja alapján meghatározhatóak az egyes amplifikációs görbék, melyekről értékes információkat olvashatunk le. Az egyik ilyen fontos adat az úgynevezett Ct-érték, mely a küszöbérték átlépéséhez szükséges ciklusszámot jelöli, ami felett a PCR reakció során kimutathatóvá válik az adott célgén jelenléte. Emellett ez a szám szolgál alapjául a kiindulási templát-DNS mennyiség meghatározásának is. A másik lényeges paraméter az exponenciális fázist jelölő szakasz, amely során a vizsgálni kívánt DNS szakaszok sokszorozódása exponenciálisan történik. Az ezt követő plató fázis felé közeledve egyre csökken az amplifikáció mértéke, ami a reakció-hatékonyság csökkenésének eredménye, mely a reakció során folyamatosan fogyó reagens limitáló hatásának következménye. Ennek eredményeként nem keletkezik már termék és a reakció eléri a plató fázist (**13. ábra**).

Fontos azonban, hogy az expressziós változás kvantitálására ne a késői exponenciális vagy a plató fázisban kerüljön sor, hanem az exponenciális fázis korai szakaszában, ugyanis ekkor még az összes reagens feleslegben van jelen a reakcióközegben, valamint a DNS-polimeráz enzim is nagy hatékonysággal működik, ezáltal pontosabb eredményeket kapunk.

A vizsgált miRNS-ek relatív expressziós szintjét komparatív Ct módszerrel számoltuk ki. A fold change (FC) értékeket a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszerrel határoztuk meg, melynek során a ΔCt -t úgy számoltuk ki, hogy a referencia gén (hsa-miR-103a-3p) Ct-értékét kivontuk a cél-miRNS Ct-értékéből minden egyes minta esetén.



13. ábra: Az RT-qPCR reakció során keletkező amplifikációs görbe és annak főbb fázisai (Forrás: <https://www.bio-rad.com/>).

8.1.6. Az mRNS szekvenálás eredményeinek validálása RT-qPCR módszerrel

Az mRNS szekvenálással nyert eredmények megerősítése ugyanazon totál RNS minták felhasználásával történt, mint a miRNS szekvenálás validálása esetében. Azonban a két procedúra között voltak különbségek a felhasznált minták mennyiségét és az alkalmazott kitéket illetően. Ebben az esetben az RT-qPCR reakcióhoz szükséges cDNS molekulák átírása 500 ng totál RNS felhasználásával a Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével, a gyártó utasításait követve, 20 μ l végtérfogatban történt.

Melyhez az esetleges genomi DNS maradványok degradálása érdekében

- 1 μ l 10x dsDNase Buffer-t
- 1 μ l dsDNase-t
- összesen 8 μ l nukleáz mentes vizet és templát RNS-t mértünk össze, attól függően, hogy hány μ l totál RNS tartalmazta az 500 ng RNS mennyiséget.

A kapott elegyet 2 percig 37°C-on inkubáltuk a degradációs folyamat lezajlása érdekében, majd jégen tartottuk őket a reakció mix összeállításáig, mely az alábbi komponenseket tartalmazta:

- 4 µl 5x Reaction Mix
- 2 µl Maxima Enzyme Mix
- 4 µl nukleáz mentes víz

A két elegy összevegyítését követően a cDNS szintézis érdekében 10 percig 25 °C-on, 15 percig 50 °C-on, valamint 5 percig 85 °C-on inkubáltuk a mintákat. A validálásra az iDEP analízis és a szekvenálás normalizált adatai alapján az alábbi 14 mRNS gén került kiválasztásra: *E2F2*, *HOXD13*, *VEGFA*, *CDC45*, *AURKB*, *HOXC10*, *MYBL2*, *FABP6*, *PRLHR*, *NEUROD6*, *CBLN1*, *HRH3*, *HCN1* és *RELN*, melyek relatív expresszióját a Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix és a Lightcycler® 96 (Roche, Pleasanton, Kalifornia, USA) készülék segítségével határoztuk meg, referencia génként a *GAPDH*-t használva.

A miRNS-ek esetében végzett validálással szemben az mRNS-ek kifejeződésének vizsgálata az általunk megtervezett primerekkel zajlott (**2. táblázat**), mely tervezési folyamatot az NCBI (National Center for Biotechnology Information – Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ) weboldalán elérhető primer tervező felület használatával hajtottunk végre. A tervezési folyamatot az alábbi specifikus beállítások alapján végeztük el: a PCR termék méretét 200 nukleotidban maximalizáltuk, a primerpárok által amplifikálandó szakaszon legalább egy intron szekvencia meglétét engedélyeztük, melynek minimális hosszúságát 100 nukleotidra állítottuk be, továbbá engedélyeztük a kiválasztott primerek esetében a splice variánsok amplifikációját is.

A tervezési folyamat kritikus lépése, hogy megtaláljuk azokat a primereket, melyekkel képesek vagyunk a megfelelő és hatékony amplifikáció elérésére, valamint a primer dimerek képződésének elkerülésére. Így a megfelelő primerek kiválasztása érdekében az alábbi szempontokat követtük:

- a guanin (G) – citozin (C) nukleotidok aránya 30-60% között legyen
- a primer hosszúsága 18-30 nukleotid tartományba essen
- az optimális olvadási hőmérséklet (T_m) 60 °C; a forward és a reverz primerek között ne legyen 2 °C-nál több T_m különbség
- a 3' self-complementarity (3' önkomplementaritás) a lehető legkisebb legyen mindkét primer esetében.

A felhasznált primerek hígítása ebben az esetben nem egységesen történt. A gyártó által, minden primerre külön meghatározott mennyiségű nukleáz mentes víz hozzáadását követően 100 uM-os oldatot kaptunk, amit az RT-qPCR reakcióhoz 10 uM-osra kellett hígítanunk.

Az RT-qPCR reakció összeállításához egy primer- és egy cDNS mix-et állítottunk össze. A PCR reakcióhoz 200 ng cDNS szükséges, így a 11 µl végtérfogatú cDNS mix-hez mintánként annyi templát DNS-t mértünk ki, amennyi tartalmazza ezt a 200 ng-ot és azt egészítettük ki annyi nukleázmentes vízzel, hogy 11 µl-t kapjunk. A primer mix-hez 12,5 µl Maxima SYBR Green qPCR Master Mix-et, valamint 0,75-0,75 µl forward és reverz primert használtunk fel mintánként. Az így kapott két elegyet a plate egyes well-jeibe mérve well-enként 25 µl végtérfogatban zajlottak az RT-qPCR mérések.

A RT-qPCR reakciót az alább feltüntetett beállítások alapján végeztük el:

Kezdeti denaturációs lépés: 95 °C, 10 perc

A 2. ciklustól a 40. ciklusig (3 step cycling):

- Denaturációs lépés: 95 °C, 15 másodperc – a DNS szálak szétválását eredményezi.
- Primer hibridizáció (anneálás): 60 °C, 30 másodperc – a primerek megfelelő helyre történő bekötődése.
- Lánchosszabbítás (elongáció): 72 °C, 30 másodperc – a primerek bekötődése után a DNS polimeráz enzim megszintetizálja a komplementer DNS szálát.

Oladási görbe (melting curve) analízis:

- 95 °C, 10 másodperc
- 65 °C, 60 másodperc
- 97 °C, 1 másodperc

Hűtési lépés: 37 °C, 30 másodperc

2. táblázat: Az RT-qPCR mérésekhez használt primerpárok listája.

Gén név	Forward primer (5'-3')	Reverz primer (5'-3')
<i>MYBL2</i>	CGGAGCAGAGGGATAGCAAG	TCCAGTCCTGCTGTCCAAAC
<i>AURKB</i>	ACCCCATCTGCACTTGTCTT	TCGGGTGTCCCCTGCTATT
<i>VEGFA</i>	CTACCTCCACCATGCCAAGT	GATAGACATCCATGAACTTCACCA
<i>CDC45</i>	CGGATGCTGCACAACCATT	GTGCGTCCAGAACTTGCTC
<i>E2F2</i>	GAAGGCCAAGAACAACATCCAG	TTGTCCTCAGTCAGGTGCTT
<i>HOXC10</i>	CACCTCGGATAACGAAGCGA	GGGCACCTCTTCTTCCTTCC
<i>HOXD13</i>	AGTCCTGGACGCTGGCTA	CCCTCTTCGGTAGACGCAC
<i>HRH3</i>	CTGCTCAACCTCGCCATCTC	CTGTCAGCACGTAGGGTACA
<i>CBLN1</i>	AGAACGCAGCACTTTCATCG	CCAGCGAAGGCTGAAATCAC
<i>RELN</i>	ATACAGCGTCAACAACGGGA	CGACCTCCACATGGTCCAAA
<i>HCN1</i>	AGACAGTTGCCATTGACCGA	CTGCACCATCTCCCTGTCAT
<i>NEUROD6</i>	CAGGAGACGATGCGACACT	TTTGCTTCTGGTCCTCGCA
<i>PRLHR</i>	TTCTTCCCGCGAGTGCTTT	CTCTGGTTGGCGGGAGTTG
<i>FABP6</i>	TCACCGGCAAGTTCGAGATG	TGCGGGCCTTTTCGATTACA
<i>GAPDH2</i>	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

8.1.7. Statisztikai analízis

A miRNS-ek és az mRNS-ek validálásával kapott adatok eloszlását egységesen a Kolmogorov-Smirnov teszttel elemeztük, melynek átlag és szórás értékeit analizálva információt nyerünk arról, hogy a vizsgált adatok normál eloszlást mutatnak-e. Mivel a mintáink nem mutattak normál eloszlást, az RT-qPCR mérésekből származó normalizált expressziós adatok statisztikai szignifikanciáját nem-parametrikus Mann-Whitney U teszttel számítottuk ki, melynek során a kontroll vs. beteg csoport között megfigyelhető expressziós különbséget $p < 0,05$ értéknél tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A validált miRNS-ek diagnosztikai hatékonyságát az EasyROC (ver. 1.3.1.) analízissel készített ROC-AUC görbék alapján határoztuk meg a szenzitivitási és specificitási értékek alapján. A ROC analízis egy

széleskörűen alkalmazott statisztikai módszer, mely rendkívül hasznos és informatív mind a molekuláris diagnosztikai, mind a biomarker vizsgálatok területén. Ugyanis megbízható adatokat szolgáltat a valódi- valamint álpozitív és negatív értékekről egy adott diagnosztikai teszt esetén. A szignifikancia szint ebben az esetben is $p < 0,05$ volt.

8.2. Felhasznált vérplazmaminták

Kutatásunk másik fontos célkitűzéseként a szövetek vizsgálatával kapott eredmények összevetését végeztük el folyadék biopsziás eljárással nyert plazmaminták vizsgálatával. A kutatásba bevont egyének mindegyike ugyancsak a Debreceni Egyetem Idegsebészeti Klinikáján állt kezelés alatt. Minden vizsgálati alanytól írásos beleegyezést kaptunk a mintájuk felhasználását illetően. A munkánkhoz felhasznált vérminták 6, szövettani vizsgálattal igazolt GBM-es betegtől, valamint 6 porckorongsérv miatt kezelés alatt álló egyéntől származtak, mely utóbbiak képezték a vizsgálatunk kontrollcsoportját (**3. táblázat**). Ez utóbbi csoportba sorolt egyének átlagéletkora 58,6 év, míg a GBM-es csoportban szereplő betegeké 61,3 év volt. Mindkét csoportban egyenlő volt a nők és a férfiak száma. A vizsgálati alanyok demográfiai és klinikai adatait a kórlapok áttekintéséből nyertük. A minták kiválasztásánál a szövetmintákhoz hasonlóan ebben az esetben is olyan GBM-es betegeket válogattunk be, akik a vizsgálatban való részvételt megelőzően se kemoterápiás, se sugárterápiás kezelésben nem részesültek. A vérminták gyűjtésére a vizsgálati alanyok kórházi felvételekor, vagy a műtéti altatást megelőzően került sor.

A teljes vérmintákat EDTA-antikoagulált csövekbe (BD Vacutainer, Euromedic, Budapest, Magyarország) gyűjtötték minden betegtől és egészséges önkéntestől. A számunkra fontos plazma kinyerése érdekében a mintavételtől számított 2 órán belül (addig -4 °C -on történt tárolásuk) a teljes vért kétlépcsős centrifugálási protokollnak vetettük alá ($2500\times g$ és $16\ 000\times g$; 10-10 perc, 4 °C). A plazma frakció elválasztása után a sejtmentes plazmamintákat aliquot-okba mértük és további felhasználásig -80 °C -on tároltuk.

Kutatásunkat az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága, Budapest, Magyarország az alábbi engedéllyel hagyta jóvá: ETT TUKEB; projekt azonosító kód: 51450/2015/EKU (0411/15).

3. táblázat: A NanoString nCounter Analízishez felhasznált 6 kontroll- és 6 GBM-es beteg nemére (F – férfi, N – nő), életkorára és immunhisztokémiai jellemzőire vonatkozó adatok.

Minták	Nem	Kor	Immunhisztokémiai jellemző
Kontroll_1	N	64	-
Kontroll_2	N	62	-
Kontroll_3	N	60	-
Kontroll_4	F	42	-
Kontroll_5	F	68	-
Kontroll_6	F	56	-
GBM_1	F	52	IDH vad típus
GBM_2	F	69	IDH vad típus
GBM_3	F	67	IDH vad típus
GBM_4	N	59	IDH vad típus
GBM_5	N	59	IDH vad típus
GBM_6	N	62	IDH vad típus

8.2.1. Totál RNS izolálás vérplazmából

A plazmából történő miRNS kimutatás az utóbbi időben nagy érdeklődést váltott ki a különböző betegségek non-invazív biomarkereinek felfedezésére irányulóan. Ezeket a törekvéseket indokolja a miRNS-ek relatíve stabil extracelluláris jelenléte, valamint az a tény, hogy számos szérumból vagy plazmából tisztított miRNS egyedi expresszióját mutatták már ki néhány daganat típus esetén.

A plazmamintákból történő sejtmentes totál RNS tisztítását – beleértve a miRNS-eket is - a miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével végeztük a gyártó utasításai szerint. A szövetek esetén felhasznált RNS izoláló kit-hez hasonlóan a miRNeasy Serum/Plasma Kit is a fenol/guanidin alapú lízist kombinálja a szilika membrán alapú tisztítással az RNS molekulák megfelelő minőségű és kihozatalú tisztítása érdekében. A kit nagy előnye, hogy meglehetősen kis mennyiségű (200 µl) plazmaminta elegendő a nagy hatékonyságú tisztításhoz.

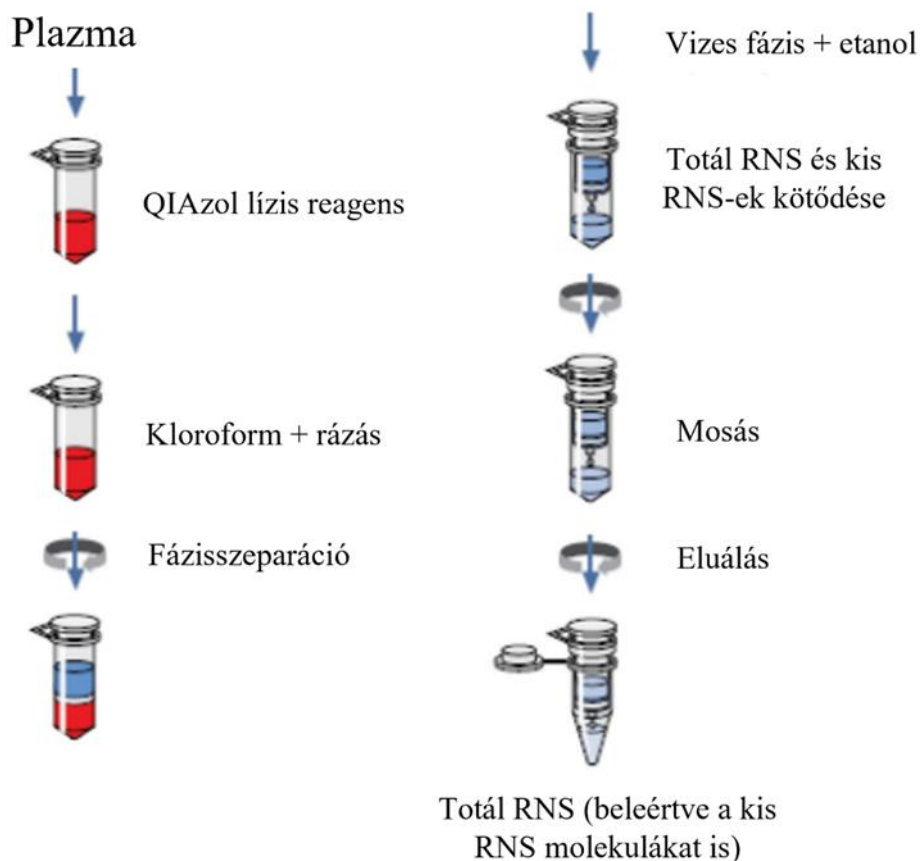
Az izolálás megkezdése előtt RT-n kiolvasztottuk a felhasználni kívánt plazmákat, majd 4°C-on 10 percig 16.000 xg sebességgel centrifugáltuk a mintákat az izolálást esetlegesen zavaró komponensek kiülepítése érdekében. Ezt követően a centrifugált mintákat jégre helyeztük és kiindulási mennyiségként mindegyikből 200 µl-t mértünk steril eppendorf csövekbe. A plazmák megmaradt részét további feldolgozásig - 80°C-on tároltuk. Ezt követően elszívó fülke alatt 5 térfogatrészt QIAzol lízis reagenst (200 µl kiindulási plazma mennyiség esetén 1000 µl) adtunk a mintáinkhoz a lízis megkönnyítése mellett a fehérje komplexek és RNázok denaturálása, valamint a maradék DNS és fehérje nagy részének szerves extrakcióval történő eltávolítása érdekében. A QIAzol - al történő vortexelést követően 5 percig inkubáltuk a mintáinkat RT-n. Az 5 perc letelte után ugyancsak elszívó fülke alatt a kiindulási minta térfogatával megegyező mennyiségű (200 µl) kloroformot adtunk a mintákhoz, majd 15 másodpercen át erősen ráztuk őket. Ezzel a lépéssel elősegítve a következő centrifugálás során bekövetkező fázisszeparációt, mely előtt egy újabb 5 perces inkubáció következett RT-n. Az inkubációs idő letelte után 4°C-on 15 percig 12.000 xg sebességgel centrifugáltuk a mintákat, majd a fázisok szétválását követően az RNS molekulákat tartalmazó felső vizes fázissal dolgoztunk tovább. Ezt a fázist (200 µl minta esetén 600 µl) óvatosan új gyűjtőcsöbe pipettáztuk ügyelve arra, hogy az interfázisból ne kerüljön át semmi.

A további lépések mindegyike RT-n zajlott.

A vizes fázis átmérését követően 1,5 térfogatrészt (600 µl vizes fázis esetén 900 µl) 100%-os etanolt adtunk a csövekhez, majd alaposan elegyítettük a vizes fázissal többszöri fel-le pipettázással. Ezzel biztosítva az RNS molekulák szilika membránhoz történő kötődésének megfelelő körülményeit. Ezt követték az oszlopos tisztítási lépések, melyek során maximum 700 µl mintát mértünk az RNeasy MinElute Spin oszlopokra és 8000 xg sebességgel 1 percig centrifugáltuk RT-n, majd az átfolyót kiöntöttük. Ezt a lépést addig ismételtük, amíg az összes minta maradéktalanul az oszlopra nem került. Az ezt követő mosási lépések részeként először 700 µl RWT puffert mértünk az oszlopra, amit egy újabb centrifugálás (8000 xg, 1 perc, RT) követett. Ezt követően 500 µl RPE pufferrel folytattuk a mosást, majd a centrifugálás (8000 xg, 1 perc, RT) után 500 µl 80%-os etanollal zártuk a folyamatot, melyet 2 percen át, 8000 xg sebességgel végzett centrifugálás követett. A mosás befejezését követően az RNeasy MinElute Spin oszlopokat a kit-ben lévő új 2 ml-es gyűjtőcsövekbe helyeztük, majd 16.000 xg sebességgel 5 percen át centrifugáltuk a membránok teljes megszáradása érdekében. Végezetül új 1,5 ml-es gyűjtőcsövekbe helyeztük az oszlopokat, majd 15 µl RNáz mentes vizet mértünk

közvetlenül a membránra, ügyelve, hogy ne sértsük fel. 5 perc RT-n történő inkubációt követően teljes sebességgel 1 percen át centrifugáltuk a mintákat eluálás céljából. (14. ábra).

Az izolálás végeztével Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) spektrofotométer segítségével, az A260/A280 és A260/A230 abszorbancia arányok alapján nyertünk információt az izolált RNS mintáink koncentrációjáról és minőségéről. Az eluátumok ezt követő tárolását a további felhasználásuk határozta meg. Az izolálást követő cDNS szintézis, majd RT-qPCR mérés esetén jégen, későbbi felhasználás esetén pedig -80 °C-on történt tárolásuk.



14. ábra: A miRNeasy Serum/Plasma Kit-tel történő totál RNS izolálás protokolljának főbb lépései. (Forrás: <https://www.qiagen.com/>; miRNeasy Serum/Plasma Handbook).

Az izolálással nyert érett miRNS-ek reverz transzkripcióját a miScript II RT Kit használatával hajtottuk végre a gyártó utasításait követve. A reakcióhoz szükséges 20 µl végtérfogatú elegy az alábbi összetevőket tartalmazta:

- 4 µl 5x miScript HiSpec Buffer
- 2 µl 10x miScript Nucleics Mix
- 2 µl miScript Reverse Transcriptase Mix

- 10 ng templát RNS
- nukleáz mentes víz

A kész elegyeket a reverz transzkripció reakció során 60 percig 37 °C-on, majd 5 percig 95 °C-on inkubáltuk. Utóbbi lépés biztosította a reverz transzkriptáz enzim inaktiválását.

A reakció lezajlása után a cDNS-ek koncentrációját Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fischer Scientific, USA) segítségével határoztuk meg, melyhez 2 µl cDNS-t vegyítettünk 198 µl, a Qubit™ dsDNA Quantification Assay Kit-ben lévő DNA Reagent Buffer és DNA reagent 200:1 arányú elegyével. Az összemérést rövid vortexelés után 2 percig tartó inkubálás követte RT-n, majd megmértük az egyes mintákban lévő cDNS-ek mennyiségét.

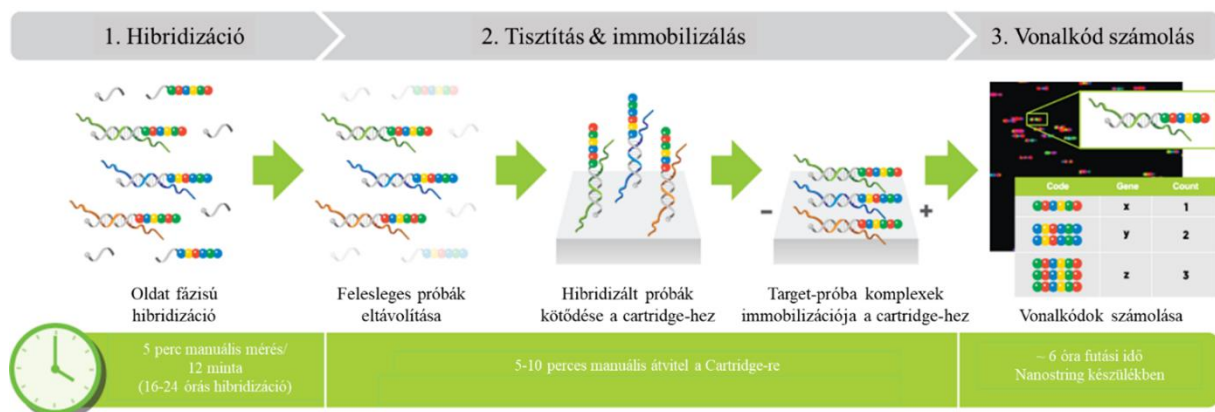
8.2.2. Eltérő mértékben expresszálódott miRNS-ek azonosítása NanoString analízissel

A kontroll, illetve a GBM-es betegektől származó plazmaminták miRNS expressziós mintázata a NanoString nCounter Analysis System (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA) nCounter Human v3 miRNS panel alkalmazásával került meghatározásra, mely rendkívül nagy érzékenységgel képes detektálni az eltérő expressziót mutató miRNS-eket még olyan kihívást jelentő mintatípusokban is, mint a plazma, melyről jól tudjuk, hogy nagyon alacsony koncentrációban (tapasztalatunk alapján az esetek legnagyobb részében ~20-100 ng/µl) tartalmazza például a sejtmentes miRNS-eket.

Magát az RNS izolálást követő mérési folyamat az RT-Europe Kutató Központban, Mosonmagyaróváron történt. A módszer speciális működési elvének köszönhetően multiplex gén kvantifikációt tesz lehetővé egy enzimmentes, hibridizáción alapuló technológia segítségével, amplifikációs és reverz transzkripció lépés nélkül, molekuláris vonalkódok segítségével. Ezek alapján elmondható, hogy ez a módszer egy egyszerű és gyors biomarker vizsgálatot tesz lehetővé, melynek magyarázata, hogy szinte az összes miRNS „read” 200-300 miRNS-hez társul, így előnyösebb egy olyan platformmal analizálni, amely maximalizálja a biológiailag releváns lefedettséget (<https://nanosttring.com/products/ncounter-assays-panels/immunology/mirna-expression-panels>).

A NanoString technológia egyetlen reakcióban 798 - a miRBase adatbázis alapján biológiailag és klinikailag leginkább releváns - érett miRNS molekulát képes egyszerre detektálni, és a miRNS expresszió közvetlen digitális mérésén alapul. A folyamatban egy próba

pár vesz részt. A pár egyik tagja a riporter próba, aminek az 5' végén található fluoreszkáló szegmensek hat pozíciós, négy színből álló színkódot alkotnak, amely az összes tesztelt miRNS esetében egyedi. A másik a capture próba, ami a 3'-végen biotint hordoz, mely a NanoString mintakazettáinak felületén (cartridge) lévő streptavidin réteghez való kötődésért és ezáltal a miRNS targe-próba komplexek immobilizálásáért felelős. Az analízis során először a capture és a riporter próba párokat összekeverik a totál RNS-sel (100 ng). Majd az oldatfázisú overnight hibridizáció során (16-24 óra, 65 °C) a próba párok szekvencia specifikusan felismerik a target miRNS-eket. A hibridizációt követően a target-próba komplexek a NanoString mintakazettáinak felületéhez kötődnek, majd immobilizálódnak és a felszínéhez simulnak. A hibridizáció után a minták az nCounter készülékbe kerülnek, amely egy kétlépcsős, automatizált mágneses gyöngy alapú tisztítással eltávolítja a felesleges, nem kötődött próbákat. Végül a komplexeket az nCounter Digital Analyzer készülék (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA) automata fluoreszcens mikroszkópja szkenneli, nagy sűrűségű szkennelést (600 látómező) alkalmazva, majd a vonalkódokat minden egyes célmolekula esetében megszámlolja és az egyes mintákban jelen lévő cél RNS molekulákat számszerűsíti, melyek egy szoftver segítségével kerülnek elemzésre (15. ábra).



15. ábra: Az nCounter NanoString technológia fő lépéseinek áttekintő ábrája. (Forrás: <https://nanosttring.com/>)

A kapott adatok háttérkorrekcióját a negatív kontrollok átlagos ± 2 standard deviációjának kivonásával végezték. A sávonkénti technikai eltérést a pozitív kontrollok mértani középértékével korrigálták. A korrekció után egy független előszűrési lépést hajtottak végre, annak érdekében, hogy minden olyan miRNS eltávolításra kerüljön, amely a minták bármelyikében háromnál kevesebbszer volt jelen. Ezt követően a GBM és kontrollcsoport között szignifikánsan eltérő expressziót mutató miRNS-ek azonosítását nem-parametrikus Mann Whitney U teszttel végeztük, majd az eltérő mértékű miRNS-expressziós adatokat az

iDEP.95 webes program DESeq2 csomagjával elemeztük ($FC \geq 1$ és $FDR \leq 0,1$ beállítást alkalmazva).

8.2.3. Az eltérő mértékben expresszáldott miRNS-célpontok in silico predikciója

Az in silico target predikció során először egy miRNS-célgén hálózatot hoztunk létre a web-alapú miRNet vizuális hálózat elemző platform használatával (<https://www.mirnet.ca>), mely a hálózatban szereplő top miRNS-eket „degree” - és „betweenness (közöttség) centrality” értékeik alapján rangsorolta. Ezen miRNS-ek kísérletesen validált target génjeinek előrejelzését a miRNet, a miRTarBase és a TargetScan szoftverekkel végeztük (<http://miRTarBase.mbc.nctu.edu>; www.targetscan.org). Ezt követően a kapott target interakciókat tovább validáltuk a miRWalk2 adatbázis (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de>) használatával, majd a célgének általános és GBM-specifikus protein-protein interakciós (PPI) hálózatait a NetworkAnalyst 3.0 (www.NetworkAnalyst.ca) platformmal hoztuk létre. Az eltérő mértékben expresszáldott miRNS-célgéneket felhasználva a DAVID szoftver (<https://david.ncifcrf.gov>) segítségével hálózat-alapú, biológiai folyamatokat leíró gén ontológiát (GO), valamint funkcionális dúsulási és útvonalelemzést végeztünk a szoftver KEGG adatbázisának útvonal-dúsító opcióját használva. Az elemzések során a $<0,05$ p -értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

8.2.4. A NanoString analízissel kapott eredmények validálása RT-qPCR módszerrel

A NanoString analízissel kapott eredmények megerősítéséhez felhasznált sejtmentes totál RNS-ek kinyerése 28 egészséges kontroll egyén és 26 GBM-es beteg plazmamintájából (200 μ l) történt a miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Hilden, Németország) használatával, a 8.2.1. fejezetben leírt, gyártó által megadott protokoll alapján. Az izolált totál RNS mintákban lévő miRNS-frakció koncentrációját a Qubit® 2.0 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) miRNS-specifikus fluorometriás eszközzel mértük. Az érett miRNS-ek mennyiségének mérése RT-qPCR mérésekkel történt LightCycler® 96 készülék (Roche, Pleasanton, CA, USA) segítségével. A reakció során kvantitálni kívánt miRNS-ek reverz transzkripciójához a miScript II RT Kit-et (Qiagen, Hilden, Németország) használtuk. Az RT-qPCR mérések során a miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével történt a validálásra kiválasztott hsa-miR-433-3p, hsa-miR-29-3p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-

133a-3p és a hsa-miR-1286-3p miRNS-ek expressziós szintjének detektálása a GBM-es és kontrollcsoportban egyaránt, a gyártó által készített specifikus primerek (miScript Primer Assays, Qiagen, Hilden, Németország) alkalmazásával. A kísérletek során három párhuzamos mérést végeztünk.

Az egyes, 10 µl végtérfogatú PCR reakcióelegyek az alábbi összetevőket tartalmazták:

- 5 µl QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (2x)
- 1 µl miScript Universal Primer (10x)
- 1 µl miScript Primer Assay
- 500 pg cDNS termék és nukleáz mentes víz (10 µl térfogatig kiegészítve)

Az RT-qPCR reakciókat az alábbi beállítások szerint végeztük:

Kezdeti denaturációs lépés: 95 °C, 15 perc

A 2. ciklustól a 50. ciklusig (3 step cycling):

- Denaturációs lépés: 94 °C, 15 másodperc, a DNS szálak szétválását eredményezi.
- Primer hibridizáció (anneálás): 55 °C, 30 másodperc, a primerek megfelelő helyre történő bekötődése.
- Lánchosszabbítás (elongáció): 70 °C, 30 másodperc, a primerek bekötődése után a DNS polimeráz enzim megszintetizálja a komplementer DNS szálát.

További 1 ciklus:

- 95 °C, 20 másodperc
- 40 °C, 20 másodperc
- 85 °C, 00 másodperc

Hűtés: 37 °C, 30 másodperc

Annak igazolására, hogy a detektált jel egyetlen PCR termékhez tartozik 50 °C - 95 °C-os hőmérséklet tartományban 25 másodpercenként történő fluoreszcens mérésekkel olvadási görbe analízist végeztünk a hőmérséklet 0,2 °C-onkénti csökkentésével. A validált miRNS-ek expressziós szintjét komparatív Ct módszerrel számoltuk ki, belső kontrollként a miR-16-5p-t használva, melyet szakirodalmi adatok alapján választottunk ki a normalizálásra. A relatív expresszió értékének meghatározására a ΔCt módszert alkalmaztuk.

8.2.5. Statisztikai analízis

Az RT-qPCR mérésekkel kapott miRNS expressziós szintek szignifikancia számításait a nem-parametrikus Mann-Whitney U-teszttel kalkuláltuk, melynek során a $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az RT-qPCR mérésekből származó, szignifikáns különbséget mutató miRNS-ek normalizált expressziós adatait felhasználva az easyROC (<http://biosoft.erciyes.edu.tr/app/easyROC/>; ver. 1.3.1.) program segítségével ROC-AUC görbét készítettünk a miRNS-eink diagnosztikai potenciáljának felmérése érdekében. Az analízissel kapott optimális cut-off, AUC, szenzitivitási és specificitási értékek alapján értékes információt nyerhetünk a miRNS-ek, mint lehetséges biomarker jelöltek klinikai értékéről. A szignifikancia szint ebben az esetben is $p < 0,05$ volt.

9. Eredmények

9.1. Eltérő mértékű expressziót mutató miRNS-ek azonosítása a glioblastomás és a kontrollcsoport szövetmintáiból

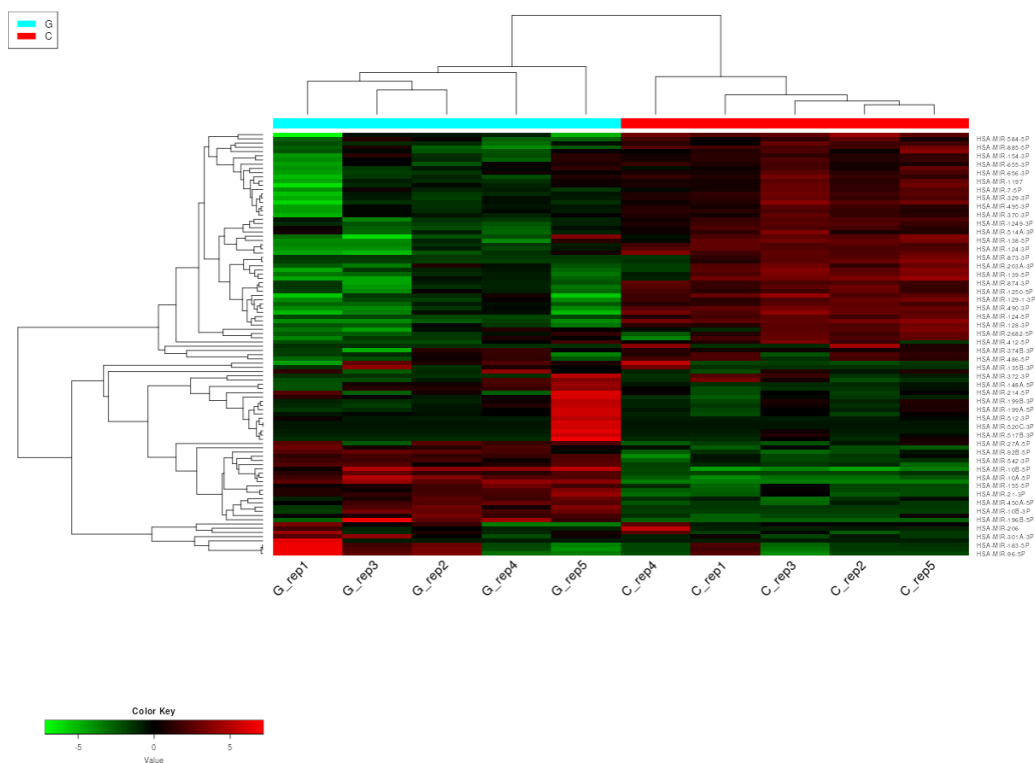
9.1.1. Új generációs szekvenálás

A miRNS-expressziós mintázat változásának elemzése új generációs kis RNS szekvenálás alkalmazásával, Illumina NextSeq 500 készülékkel valósult meg. Az ehhez szükséges szekvenáló könyvtárak létrehozása 5-5 db intraoperatív eltávolított GBM-es tumorszövetből és alacsonyabb grádusú (1-2 grádus) gliómás beteg perifériás agyi területéről származó ép szövetmintából tisztított totál RNS felhasználásával történt.

A 8.1.2. alfejezetben ismertetett szekvenálásból származó normalizált adatokat a 8.1.3. alfejezetben leírtaknak megfelelően az iDEP.96 webes program segítségével bioinformatikai elemzésnek vetettük alá. Majd az így kapott eredmények validálását, valamint további bioinformatikai és statisztikai elemzését végeztük el.

9.1.2. Hierarchikus klaszterezés és főkomponens elemzés

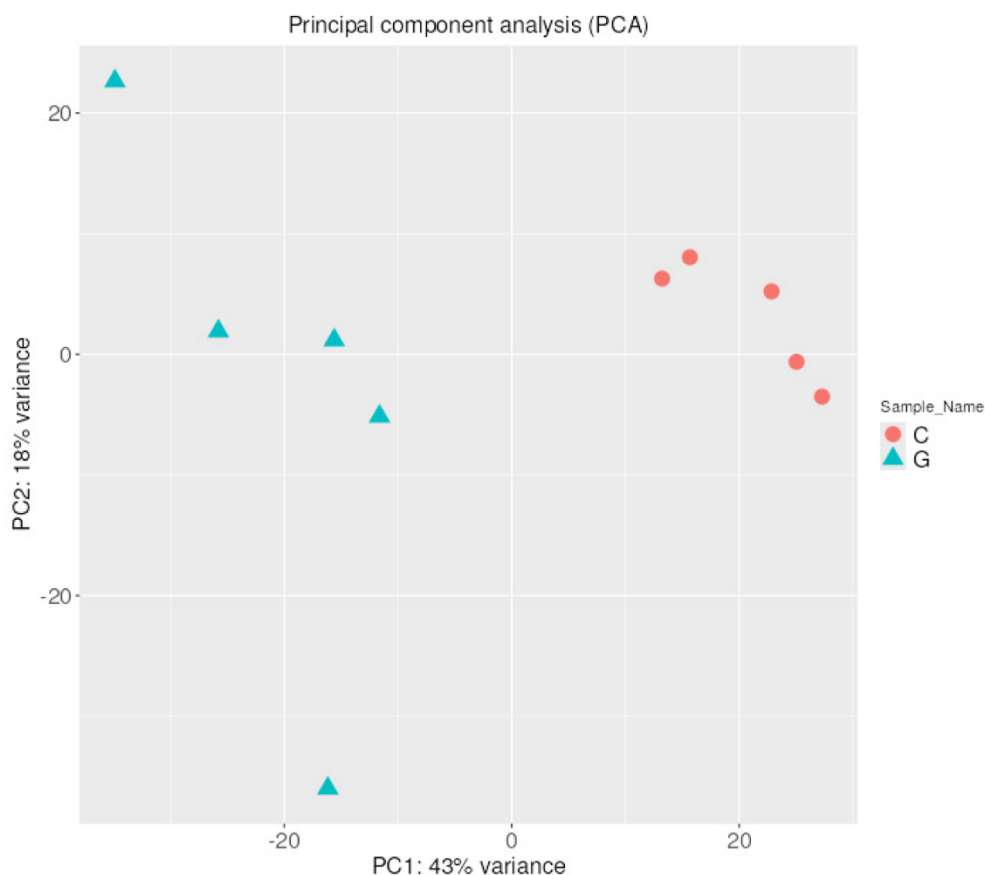
A miRNS-ek expressziós mintázatában bekövetkező változások vizualizálása érdekében hierarchikus klaszterelemzést végeztünk a GBM – kontrollcsoport összehasonlításban. Az analízis során a program minden egyes minta esetében rangsorolta a miRNS géneket a 200 legnagyobb mértékű eltérést mutató gént felhasználva, azok standard deviációja alapján. Ezek közül a két csoport összehasonlításában a top 50 legvariábilisabb expressziót mutató miRNS került ábrázolásra (**16. ábra**). Az ábrán látható heatmap adatmegjelenítési technika a vizsgált csoportokon belül a miRNS-ek globális expressziós mintázata alapján olyan egymásba ágyazott klasztereket képezett, melyeken belül a hasonló szignifikáns expressziós mintázatot mutató géneket helyezte el. Zöld színnel a downregulálódott, piros színnel az upregulálódott gének láthatóak az egyes csoportokban. A program által képzett klasztereket megfigyelve elmondható, hogy az ábrán feltüntetett 50 vizsgált miRNS expressziója egyértelmű különbséget mutat a kontroll- és a GBM-es csoport között.



16. ábra: A top 50 miRNS expressziós profiljának ábrázolása hierarchikus klaszterezés segítségével a GBM-kontroll összehasonlításban. Az egyes oszlopok a GBM-es és a kontroll- (G – glioblastoma, C – kontroll) mintákat, míg az egyes sorok egy adott miRNS-t jelölnek. Zöld színnel a downregulációt, piros színnel az upregulációt mutató miRNS gének vannak jelölve.

A miRNS-expressziós értékek eloszlásának jobb értelmezhetősége és vizualizálása érdekében főkomponens-elemzést (PCA – „Principal Component Analysis”) is végeztünk, melynek célja a vizsgált biológiai minták csoportosítása és az esetleges úgynevezett „outlier” azaz kilógó minták identifikációja volt. Az elemzéssel az eredeti változókat kevesebb számú főkomponens változóvá tudjuk összevonni korrelációjuk alapján, úgy, hogy az adott változókhoz rendelt súlyok segítségével a lehető legnagyobb variációt megtartjuk az eredeti változók teljes heterogenitásából. Az ábrán látható két főtengeley közül a PC1 a leginkább mérvadó, mely főirány mentén a minták a legnagyobb eltérést mutatják. Analízisünk eredményeként elmondható, hogy a GBM-es minták expressziós mintázatuk alapján egyetlen klasztert alkotnak, és egyértelműen elkülönülnek a kontrollmintáktól az első főkomponens alapján, amely a variancia 43%-át képviseli. Ez az adateloszlás arra utal, hogy

a GBM biogenezise számos miRNS expressziójának drasztikus változását indukálta (17. ábra).



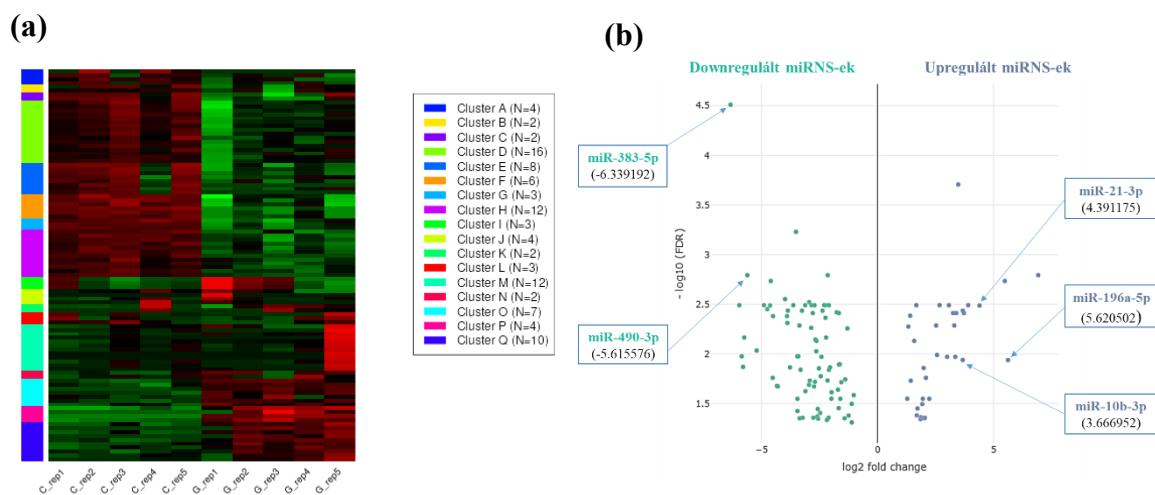
17. ábra: A GBM – kontrollcsoport miRNS expressziós profiljának ábrázolása főkomponens analízis (PCA) segítségével. Az első főkomponens (PC1) mentén egyértelmű elkülönülés látható a GBM-es minták és a kontrollminták között.

9.1.3. Eltérő mértékben expresszálódott miRNS gének azonosítása

A szignifikánsan eltérő expressziót mutató géneket az iDEP.96 webes program DESeq2 algoritmusával, (FDR) <0,05 és FC > 2 küszöbértékek alkalmazásával identifikáltuk. Ezen beállítások mellett összesen 117 olyan miRNS-t sikerült azonosítanunk, amelyek expressziója szignifikánsan eltért a GBM-es betegek mintáiban a kontrollmintákkal összevetve. Ezek közül 35 miRNS upregulációt ($\log_2FC \geq 1$), míg 82 downregulációt ($\log_2FC \leq -1$) mutatott. Az analízissel kapott 117 szignifikáns eltérést mutató miRNS közül az alábbi négy mutatta a legerősebb upregulációt: hsa-miR-10b-5p ($\log_2FC = 6,9$), hsa-miR-196a-5p ($\log_2FC = 5,62$), hsa-miR-10a-5p ($\log_2FC = 5,48$) és hsa-miR-21-3p ($\log_2FC =$

4,39). Ezzel szemben a négy legnagyobb mértékben downregulálódott miRNS a hsa-miR-383-5p ($\log_2FC = -6,3$), a hsa-miR-129-5p ($\log_2FC = -5,96$), a hsa-miR-129-2-3p ($\log_2FC = -5,89$) és a hsa-miR-219a-2-3p ($\log_2FC = -5,8$) volt.

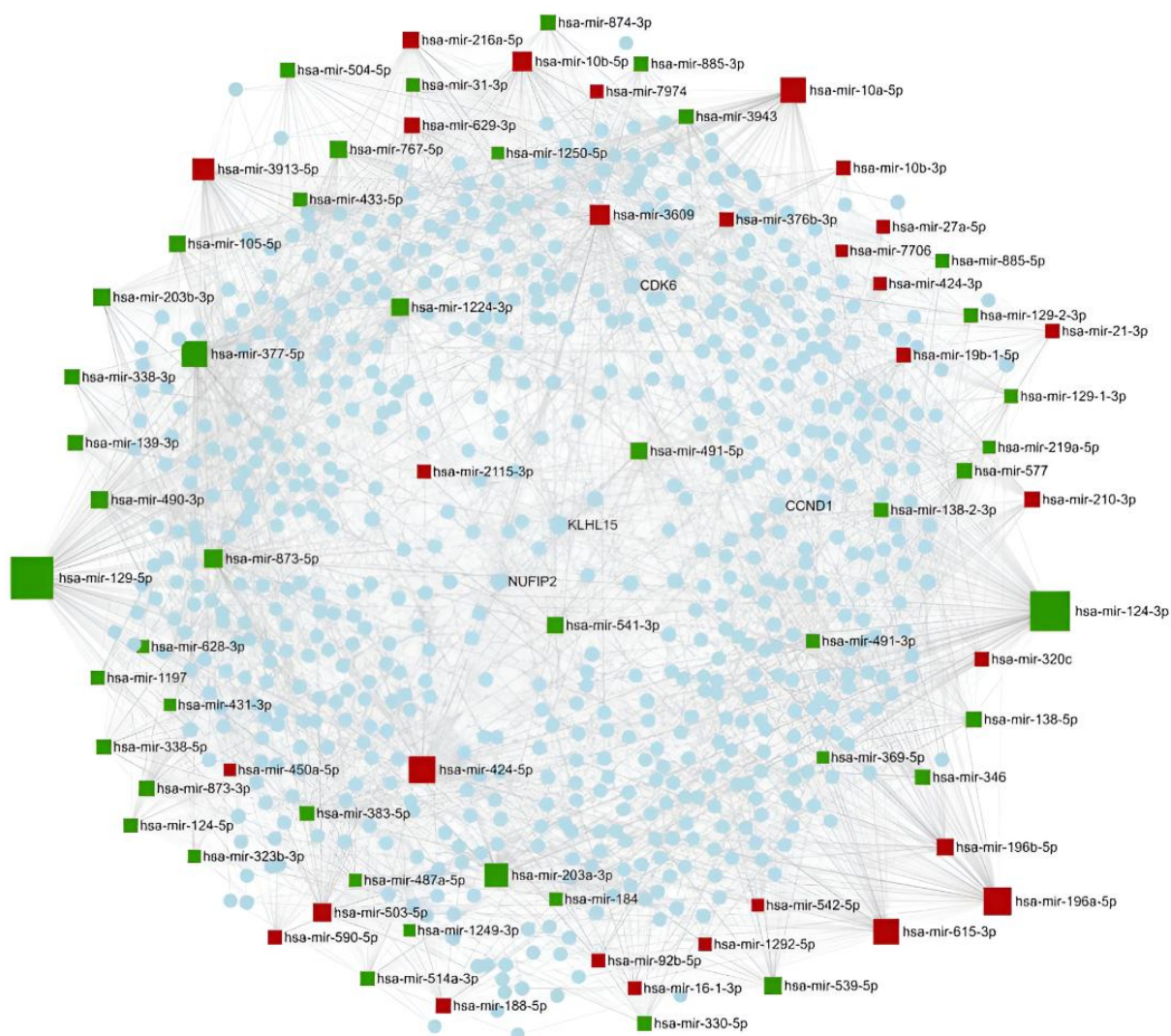
Ahhoz, hogy jobban megértsük és felmérjük a GBM kialakulásának miRNS expressziós mintázatra gyakorolt hatását, k-közép klaszterezést alkalmaztunk, melynek során a miRNS-eket expressziós értékeik alapján soroltuk csoportokba. Emellett az egyes csoportokon belül volcano plot analízist is alkalmaztunk a miRNS gének rangsorolása érdekében, mely egyidejűleg ábrázolja a minimum kétszeres expressziós különbséggel jellemezhető géneket, úgy, hogy közben kiemeli azokat, amelyek szignifikáns mértékű expressziót mutattak. Az így kapott hőtérkép (**18. (a) ábra**) és volcano plot (**18. (b) ábra**) analízis alapján megállapítható, hogy a GBM tumorgenezise szignifikáns változást eredményezett a miRNS-transzkriptomban. Ezen nagymértékű deregulációt mutató miRNS-ek közül, az alábbiak kerültek kiválasztásra a validálási folyamathoz \log_2FC értékük alapján: a downregulációt mutató hsa-miR-383-5p ($\log_2FC = -6,339192$) és hsa-miR-490-3p ($\log_2FC = -5,615576$), továbbá az upregulálódott hsa-miR-21-3p ($\log_2FC = 4,391175$), a hsa-miR-196a-5p ($\log_2FC = 5,620502$) és a hsa-miR-10b-3p ($\log_2FC = 3,666952$).



18. ábra: (a) A DESeq2 algoritmussal detektált 117 eltérő mértékű expressziót mutató miRNS gén k-közép klaszterezése. „G” jelöléssel a glioblastomás, míg „C” jelöléssel a kontroll minták láthatóak. Zöld színnel a downregulációt, piros színnel az upregulációt mutató miRNS géneket szemlélteti a hőtérkép. (b) A szignifikánsan eltérő expressziót mutató miRNS gének ábrázolása volcano plot segítségével. Megjelölve a validálására kiválasztott miRNS-ek láthatóak.

9.1.4. A miRNS-ek rangsorolása hálózat-alapú elemzéssel

Ahogy azt már a szakirodalmi áttekintésben is ismertettem a miRNS-ek onkogén vagy tumorszupresszor funkcióval is rendelkezhetnek, mely tulajdonságuknak köszönhetően igen komplex szabályozásra képesek. Emellett azon tények ismerete, hogy egyetlen miRNS több gént is szabályoz, valamint a miRNS-ek kombinációja együttesen modulálhatja a daganat kialakulásához szükséges jelátviteli utakat, nélkülözhetetlenné teszi a hálózat-alapú megközelítések alkalmazását, melynek során a közvetlen célpontjaik meghatározása megkönnyíti egy adott miRNS szerepének megismerését és megértését a GBM kialakulásában. Ennek érdekében a miRNet vizuális hálózat elemző platformot alkalmazva elemeztük a miRNS-célpontokat, melynek során kizárólag a kísérletileg validált targetekre fókuszáltunk. Az elemzés során az eltérő mértékben expresszáladott miRNS-eink adatait felhasználva egy olyan miRNS-központú hálózatot építettünk, amely magában foglalja a közvetlen miRNS-célgén kölcsönhatásokat, valamint a célgének által kódolt fehérje-fehérje kölcsönhatásokat egyaránt. Megfigyeléseink alapján elmondható, hogy ebben a heterogén hálózatban a hsa-miR-15a-5p rendelkezett a legmagasabb fokszámértékkel (260), amelyet a hsa-miR-424-5p (185) és a hsa-miR-21-5p (131) követett, ami világosan tükrözi jelentőségüket az interaktom hálózatban. A célgének tekintetében elmondható, hogy a Nukleáris FMR1 Interakciós Fehérje 2 (*NUFIP2*) volt a legtöbb miRNS által szabályozott target, emellett a legtöbb interakciós fehérjepartnerrel rendelkezett (degree érték: 20), melyet a Cinkujj-fehérje 460 (*ZNF460*; degree érték: 19), a Ciklin D1 (*CCND1*; degree érték: 15) és a Ciklin-függő kináz 6 (*CDK6*; degree érték: 15) követett. Ezt a miRNet által generált miRNS-célgén és fehérje-fehérje kölcsönhatásokból felépített minimum hálózatot a **19. ábra** szemlélteti.

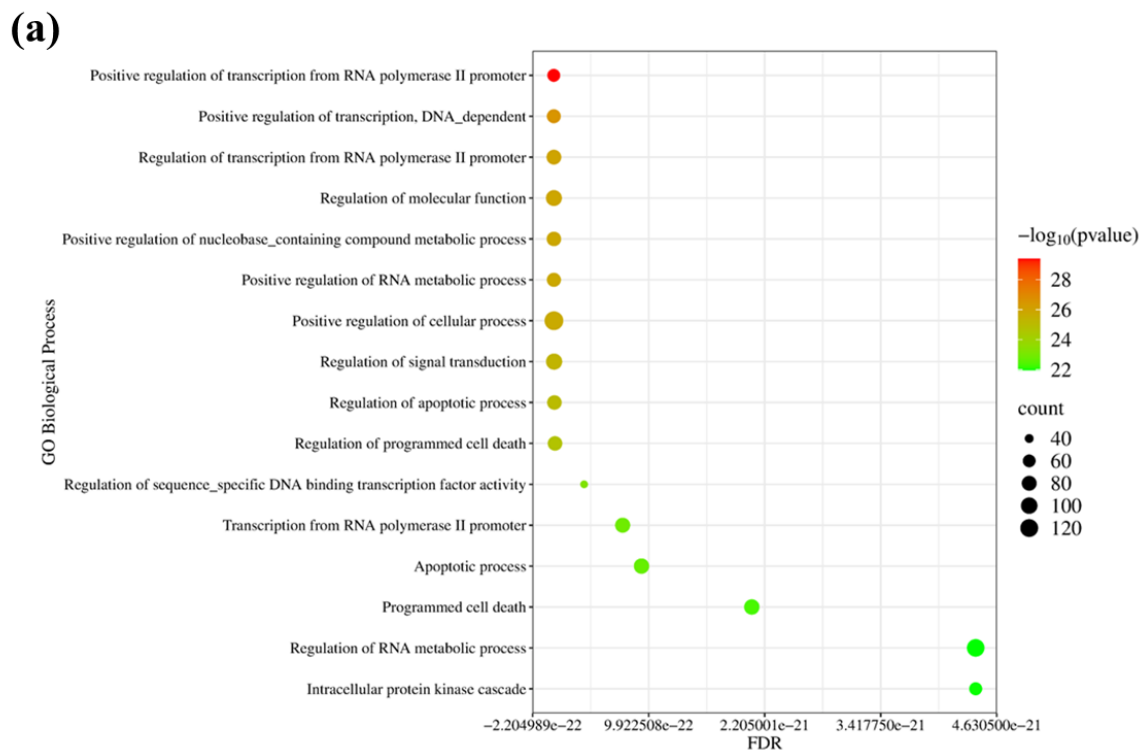


19. ábra: Az iDEP.96 analízis alapján eltérő mértékű expressziót mutató miRNS-ek és azok kísérletesen validált célgénjeinek miRNet által generált minimum halózata. Színkód: a piros négyzetek az upregulálódott, a zöld négyzetek pedig a downregulálódott miRNS-eket jelölik. A kék pontok a fehérjéket szemléltetik.

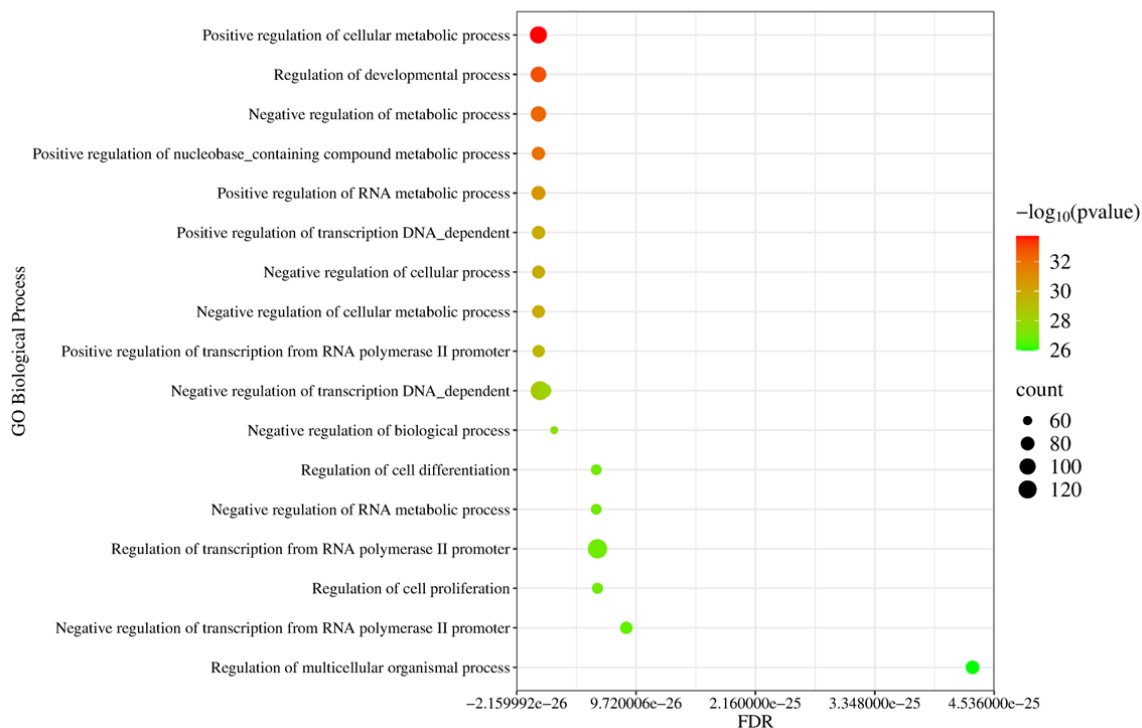
9.1.5. A miRNS célpontok gén ontológiai és útvonalelemzése

A kísérletesen validált miRNS-célpontok 9.1.4. alfejezetben bemutatott kölcsönhatási hálózata alapján a NetworkAnalyst 3.0 vizuális analitikai platform GO és KEGG adatbázisainak használatával funkcionális dúsulási és útvonalelemzést végeztünk annak felmérése érdekében, hogy a GBM-ben szignifikánsan eltérő expressziót mutató miRNS-ek és azok targetei milyen biológiai folyamatokban vesznek részt, illetve ezek a folyamatok

milyen mértékben járulnak hozzá a daganat kialakulásához. Az upregulálódott miRNS-eket vizsgálva azt találtuk, hogy azok célgénjeinek fehérjetermékei olyan biológiai folyamatokban mutatnak dúsulást, mint az anyagcsere folyamat pozitív szabályozása ($p = 2,11 \times 10^{-30}$), a jelátvitel ($p = 4,54 \times 10^{-26}$) vagy épp az apoptotikus folyamat szabályozása ($p = 9,54 \times 10^{-26}$) (20. (a) ábra). Míg a downregulálódott miRNS-ekhez köthető fehérjetermékek a fejlődési folyamatok regulációja ($p = 1,37 \times 10^{-33}$) mellett, a metabolikus folyamatok negatív- ($p = 5,21 \times 10^{-33}$) és a transzkripció pozitív szabályozásában ($p = 1,4 \times 10^{-30}$) mutattak dúsulást (20. (b) ábra).



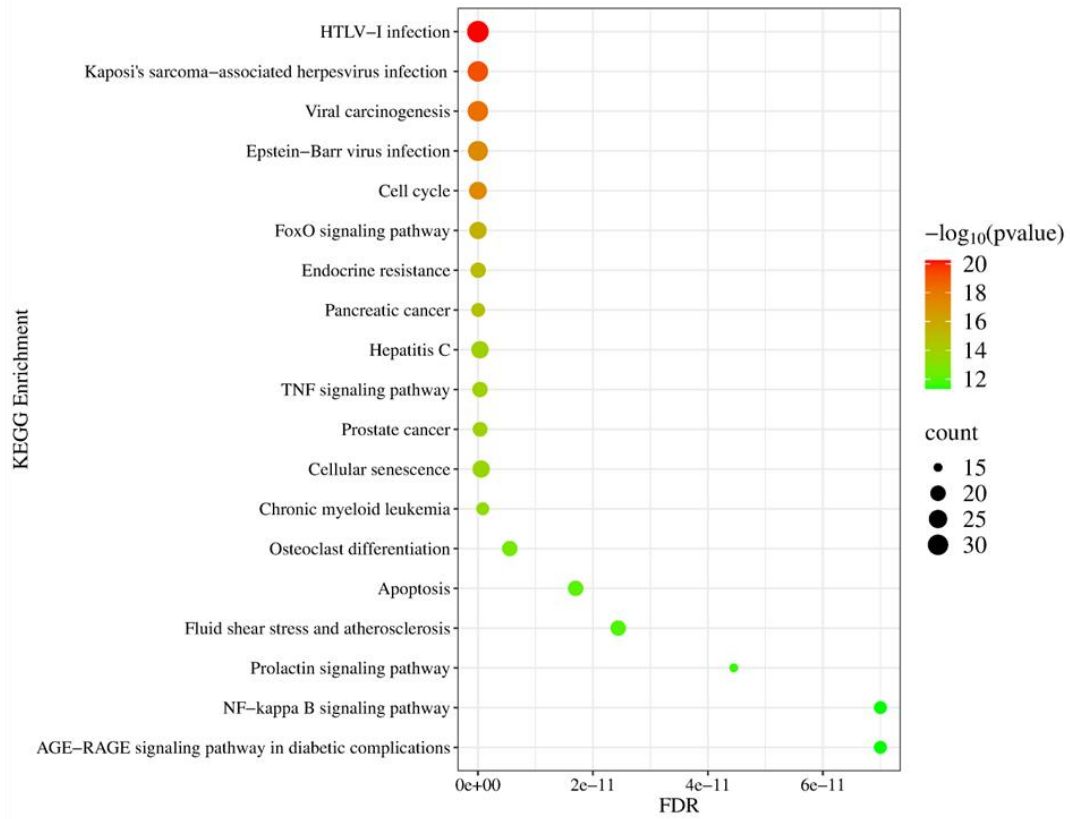
(b)



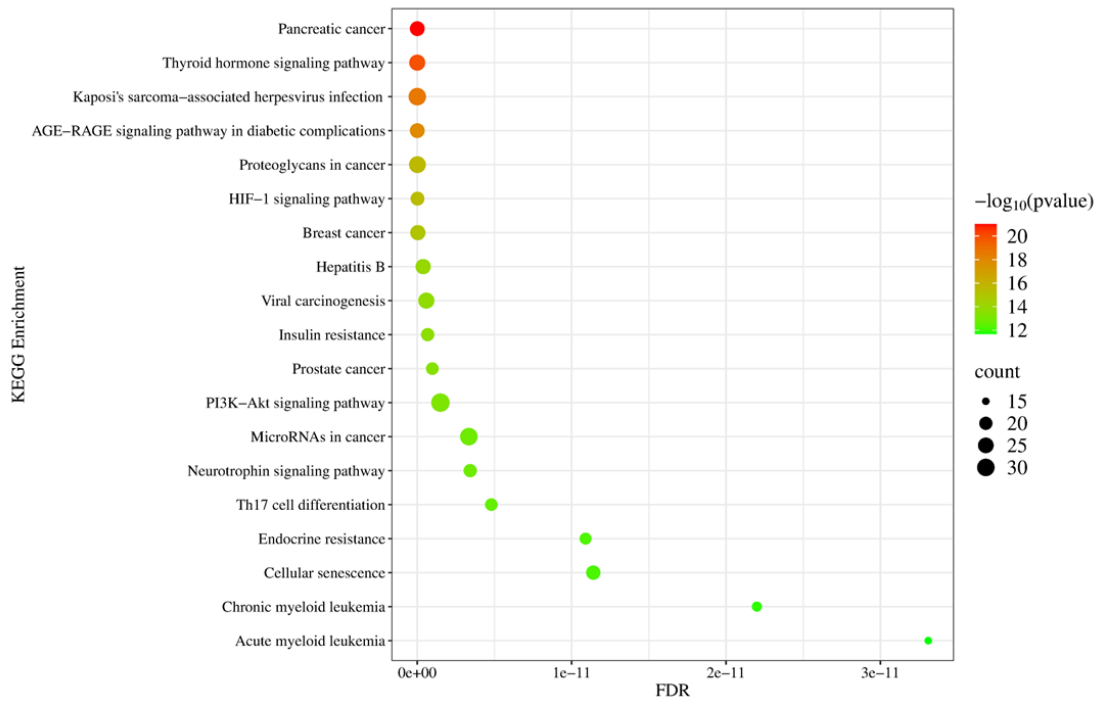
20. ábra: A NetworkAnalyst 3.0 programmal végzett GO biológiai folyamatokon alapuló funkcionális dúsulási elemzése az (a) upregulálódott és a (b) downregulálódott miRNS-ekhez kapcsolódó célgéneknek. Az észlelt biológiai folyamatok szignifikanciáját az FDR és a $-\log_{10}(\text{p-értékek})$ jellemzik. A pontok mérete arányos az adott folyamatban szereplő gének számával.

A gén ontológiai elemzést követő, KEGG adatbázis segítségével végzett útvonal analízissel azt találtuk, hogy a vizsgált upregulálódott miRNS-ek célgénjei különböző daganatos megbetegedésekhez köthető útvonalakban vesznek részt, úgymint a tumoros megbetegedések ($p = 1,22 \times 10^{-21}$), a sejtciklus ($p = 5,33 \times 10^{-18}$) és a FoxO jelátviteli útvonal ($p = 3,22 \times 10^{-16}$) (21. (a) ábra). A downregulálódott miRNS-ek célgénjei esetében is a daganatos folyamatokban résztvevő útvonalak mutattak leginkább dúsulást, mint például az AGE-RAGE jelátviteli útvonal szabályozása ($p = 1,3 \times 10^{-18}$) és a proteoglikánok szerepe a daganatképződésben ($p = 2,25 \times 10^{-16}$) (21. (b) ábra).

(a)



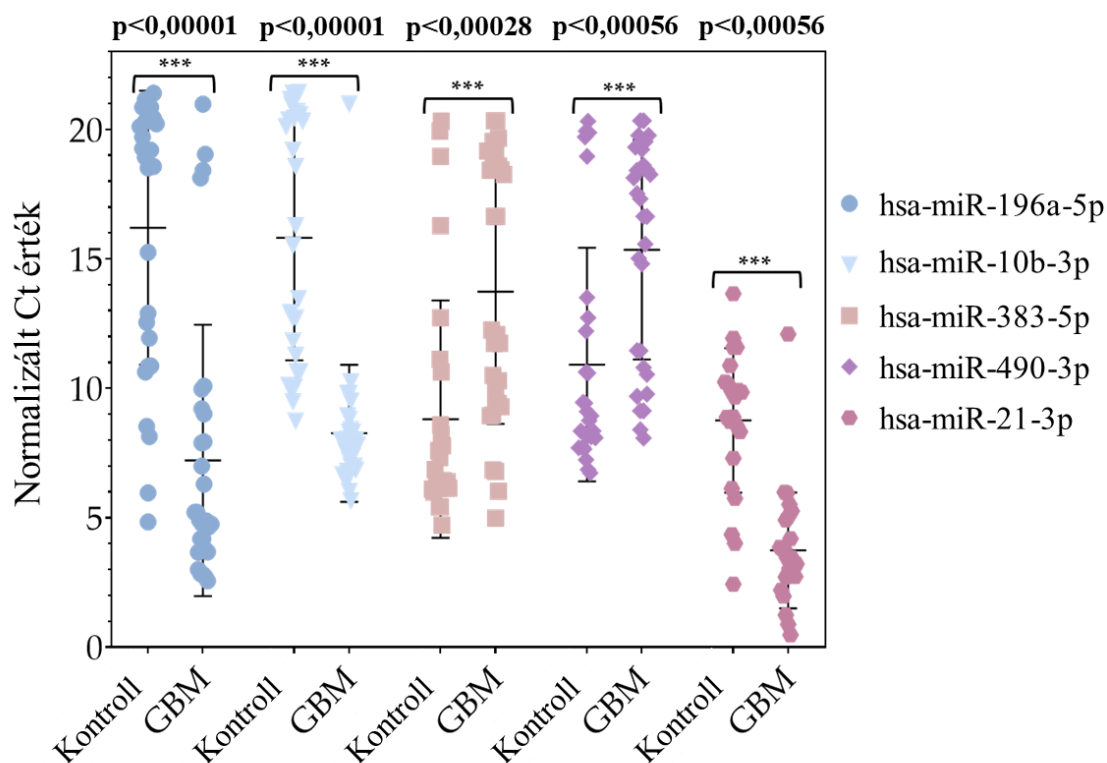
(b)



21. ábra: A NetworkAnalyst 3.0 programmal végzett **(a)** upregulálódott és **(b)** downregulálódott miRNS-ekhez kapcsolódó célgének KEGG útvonal-alapú funkcionális dúsulási elemzése. A detektált útvonalak szignifikanciája az FDR és a $-\log_{10}(p\text{-értékek})$ alapján került meghatározásra. A pontok mérete arányos az adott folyamatban szereplő gének számával.

9.1.6. A szövetmintákban eltérő mértékben expresszáldott miRNS-ek validálása RT-qPCR módszerrel

Az NGS-sal kapott eredmények megerősítéséhez három upregulálódott (hsa-miR-196a-5p ($\log_2FC = 5,6$), hsa-miR-21-3p ($\log_2FC = 4,39$), hsa-miR-10b-3p-t ($\log_2FC = 3,66$)), valamint két downregulálódott miRNS-t (hsa-miR-383-5p-t ($\log_2FC = -6,33$), hsa-miR-490-3p-t ($\log_2FC = -5,61$)) választottunk ki \log_2FC értékeik alapján. A \log_2FC értékeken túl a kiválasztás során azt a szempontot követtük, hogy jól elkülöníthetően, vagy csak a kontroll, vagy csak a GBM-es csoportban mutassanak eltérő expressziót az adott miRNS-ek az NGS-sel kapott normalizált adatok alapján. A kiválasztott miRNS-ek relatív expressziójának meghatározását RT-qPCR mérésekkel végeztük, amelyhez szükséges totál RNS-ek izolálása 30 GBM-es és 28 kontroll csoportba tartozó egyén agyszövet mintájából történt. Mindkét csoportban egyenlő volt a férfiak és a nők száma. A kísérletek során három párhuzamos mérést végeztünk. Referencia miRNS-ként a hsa-miR-103a-3p-t használtuk [Veryaskina et al., 2022]. Az RT-qPCR méréseket követő statisztikai elemzés során a Mann-Whitney U teszt segítségével határoztuk meg a mérésekből származó eredmények szignifikanciáját (**22. ábra**). A teszt segítségével kalkulált p -értékek alapján mindhárom upregulált (hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-21-3p, hsa-miR-10b-3p) és mindkét downregulált (hsa-miR-383-5p, hsa-miR-490-3p) miRNS esetében szignifikáns különbséget tapasztaltunk a GBM vs. kontroll csoport összehasonlításban, így elmondható, hogy sikeresen validáltuk az NGS-ből származó eredményeket.



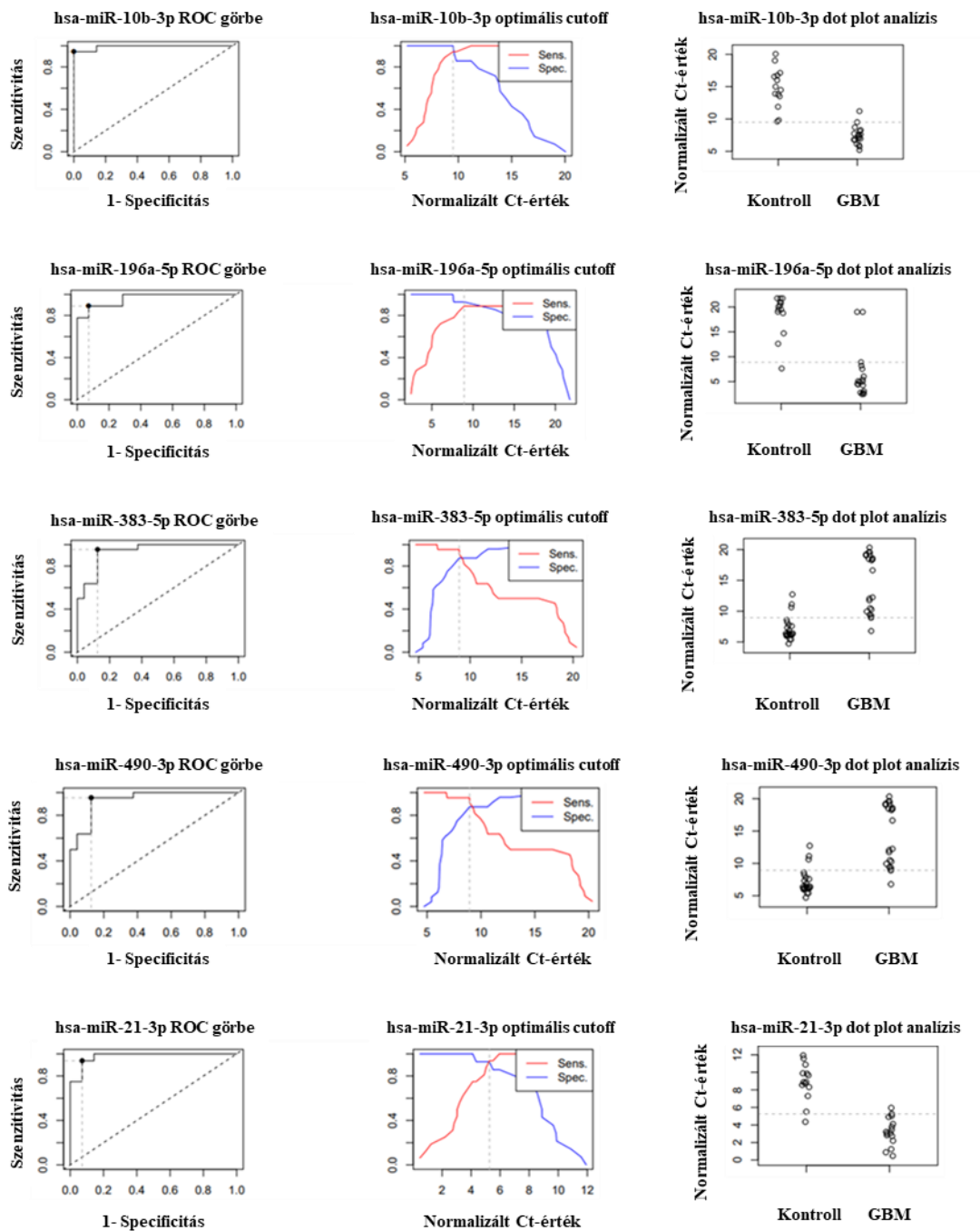
22. ábra: A szignifikánsan deregulált miRNS-ek normalizált Ct-értékeinek ábrázolása GraphPad Prism 8.0 program használatával. A p -értékeket Mann-Whitney U teszttel számoltuk ki. Az ábrán látható validált miRNS-ek p -értéke ***** $p < 0,001$** .

Ezen miRNS-ek normalizált expressziós adatait felhasználva ROC-AUC görbékét készítettünk az EasyROC program segítségével, annak érdekében, hogy a tumorgenezisben betöltött szerepük mellett felmérjük az esetleges diagnosztikai potenciáljukat. A ROC analízis egyik legfontosabb paramétere a görbe alatti terület, az úgynevezett AUC érték, melynek maximális értéke 1. A validált hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-21-3p, hsa-miR-10b-3p, hsa-miR-383-5p és hsa-miR-490-3p esetében az alábbi AUC értékeket kaptuk: 0,96032; 0,97768; 0,99206; 0,9375 és 0,9648. Az optimális cut-off értékek kiszámításához a kontroll- és a GBM-es csoportban a validált miRNS-ek normalizált Ct-értékeit dichotomizáltuk a szenzitivitási értékek 1-specificitási értékekhez viszonyított leképezésével. A betegségben szenvedők számának arányából a diagnosztikai szenzitivitás, míg az egészséges résztvevők arányából a diagnosztikai specificitásról tudunk információt nyerni. Ezen paraméterek és az alábbi képletek segítségével meg tudjuk határozni a diagnosztikai tesztünk hatékonyságát [Fazekasné & Góth, 1999].

- Diagnosztikai szenzitivitás = $VP/(VP+ÁN)$
- Diagnosztikai specificitás = $VN/(VN+ÁP)$

A képletekben a VP: a valódi pozitív, a VN: a valódi negatív, az ÁP: az álpozitív, az ÁN: pedig az álnegatív eseteket jelöli.

A legmagasabb szenzitivitási értékeket a két downregulálódott miRNS-ünk, a hsa-miR-383-5p (95%) és a hsa-miR-490-3p (95%) esetében figyeltük meg. Valamivel alacsonyabb, de ugyancsak kiemelkedő értékeket kaptunk az upregulálódott hsa-miR-10b-3p (94%), a hsa-miR-21-3p (93,8%) és a hsa-miR-196a-5p (88%) esetében. Ezzel szemben az 1-specificitás értékek eltérő sorrendet követtek. Ebben az esetben a legnagyobb értékek az upregulálódott miRNS-ekhez voltak köthetőek. A legmagasabb érték a hsa-miR-10b-3p (100%) esetében volt megfigyelhető, amit a hsa-miR-21-3p (92,9%), a hsa-miR-196a-5p (92%), majd a két downregulálódott hsa-miR-383-5p (95%) és a hsa-miR-490-3p (85%) követett (**23. ábra**).



23. ábra: (a) Az RT-qPCR módszerrel sikeresen validált miRNS-ek szenzitivitási és 1-specificitási értékeinek ábrázolása ROC-AUC görbék segítségével. **(b)** A validált miRNS-ek (hsa-miR-10b-3p – normalizált Ct-érték: 9,9; hsa-miR-196a-5p – normalizált Ct-érték: 9,8; hsa-miR-383-5p normalizált Ct-érték: 9,8; hsa-miR-490-3p normalizált Ct-érték: 9,8; hsa-miR-21-3p normalizált Ct-érték: 5,8) optimális cut-off értékei. **(c)** A validált miRNS-ek dot plot analízise a kontroll és GBM-es szövetmintákra vonatkoztatva.

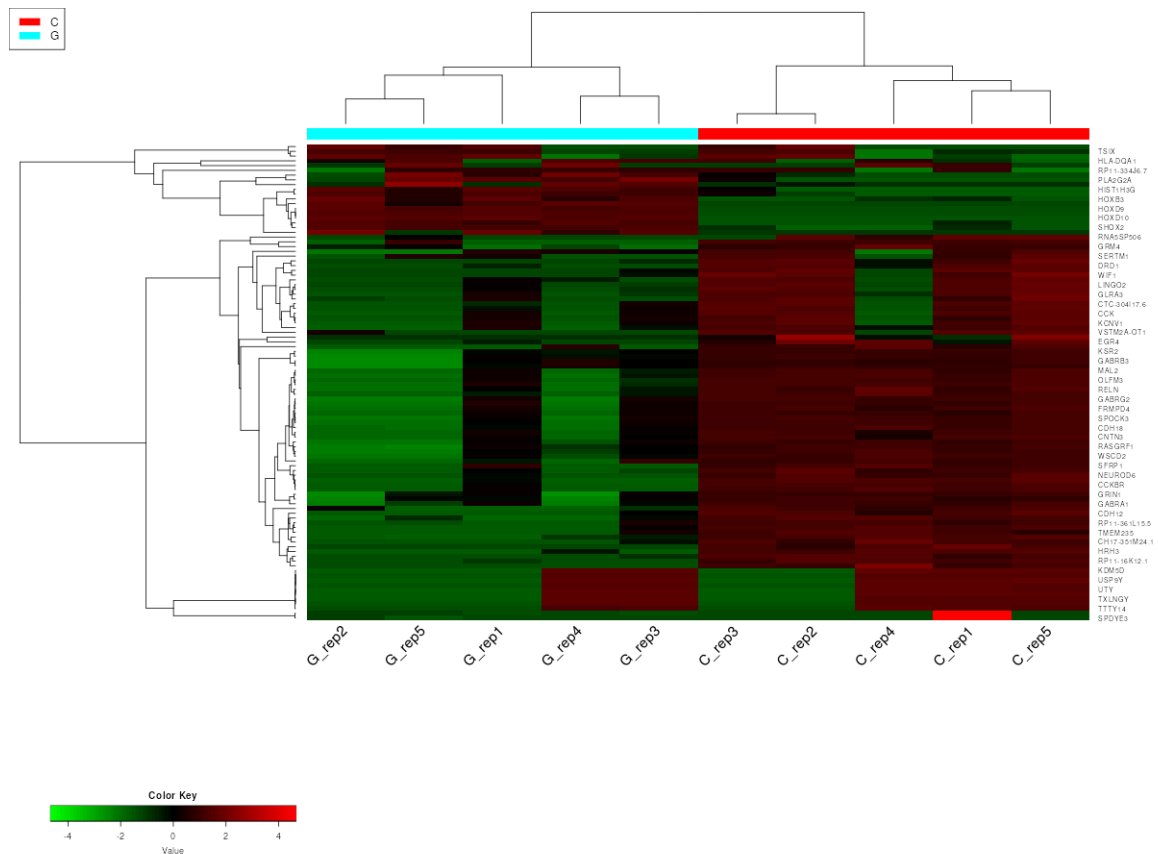
9.2. Eltérő mértékű expressziót mutató mRNS-ek azonosítása a glioblastomás betegek és a kontrollcsoport szövetmintáiban

9.2.1. Új generációs szekvenálás

A GBM-es és a kontrollcsoportba tartozó egyénektől származó szövetminták mRNS-expressziós profiljának összehasonlítása érdekében NGS-t alkalmaztunk az Illumina NextSeq 500 készülék (Illumina, San Diego, CA, USA) segítségével. A szekvenáló könyvtárak létrehozása ugyanabból az 5 GBM-es beteg tumorrégiójából és 5 alacsony grádusú gliómás beteg perifériás tumorrégiójából származó szövetmintákból izolált totál RNS felhasználásával történt, mint a miRNS szekvenálás esetében. Utóbbi mintákat használtuk kontrollcsoportként a kísérletünk során.

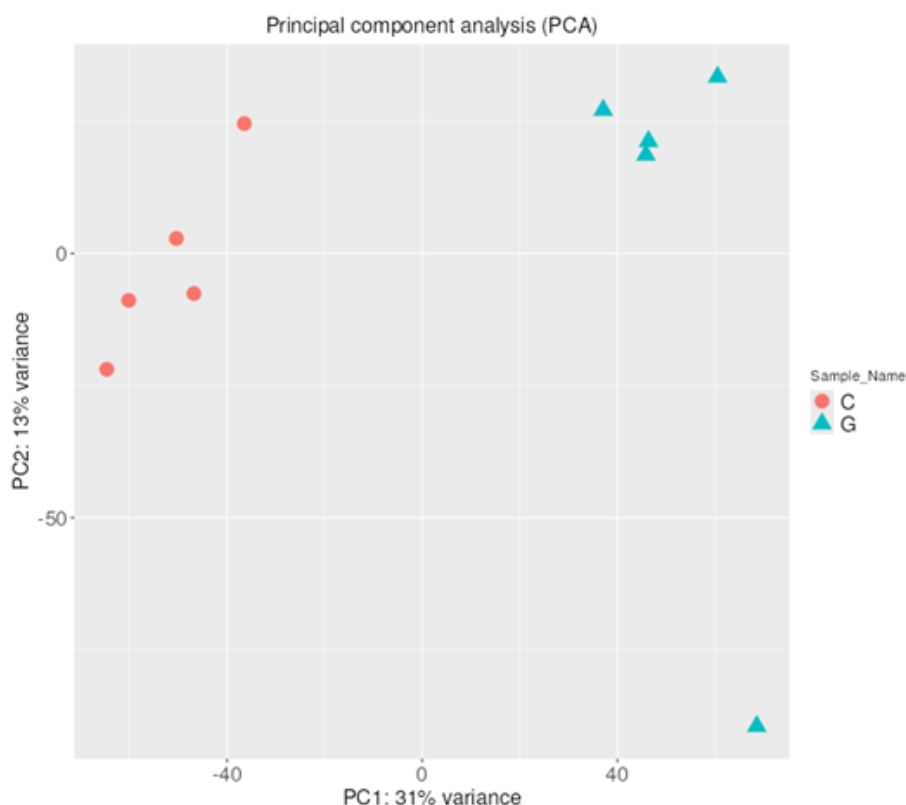
9.2.2. Hierarchikus klaszterezés és főkomponens elemzés

Az mRNS szekvenálás eredményeinek értelmezése érdekében az iDEP.96 webes program segítségével hierarchikus klaszterelemzést végeztünk a GBM-es és kontrollcsoport NGS adatkészletének felhasználásával. Az analízis során az mRNS-ek standard deviációjuk alapján kerültek rangsorolásra az összes mintában, a top 200 legvariábilisabb expressziót mutató gén felhasználásával, melyek közül a két csoport összehasonlításában a top 50 legnagyobb mértékű expressziós változást mutató mRNS került ábrázolásra hőtérkép formájában (**24. ábra**).



24. ábra: A top 50 mRNS expressziós profiljának ábrázolása hierarchikus klaszterezés segítségével a GBM-kontroll összehasonlításban. Az egyes oszlopok a GBM-es és a kontroll- (G – glioblastoma, C – kontroll) mintákat, míg az egyes sorok egy adott mRNS-t jelölnek. Zöld színnel a downregulációt, piros színnel az upregulációt mutató mRNS gének vannak jelölve.

A miRNS-ekhez hasonlóan az mRNS expressziós értékek eloszlását is PCA segítségével szemléltettük, az első és a második főkomponens mentén. A **25. ábrán** látható PCA plot alapján elmondható, hogy a GBM-es minták egyetlen klasztert alkotnak mRNS expressziós mintázatuk alapján, így egyértelműen elkülönülnek a kontrollmintáktól az első főkomponens mentén, amely a variancia 31%-át képviseli. A variancia ezen adateloszlása ebben az esetben is alátámasztja, hogy a GBM biogenezise drasztikus változást indukál számos mRNS expressziójában.

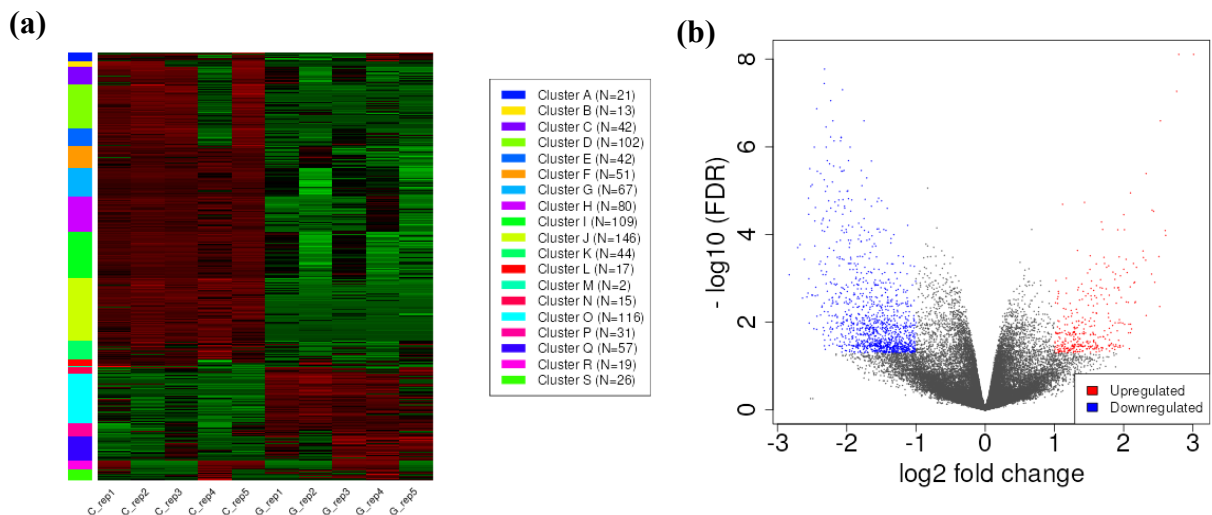


25. ábra: A GBM – kontrollcsoport mRNS expressziós profiljának ábrázolása főkomponens analízis (PCA) segítségével. Az első főkomponens (PC1) mentén egyértelmű elkülönülés látható a GBM-es minták és a kontrollminták között.

9.2.3. Eltérő mértékben expresszáladott mRNS gének azonosítása

A szignifikánsan eltérő expressziót mutató gének azonosítását az iDEP.96 webes program DESeq2 algoritmusával végeztük. Az (FDR) <0,05 és FC > 2 küszöbértékek beállítása mellett 365 upregulált ($\log_2FC \geq 1$) és 1225 downregulált ($\log_2FC \leq -1$) mRNS-t detektáltunk a GBM-es betegek mintáiban a kontrollcsoportéhoz képest. Az 5 legnagyobb mértékű upregulációt mutató mRNS a *HOXD10* ($\log_2FC = 7,06$), a *SHOX2* ($\log_2FC = 6,86$), a *POSTN* ($\log_2FC = 6,09$), a *TOP2A* ($\log_2FC = 6,08$) és a *HOXD11* ($\log_2FC = 5,95$) volt. Míg az 5 leginkább downregulált mRNS a *RELN* ($\log_2FC = -8,56$), a *GRIN1* ($\log_2FC = -8,29$), az *UNC13C* ($\log_2FC = -8,04$), az *OPALIN* ($\log_2FC = -7,94$) és a *GABRA1* ($\log_2FC = -7,89$) volt.

Annak érdekében, hogy felmérjük a GBM kialakulásának mRNS-expresszióra gyakorolt hatását k-közép klaszteranalízist végeztünk, melynek során az iDEP.96 program az expressziós értékeik alapján csoportosította az mRNS-eket (**26. ábra (a)**). Az ezen értékeket ábrázoló volcano-plot az x-tengelyen az mRNS-ek log₂FC értékét, az y-tengelyen pedig a p-értékét megjelenítve (**26. (b) ábra**) világosan szemlélteti, hogy a GBM kialakulása az mRNS-transzkriptom mélyreható változását eredményezi. Ezen megfigyelés megerősíti a miRNS-ek mRNS-eket szabályozó funkcióját és azok GBM genézisben betöltött valódi szerepét.



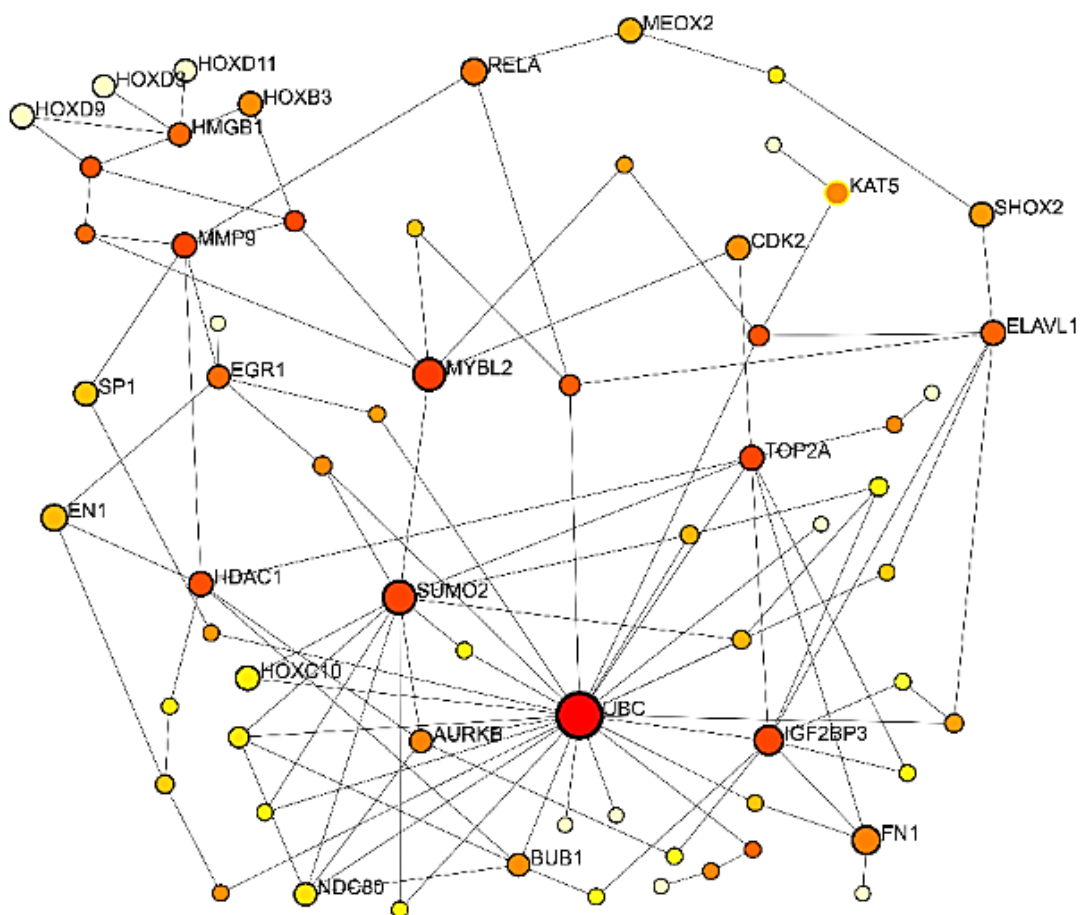
26. ábra: (a) A DESeq2 algoritmussal detektált 1590 eltérő mértékű expressziót mutató mRNS gén k-közép klaszterezése. „G” jelöléssel a glioblastomás, míg „C” jelöléssel a kontroll minták láthatóak. Zöld színnel a downregulációt, piros színnel az upregulációt mutató miRNS géneket szemlélteti a hőtérkép. (b) A szignifikánsan eltérő expressziót mutató mRNS gének ábrázolása volcano plot segítségével. A downregulálódott gének kék, míg az upregulálódott gének piros színnel vannak megjelenítve az ábrán.

9.2.4. A deregulált mRNS-ek fehérje-fehérje interakciós (PPI) hálózatának elemzése

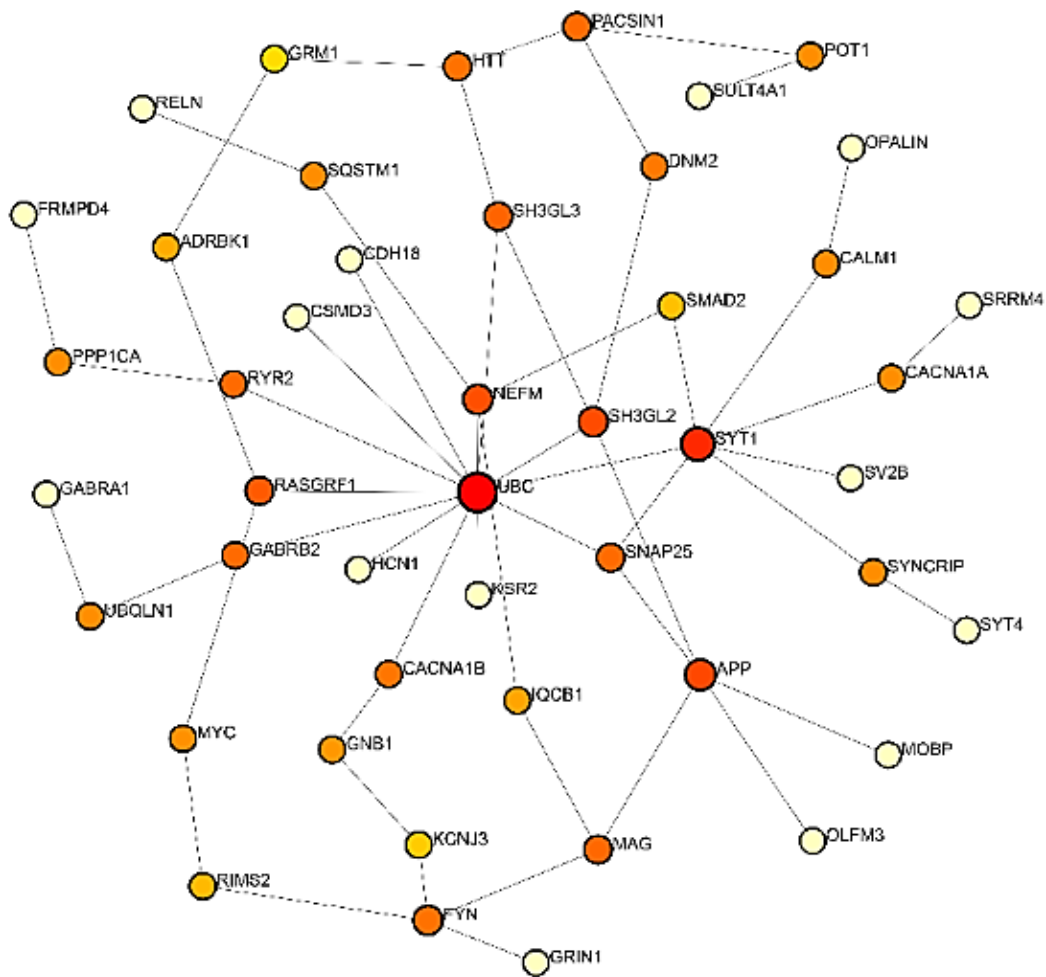
A top 50 legjelentősebb mértékben up- és downregulálódott mRNS-eket külön-külön analizálva a NetworkAnalyst 3.0 analitikai platform segítségével úgynevezett minimum PPI hálózatokat építettünk fel, melyeket a **27. ábra** szemléltet. Mindkét analízis eredményeképpen a központi fehérjék (hub) között - melyek szignifikáns biológiai relevanciával rendelkező kulcs csomópontoknak tekinthetőek – sok olyat találtunk, amelyekről már ismert, hogy szerepet játszanak a tumorgenezis folyamatában. A kapott hálózatot vizsgálva azt az érdekes megállapítást tettük, hogy mind az up-, mind a downregulált mRNS-ek elemzése során az

ubiquitin C (UBC) fehérje rendelkezett a legtöbb kölcsönhatással. Az ubikvitináció, mint poszttranszlációs fehérje módosítás jelentős szerepet tölt be a különböző sejt folyamatokban, köztük a hiszton módosításban, melynek révén szabályozza a gének kifejeződését. Ezen kívül összefüggésbe hozható a fehérjék lebontásával, a DNS-hibajavítással, a kináz módosítással, az endocitózis folyamatával, valamint a sejtciklus és a szignálutak szabályozásával [Scholz et al., 2020; Maksoud et al., 2021]. Az upregulált mRNS-alapú kölcsönhatási hálózatban (27. (a) ábra) az UBC mellett a kis ubiquitinszerű módosító fehérje 2 (SUMO2) és az inzulin-szerű növekedési faktor 2 mRNS kötő fehérje 3 (IGF2BP3) rendelkezett a legtöbb kölcsönhatással és viszonylag magas fokszám-értékkel (12 és 9 a SUMO2 és a IGF2BP3 esetében). Míg a downregulált mRNS-alapú hálózatban a szinaptotagmin 1 (SYT1) és az amiloid prekursor fehérje (APP) követte az UBC-t (27. (b) ábra).

(a)



(b)



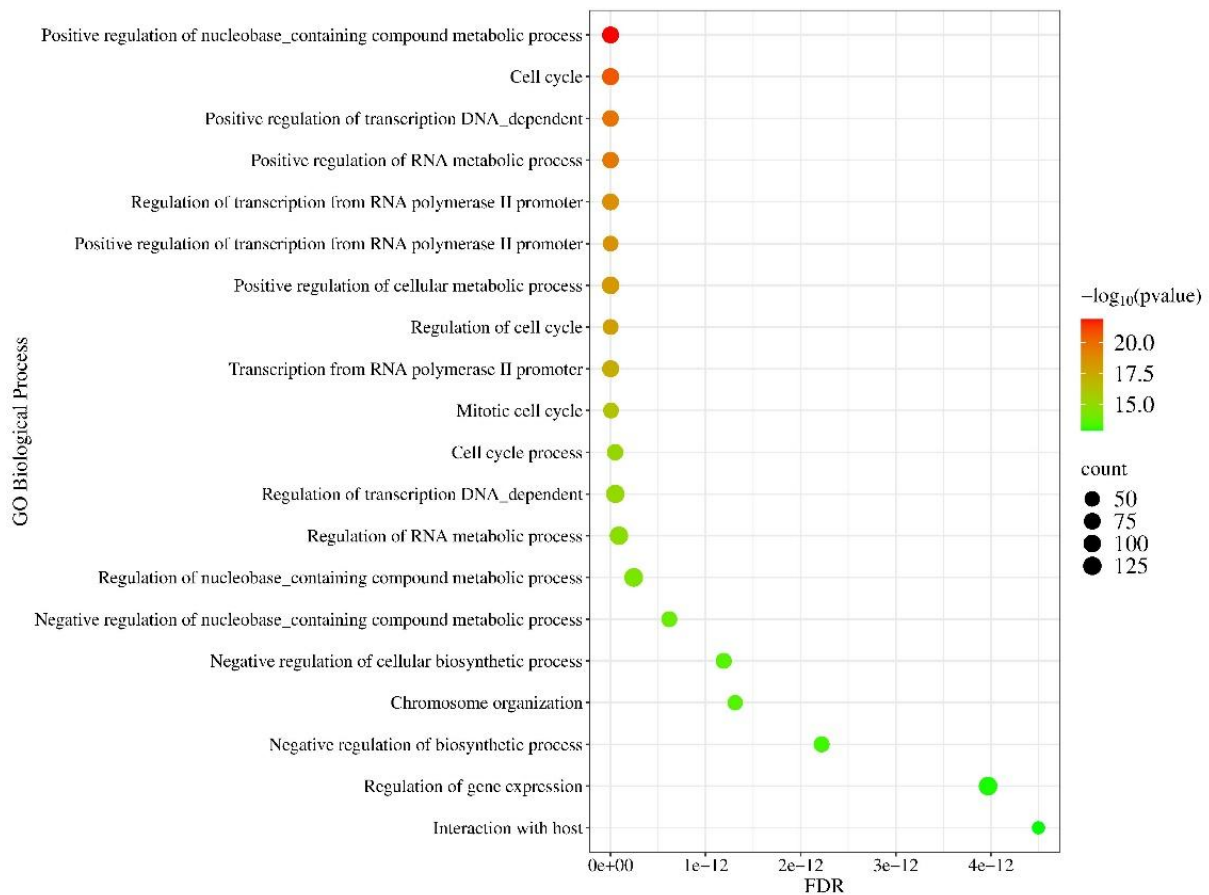
27. ábra: A NetworkAnalyst 3.0 analitikai platform segítségével készített (a) upregulálódott és (b) downregulálódott mRNS-alapú PPI minimum hálózat topológiája. A csomópontok az egyes fehérjéket jelölik, míg a csomópontok mérete a fehérjék fokszám-centralitásának felelnek meg.

9.2.5. Az mRNS molekulák gén ontológiai (GO) és útvonal-dúsulási elemzése

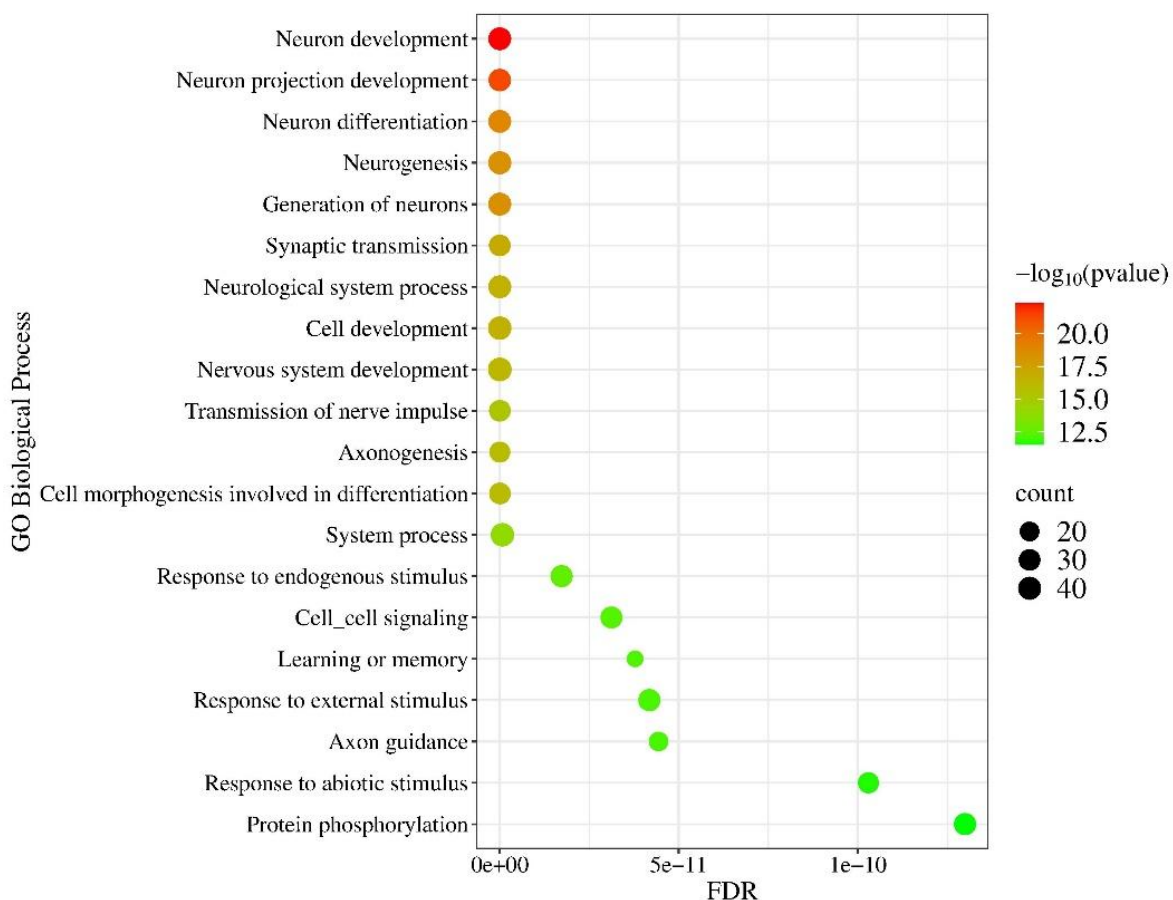
A NetworkAnalyst 3.0 GO és KEGG adatbázis-opcióinak alkalmazásával PPI funkcionális dúsulási és útvonalelemzést végeztünk a deregulált mRNS-ek felhasználásával. Az upregulált fehérjék GO biológiai folyamat-alapú (GO_BP) dúsulási elemzésével azt találtuk, hogy ezek a fehérjék többek között a nukleobázis-tartalmú vegyületek anyagcsere folyamatainak pozitív szabályozásában ($p = 1,27 \times 10^{-22}$), a sejtciklus folyamatában ($p = 2,28 \times 10^{-21}$), az RNS-anyagcsere folyamatok pozitív szabályozásában ($p = 2,66 \times 10^{-20}$), valamint a kromoszóma szerveződésében ($p = 3,35 \times 10^{-14}$) játszanak szerepet (**28. (a) ábra**). Ezzel

szemben a downregulált fehérjék olyan folyamatokban dúsultak, mint a neuronok fejlődése ($p = 4,5 \times 10^{-23}$), a neuronok nyúlványainak fejlődése ($p = 5,48 \times 10^{-22}$), a neuronok differenciálódása ($p = 1,3 \times 10^{-19}$) vagy a szinaptikus transzmisszió ($p = 1,43 \times 10^{-17}$) (28. (b) ábra).

(a)



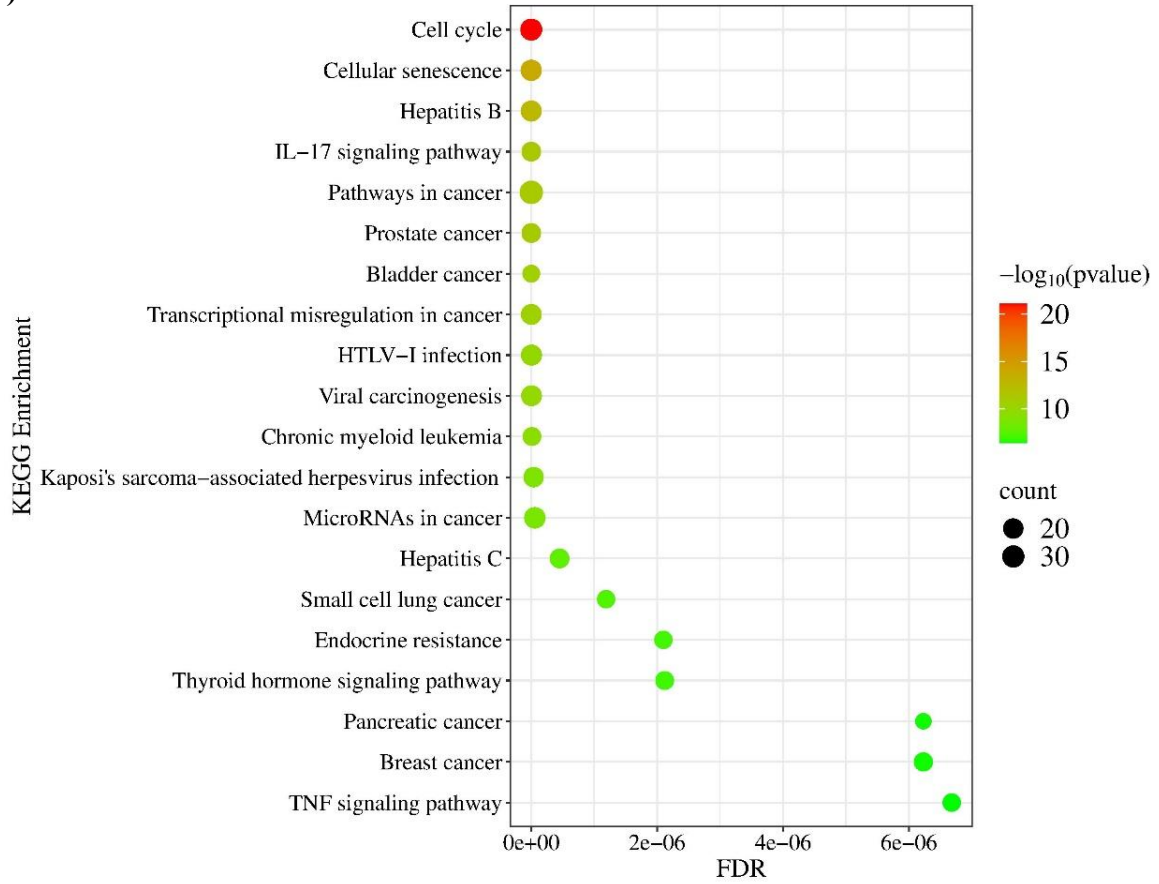
(b)



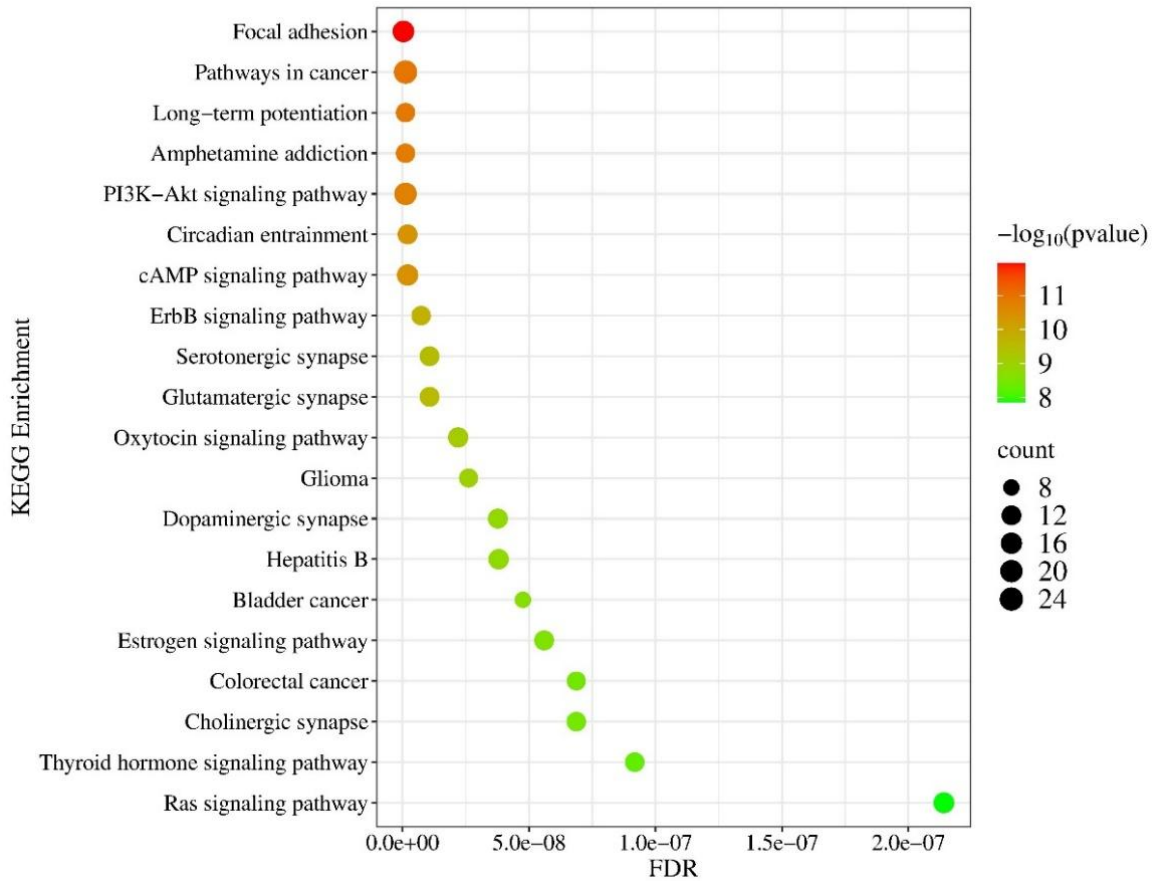
28. ábra: A NetworkAnalyst 3.0 programmal végzett GO biológiai folyamatokon alapuló (GO_BP) funkcionális dúsulási elemzése a top 50 (a) upregulálódott és (b) downregulálódott mRNS-eknek. Az észlelt biológiai folyamatok szignifikanciáját az FDR és a $-\log_{10}$ (p-értékek) jellemzik. A pontok mérete arányos az adott folyamatban szereplő gének számával.

A KEGG adatbázis használatával megállapítottuk, hogy az upregulált mRNS-ek különböző, a daganatképződéshez kapcsolódó útvonalakban játszanak szerepet, úgymint a sejtciklus ($p = 8,31 \times 10^{-22}$), a sejtek öregedése ($p = 1,69 \times 10^{-14}$), útvonalak a daganatos betegségekben ($p = 3,06 \times 10^{-11}$) és az IL-17 jelátviteli útvonal ($p = 5,38 \times 10^{-12}$) (29. (a) ábra), míg a downregulált mRNS-ek a fokális adhézió ($p = 1,13 \times 10^{-12}$), útvonalak a daganatos betegségekben ($p = 1,23 \times 10^{-11}$), a hosszú távú potenciáció ($p = 1,27 \times 10^{-11}$), valamint az ErbB szignalizációs útvonalakban játszottak szerepet (29. (b) ábra).

(a)



(b)



29. ábra: A NetworkAnalyst 3.0 programmal végzett **(a)** upregulálódott és **(b)** downregulálódott mRNS-ek KEGG útvonal-alapú funkcionális dúsulási elemzése. A detektált útvonalak szignifikanciája az FDR és a $-\log_{10}(p\text{-értékek})$ alapján került meghatározásra. A pontok mérete arányos az adott folyamatban szereplő gének számával.

9.2.6. A szövetmintákban eltérő mértékű expressziót mutató mRNS-ek validálása RT-qPCR módszerrel

Az NGS és a bioinformatikai elemzés alapján szignifikánsan eltérő expressziót mutató mRNS-ek megerősítését szintén RT-qPCR módszerrel végeztük, melyhez ugyanazon totál RNS mintákat használtuk fel a GBM-es és a kontrollcsoportból, mint a miRNS-ek esetében. Ezzel biztosítva az eredmények lehető legpontosabb összevetését, valamint a miRNS-ek valódi szabályozó funkciójának felderítését.

Mivel az mRNS-ek esetében lényegesen nagyobb számú deregulált gént azonosítottunk, így a validálásra történő up-, és downregulált mRNS-ek kiválasztásakor elsősorban arra törekedtünk, hogy a teljes expressziós spektrumot lefedjük és ezáltal átfogóbb képet kapjunk a miRNS-ek általi szabályozás poszttranszkripcionális szintjéről.

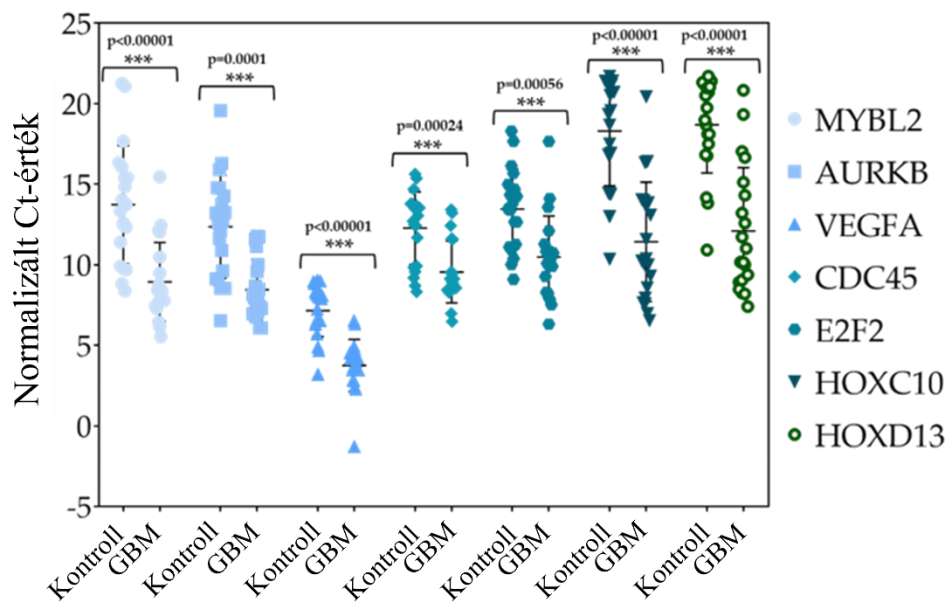
A validálás során az alábbi 7 up-, és 7 downregulált mRNS relatív expresszióját határoztuk meg, mely eredmények normalizálásához a *GAPDH*-t használtuk belső kontrollként **(4. táblázat)** [Kreth et al., 2010]. Minden esetben három párhuzamos mérést végeztünk.

4. táblázat: A validálásra kiválasztott up-, és downregulált mRNS-ek neve és \log_2FC értéke.

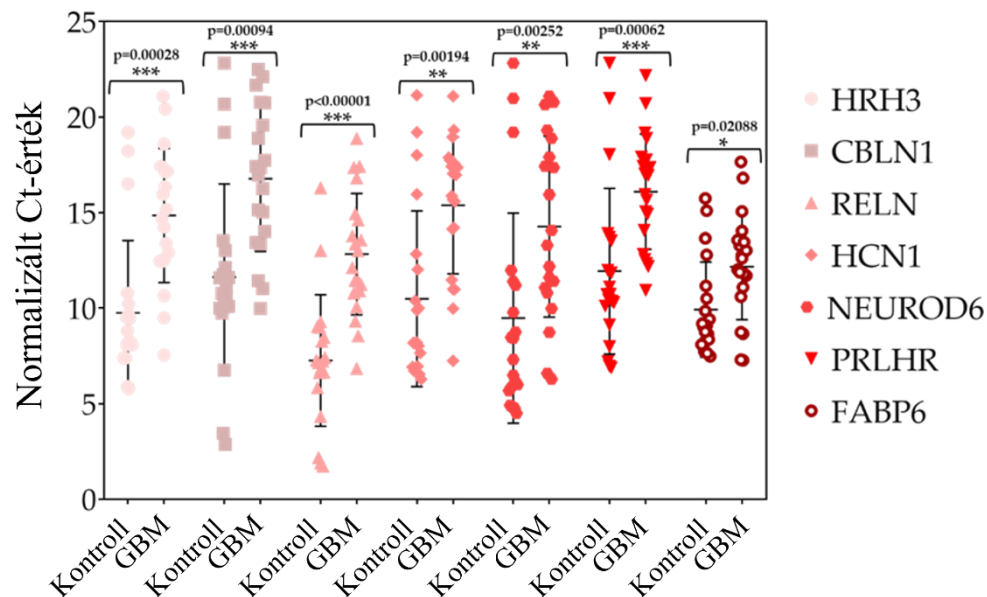
Upregulált mRNS	\log_2FC érték	Downregulált mRNS	\log_2FC érték
<i>E2F2</i>	3,59	<i>FABP6</i>	-2,3
<i>HOXD13</i>	3,69	<i>PRLHR</i>	-4,37
<i>VEGFA</i>	4,3	<i>NEUROD6</i>	-5,72
<i>CDC45</i>	4,31	<i>CBLN1</i>	-6,16
<i>AURKB</i>	4,6	<i>HRH3</i>	-6,39
<i>HOXC10</i>	4,9	<i>HCN1</i>	-7,36
<i>MYBL2</i>	5,73	<i>RELN</i>	-8,5

Az RT-qPCR mérésekkel kapott normalizált expressziós értékek szignifikanciájának kiszámítását Mann-Whitney U teszttel végeztük a GBM vs. kontrollcsoport összehasonlításban, melynek eredményeként elmondható, hogy mind az upregulált *E2F2*, *HOXD13*, *VEGFA*, *CDC45*, *AURKB*, *HOXC10* és *MYBL2*, mind a downregulált *FABP6*, *PRLHR*, *NEUROD6*, *CBLN1*, *HRH3*, *HCN1* és *RELN* gének esetében sikeresen megerősítettük a szekvenálás során megfigyelt eltérő expressziót a GBM csoportban a kontrollhoz viszonyítva. A Mann-Whitney U teszttel nyert szignifikancia értékeket az upregulált mRNS-ek esetében a **30. (a) ábra**, a downregulált mRNS-ek esetében pedig a **30. (b) ábra** szemlélteti.

(a)



(b)



30. ábra: A validálási folyamatban részt vevő **(a)** szignifikánsan upregulált és **(b)** szignifikánsan downregulált mRNS-ek normalizált Ct-értékeinek ábrázolása a GraphPad 8.0.1 program segítségével. A feltüntetett *p*-értékek kalkulációja Mann-Whitney U teszttel történt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Az upregulált mRNS-ek mindegyike, valamint a *HRH3*, *CBLN1*, *RELN* és *PRLHR* downregulált mRNS-ek $p < 0,001$ értékkel rendelkeznek. Míg a szintén downregulált *HCN1* és *NEUROD6* esetében $p < 0,01$, a *FABP6* tekintetében pedig $p < 0,05$ értéket kaptunk.

9.2.7. Az új generációs szekvenálással (NGS) meghatározott miRNS és mRNS expresszió közötti korreláció megállapítása

Az NGS adatok bioinformatikai elemzését és azok validálását követően a deregulált miRNS és mRNS adatkészletünk között fennálló korreláció megállapítása érdekében a miRTarBase és a miRTargetLink 2.0 adatbázisok segítségével miRNS-mRNS kölcsönhatásokat vizsgáltunk, amely során csak a kísérletesen validált target gén-interakciókat vettük figyelembe. Az analízissel nyert miRNS-ek és azok cél mRNS-einek expressziója közötti inverz korrelációt a **5. táblázat** mutatja be.

5. táblázat: Az NGS adatkészletünkben megtalálható deregulált miRNS-ek és azok kísérletesen validált target génjei között megfigyelhető korreláció.

Szabályozott gén	Biológiai folyamat	Expresszió változása (up/down)	miRNS	Expresszió változása (up/down)	Referenciák
<i>AHR</i>	transzkripció szabályozása	up	hsa-miR-124-3p	down	[Liu et al., 2018]
<i>E2F2</i>	transzkripció szabályozása	up	hsa-miR-218-5p	down	[Zhang et al., 2015]
<i>HOXC10</i>	transzkripció szabályozása	up	hsa-miR-129-5p	down	[Liu et al., 2020]
<i>HOXD4</i>	transzkripció szabályozása	up	hsa-miR-10b	up	[Phua et al., 2011; Deforz et al., 2022]
<i>MYBL2</i>	transzkripció szabályozása	up	hsa-miR-30e-5p	down	[Zhang et al., 2018]

<i>NEUROD2</i>	transzkripció szabályozása	down	hsa-miR-210-3p	up	[Agrawal et al., 2018]
<i>AJAP1</i>	sejtdhézió	down	hsa-miR-196a-5p	up	[Takkar et al., 2021]
<i>MMP9</i>	sejtmigráció	up	hsa-miR-490-3p	down	[Zhang et al., 2019]
<i>POSTN</i>	sejtmigráció	up	hsa-miR-340-5p	down	[Liu et al., 2019]
<i>STC2</i>	sejtmigráció	up	hsa-miR-381-3p	down	[Ma et al., 2020]
<i>GABRA1</i>	szinaptikus átvitel	down	hsa-miR-155-5p	up	[D'Urso et al., 2012]
<i>GABRB2</i>	szinaptikus átvitel	down	hsa-miR-10a-5p hsa-miR-10b-5p	up	[Grigore et al., 2024; Liu et al., 2020]
<i>HCN1</i>	idegimpulzus átvitele	down	hsa-miR-10a-5p hsa-miR-10b-5p	up	[Valle-Garcia et al., 2024]
<i>AURKA</i>	sejtciklus szabályozása	up	hsa-miR-124-3p	down	[Huang et al., 2021]
<i>AURKB</i>	sejtciklus szabályozása	up	hsa-miR-93-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-130b-3p	up	[Huang et al., 2021]
<i>CDC45</i>	sejtciklus szabályozása	up	hsa-miR-485-5p	down	[Liu et al., 2021]
<i>CDK6</i>	sejtciklus szabályozása	up	hsa-miR-107	down	[Chen et al., 2013]
<i>EGFR</i>	sejtproliferáció	up	hsa-miR-7	down	[Kefas et al., 2008]
<i>VEGFA</i>	sejtproliferáció angiogenezis	up	hsa-miR-383-5p	down	[Liu et al., 2024]
<i>LTBP-1</i>	tumor-asszociált makrofágok szabályozása	up	hsa-miR-340-5p	down	[Liu et al., 2019]
<i>POSTN</i>	tumor-asszociált makrofágok szabályozása	up	hsa-miR-340-5p	down	[Liu et al., 2019]
<i>BCL2</i>	apoptózis	up	hsa-miR-136-3p	down	[Yang et al., 2012]

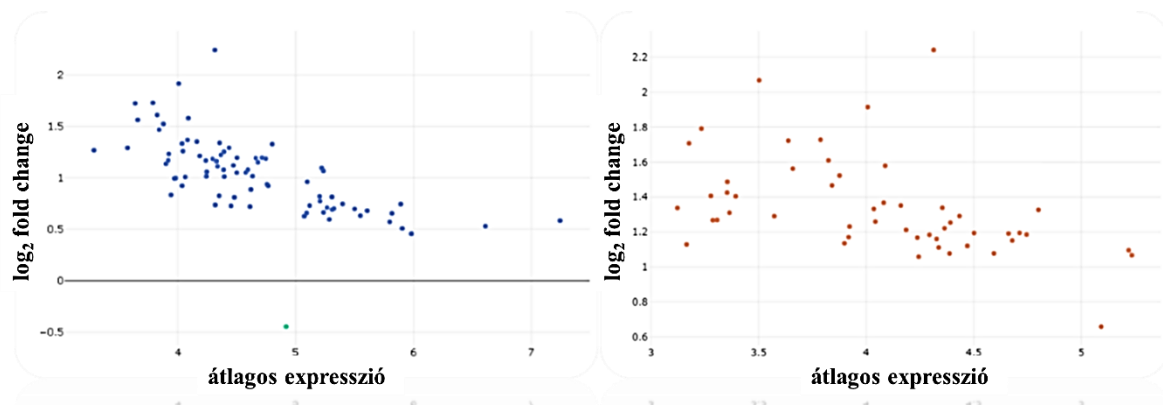
<i>EZH2</i>	epigenetikai szabályozás	up	hsa-miR-138-5p, hsa-miR-490-3p	down	[Qiu et al., 2013; Vinchure et al., 2019]
-------------	--------------------------	----	-----------------------------------	------	--

Az analízissel kapott korrelációs adatok alapján arra a feltételezésre jutottunk, hogy a GBM-es páciensekben szignifikáns mértékben up-, vagy downregulálódott miRNS-ek részt vehetnek a sejtciklus (*AURKB*, *CDC45*, *CDK6*), a sejtproliferáció (*EGFR*, *VEGFA*) és az angiogenezis (*VEGFA*) folyamatában szerepet játszó gének kifejeződésének szabályozásában, ezáltal tumornövekedést támogató hatást kifejtve. Továbbá ugyanebben a kontextusban elmondható, hogy kölcsönhatnak olyan upregulált transzkripciós faktorokkal, úgymint az *E2F2* és a *MYBL2*, melyek szabályozzák a sejtciklusban, a sejt differenciációban és a sejtproliferációban részt vevő gének átírását. Ezen felül más target gének (*AJAPI*, *MMP9*, *POSTN*, *STC2*) az adhézió vagy a migráció szabályozásával elősegítik az áttétképződést, míg az upregulált *HOXC10* részt vesz a migrációs kapacitást fokozó gének transzkripciójában. Ezek mellett olyan géneket (*LTBP-1*, *POSTN*) is azonosítottunk, amelyeken keresztül a tumorhoz kapcsolódó makrofágok szabályozó funkciója befolyásolhatja a tumor mikrokörnyezetét.

9.3. Eltérő mértékben expresszáldott miRNS-ek azonosítása GBM-es betegek és egészséges kontroll egyének plazmamintáiból NanoString nCounter Analízis alapján

A GBM-es betegek és az egészséges kontrollcsoportba tartozó egyének miRNS expressziós profiljának összehasonlítása 6 GBM-es és 6 porckorongsérvel diagnosztizált személy - mint egészséges kontroll - plazmamintájának felhasználásával történt. A betegek életkora 52 és 69 év között mozgott, az átlagéletkoruk 61,3 év volt, míg a kontrollcsoport tagjai 42 és 68 év közöttiek voltak, átlagéletkoruk pedig 58,6 év volt. Mindkét csoportban egyenlő arányban szerepeltek nők és férfiak. Az említett mintákban eltérő expressziót mutató miRNS-ek a NanoString nCounter Analysis System (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA) nCounter Human v3 miRNS panel segítségével kerültek meghatározásra. Az analízissel kapott normalizált miRNS-számlálási értékek jelentősen eltértek a vizsgált csoportok között, melyek közül a kontrollcsoportban a legtöbb minta miRNS-tartalma igen alacsony volt, néhány kivételtől eltekintve. A vizsgált miRNS-ek közül a hsa-miR-451a esetében figyeltük meg a legmagasabb normalizált számlálási értéket, mely a kontroll csoport esetében 1144, a GBM-es betegekben pedig 2965 csoportos átlagértékkel volt jellemezhető. Ezt a hsa-let-7i-5p és a hsa-

miR-6721-5p követte (csoportos átlagértékek kontroll vs. GBM: 233, illetve 349; 179, illetve 254). Ennek ellenére ezen magas mértékű expressziót mutató miRNS-ek egyike sem mutatott szignifikánsan eltérő expressziót a vizsgált csoportok között. A teljes adatkészlet normalizálását 10 háztartási miRNS mértani átlagát véve végezték. Az analízis eredményeként a vizsgált 798 egyedi miRNS-ből 107 mutatott szignifikáns különbséget a daganatos és a normál plazmaminták között a szűrési és differenciális expressziós elemzést követően. A kapott expressziós adatokat a fold-change (FC) és hamis felfedezési arány (FDR – false discovery rate) cut-off határértékeihez (\log_2FC 1 és FDR 0,1) igazítva csupán egyetlen miRNS, a hsa-miR-181a-3p mutatott downregulációt és összesen 52 miRNS mutatott upregulációt (**6. táblázat**) a GBM-es mintákban az egészséges kontrollhoz viszonyítva, melyek közül a hsa-miR-338-5p expressziós szintje volt a legmagasabb ($\log_2FC = 2,14$). Ezen eltérően expresszálódó miRNS-ek eloszlását a **31. (a)** és **(b)** ábra szemlélteti.



31. ábra: A GBM-es betegek plazmamintáiban eltérő mértékű expressziót mutató miRNS-ek normalizált értékének ábrázolás \log_2FC és átlagos expressziós értékek függvényében. Az **(a)** jelölésű MA plot az expressziós adatok FDR 0,15 és FC 0,5-ös határértékekre történő szűrését, míg a **(b)** ábra ugyanezeket az adatokat szemlélteti FDR 0,1 és FC 1 értékek beállításával.

A szakirodalom, valamint a miRCancer és miR2Disease adatbázisokban történő keresésünk eredménye alapján elmondható, hogy az általunk azonosított eltérő mértékű expressziót mutató miRNS-ek többségéről (~94%) már korábban kiderült, hogy különböző rosszindulatú daganatokkal, illetve közülük jónéhányan (~57%) a GBM-val is összefüggésbe hozhatóak (**6. táblázat**). Azonban a GBM-hez köthető, eddig még más kutatócsoportok által le nem írt 2 új asszociációt is azonosítottunk. Ezek a hsa-miR-1252-5p és a hsa-miR-591.

6. táblázat: A GBM vs. kontroll csoport plazmamintáiban szignifikánsan eltérő expressziót mutató miRNS-ek listája log2FC értékeik és a különböző tumortípusok kialakulásában betöltött szerepük alapján.

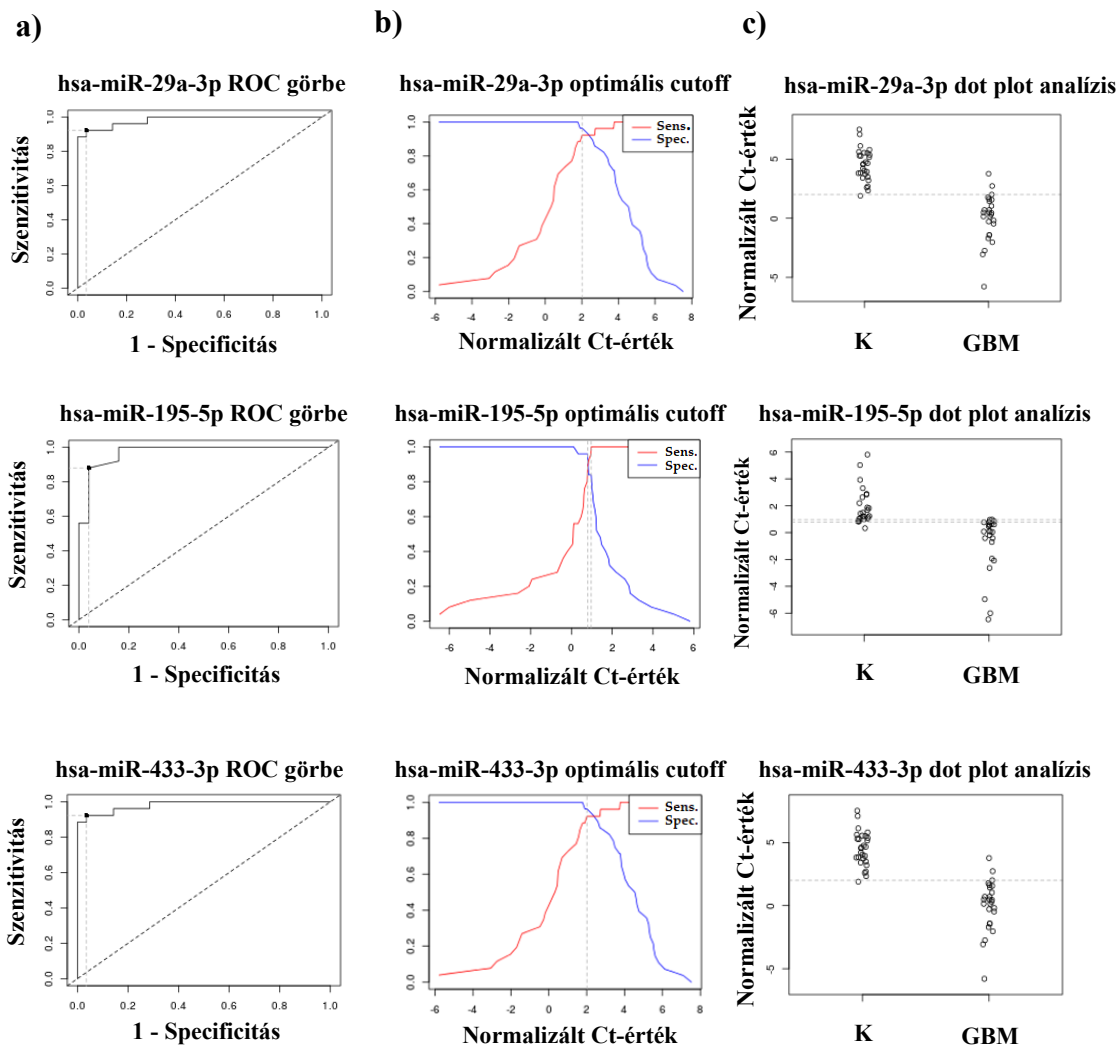
	miRNS ID	log2FC	miRNS ID	log2FC
A GBM-val és egyéb tumortípusokkal asszociációt mutató miRNS-ek	hsa-miR-182-5p	1.61	hsa-miR-338-5p	2.14
	hsa miR-1289	1.58	hsa-miR-433-3p	1.9
	hsa-miR-610	1.47	hsa-miR-302e	1.78
	hsa-miR-22-3p	1.44	hsa-miR-6503-3p	1.6
	hsa-miR-758-5p	1.36	hsa-miR-1273c	1.52
	hsa-miR-520d-3p	1.35	hsa-miR-195-5p	1.48
	hsa-miR-3065-3p	1.27	hsa-miR-362-3p	1.3
	hsa-miR-503-3p	1.27	hsa-miR-369-3p	1.25
	hsa miR-650	1.27	hsa-miR-4425	1.19
	hsa miR-135a-5p	1.27	hsa-miR-510-3p	1.18
	hsa-miR-29a-3p	1.26	hsa miR-3127-5p	1.18
	hsa-miR-215-5p	1.22	hsa miR-625-5p	1.15
	hsa-miR-152-5p	1.18	hsa-miR-5481	1.14
	hsa-miR-548e-3p	1.18	hsa-miR-656-3p	1.13
	hsa-miR-769-3p	1.15	hsa-miR-331-3p	1.11
	hsa-miR-296-3p	1.15	hsa-miR-520h	1.1
	hsa-miR-133a-3p	1.14	hsa-miR-3131	1.1
	hsa-miR-1296-3p	1.14	hsa-miR-361-5p	1.09
	hsa-miR-381-3p	1.14	hsa-miR-1908-3p	1.06
	hsa-miR-1185-5p	1.13	hsa-miR-744-5p	1.05
	hsa-miR-423-5p	1.12	hsa-miR-4536-3p	1.01
	hsa-miR-497-5p	1.1		
	hsa-miR-197-5p	1.07	Csak a GBM-val mutat asszociációt	
	hsa-miR-573	1.05	hsa-miR-423-3p	1.42
	hsa-miR-147a	1.04		
	hsa-miR-196b-5p	1.01		
	hsa-miR-433-5p	1.01	Új asszociáció	
	hsa-miR-345-5p	1.01	hsa-miR-1252-5p	1.18
hsa-miR-181a-3p	-0.43	hsa-miR-591	1.22	

Egyéb tumortípusokkal asszociációt mutató miRNS-ek

9.3.1. Az eltérő mértékben expresszáldott miRNS-ek plazmamintákból történő azonosítása RT-qPCR módszerrel

A NanoString analízissel kapott eredmények validálásához véletlenszerűen kiválasztott 6 miRNS (hsa-miR-433-3p, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-29a-3p és hsa-miR-1286-3p, ez utóbbi nem mutatott eltérő mértékű expressziót a két csoport között) relatív expressziójának meghatározása RT-qPCR mérésekkel történt a hsa-miR-16-5p-t használva referencia miRNS-ként [Ma et al., 2018; Fong et al., 2015]. Minden kísérlet során 3 párhuzamos mérést végeztünk. Az RT-qPCR mérésekből származó normalizált adatok alapján a hsa-miR-433-3p, a hsa-miR-195-5p és a hsa-miR-29a-3p expressziója mutatott szignifikáns upregulációt a GBM-es csoportban a kontrollcsoporthoz képest (a Kruskal-Wallis p -értékek a hsa-miR-433-3p esetében $p = 0,00714$ -nek a hsa-miR-195-5p esetén $p = 0,0466$ -nek, míg a hsa-miR-29a-3p esetében $p = 0,0041$ -nek adódtak), míg a hsa-miR-362-3p és a hsa-miR-133a-3p esetében sem a GBM-es, sem az egészséges kontrollmintákban nem tudtunk expressziót kimutatni.

A NanoString analízis és az RT-qPCR mérésekkel történő validálást követően a diagnosztikai hatékonyságot szemléltető ROC-AUC görbéket készítettünk a két csoport között szignifikánsan eltérő expressziót mutató hsa-miR-433-3p, hsa-miR-195-5p és hsa-miR-29a-3p normalizált expressziós adatait felhasználva. Az analízissel kapott AUC értékek 0,98214-nek, 0,9704-nek és 0,98214-nek adódtak a hsa-miR-433-3p, hsa-miR-195-5p és a hsa-miR-29a-3p esetében, melyek mindegyike kiemelkedő diagnosztikai potenciállal ruházta fel a vizsgált miRNS-eket, ezáltal előrejelezve esetleges biomarkerként történő alkalmazhatóságukat a klinikai gyakorlatban. Ezt követően az optimális cut-off értékek meghatározásához a kontroll- és a GBM-es csoportban a validált miRNS-ek normalizált Ct-értékeit dichotomizáltuk, a szenzitivitási értékek 1-specificitási értékekhez viszonyított leképezésével. Ennek eredményeként a hsa-miR-433-3p és a hsa-miR-29a-3p azonos szenzitivitási (92%) és 1-specificitási (96%) értéke volt megfigyelhető, míg a hsa-miR-195-5p esetében a szenzitivitás (88%) valamivel alacsonyabb volt változatlan 1-specificitás érték (96%) mellett (**32. ábra**).

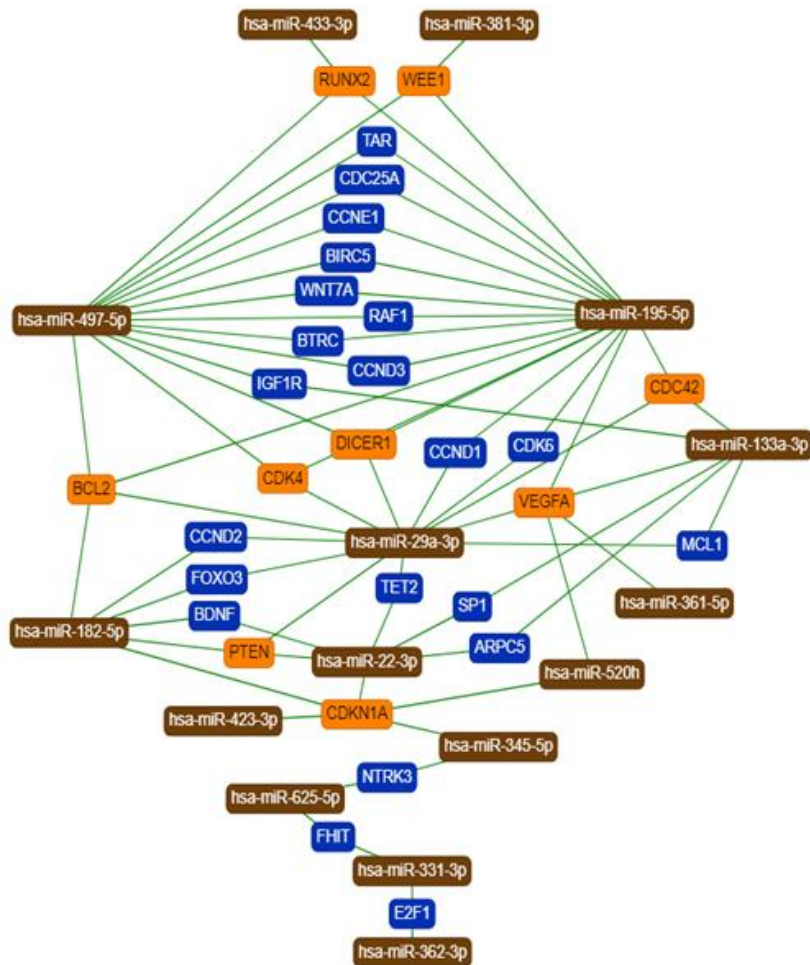


32. ábra: (a) Az RT-qPCR módszerrel sikeresen validált miRNS-ek (hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-433-3p) szenzitivitási és 1- specificitási értékének ábrázolása ROC-AUC görbék segítségével. (b) A validált miRNS-ek (hsa-miR-29a-3p – normalizált Ct-érték: 2; hsa-miR-195-5p – normalizált Ct-érték: 0,97; hsa-miR-433-3p – normalizált Ct-érték: 2) optimális cut-off értékei. (c) A validált miRNS-ek dot plot analízise a kontroll és GBM-es plazmamintákra vonatkoztatva.

9.3.2. A miRNS-ek rangsorolása hálózat-alapú elemzéssel, targetgén predikció

Az eltérő mértékű expressziót mutató miRNS-ek funkciójának pontos jellemzéséhez kritikus fontosságú a miRNS-célpontok megfelelő azonosítása. A miRNS funkció hálózatalapú elemzésének fontosságát az a tény indokolja, hogy egyetlen miRNS nem csak egy, hanem több különböző mRNS-sel is kölcsönhatásba léphet, valamint egy mRNS transzlációját több miRNS is szabályozhatja. Így az elemzésünk során létrehozott hálózatban közvetlen miRNS-célgén, valamint fehérje-fehérje kölcsönhatások szerepelnek, mely megközelítés lehetővé teszi az adott miRNS-ek hálózaton belüli fontosságának meghatározását hálózat-specifikus centralitás értékek alapján. Az így kapott eredményeink szerint a hsa-miR-215-5p rendelkezett a legmagasabb fokszámértékkel (755), amelyet a hsa-miR-195-5p és a hsa-miR-362-3p követett 640 és 536 fokszámértékekkel, mely a hálózatban betöltött fontosságukat tükrözi.

Ezt követően a kísérletünk során azonosított, szignifikánsan eltérő expressziót mutató miRNS-ek adatait felhasználva a miRTargetLink adatbázis használatával egy úgynevezett „core” miRNS-target hálózatot hoztunk létre azzal a céllal, hogy reprezentáljuk a kísérletesen validált miRNS-target interakciókat a 10 legnagyobb mértékű expressziós értékkel rendelkező miRNS esetében. Ebbe az analízisbe az RT-qPCR-rel történő validálás során vizsgált hsa-miR-433-3p, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-133a-3p és hsa-miR-29a-3p miRNS-eket is bevontuk (**33. ábra**). A hálózatépítés eredményeként a teljes hálózatban szereplő, kettőnél több kölcsönhatással rendelkező közös célgének az alábbiak voltak: RUNX2 transzkripciós factor (*RUNX2*), nukleáris kináz (*WEE1*, a sejtciklus progressziójának kulcsfontosságú szabályozója), sejtosztódási ciklus fehérje 42 (*CDC42*), B-sejtes limfóma 2 (*BCL2*, az apoptózis szabályozója), ciklin-függő kináz 4 (*CDK4*), RNS-hasító endonukleáz 1 (*DICER1*), vaszkuláris endoteliális növekedési faktor A (*VEGFA*), foszfatáz és tenzin homológ (*PTEN*) és a ciklinfüggő kináz inhibitor 1A (*CDK1NA*), melyek fehérjetermékei ismertén részt vesznek a tumorgenezis folyamatában (**33. ábra**) [Okura et al., 2016; Zhao et al., 2019; Luo et al., 2019; McDonald et al., 2002].

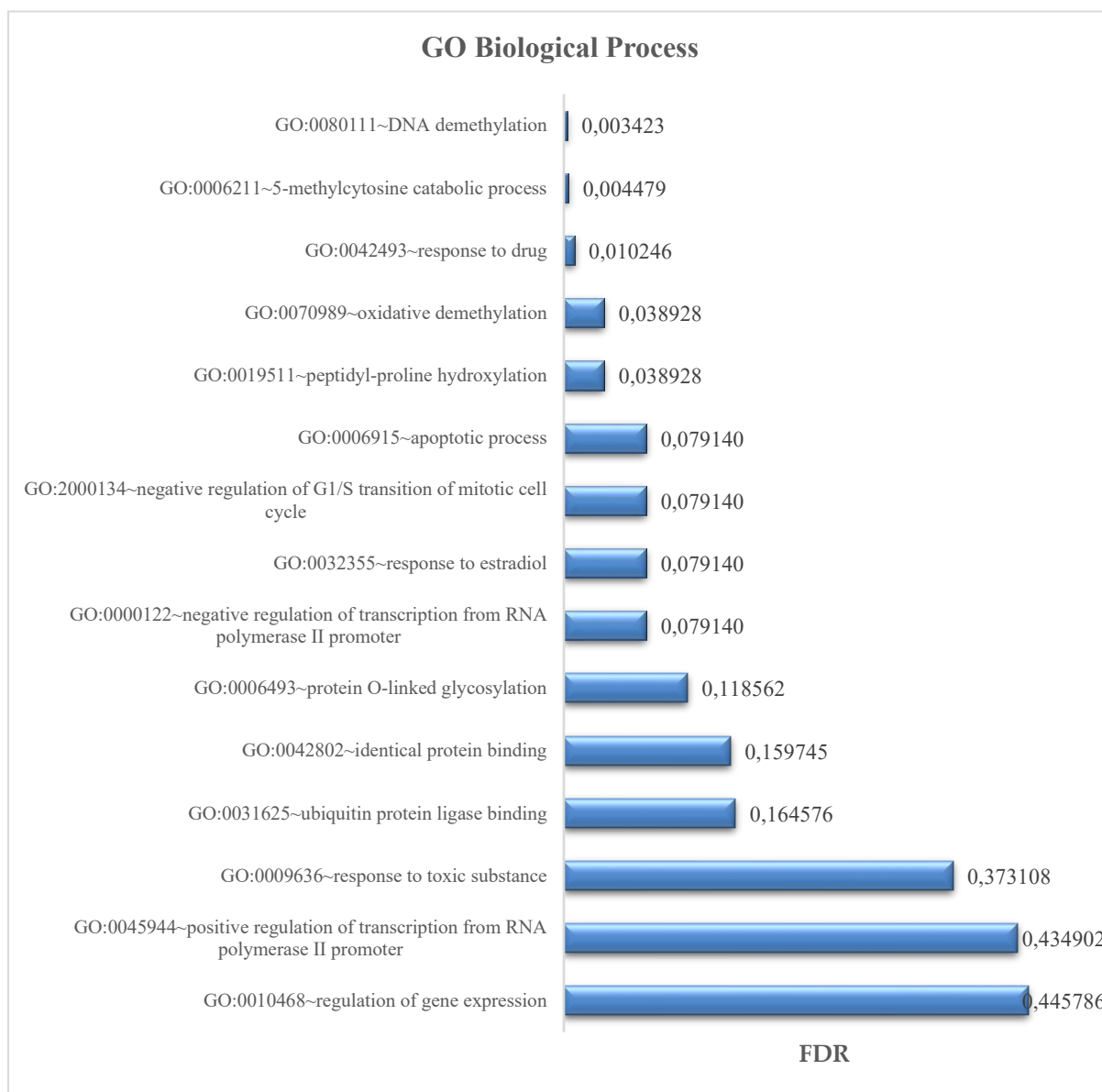


33. ábra: Az eltérő mértékű expressziót mutató miRNS-ek és azok kísérletesen validált target génjeinek „core” hálózata. A hálózatépítés a miRTargetLink adatbázis „strong” interakció opciójával történt. Narancssárga színnel a teljes hálózatban több, mint két interakcióval, míg kék színnel a két interakcióval rendelkező célgének szerepelnek.

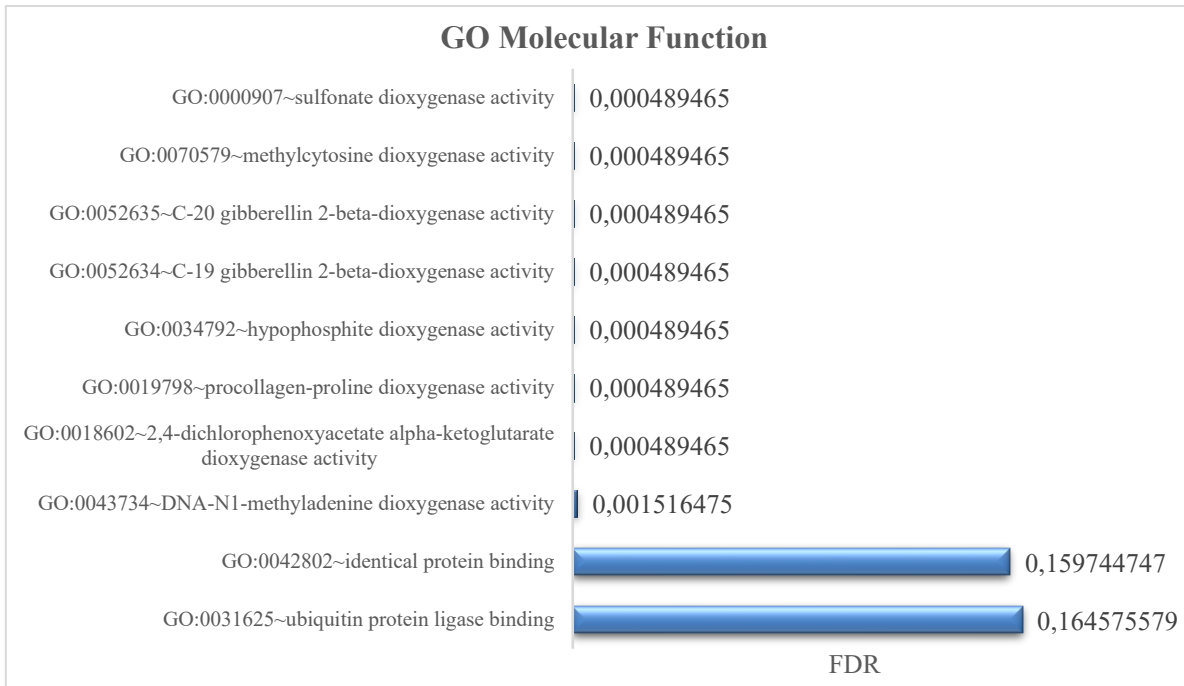
9.3.3. A miRNS-targetek gén ontológiai és útvonal-dúsulási elemzése

Annak érdekében, hogy jobban megértsük a prediktált target gének funkcióját és a szignifikánsan eltérő expressziót mutató miRNS-ek lehetséges patofiziológiai szerepét a GBM kialakulásában, a DAVID bioinformatikai szoftver segítségével a biológiai folyamatokat jellemző GO (GO biológiai folyamat: GO_BP és molekuláris funkció: GO_MF) és az útvonalakat detektáló KEGG analízist végeztünk a legnagyobb mértékben upregulált 38 és az egyetlen downregulált miRNS (hsa-miR-181a-3p) bevonásával. A GO_BP (**34. ábra**) és GO_MF (**35. ábra**) alapú analízissel azonosított biológiai folyamatok között DNS-

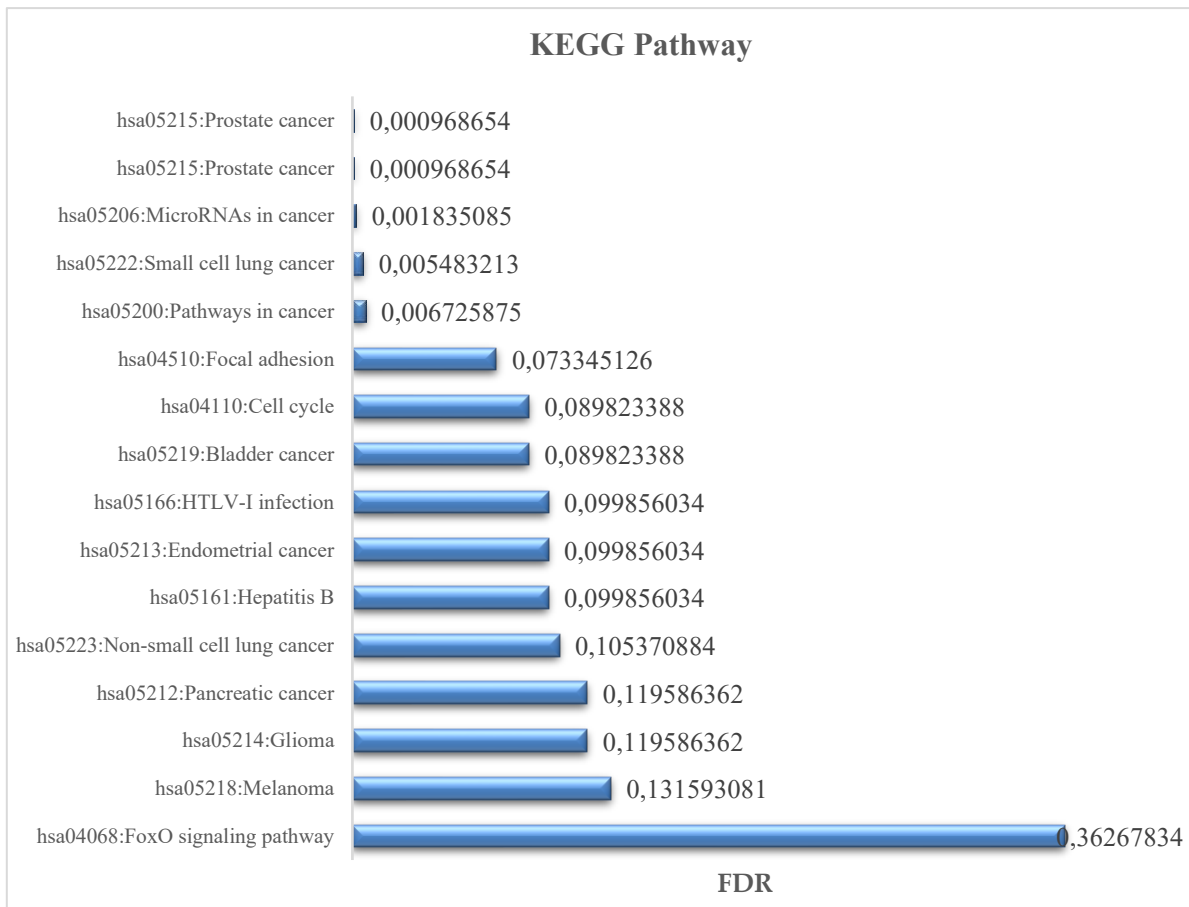
demetilációt, fehérje-O-kapcsolt glikozilációt, az RNS-polimeráz II promótorról történő transzkripció pozitív szabályozását, az RNS-polimeráz II promótorról történő transzkripció negatív szabályozását, a génexpresszió szabályozását, a mitotikus sejtciklus G1/S átmenetének negatív szabályozását és az apoptózis folyamatát azonosítottuk. Míg a KEGG útvonal elemzésének eredménye alapján számos daganattípussal, úgymint a glióma, prosztata-daganat, hólyagdaganat, kissejtes- és nem kissejtes tüdő-daganat, melanoma, endometrium-daganat, hasnyálmirigy-daganat, valamint vírusfertőzéshez köthető útvonalakkal (hepatitis B, HTLV-I fertőzés) voltak összefüggésbe hozhatóak a vizsgált top miRNS-ek (36. ábra).



34. ábra: A top 38 deregulált miRNS célgénjeinek funkcionális annotációs elemzése a GO biológiai folyamatokban való dúsulásuk alapján. Az ábrán jelölt útvonalak szignifikanciáját az oszlopdiagramon feltüntetett FDR-értékek jellemzik.



35. ábra: A top 38 deregulált miRNS célgénjeinek funkcionális annotációs elemzése a GO molekuláris funkciók alapuló dúsulásuk alapján. Az ábrán jelölt útvonalak szignifikanciáját az oszlopdiagramon feltüntetett FDR-értékek jellemzik.

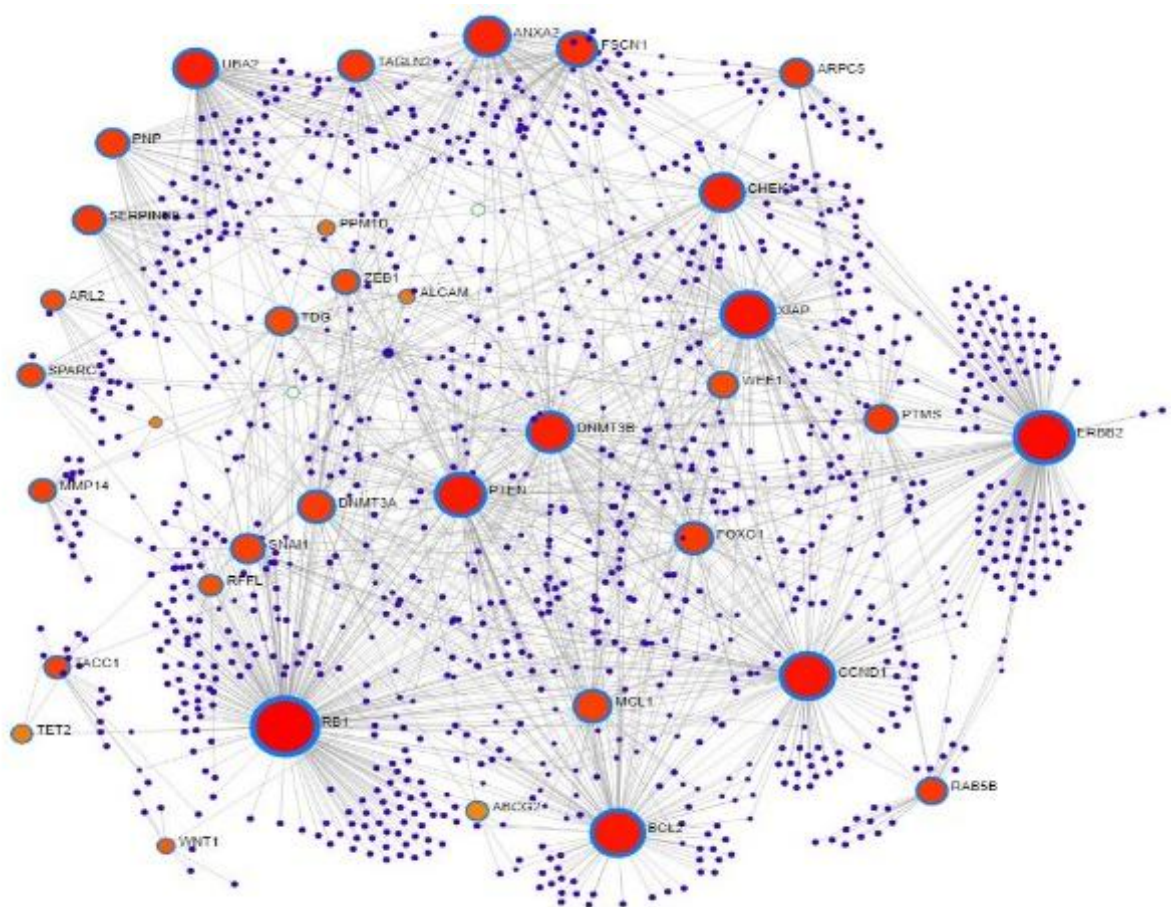


36. ábra: A top 38 deregulált miRNS célgénjeinek funkcionális annotációs elemzése a specifikus KEGG útvonalakban való dúsulásuk alapján. Az ábrán jelölt útvonalak szignifikanciáját az oszlopdiagramon feltüntetett FDR-értékek jellemzik.

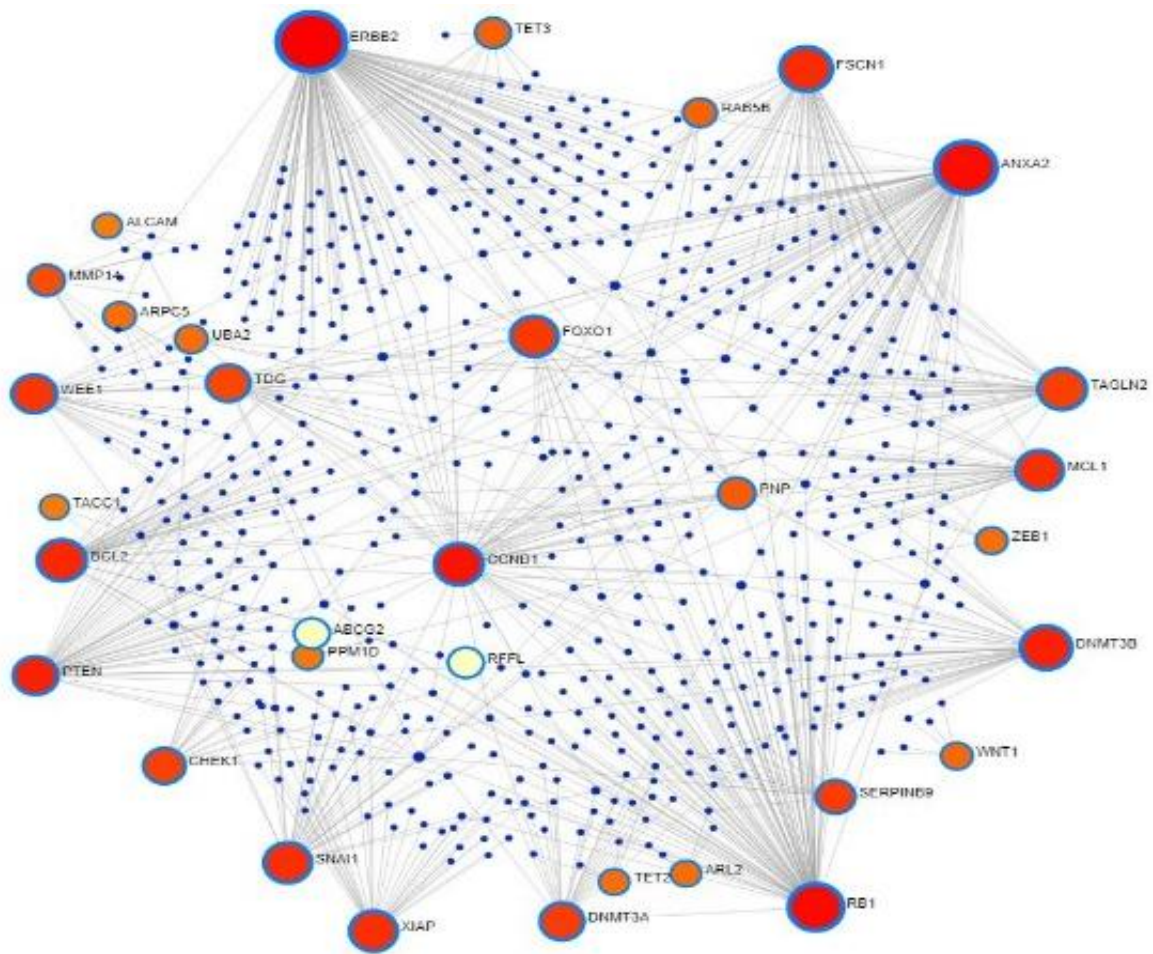
9.3.4. A miRNS-targetek fehérje-fehérje interakciós (PPI) hálózatának elemzése

A géndúsulási és útvonal analízist követően a top 38 upregulált és az egyetlen downregulált miRNS közös fehérje-célpontjai alapján a NetworkAnalyst segítségével először egy általános, majd egy úgynevezett „cortex-specifikus” PPI hálózatot hoztunk létre szabályozó funkciójuk pontosabb feltárása érdekében. Mindkét generált hálózat igen nagyméretűnek bizonyult, melyek az általános PPI hálózatban összesen 1191 csomóponttal és az azokat összekötő 1676 éllel, míg a „cortex-specifikus” PPI hálózat esetében 668 csomóponttal és 852 éllel voltak jellemezhetőek (**37. (a) és (b) ábra**).

(a)



(b)



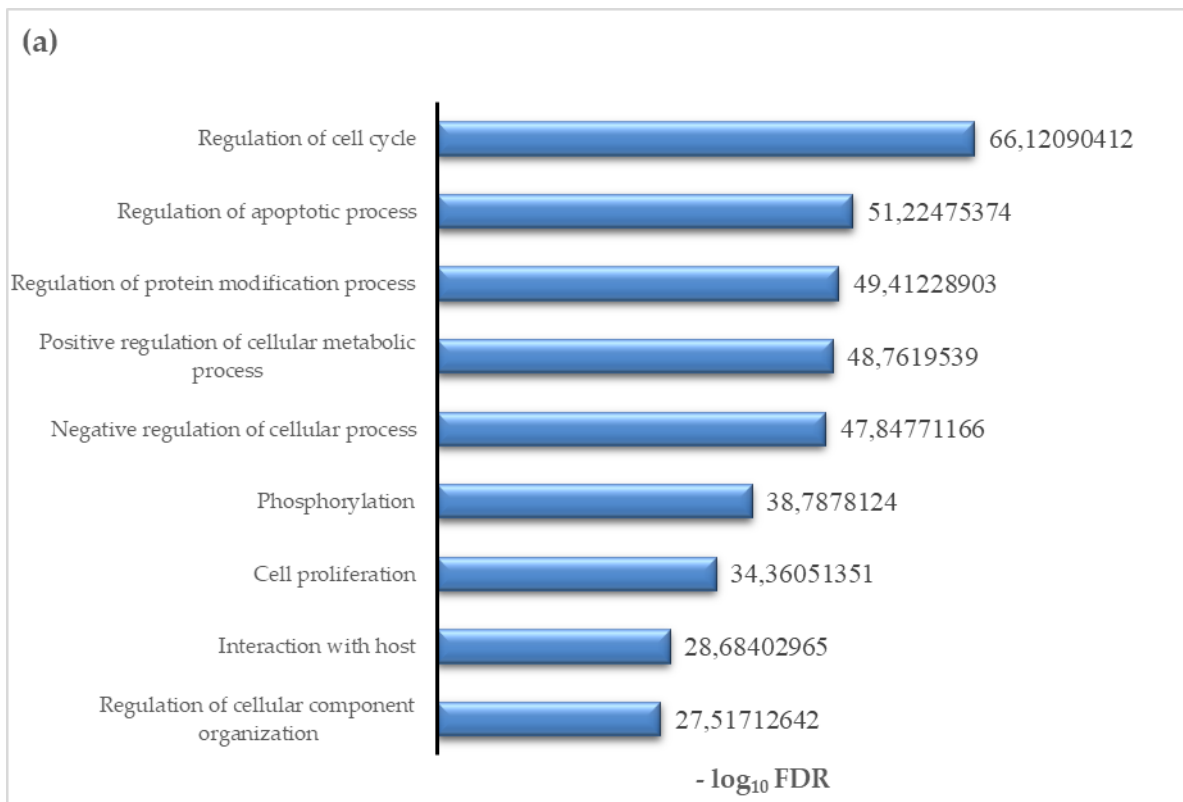
37. ábra: A top 39 eltérő mértékű expressziót mutató miRNS közös célpontjai alapján a NetworkAnalyst segítségével létrehozott (a) általános és (b) „cortex-specifikus” PPI minimum hálózatok. Mindkét hálózat a fő csomópontokat (piros színnel jelölve) tartalmazza, melyek mindegyike egy-egy fehérjét képvisel. Az egyes csomópontok mérete fokszám-központságuknak (degree centrality) felel meg, mely az egyes csomópontok kapcsolatainak számát viszonyítja a hálózatban lévő összes kapcsolathoz.

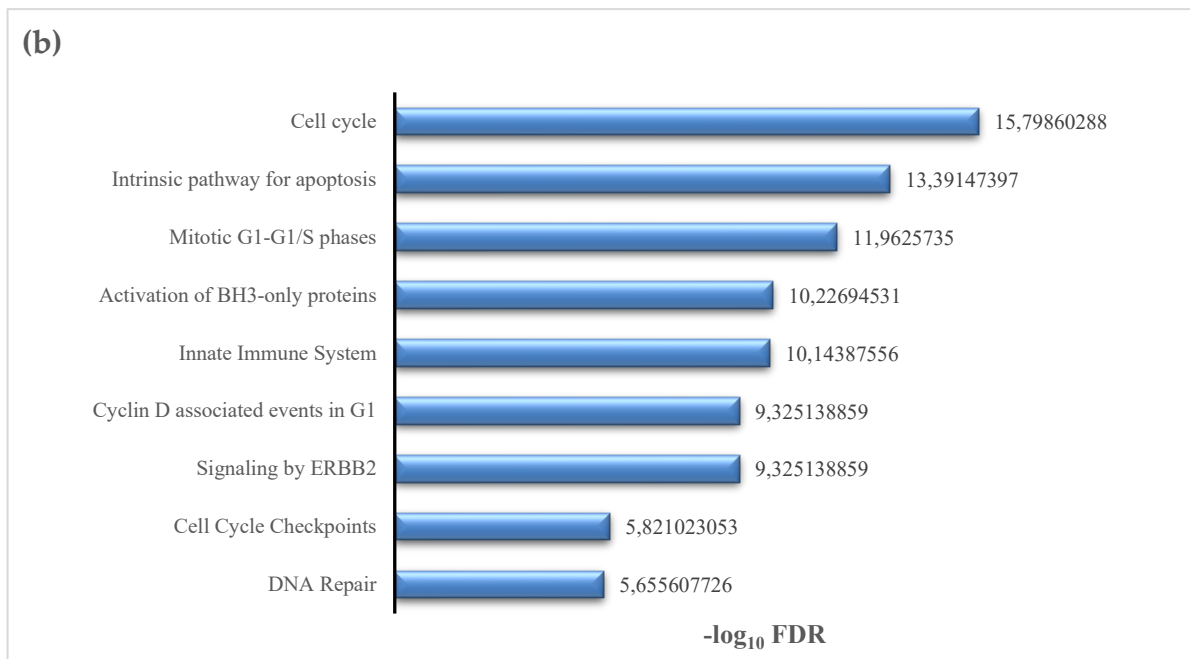
A két hálózat összehasonlítását követően arra a megállapításra jutottunk, hogy a biológiailag releváns, kulcsfontosságú csomópontok közül sok közös a két hálózatban, és olyan fehérjéket képviselnek, amelyekről már ismert, hogy részt vesznek a tumorgenezis folyamatában. Ilyen azonosított fehérjék például a BCL2, a retinoblasztóma 1 (RB1), a PTEN, az erb-b2 receptor tirozin-kináz 2 (ERBB2), a ciklin D1 (CCND1), a cinkujj E-boksz kötő homeobox 1 (ZEB1), a fascin aktin-kötő fehérje 1 (FSCN1), a Wnt1 jelátviteli fehérje (WNT1), az X-kromoszómához

kötött apoptózisgátló fehérje (XIAP), a forkhead box O1 transzkripciós faktor (FOXO1), az ubiquitin-szerű módosító aktiváló enzim 2 (UBA2), a DNS-metiltransferáz 3B (DNMT3B), az annexin A2 (ANXA2) és a WEE1.

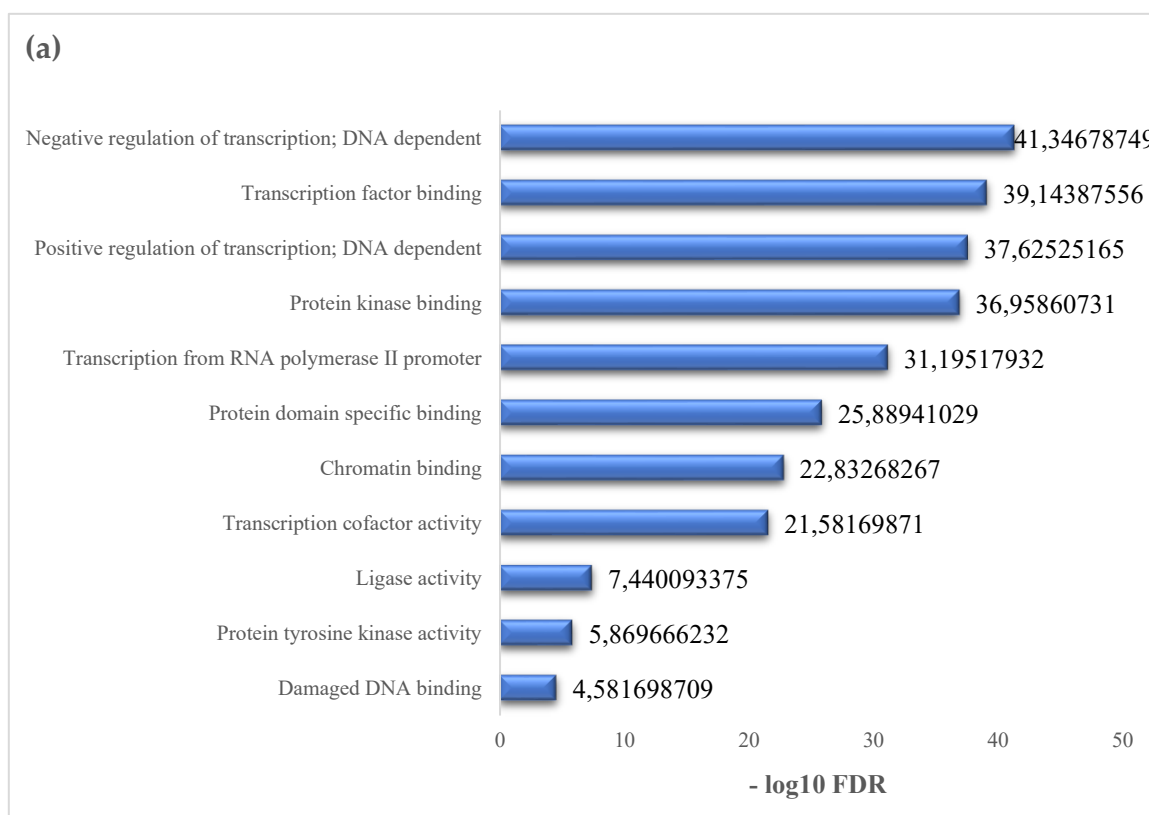
Azonban a csomópontok fokszám alapján történő rangsorolása nem volt azonos a két PPI hálózatban. Ugyanis az ERBB2, RB1, ANXA2, CCND1, PTEN, FSCN1, DNMT3B, BCL2, XIAP, FOXO és a WEE1 mindkét hálózatban jelen volt, azonban magasabb fokú centralitással voltak jellemezhetőek a „cortex-specifikus” PPI hálózatban.

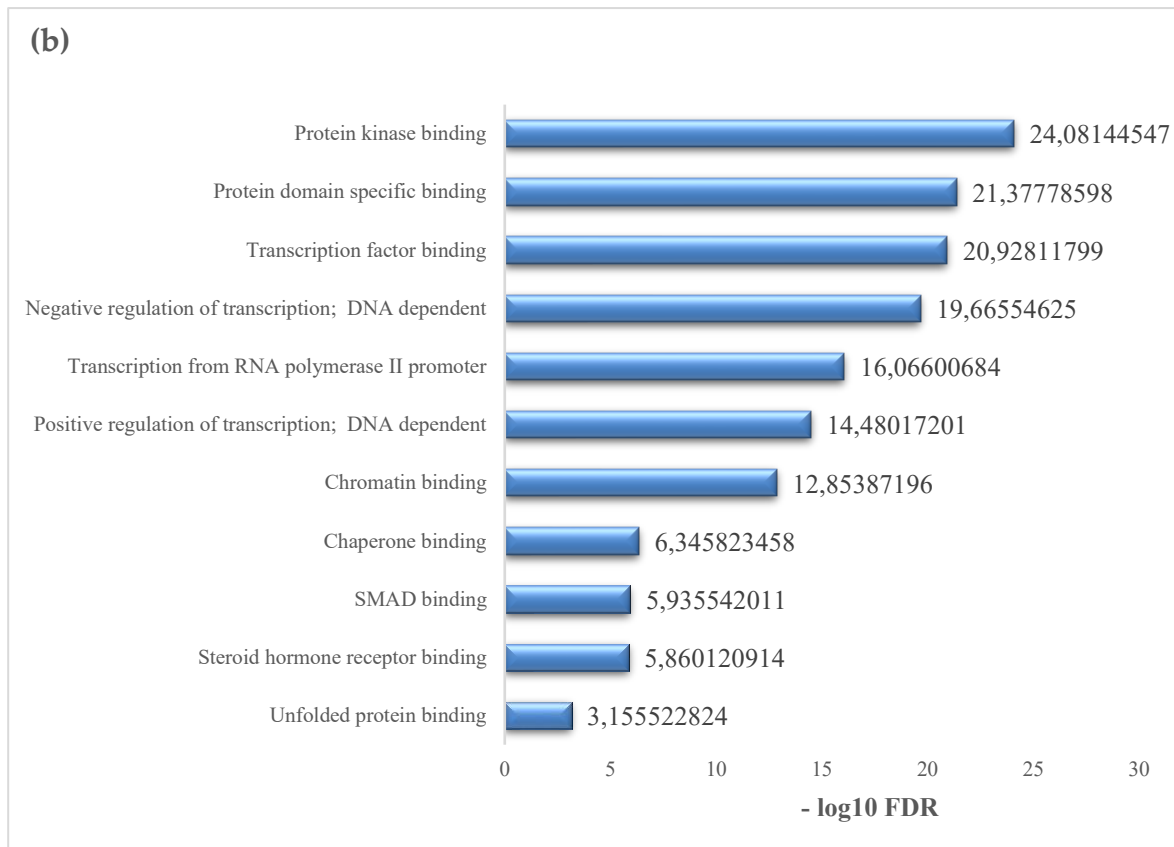
Ezt követően a NetworkAnalyst eszköz GO és KEGG adatbázisainak használatával PPI hálózat alapú funkcionális dúsulási és útvonal analízist is végeztünk az általános és a „cortex-specifikus” elemzéssel kapott eredmények összehasonlítása érdekében, melynek eredményeit a **38. és a 39. ábrák** szemléltetik. A funkcionális dúsulási elemzés eredményei arra engednek következtetni, hogy a plazmában fellelhető keringő miRNS-ek nem véletlenszerűen szabadulnak fel a sejtekből. Ezen miRNS-ek számos prediktált target génje a tumorgenezis folyamatát előmozdító, kritikusan fontos biológiai folyamatokban és útvonalakban mutat jelentős dúsulást. Úgymint, a sejtciklus, a vírusos karcinogenezis, az ubiquitin által közvetített proteolízis, az apoptózis, a FoxO-, a p53-, az ErbB-, a PI3K-Akt-, a neurotrofin jelátviteli útvonal, a glióma genézis, a transzkripciós szabályozási zavar vagy épp az EGFR tirozin-kináz inhibitor rezisztencia (**40. ábra**).



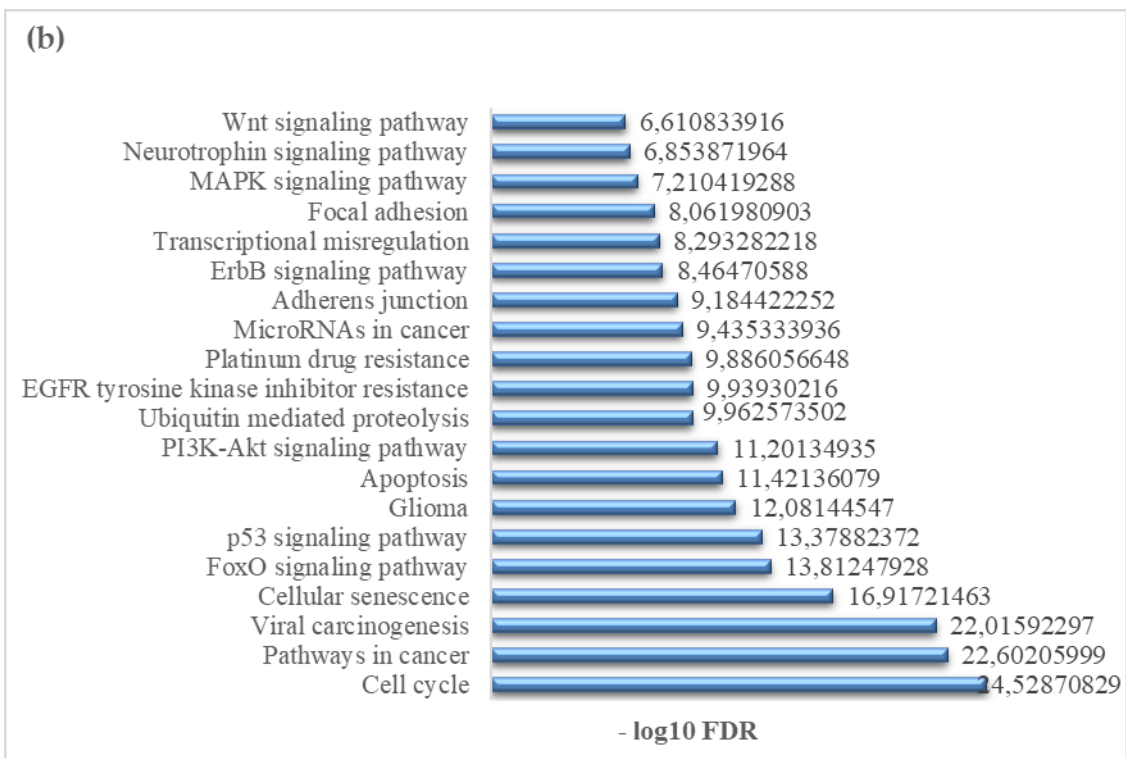
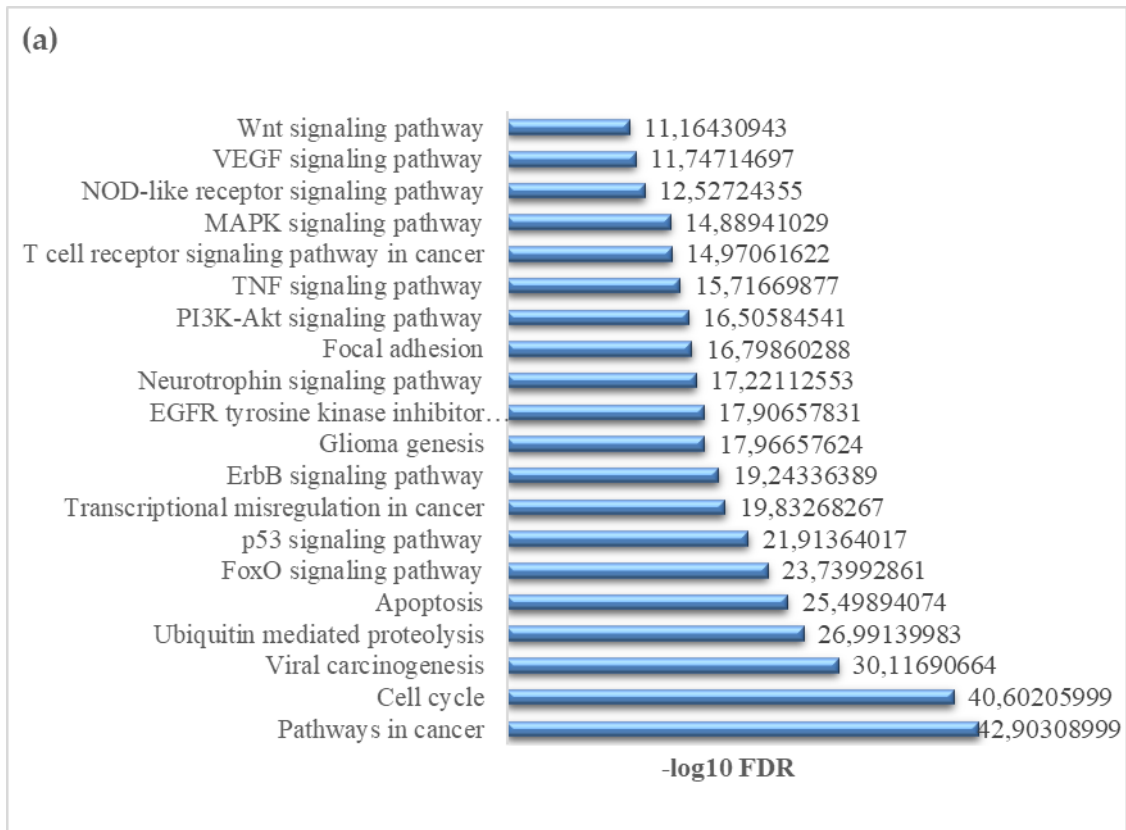


38. ábra: Az eltérő mértékben expresszáldott miRNS-ek célgénjeinek GO_BP alapú **(a)** általános és **(b)** „cortex-specifikus” funkcionális annotációs elemzése a NetwokAnalyst segítségével. Az ábrán jelölt útvonalak szignifikanciáját az oszlopdiagramon feltüntetett FDR-értékek jellemzik.





39. ábra: Az eltérő mértékben expresszáldott miRNS-ek célgénjeinek GO_MF alapú **(a)** általános és **(b)** „cortex-specifikus” funkcionális annotációs elemzése a NetwokAnalyst segítségével. Az ábrán jelölt útvonalak szignifikanciáját az oszlopdiagramon feltüntetett FDR-értékek jellemzik.



40. ábra: Az eltérő mértékben expresszáldott miRNS-ek célgénjeinek KEGG útvonal alapú **(a)** általános és **(b)** „cortex-specifikus” funkcionális annotációs elemzése a NetwokAnalyst segítségével. Az ábrán jelölt útvonalak szignifikanciáját az oszlopdiagramon feltüntetett FDR-értékek jellemzik.

10. Diszkusszió

A glioblastoma (GBM) jelenleg a magas grádusú gliómák több, mint 50%-át teszi ki, mely gyakoriságának és súlyosságának köszönhetően a neuroonkológia területén az egyik legnagyobb kihívást jelentő központi idegrendszeri daganattípust képviseli [Reimunde et al., 2021]. A GBM-et az esetek legnagyobb részében de novo kialakulás jellemzi, amely rendkívül gyorsan, néhány héten vagy hónapon belül következik be. Ritkább esetben azonban alacsonyabb grádusú gliómákból történő kifejlődése figyelhető meg [Bianco et al., 2017; Martínez-Garcia et al., 2018]. A betegség a patogenezisére eddig rendelkezésre álló, igen nagy mennyiségű adat ellenére továbbra is gyógyíthatatlannak minősíthető, melyen a komplex, multimodális kezelési stratégia sem segít jelentősen. A terápiát követő medián túlélési idő mindössze 15 hónapra, míg az 5 éves túlélési esély hozzávetőleg 10%-ra tehető [Ostrom et al., 2014; Shea et al., 2016]. Intenzív kutatottsága ellenére sem ismert még teljes mértékben a betegség molekuláris háttere, ezért továbbra is nagy az igény a kórkép kialakulása és progressziójának alakulása mögött álló olyan új molekulák azonosítására, amelyek a tumorgenezis folyamatának mélyrehatóbb megértése mellett képesek a diagnózis felállításának elősegítésében is. Ennek érdekében tanulmányunk elsődleges célkitűzése a GBM-re jellemző miRNS-ek - mint a többsejtű szervezetek univerzális és nélkülözhetetlen génszabályozó molekuláinak – szövet és plazmamintákban történő azonosítása, továbbá a tumorgenezisben betöltött szerepük, valamint az általuk ténylegesen szabályozott célgének igazolása volt. Ugyanis ezek a molekulák kiemelkedő diagnosztikai és/vagy prognosztikai biomarkerekként szolgálhatnak különböző daganatos megbetegedések esetén, köszönhetően szövetspecifikus kifejeződésüknek, illetve onkogén vagy tumorszupresszor működésüknek, mellyel olyan gének szabályozásában vesznek részt, amelyek szorosan összekapcsolhatók a daganatképződés folyamatával [Chakraborty et al., 2023]. További előnye ezen molekulák vizsgálatának, hogy a szövetek mellett a különböző testfolyadékokban (vér, szérum/plazma, cerebrospinalis folyadék, vizelet) is meglehetősen stabilan jelen vannak, így kóros expressziójuk szintén elősegítheti a különböző daganatos betegségek azonosítását. Ezen ismeretek fényében további célunk volt annak felmérése, hogy az identifikált miRNS-ek milyen eséllyel alkalmazhatóak a jövőben diagnosztikai biomarkerekként a klinikumban.

10.1. Eltérő mértékű expressziót mutató miRNS-ek és mRNS-ek azonosítása glioblastomában szenvedő betegek szövetmintáiban gén ontológiai és útvonal dúsulási elemzéssel kombinálva

A miRNS és mRNS szekvenálások eredményeit elemző bioinformatikai analíziseket, valamint a validálási folyamatot követő funkcionális dúsulási elemzéssel számos olyan, a GBM progressziójával kapcsolatos folyamatot sikerült feltárnunk, melyek az általunk azonosított eltérő mértékű expressziót mutató miRNS-ekhez és mRNS-ekhez köthetők. Ilyenek például a klasszikus neurotranszmitter-receptorok (NTRs), úgymint a gamma-aminobutirinsav (GABA) receptorok, a glutamát receptorok és a dopaminreceptorok eltérő expressziója, melyek mindegyike hozzájárulhat a tumor kialakulásához. A GBM-hez köthető NTRs megváltozott működéséről többek között Belotti és munkatársai is beszámoltak már, akik 10 *NTR* gén downregulációját azonosították sikeresen GBM-es betegek szövetmintáiból [Belotti et al., 2022]. Tanulmányunk során, hasonlóképpen Belotti-ék megfigyeléséhez a 10 *NTR* génből 5 gén (*GABRA1*, *GABRB2*, *GABRG2*, *GRIN1* és *DRD1*) szignifikáns mértékben csökkent expresszióját tudtuk kimutatni úgyszintén GBM-es betegek szövetmintáiból. Ezen génekhez köthetően D’Urso és munkatársai kimutatták, hogy a *GABRA1* a hsa-miR-155 poszttranszkripcionális szabályozása alatt áll, mely összefüggést az NGS adatkészletünk alapján készített miRNS-mRNS korrelációs adatok és az ezek alapján végzett target predikciós analízis is megerősítenek (**5. táblázat**) [D’Urso et al., 2012]. A KEGG adatbázis segítségével végzett útvonalelemzés alapján a miRNS-ekre vonatkozóan azt találtuk, hogy a deregulált miRNS-ek eltérő kombinációban különböző daganattípusok kialakulásában is szerepet játszhatnak, illetve több daganatképződéshez köthető útvonalban is dúsulást mutattak, beleértve a FoxO jelátviteli útvonalat az upregulálódott miRNS-ek, vagy a tumoros folyamatokban szerepet játszó proteoglikánokat a downregulációt mutató miRNS-ek esetében. Előbbi jelátviteli útvonalban résztvevő, tumorszuppresszorként funkcionáló FOXO transzkripció faktorok bizonyítottan fontos szerepet játszanak a daganat anyagcserefolyamatában, valamint az angiogenezis szabályozásában [Farhan et al., 2020]. Utóbbiak különböző kölcsönhatásokat indukálnak a tumor és mikrokörnyezete között, továbbá számos tumorképződést serkentő útvonalat szabályoznak. Következésképpen elmondható, hogy a proteoglikánok az őket módosító enzimekkel együtt fontos terápiás célpontként és biomarkerként szolgálhatnak GBM-ben [Wade et al., 2013]. Az NGS alapján detektált mRNS-ek esetében az upregulált mRNS-ekkel összefüggésbe hozható útvonalakra fókuszálva olyan, a daganatképződéssel szorosan összefüggő molekulákat és útvonalakat azonosítottunk, mint például az IL-17 jelátvitel, mely

az Akt1 által indukált K63-kapcsolt ubikvitináció keresztül hat a TNF Receptor Asszociált Faktor 6 (TRAF6) jelátviteli fehérjére, amely a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK), a CCAAT-enhancer kötő fehérje β (C/EBP β) és a nukleáris faktor κ B (NF- κ B) útvonalak aktiválódásához vezet [Monin et al., 2018]. Az említett folyamatok mindegyike bizonyítottan összefüggésben áll a GBM kialakulásával a GBM-es sejtek túlélésének (NF- κ B, TRAF6, MAPK, IL-17), növekedésének (IL-17, MAPK, NF- κ B), inváziójának (TRAF6, IL-17) serkentésén, valamint a krónikus gyulladós folyamat kialakításán (IL-17) és fenntartásán (NF- κ B), továbbá az angiogenezis (IL-17) elősegítésén keresztül [Karin et al., 2002; Sun et al., 2019; Kowthavarapu et al., 2021; Łaszczych et al., 2024]. A downregulációt mutató mRNS-eket illetően megállapítottuk, hogy többségük a fokális adhézióhoz kapcsolódó útvonalakhoz köthetőek, melyben szerepet játszó adhéziós molekulák csökkent kifejeződése szükséges a tumorsejtek migrációjához és inváziójához [Kalluri & Weinberg, 2009].

10.2. Az eltérő mértékű expressziót mutató miRNS-ek validálása RT-qPCR módszerrel szövetmintákban

Az RT-qPCR mérésekkel sikeresen validált miRNS-einket tekintve elmondható, hogy eredményeinkhez hasonlóan Takkar és munkatársai is szignifikánsan emelkedett expressziót figyeltek meg a **hsa-miR-196a** esetében, valamint hipoxia-indukálható faktor (HIF) által szabályozott miRNS-ként azonosították, mely oncomiR-ként funkcionál GBM-ben [Takkar et al., 2021]. Yang és munkatársai úgyszintén megerősítették a hsa-miR-196a upregulációját GBM-es betegek nagy csoportján, továbbá szignifikáns korrelációt véltek felfedezni a hsa-miR-196a deregulációja és a betegség rossz prognózisa között [Yang et al., 2014]. A következő, általunk azonosított, nagymértékben upregulált miRNS a **hsa-miR-10b**, melynek érdekessége, hogy fiziológias körülmények között nem mérhető expressziója az agyszövetben, azonban minden GBM-altípus esetén erősen megnövekedett kifejeződést mutat [Teplyuk et al., 2016]. A hsa-miR-196a-hoz hasonlóan a hsa-miR-10b-t is oncomiR-ként azonosították, mely tulajdonságával a tumorgenezis folyamatának elősegítése mellett szerepet játszik még a GBM sejtek malignus természetének fenntartásában [Gabriely et al., 2011]. Ezt igazolja El Fatimy és kutatócsoportjának megfigyelése is, melyet a hsa-miR-10b génszerkesztésével végzett kutatásuk során állapítottak meg. Kimutatták ugyanis, hogy az említett miRNS funkcióvesztéses mutációja a gliómasejtek pusztulásához vezet, szemben más tumoros sejtvonalakkal. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a nagymértékben deregulált hsa-miR10b vírus mediálta génablációja hatékony terápiás módszert képviselhet a

GBM kezelésében [El Fatimy et al., 2017]. A harmadik és egyben utolsó, általunk azonosított szignifikáns upregulációt mutató miRNS a **hsa-miR-21**, melyet számos tanulmány írt már le az egyik legfontosabb oncomiR-ként GBM-ben [Chen et al., 2021; Beylerli et al., 2022]. A tumor kialakulásához és progressziójához társítható folyamatokban, úgymint a p53 és a PI3K-Akt útvonalakban betöltött szerepe igazolja fontosságát, illetve magyarázatot ad az upregulációja és a GBM-ben szenvedő betegek rövid túlélési ideje közötti összefüggésre [Jiang et al., 2020].

Az általunk sikeresen validált downregulációt mutató miRNS-ek, a **hsa-miR-383-5p** és a **hsa-miR-490-3p** esetében elmondható, hogy a megfigyeléseinkhez hasonlóan más kutatócsoportok is csökkent kifejeződésüket írták le glióma szövetekben és sejtekben [Xu et al., 2015; Zhang et al., 2019]. He és munkatársai arról számoltak be, hogy az inzulinszerű növekedési faktor-1 receptor (IGF1R) a hsa-miR-383-3p közvetlen célpontjaként az *IGF1R* upregulációját okozva az AKT szerint/treonin kináz stimulációjához vezet, ami a mátrix metalloproteináz 2 (MMP2) enzim termelésének serkentésén keresztül fokozott inváziót eredményez. Ezen eredményekhez hasonlóan kutatócsoportunk is sikeresen azonosította néhány metalloproteináz enzim (MMP9: $\log_2FC = 5,36$; MMP14: $\log_2FC = 3,74$; MMP23: $\log_2FC = 2,4$) szignifikánsan megnövekedett szintjét az mRNS szekvenálás segítségével, melyek közül az MMP9 és az általunk sikeresen validált másik downregulált miRNS-sel, a hsa-miR-490-3p-vel mutatott korrelációt. Továbbá ezt a miRNS-t Vinchure és munkatársai az egyik hiszton metiláló molekula, az enhancer of zeste homolog-2 (*EZH2*) meglehetősen fontos direkt célpontjaként azonosították, mely alapján feltételezik, hogy az *EZH2* upregulációja és a hsa-miR-490-3p downregulációja a tumorgenezis korai lépése lehet. Megállapításaikhoz hasonlóan mind a miRNS, mind az mRNS szekvenálással nyert eredményünk alapján ugyanilyen expressziós változást detektáltunk mindkét molekula esetében (*EZH2*: $\log_2FC = 2,72$) [Vinchure et al., 2019].

Legjobb tudomásunk szerint a fent részletezett öt miRNS, a hsa-miR-196a-5p, a hsa-miR-10b-3p, a hsa-miR-21-3p, a hsa-miR-383-5p és a hsa-miR-490-3p expressziójának együttes, szignifikáns deregulációját rajtunk kívül más tanulmány ezidáig nem azonosította. Ennek egyik lehetséges magyarázata lehet az etnikai hovatartozás, mely a miRNS-hez köthető kutatások közötti heterogenitás alapját képezheti [Ma et al., 2018; Wang et al., 2019]. Ezért célszerű egy adott fenotípussal, például a GBM-el összefüggő, egy adott földrajzi területre specifikus szignifikánsan deregulált miRNS-eket azonosítani. Ezt a feltevést erősíti a Zhou és munkatársai által végzett metaanalízis, melynek eredményeként azt találták, hogy a miRNS-ek magasabb diagnosztikai értéket mutattak a kaukázusi populációban, mint az ázsiaiak körében. Ebből arra következtethetünk, hogy ugyanazon miRNS deregulációja a különböző etnikumokban szintén

befolyásolhatja a miRNS-ek diagnosztikai értékét [Zhou et al., 2018]. Az etnikai hovatartozás mellett a rendelkezésre álló betegpopulációból származó adataink – összhangban más GBM vizsgálatokkal – megerősítik, hogy a betegség előfordulása az életkor előrehaladtával nő, valamint nagyobb gyakoriságot mutat és rosszabb medián túléléssel társítható a férfiak körében, összevetve a nők vizsgálatából származó adatokkal [Colopi et al., 2023].

10.3. Az eltérő mértékű expressziót mutató mRNS-ek validálása RT-qPCR módszerrel szövetmintákban

Kutatásunk során az alábbi 7 upregulációt mutató (*E2F2*, *HOXD13*, *VEGFA*, *CDC45*, *AURKB*, *HOXC10*, *MYBL2*), valamint 7 downregulálódott (*FABP6*, *PRLHR*, *NEUROD6*, *CBLN1*, *HRH3*, *HCN1* és *RELN*) gén került kiválasztásra az mRNS szekvenálás és az iDEP analízis alapján, melyek mindegyike esetében szignifikánsan eltérő expressziós különbséget detektáltunk a GBM-es csoportban, a kontrollcsoporttal összevetve. Az alábbiakban ezen génekre és az általuk betöltött funkciókra térek ki részletesebben. A szekvenálás alapján szignifikáns eltérést mutató gének közül kiemelendők a *HOX*-gének, melyekről kijelenthető, hogy a *HOXD1* és a *HOXD-ASI* kivételével nem figyelhető meg kifejeződésük a normál agyszövetben. Következésképpen elmondható, hogy deregulációjuk szerepet játszhat a GBM kialakulásában. Az általunk validált upregulált *HOXC10* génről kimutatták, hogy megnövekedett expressziója fokozza a GBM sejtvonalak migrációs képességét [Gonçalves et al., 2020]. A szekvenálás eredményei alapján a 39 ismert *HOX*-gén közül a **F1. kiegészítő táblázatban** feltüntetett 15 gén eltérő expresszióját figyeltük meg a GBM-es betegek szövetmintáiban. A többi, megnövekedett expressziós szinttel jellemezhető gént tekintve elmondható, hogy a MYB Proto-Onkogén Like 2 (*MYBL2*), mint a myeloblastosis transzkripciós faktor család tagja - hasonlóan az *E2F2* transzkripciós faktorhoz - fontos szerepet tölt be a sejtek proliferációjának és differenciálódásának szabályozásában [Zhang et al., 2015; Fu et al., 2022]. Ezen növekedett expressziót mutató transzkripciós faktorok mellett említeném meg a Neuronális differenciálódás 6 (*NEUROD6*) gént, melynek azonban downregulációját véltük felfedezni. Ehhez kapcsolódóan Agrawal és munkatársai megfigyelték, hogy a *NEUROD2* tumorszupresszor szereppel rendelkezik a sejtproliferáció, a migráció és a tumorképződési képesség gátlásán keresztül GBM sejtvonalakban. Továbbá azt is megállapították, hogy a gén downregulációja összefüggést mutat a betegség rossz prognózisával [Agrawal et al., 2018]. Az eddig jellemzett transzkripciós faktorok mellett a validálási csoportban a sejtproliferáció szabályozásával összefüggésbe hozható egyéb gének is

jelen voltak, melyek deregulációját RT-qPCR-el sikeresen megerősítettük, úgymint a sejtosztódási ciklus 45 (*CDC45*), melynek fehérjeterméke alapvető szerepet tölt be az eukarióta DNS-replikáció iniciációs szakaszának szabályozásában. A *CDC45* megnövekedett kifejeződését a GBM mellett számos más daganattípusban is megfigyelték már, valamint ezen irányú expressziós változását összefüggésbe hozták a rövidebb teljes túlélési idővel [Lu et al., 2022]. További, a sejtciklus folyamatában résztvevő upregulált gén az Aurora Kináz B (*AURKB*), mely szerin/treonin kinázként működve a kromatidok szétválásának szabályozásán keresztül fejti ki regulációs hatását. A GBM esetében e gén megnövekedett expressziója rossz prognózissal, valamint fokozott TMZ rezisztenciával társul [Alafate et al., 2019]. A sejtciklus szabályozásán túl további, a daganatképződés folyamatához kapcsolódó gén szignifikáns upregulációját is sikeresen megerősítettük RT-qPCR-el. Ilyen a vaszkuláris endoteliális növekedés faktor A (*VEGFA*), mely a sejtprolifерáció előmozdításán túl az angiogenezis indukciójában játszik kulcsfontosságú szerepet, elősegítve ezzel a tumornövekedéshez elengedhetetlen tápanyagok szállítását [Liu et al., 2024].

A downregulálódott gének funkcionális dúsulási elemzésével megállapítottuk, hogy ezen mRNS-ek túlnyomó többsége a neuronfejlődéssel és a szinaptikus transzmisszió, azaz a neuronok közötti jelátvitel jelenségével hozhatóak összefüggésbe. Eredményeink szerint a GBM-es betegekben legnagyobb mértékben downregulált mRNS a Reelin (*RELN*), amely - mint nagy szekretált extracelluláris mátrix glikoprotein - részt vesz az agy fejlődésében, valamint szabályozza a neuronok migrációját és az agykérgi rétegek kialakulását [Honda et al., 2011]. Emellett a hiperpolarizáció által aktivált ciklikus nukleotid által kapuzott 1-es csatorna (*HCNI*), a hisztamin receptor H3 (*HRH3*) és a cerebellin-1 (*CBLNI*) mutatott igen nagymértékű downregulációt. Ezek közül a *HCNI* elősegíti a Na⁺ és K⁺ ionok mozgását a sejtmembránon keresztül, így szabályozva az idegsejtek ingerelhetőségét. E gén nagyfokú downregulációját figyelte meg Phan és munkatársai a *HCN* géncsalád és a teljes túlélési idő korrelációjának vizsgálata során. Melynek eredményeként arra jutottak, hogy a géncsalád *HCNI* tagjának kifejeződése az agydaganatok közül különösen GBM-ben mutatott meglehetősen alacsony expressziót, mely változás negatív korrelációt feltételez a teljes túlélési időt illetően [Phan et al., 2017]. A *HRH3* génre irányuló eddigi kutatások azt mutatták, hogy az esetek legnagyobb részében a gén nagymértékű kifejeződése figyelhető meg a bazális ganglionokban, az agykéregben és a hippokampusz területén, valamint fontos szerepet tölt be a neurotranszmitterek felszabadulásának szabályozásában [Lin et al., 2015]. Ezzel szemben a mi eredményeink a *HRH3* expressziójának nagyfokú csökkenését mutatta, melynek magyarázata lehet a korábban már említett etnikai különbség. Ugyanis Lin tanulmánya az ázsiai populációra

terjedt ki. A *CBLN1* a szinaptikus szerveződésben betöltött szerepéről ismert, melynek downregulációját GBM-ben kutatásunkkal összhangban Zhang és munkatársai is megfigyelték [Zhang et al., 2023]. A fent említett gének mellett a prolaktin felszabadító hormon receptor (*PRLHR*) és a zsírsavkötő fehérje 6 (*FABP6*) gének GBM-ben megfigyelhető downregulációját erősítettük meg. Ezek közül a *PRLHR* esetében Liu és munkatársai ugyancsak megerősítették a gén csökkent kifejeződését gliómákban. Továbbá egy érdekes összefüggést állapítottak meg, mely szerint ezen tumorszupresszorként működő immungén kifejeződése negatív korrelációt mutat a gliómás betegek életkorával és a kialakult glióma grádusával, nemtől függetlenül. Tehát az életkor előrehaladtával (>45 év) és a magasabb grádussal arányosan csökken a *PRLHR* expressziója, melynek köszönhetően új terápiás célpontot képviselhet a túlélési arányt illetően [Liu et al., 2022]. Eredményeink alapján ezt a megfigyelést mi is meg tudjuk erősíteni, ugyanis a validálásba bevont betegek 99%-a 45 év feletti volt. A *FABP6* kifejeződése esetében azonban más kutatócsoportok eredményeivel ellentétben, mi a gén downregulációját figyeltük meg [Pai et al., 2021].

10.4. A miRNS és mRNS expresszió közötti korreláció meghatározása új generációs szekvenálás (NGS) eredményei alapján

A miRNS és mRNS NGS-ből származó két adatkészlet közötti kapcsolat vizsgálatával a GBM tumorgenezisének különböző szakaszaiban résztvevő molekulák áttekintését céloztuk meg, melynek eredményeit a **5. táblázat** szemlélteti. A felsorolt miRNS-ekről elmondható, hogy olyan kulcsfontosságú, a daganat növekedését elősegítő folyamatokban szerepet játszó gének epigenetikai szabályozásában vesznek részt, mint a sejtciklus (*AURKB*, *CDC45*, *CDK6*), a sejtproliferáció (*EGFR*, *VEGFA*) vagy az angiogenezis (*VEGFA*). Más gének (*AJAPI*, *MMP9*, *STC2*) a sejtek adhéziós vagy migrációs folyamatának szabályozásával járulnak hozzá az áttétképződéshez. E gének közül az mRNS szekvenálás során a GBM-ben feltételezett tumorszupresszorként azonosított *AJAPI* az általunk sikeresen validált hsa-miR-196a-5p kísérletesen validált célpontja [Takkar et al., 2021]. A sztanniocalcin 2 (*STC2*) szekretált glikoproteinről Yun és munkatársai kimutatták, hogy upregulációja jelentős mértékben hozzájárul a GBM sejtek növekedéséhez és az invazív fenotípus kialakításához. Továbbá kísérletesen igazolták, hogy az *STC2* a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) jelátviteli útvonalon keresztül fokozza a mátrix metalloproteinázok (MMPs) expressziós szintjét, ezzel elősegítve a tumorsejtek invázióját [Yun et al., 2022]. A korrelációs analízis során az is kiderült, hogy az *STC2* kifejeződése a hsa-miR-381-3p szabályozása alatt áll, míg az általunk sikeresen

validált hsa-miR-490-3p az MMPs közül az *MMP9* expressziójának jelentős csökkenését eredményezi [Zhang et al., 2019; Ma et al., 2020]. Ezenkívül megfigyeltük, hogy a tumor-asszociált makrofágok (LTBP-1, POSTN) általi szabályozás szerepet játszik a daganatos sejtek terjedésében a tumor mikrokörnyezetének módosításával. Ezt Liu és munkatársai is megerősítették, ugyanis azt találták, hogy a miR-340-5p lényeges szerepet tölt be ezen makrofágok szabályozásában a *POSTN* és az *LTBP-1* targetálásán keresztül [Liu et al., 2019].

10.5. Eltérő mértékben expresszáldott miRNS-ek azonosítása glioblastomás betegek és egészséges kontroll egyének plazmamintáiban

10.5.1. NanoString analízis és az eltérő mértékben expresszáldott miRNS-ek azonosítása

A kontroll- és a GBM-es csoport Nanostring System nCounter Human v3 paneljával végzett keringő miRNS-expressziós profiljának összevetése során a miRNS-ek többsége esetében alacsony miRNS-count értékeket figyeltünk meg. Ennek magyarázata maga a kimutatási módszer, mely alapvetően eltér a PCR segítségével végzett miRNS detektációs módszerektől, ugyanis a NanoString analízis amplifikációs lépés nélkül zajlik. A kísérlet eredményeként azonosított szignifikánsan deregulált 53 miRNS az összesen elemzett 798 miRNS 6,64%-át tette ki. Ezen miRNS-ek további vizsgálatával azt találtuk, hogy közel 93%-uk már leírásra került különböző rosszindulatú daganatos betegségekben, illetve körülbelül 57%-ukat a GBM-el is összefüggésbe hozták (**6. táblázat**) [Hsu et al., 2011; Xie et al., 2013]. A NanoString mérések eredményeként az 53 deregulált miRNS közül az egyetlen downregulációt mutató a hsa-miR-181a-3p volt, míg a legnagyobb mértékű upregulációt a hsa-miR-338-5p mutatta. Előbbiről Shi és munkatársai azonosították, hogy tumorszuppresszorként funkcionál, valamint a növekedés gátlását, az apoptózis indukálását és az invázió gátlását eredményezi glióma sejtekben. Mely megállapítások arra utalnak, hogy az abberáns hsa-miR-181a kritikus tényező lehet a gliómák malignus megjelenését illetően. A miR2Disease és miRCancer adatbázisokban keresve azt találtuk, hogy ezen szignifikánsan deregulált miRNS-ek közül kettő, a hsa-miR-1525-5p és a hsa-miR-591 új összefüggést mutatott a GBM-el.

10.5.2. Az eltérő mértékben expresszáldott miRNS-ek validálása RT-qPCR módszerrel

A NanoString analízissel kapott eredmények validálására véletlenszerűen kiválasztott miRNS-ek közül a hsa-miR-433-3p, a hsa-miR-195-5p és a hsa-miR-29a-3p esetében sikeresen megerősítettük azok szignifikánsan megnövekedett expressziós szintjét a GBM-es csoportban. Eredményeinkhez hasonlóan Wang és munkatársai szintén kimutatták a **hsa-miR-195-5p** fokozott expresszióját GBM-es betegek vérmintáiban. Feltételezésük szerint ez a miRNS a zsírsav metabolizmus szabályozásában működhet közre GBM-ben [Wang & Lu, 2020]. Egyes megfigyelések szerint a relapszussal jellemezhető daganatos betegségek szoros összefüggést mutatnak bizonyos anyagcsere rendellenességekkel, mint például a zsírsav bioszintézis csökkenése, melyről megállapították, hogy szerepet játszik több daganatos betegség patogenezisében [Kannan et al., 1980]. A hsa-miR-195 kifejeződését vizsgálva Jia és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy ezen miRNS fokozott expressziója hosszabb medián túlélési idővel társítható (56,53 hónap), szemben a csökkent kifejeződést mutató betegekkel, akik esetében ez az érték 15 hónapnak adódott. Továbbá az általuk végzett, túlélés vizsgálatára irányuló többváltozós Cox-regressziós analízis azt mutatta, hogy a magas hsa-miR-195 szint a betegség csökkent mortalitásával járt együtt [Jia et al., 2020]. A következő validált miRNS-ünk, a **hsa-miR-29a** esetében Zhao és munkatársai megállapították, hogy ezen miRNS aktiválja a GBM növekedésének és inváziójának komplex poszttranszkripcionális programját a *PTEN*, az *EphB3* és a *SOX4* downregulálásán keresztül, ezzel támogatva a GBM aggresszív természetét. Megfigyelték továbbá, hogy a hsa-miR-29a fokozott expressziója korrelációt mutat a betegek csökkent túlélésével [Zhao et al., 2019]. Az utolsó általunk azonosított keringő miRNS-t, a **hsa-miR-433-3p**-t illetően korábbi tanulmányok is leírták deregulációját különböző daganatos megbetegedésekben és szignifikáns asszociációt találtak ezen miRNS megváltozott expressziója és a betegségek klinikai kimenetele között. Azonban eredményeinkkel ellentétben a hsa-miR433-3p downregulációját figyelték meg többek között gyomor karcinómában és hepatitis B-vírussal asszociált hepatocelluláris karcinómában [Luo et al., 2009; Wang et al., 2012]. Ennek az ellentétes eredménynek számos oka lehet, beleértve a mintaforrásokat, a kimutatási módszerek és a tumor altípusok közötti különbségeken túl az egyéni különbségeket is. Éppen ezért további vizsgálatokra van szükség a hsa-miR-433-3p GBM-ben betöltött szerepének további értékeléséhez.

10.5.3. A miRNS-ek rangsorolása, target gén predikció

A vizsgált miRNS-ek rangsorolása a miRNet eszköz segítségével történt fokszám-központiségük alapján, mely a hálózatban betöltött biológiai jelentőségüket tükrözi. A rangsorolást követően a miRTargetLink eszközt alkalmazva a 15 eltérő mértékű expressziót mutató miRNS (beleértve a validált miRNS-eket is) között fennálló legerősebb kölcsönhatásokat szemléltető „core” miRNS-target hálózatot alkottunk. Ennek eredményeként a teljes hálózatban kettőnél több kölcsönhatást mutató közös célgénnek a következők voltak: *RUNX2*, *WEE1*, *CDC42*, *BCL2*, *CDK4*, *DICER1*, *VEGFA*, *PTEN* és *CDK1NA*. Ezek közül Yamada és munkatársai hét GBM-es sejtvonalból öt esetében kimutatták a *RUNX2* fehérjét, melynek szintje pozitívan korrelált a GBM sejtek proliferációs kapacitásával [Yamada et al., 2018]. Wu és munkatársai a *WEE1* vizsgálatok arra a következtetésre jutottak, hogy a PI3K-val kombináltan alkalmazva sikeres célzott terápiát tesz lehetővé GBM-ben [Wu et al., 2018]. A *CDC42* esetében megfigyelték, hogy expressziója a GBM proneurális és neurális alcsoportjaiban a legmagasabb, mely rosszabb progressziómentes túléléssel társítható [Okura et al., 2016]. Ehhez hasonlóan a *bcl-2* expressziója is szignifikáns kapcsolatban áll a túléléssel. Ugyanis McDonald és munkatársai 79 GBM-ben és 80 anaplasztikus asztrocitómában szenvedő beteg szövetmintájában vizsgálták az anti-apoptotikus *bcl-2* expresszióját immunfestés segítségével, melynek eredményeként megállapították, hogy a *bcl-2*-vel festődő sejtek aránya statisztikailag szignifikáns prognosztikai faktorként szerepel a magas grádusú gliómákban és jobb túléléssel hozható összefüggésbe, melyet nem befolyásol a szövettani grádus [McDonald et al., 2002]. A sejtciklus szabályozásában szerepet játszó *CDK4* gén amplifikációja gyakori jelenség a GBM-ben. Éppen ezért potenciális célpontnak tekinthető a betegség kezelésében. Erre jó példa Li és munkatársainak megfigyelése, mely szerint a proneurális GBM fokozottan érzékeny a *CDK4/6* palbociclib általi gátlására, melynek hatására dinamikus átprogramozáson megy keresztül, ami kombinált terápia szükségességének megfontolását sugallja [Li et al., 2017]. Míg a *VEGFA* emelkedett expressziója feltételezhető előfeltétele az asztrocitómák agresszív és infiltratív növekedésének [Johansson et al., 2002]. A *PTEN* esetében számos tanulmány kimutatta, hogy enzimatis aktivitásától függetlenül, specifikus nukleáris fehérjékkel történő interakción keresztül irányítja a tumorgenezis folyamatát. Ezt a megfigyelést Benitez és munkatársai is megerősítették, mely szerint a *PTEN* a DAXX és a H3.3 hiszton kromatin-asszociált komplexein keresztül szabályozza a GBM onkogenezisét [Benitez et al., 2017].

10.5.4. A miRNS célpontok gén ontológiai (GO) és útvonal dúsulási elemzése

A miRNS-specifikus targetlistánk felhasználásával végzett GO_BP és KEGG útvonal-alapú funkcionális annotációs elemzésünk feltárta, hogy a deregulált miRNS-ek által poszttranszkripciós szinten szabályozott gének a tumorgenezis szempontjából kulcsfontosságú jelátviteli útvonalakban mutatnak dúsulást. Ehhez kapcsolódóan a biológiai folyamatok között a DNS-metilációt, a fehérjék O-kapcsolt glikolizációját, az RNS polimeráz II promóterről történő transzkripció pozitív és negatív szabályozását, a génexpresszió szabályozását, a mitotikus sejtciklus G1/S átmenet negatív szabályozását és az apoptotikus folyamatokban betöltött szerepüket azonosítottuk. Míg a KEGG útvonal elemzés eredményei alapján számos tumortípus, úgymint a glióma, a prosztatadaganat, a hólyagdaganat, a kissejtes- és nem kissejtes tüdődaganat, a melanoma, az endometriumdaganat, a hasnyálmirigydaganat és a vírusfertőzésekhez köthető útvonalakkal (hepatitis B, HTLV-I fertőzés) mutatkozott összefüggés.

10.5.5. A miRNS targetek fehérje-fehérje interakciós (PPI) analízise

A target fehérjék és azok funkcionális szempontból fontos interakciós partnereik között fennálló lehetséges kölcsönhatásokat az általános és „cortex” specifikus PPI-hálózatok segítségével térképeztük fel. A fő, biológiailag releváns csomópontokat alkotó fehérjék a következők voltak: BCL2, RB1, PTEN, ERBB2, CCND1, ZEB1, FSCN1, WNT1, XIAP, FOXO1, UBA2, DNMT3B, ANXA2 és WEE1. Eredményeink alapján elmondható, hogy mindkét hálózatban lényegében ugyanazokat a fehérjéket figyeltük meg, amiből arra következtethetünk, hogy az eltérő mértékben expresszáldott miRNS-ek olyan célgéneket szabályoznak, amelyek a tumorképződést kiváltó alapvető folyamatokban vesznek részt. A NetworkAnalyst hálózatelemző platform segítségével olyan folyamatokban figyeltünk meg dúsulást, - a teljesség igénye nélkül-, mint a sejtciklus, a vírusos karcinogenezis, az ubiquitin-mediált proteolízis, az apoptózis, a transzkripciós szabályozási zavar daganatban, a glióma genézis, az EGFR tirozin kináz inhibitor rezisztencia vagy a FoxO-, a p53-, az ErbB-, a PI3K-Akt-, és a neurotrofin jelátviteli útvonalak. A kulcsfontosságú biológiai folyamatok közé tartozott a sejtciklus, az apoptózis, a fehérjemódosító folyamatok, valamint a sejtanyagcsere folyamatok pozitív és negatív szabályozása. A molekuláris funkciók tekintetében az alábbiak

dúsulása volt a legjelentősebb: enzim-kötés, a transzkripció negatív és pozitív szabályozása, transzkripció faktor-kötés, kináz-kötés és a kromatin-kötés.

A dúsulási elemzések eredményei alapján kijelenthető, hogy a legtöbb miRNS-target részt vesz a tumorképződés szempontjából kritikus jelátviteli útvonalakban és biológiai folyamatokban, ami arra utal, hogy a keringő miRNS-ek potenciális szabályozó molekulák lehetnek a tumorgenezis folyamatában. Ugyanakkor az adatok azt is szemléltetik, hogy ezek a megfigyelések nem kizárólag egy adott tumortípusra specifikusak. Azonban a hálózat alapú megközelítés olyan új fehérjék és interakciók felfedezésének eszközét biztosíthatja, amelyek fizikai és funkcionális kölcsönhatásban állnak az úgynevezett magfehérjékkel, ezáltal új daganathoz köthető géneket vagy biomarkereket képviselhetnek.

11. Összefoglalás

A központi idegrendszeret érintő daganatos betegségeket tekintve magasan a glioblastoma (GBM) jelenti a legnagyobb kihívást mind az egészségügyi ellátórendszerben, mind az alap kutatásban tevékenyek számára. A daganat nagyfokú heterogenitásából és infiltrációs képességéből fakadó terápiás nehézségek, valamint fokozott recidíva hajlama miatt esszenciális fontosságú kialakulásának még mélyebb megértése. Ezzel összefüggésben szükséges további kulcs molekulák azonosítása, melyek új terápiás és/vagy prognosztikai célpontokként szolgálhatnak, lehetővé téve a betegség hatékonyabb kezelését, jobb kimenetelét és a túlélési idő növekedését. Az ebben történő előrelépés reményében a jelenkori molekuláris biológia területén kiemelkedő figyelemnek örvendő miRNS-ekre esett a választásunk, mely molekulák, mint posztranszkripcionális szabályozók, nélkülözhetetlen biológiai folyamatok regulációjában vesznek részt.

Doktori munkám során a mai napig is gold standard eljárásként alkalmazott szövetbiopsziával nyert agyszövetminták miRNS profilját határoztam meg új generációs kis RNS szekvenálással, melynek elsődleges célja ezen molekulák GBM tumorigenezisben betöltött szerepének megismerése volt. Kutatásunk által egy olyan, öt miRNS-ből (hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-10b-3p, hsa-miR-21-3p, hsa-miR-383-5p és hsa-miR-490-3p) álló, GBM-re specifikus miRNS panelt azonosítottunk sikeresen, melyek a daganatképződésben igazolt szerepükön túl diagnosztikai markerekként is funkcionálhatnak. Emellett, szintén új generációs RNS szekvenálás alkalmazásával kívántuk igazolni a GBM-re jellemző, deregulációt mutató miRNS-ek valós szabályozó funkcióját. Ennek során sikeresen identifikáltunk 14 mRNS molekulát (*MYBL2*, *AURKB*, *VEGFA*, *CDC45*, *E2F2*, *HOXC10*, *HOXD13*, *HRH3*, *CBLN1*, *RELN*, *HCN1*, *NEUROD6*, *PRLHR*, *FABP6*), melyek a deregulált miRNS-ek szabályozása alatt állnak és szignifikánsan eltérő expressziót mutattak GBM-ben. Ezt követően célunk volt az öt validált miRNS plazmamintákban történő kimutatása is RT-qPCR módszerrel, melynek során azonban egyik miRNS esetében sem sikerült mérhető amplifikációt detektálnunk.

Így kutatásunk második felében eltérő elven alapuló módszer alkalmazásával céloztuk meg a folyadék biopsziával nyert plazmaminták miRNS expressziós profiljának feltérképezését. A NanoString módszer eredményeinek validálása során sikerrel azonosítottunk három keringő miRNS-t (hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-433-3p), melyek részt vehetnek a GBM kialakulásában. Kutatásunk jelentőségét a betegség magas mortalitási és morbiditási mutatói mellett az adja, hogy analíziseinket valódi betegminták segítségével végeztük, melyek a lehető legnagyobb mértékben képesek reprezentálni a betegség során kialakuló változásokat.

12. Summary

Among all cancers affecting the central nervous system, glioblastoma (GBM) is by far the most challenging, both for the healthcare system and for those involved in basic research. Due to the therapeutic difficulties arising from the high degree of heterogeneity and infiltration capacity of the tumor, as well as its increased tendency to relapse, it is essential to gain a deeper understanding of its development and thereby identify key molecules that could serve as therapeutic and/or prognostic targets that would enable more effective treatment of the disease, better outcomes, and contribute to increased survival time.

In the hope of making progress in this area, we chose miRNAs, which are receiving outstanding attention in the field of molecular biology recently. These molecules, as post-transcriptional regulators, participate in the regulation of essential biological processes. It can therefore be said that their altered expression can lead to tumor formation, among other things.

In the first part of my doctoral research, I characterized the miRNA profile of brain tissue samples obtained by tissue biopsy, which is still used as a gold standard procedure today, using next-generation small RNA sequencing. The primary goal of this analysis was to understand the role of these deregulated molecules in tumorigenesis. Through our research, we successfully identified a GBM-specific miRNA panel consisting of five miRNAs (hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-10b-3p, hsa-miR-21-3p, hsa-miR-383-5p and hsa-miR-490-3p), which, in addition to their proven role in tumorigenesis, may also function as diagnostic markers. In addition, we also used next-generation RNA sequencing to confirm the true regulatory function of the deregulated miRNAs in GBM. We successfully identified 14 mRNA molecules (*MYBL2*, *AURKB*, *VEGFA*, *CDC45*, *E2F2*, *HOXC10*, *HOXD13*, *HRH3*, *CBLN1*, *RELN*, *HCN1*, *NEUROD6*, *PRLHR*, *FABP6*) that are under the control of deregulated miRNAs and showed significantly different expression in GBM. Subsequently, our goal was to detect the five validated miRNAs in plasma samples using the RT-qPCR method, but we were unable to detect measurable amplification for any of the miRNAs.

Thus, in the second part of our research, we aimed to map the miRNA expression profile of plasma samples obtained by liquid biopsy using a different method. During the validation of the results of the NanoString method, we successfully identified three circulating miRNAs (hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-433-3p) that may be involved in the development of GBM. The significance of our research, in addition to the high mortality and morbidity rates of the disease, is that our analyses were performed using real patient samples, which are able to represent the changes that occur during the disease to the greatest extent possible.

13. Értekezés új megállapításai

- A hsa-miR-196a-5p, a hsa-miR-10b-3p, a hsa-miR-21-3p, a hsa-miR-383-5p és a hsa-miR-490-3p szignifikánsan eltérő expressziót mutatott a glioblastomában szenvedő betegek szövetmintáiban. Ezen miRNS-ek mindegyike kiemelkedő diagnosztikai mutatókkal jellemezhető, így ígéretes marker molekulái lehetnek a betegségnek.
- A *MYBL2*, *AURKB*, *VEGFA*, *CDC45*, *E2F2*, *HOXC10*, *HOXD13*, *HRH3*, *CBLN1*, *RELN*, *HCN1*, *NEUROD6*, *PRLHR*, *FABP6* gének mindegyike esetében szignifikáns deregulációt figyeltünk meg a glioblastomás betegek szövetmintáiban.
- Kutatásunk eredményeként egy olyan 5 miRNS-t és 14 mRNS-t tartalmazó panelt állítottunk össze, amely segíthet a glioblastoma tumorgenezisének jobb megértésében és szövetmintákon alapuló diagnosztizálásában a magyar populációban.
- A szövetmintákon túl, a glioblastomás betegektől származó plazmamintákból is sikeresen azonosítottunk eltérő expressziót mutató miRNS-eket. 53 szignifikáns deregulációval jellemezhető miRNS-t detektáltunk.
- A validálás során a hsa-miR-29a-3p, a hsa-miR-195-5p és a hsa-miR 433-3p expressziója szignifikánsan magasabbnak bizonyult a glioblastomás betegek plazmamintáiban. Ezen miRNS-ek a szövetmintákban azonosított miRNS-ekhez hasonlóan kiváló diagnosztikai potenciállal rendelkeznek, így értékes non-invazív biomarkerei lehetnek a betegségnek.
- Ebben a földrajzi régióban mi végeztük először glioblastomás betegek szövetmintáinak miRNS és mRNS, illetve plazmamintáinak miRNS profilozását.

Úgy vélem, hogy eredményeink a jövőben jó alapját képezhetik egy nagyszámú prospektív kohorszvizsgálatnak további validálás céljából.

14. Irodalomjegyzék

Adhit KK, Wanjari A, Menon S, K S. Liquid Biopsy: An Evolving Paradigm for Non-invasive Disease Diagnosis and Monitoring in Medicine. *Cureus*. 2023 Dec 8;15(12):e50176. doi: 10.7759/cureus.50176. PMID: 38192931; PMCID: PMC10772356.

Agrawal R, Garg A, Benny Malgulwar P, Sharma V, Sarkar C, Kulshreshtha R. p53 and miR-210 regulated NeuroD2, a neuronal basic helix-loop-helix transcription factor, is downregulated in glioblastoma patients and functions as a tumor suppressor under hypoxic microenvironment. *Int J Cancer*. 2018 May 1;142(9):1817-1828. doi: 10.1002/ijc.31209. Epub 2017 Dec 23. PMID: 29226333.

Aguilera P, López-Contreras AJ. ATRX, a guardian of chromatin. *Trends Genet*. 2023 Jun;39(6):505-519. doi: 10.1016/j.tig.2023.02.009. Epub 2023 Mar 7. PMID: 36894374.

Ah-Pine F, Khettab M, Bedoui Y, Slama Y, Daniel M, Doray B, Gasque P. On the origin and development of glioblastoma: multifaceted role of perivascular mesenchymal stromal cells. *Acta Neuropathol Commun*. 2023 Jun 24;11(1):104. doi: 10.1186/s40478-023-01605-x. PMID: 37355636; PMCID: PMC10290416.

Ahmed SP, Castresana JS, Shahi MH. Glioblastoma and MiRNAs. *Cancers (Basel)*. 2021 Mar 30;13(7):1581. doi: 10.3390/cancers13071581. PMID: 33808106; PMCID: PMC8037240.

Alafate W, Wang M, Zuo J, Wu W, Sun L, Liu C, Xie W, Wang J. Targeting Aurora kinase B attenuates chemoresistance in glioblastoma via a synergistic manner with temozolomide. *Pathol Res Pract*. 2019 Nov;215(11):152617. doi: 10.1016/j.prp.2019.152617. Epub 2019 Aug 23. PMID: 31563286.

Aloizou AM, Pateraki G, Siokas V, Mentis AA, Liampas I, Lazopoulos G, Kovatsi L, Mitsias PD, Bogdanos DP, Paterakis K, Dardiotis E. The role of MiRNA-21 in gliomas: Hope for a novel therapeutic intervention? *Toxicol Rep*. 2020 Nov 6;7:1514-1530. doi: 10.1016/j.toxrep.2020.11.001. PMID: 33251119; PMCID: PMC7677650.

Altinoz MA, Elmaci I, Cengiz S, Emekli-Alturfan E, Ozpinar A. From epidemiology to treatment: Aspirin's prevention of brain and breast-cancer and cardioprotection may associate with its metabolite gentisic acid. *Chem Biol Interact*. 2018 Aug 1;291:29-39. doi: 10.1016/j.cbi.2018.05.016. Epub 2018 Jun 7. PMID: 29885857.

Alzial G, Renoult O, Paris F, Gratas C, Clavreul A, Pecqueur C. Wild-type isocitrate dehydrogenase under the spotlight in glioblastoma. *Oncogene*. 2022 Jan;41(5):613-621. doi: 10.1038/s41388-021-02056-1. Epub 2021 Nov 11. PMID: 34764443; PMCID: PMC8799461.

Antequera F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol Life Sci*. 2003 Aug;60(8):1647-58. doi: 10.1007/s00018-003-3088-6. PMID: 14504655; PMCID: PMC11138798.

Abd-Elghany AA, Naji AA, Alonazi B, Aldosary H, Alsufayan M, Alnasser M, Mohammad EA, Mahmoud MZ. Radiological characteristics of glioblastoma multiforme using CT and MRI examination. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences [Internet]*. Taylor & Francis; 2019 Aug 28;12(1):289–293.

Arif KMT, Elliott EK, Haupt LM, Griffiths LR. Regulatory Mechanisms of Epigenetic miRNA Relationships in Human Cancer and Potential as Therapeutic Targets. *Cancers (Basel)*. 2020 Oct 11;12(10):2922. doi: 10.3390/cancers12102922. PMID: 33050637; PMCID: PMC7600069.

Armocida D, Frati A, Salvati M, Santoro A, Pesce A. Is Ki-67 index overexpression in IDH wild type glioblastoma a predictor of shorter Progression Free survival? A clinical and Molecular analytic investigation. *Clin Neurol Neurosurg*. 2020 Nov;198:106126. doi: 10.1016/j.clineuro.2020.106126. Epub 2020 Aug 3. PMID: 32861131.

Arneth B. Update on the types and usage of liquid biopsies in the clinical setting: a systematic review. *BMC Cancer*. 2018 May 4;18(1):527. doi: 10.1186/s12885-018-4433-3. PMID: 29728089; PMCID: PMC5935950.

Arora A, Somasundaram K. Glioblastoma vs temozolomide: can the red queen race be won? *Cancer Biol Ther*. 2019;20(8):1083-1090. doi: 10.1080/15384047.2019.1599662. Epub 2019 May 8. PMID: 31068075; PMCID: PMC6606031.

Asad AS, Nicola Candia AJ, Gonzalez N, Zuccato CF, Abt A, Orrillo SJ, Lastra Y, De Simone E, Boutillon F, Goffin V, Seilicovich A, Pisera DA, Ferraris MJ, Candolfi M. Prolactin and its receptor as therapeutic targets in glioblastoma multiforme. *Sci Rep*. 2019 Dec 20;9(1):19578. doi: 10.1038/s41598-019-55860-x. PMID: 31862900; PMCID: PMC6925187.

Baglietto L, Giles GG, English DR, Karahalios A, Hopper JL, Severi G. Alcohol consumption and risk of glioblastoma; evidence from the Melbourne Collaborative Cohort Study. *Int J*

Cancer. 2011 Apr 15;128(8):1929-34. doi: 10.1002/ijc.25770. Epub 2011 Jan 12. PMID: 21344375.

Banelli B, Forlani A, Allemanni G, Morabito A, Pistillo MP, Romani M. MicroRNA in Glioblastoma: An Overview. *Int J Genomics*. 2017;2017:7639084. doi: 10.1155/2017/7639084. Epub 2017 Nov 6. PMID: 29234674; PMCID: PMC5695025.

Belotti Y, Tolomeo S, Yu R, Lim WT, Lim CT. Prognostic Neurotransmitter Receptors Genes Are Associated with Immune Response, Inflammation and Cancer Hallmarks in Brain Tumors. *Cancers (Basel)*. 2022 May 21;14(10):2544. doi: 10.3390/cancers14102544. PMID: 35626148; PMCID: PMC9139273.

Benitez JA, Ma J, D'Antonio M, Boyer A, Camargo MF, Zanca C, Kelly S, Khodadadi-Jamayran A, Jameson NM, Andersen M, Miletic H, Saberi S, Frazer KA, Cavenee WK, Furnari FB. PTEN regulates glioblastoma oncogenesis through chromatin-associated complexes of DAXX and histone H3.3. *Nat Commun*. 2017 May 12;8:15223. doi: 10.1038/ncomms15223. Erratum in: *Nat Commun*. 2018 May 25;9:16217. doi: 10.1038/ncomms16217. PMID: 28497778; PMCID: PMC5437297.

Beylerli O, Gareev I, Sufianov A, Ilyasova T, Zhang F. The role of microRNA in the pathogenesis of glial brain tumors. *Noncoding RNA Res*. 2022 Feb 25;7(2):71-76. doi: 10.1016/j.ncrna.2022.02.005. PMID: 35330864; PMCID: PMC8907600.

Bianco J, Bastiancich C, Jankovski A, des Rieux A, Pr at V, Danhier F. On glioblastoma and the search for a cure: where do we stand? *Cell Mol Life Sci*. 2017 Jul;74(13):2451-2466. doi: 10.1007/s00018-017-2483-3. Epub 2017 Feb 17. PMID: 28210785; PMCID: PMC11107640.

Birk  Z, Nagy B, Klekner  , Virga J. Novel Molecular Markers in Glioblastoma-Benefits of Liquid Biopsy. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 12;21(20):7522. doi: 10.3390/ijms21207522. PMID: 33053907; PMCID: PMC7589793.

Bjorland LS, Fluge O, Gilje B, Mahesparan R, Farbu E. Treatment approach and survival from glioblastoma: results from a population-based retrospective cohort study from Western Norway. *BMJ Open*. 2021 Mar 12;11(3):e043208. doi: 10.1136/bmjopen-2020-043208. PMID: 33712524; PMCID: PMC7959220.

Boccellato C, Rehm M. Glioblastoma, from disease understanding towards optimal cell-based in vitro models. *Cell Oncol (Dordr)*. 2022 Aug;45(4):527-541. doi: 10.1007/s13402-022-00684-7. Epub 2022 Jun 28. PMID: 35763242; PMCID: PMC9424171

Broggi G, Altieri R, Barresi V, Certo F, Barbagallo GMV, Zanelli M, Palicelli A, Magro G, Caltabiano R. Histologic Definition of Enhancing Core and FLAIR Hyperintensity Region of Glioblastoma, IDH-Wild Type: A Clinico-Pathologic Study on a Single-Institution Series. *Brain Sci.* 2023 Jan 31;13(2):248. doi: 10.3390/brainsci13020248. PMID: 36831791; PMCID: PMC9954517.

Brown TJ, Brennan MC, Li M, Church EW, Brandmeir NJ, Rakszawski KL, Patel AS, Rizk EB, Suki D, Sawaya R, Glantz M. Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol.* 2016 Nov 1;2(11):1460-1469. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.1373. PMID: 27310651; PMCID: PMC6438173.

Brown J (2022) Role of MicroRNA Biogenesis Mechanisms of Actions and Circulation. *Gene Technol.* 11:208.

Cahoon EK, Inskip PD, Gridley G, Brenner AV. Immune-related conditions and subsequent risk of brain cancer in a cohort of 4.5 million male US veterans. *Br J Cancer.* 2014 Apr 2;110(7):1825-33. doi: 10.1038/bjc.2014.97. Epub 2014 Mar 4. PMID: 24595001; PMCID: PMC3974099.

Calin GA, Croce CM. MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells. *Oncogene.* 2006 Oct 9;25(46):6202-10. doi: 10.1038/sj.onc.1209910. PMID: 17028600.

Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M, Taccioli C, Zaneni N, Garzon R, Aqeilan RI, Alder H, Volinia S, Rassenti L, Liu X, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Apr 1;105(13):5166-71. doi: 10.1073/pnas.0800121105. Epub 2008 Mar 24. PMID: 18362358; PMCID: PMC2278188.

Carninci P, Forrest ARR, de Hoon MJL. An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nat Biotechnol.* 2017 Sep;35(9):872-878. doi: 10.1038/nbt.3947. Epub 2017 Aug 21. PMID: 28829439; PMCID: PMC5767576.

Chakraborty A, Patton DJ, Smith BF, Agarwal P. miRNAs: Potential as Biomarkers and Therapeutic Targets for Cancer. *Genes (Basel).* 2023 Jun 29;14(7):1375. doi: 10.3390/genes14071375. PMID: 37510280; PMCID: PMC10378777.

Chen L, Zhang R, Li P, Liu Y, Qin K, Fa ZQ, Liu YJ, Ke YQ, Jiang XD. P53-induced microRNA-107 inhibits proliferation of glioma cells and down-regulates the expression of

CDK6 and Notch-2. *Neurosci Lett*. 2013 Feb 8;534:327-32. doi: 10.1016/j.neulet.2012.11.047. Epub 2012 Dec 7. PMID: 23220650.

Chen M, Medarova Z, Moore A. Role of microRNAs in glioblastoma. *Oncotarget*. 2021 Aug 17;12(17):1707-1723. doi: 10.18632/oncotarget.28039. PMID: 34434499; PMCID: PMC8378762.

Choi Y, Song YJ, Lee HS, Hur WJ, Sung KH, Kim KU, Choi SS, Kim SJ, Kim DC. Epidermal growth factor receptor is related to poor survival in glioblastomas: single-institution experience. *Yonsei Med J*. 2013 Jan 1;54(1):101-7. doi: 10.3349/ymj.2013.54.1.101. PMID: 23225805; PMCID: PMC3521249.

Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 27;102(39):13944-9. doi: 10.1073/pnas.0506654102. Epub 2005 Sep 15. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 14;103(7):2464. PMID: 16166262; PMCID: PMC1236577.

Cohen AL, Holmen SL, Colman H. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2013 May;13(5):345. doi: 10.1007/s11910-013-0345-4. PMID: 23532369; PMCID: PMC4109985.

Colopi A, Fuda S, Santi S, Onorato A, Cesarini V, Salvati M, Balistreri CR, Dolci S, Guida E. Impact of age and gender on glioblastoma onset, progression, and management. *Mech Ageing Dev*. 2023 Apr;211:111801. doi: 10.1016/j.mad.2023.111801. Epub 2023 Mar 28. PMID: 36996926.

Correia de Sousa M, Gjorgjieva M, Dolicka D, Sobolewski C, Foti M. Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. *Int J Mol Sci*. 2019 Dec 11;20(24):6249. doi: 10.3390/ijms20246249. PMID: 31835747; PMCID: PMC6941098.

Cote DJ, Samanic CM, Smith TR, Wang M, Smith-Warner SA, Stampfer MJ, Egan KM. Alcohol intake and risk of glioma: results from three prospective cohort studies. *Eur J Epidemiol*. 2021 Sep;36(9):965-974. doi: 10.1007/s10654-021-00800-1. Epub 2021 Sep 4. PMID: 34482513; PMCID: PMC8859697.

Cowppli-Bony A, Bouvier G, Rué M, Loiseau H, Vital A, Lebailly P, Fabbro-Peray P, Baldi I. Brain tumors and hormonal factors: review of the epidemiological literature. *Cancer Causes*

Control. 2011 May;22(5):697-714. doi: 10.1007/s10552-011-9742-7. Epub 2011 Feb 26. PMID: 21359526.

Davis ME. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. Clin J Oncol Nurs. 2016 Oct 1;20(5 Suppl):S2-8. doi: 10.1188/16.CJON.S1.2-8. PMID: 27668386; PMCID: PMC5123811.

D'Alessio A, Proietti G, Sica G, Scicchitano BM. Pathological and Molecular Features of Glioblastoma and Its Peritumoral Tissue. Cancers (Basel). 2019 Apr 3;11(4):469. doi: 10.3390/cancers11040469. PMID: 30987226; PMCID: PMC6521241.

D'Angelo B, Benedetti E, Cimini A, Giordano A. MicroRNAs: A Puzzling Tool in Cancer Diagnostics and Therapy. Anticancer Res. 2016 Nov;36(11):5571-5575. doi: 10.21873/anticancer.11142. PMID: 27793880.

Deforz E, Uhlmann EJ, Das E, Galitsyna A, Arora R, Saravanan H, Rabinovsky R, Wirawan AD, Teplyuk NM, El Fatimy R, Perumalla S, Jairam A, Wei Z, Mirny L, Krichevsky AM. Promoter and enhancer RNAs regulate chromatin reorganization and activation of miR-10b/HOXD locus, and neoplastic transformation in glioma. Mol Cell. 2022 May 19;82(10):1894-1908.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2022.03.018. Epub 2022 Apr 6. PMID: 35390275; PMCID: PMC9271318.

Desroches J, Jermyn M, Pinto M, Picot F, Tremblay MA, Obaid S, Marple E, Urmev K, Trudel D, Soulez G, Guiot MC, Wilson BC, Petrecca K, Leblond F. A new method using Raman spectroscopy for in vivo targeted brain cancer tissue biopsy. Sci Rep. 2018 Jan 29;8(1):1792. doi: 10.1038/s41598-018-20233-3. PMID: 29379121; PMCID: PMC5788981.

Di Bonaventura R, Montano N, Giordano M, Gessi M, Gaudino S, Izzo A, Mattogno PP, Stumpo V, Caccavella VM, Giordano C, Lauretti L, Colosimo C, D'Alessandris QG, Pallini R, Olivi A. Reassessing the Role of Brain Tumor Biopsy in the Era of Advanced Surgical, Molecular, and Imaging Techniques-A Single-Center Experience with Long-Term Follow-Up. J Pers Med. 2021 Sep 12;11(9):909. doi: 10.3390/jpm11090909. PMID: 34575685; PMCID: PMC8472374.

Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in cancer. Annu Rev Pathol. 2014; 9:287-314. doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104715. Epub 2013 Sep 25. PMID: 24079833; PMCID: PMC4009396.

D'Urso PI, D'Urso OF, Storelli C, Mallardo M, Gianfreda CD, Montinaro A, Cimmino A, Pietro C, Marsigliante S. miR-155 is up-regulated in primary and secondary glioblastoma and

promotes tumour growth by inhibiting GABA receptors. *Int J Oncol.* 2012 Jul;41(1):228-34. doi: 10.3892/ijo.2012.1420. Epub 2012 Mar 28. PMID: 22470130.

Dyer MA, Qadeer ZA, Valle-Garcia D, Bernstein E. ATRX and DAXX: Mechanisms and Mutations. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017 Mar 1;7(3):a026567. doi: 10.1101/cshperspect.a026567. PMID: 28062559; PMCID: PMC5334245.

El Fatimy R, Subramanian S, Uhlmann EJ, Krichevsky AM. Genome Editing Reveals Glioblastoma Addiction to MicroRNA-10b. *Mol Ther.* 2017 Feb 1;25(2):368-378. doi: 10.1016/j.ymthe.2016.11.004. PMID: 28153089; PMCID: PMC5368404.

Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet.* 2011 Nov 18;12(12):861-74. doi: 10.1038/nrg3074. PMID: 22094949.

Ezzati S, Salib S, Balasubramaniam M, Aboud O. Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors in Glioblastoma: Current Status and Future Possibilities. *Int J Mol Sci.* 2024 Feb 15;25(4):2316. doi: 10.3390/ijms25042316. PMID: 38396993; PMCID: PMC10889328.

Familiari P, Relucenti M, Lapolla P, Palmieri M, Antonelli M, Cristiano L, Barbaranelli C, Catalano M, D'Angelo L, Familiari G, Santoro A, Frati A, Bruzzaniti P. Adult IDH Wild-Type Glioblastoma Ultrastructural Investigation Suggests a Possible Correlation between Morphological Biomarkers and Ki-67 Index. *Biomedicines.* 2023 Jul 12;11(7):1968. doi: 10.3390/biomedicines11071968. PMID: 37509607; PMCID: PMC10377045.

Farhan M, Silva M, Xingan X, Huang Y, Zheng W. Role of FOXO Transcription Factors in Cancer Metabolism and Angiogenesis. *Cells.* 2020 Jun 30;9(7):1586. doi: 10.3390/cells9071586. PMID: 32629884; PMCID: PMC7407656.

Fasano M, Pirozzi M, De Falco V, Miceli CC, Farese S, Zotta A, Famiglietti V, Vitale P, Di Giovanni I, Brancati C, Carfora V, Solari D, Somma T, Cavallo LM, Cappabianca P, Conson M, Pacelli R, Ciardiello F, Addeo R. Temozolomide based treatment in glioblastoma: 6 vs. 12 months. *Oncol Lett.* 2024 Jul 2;28(3):418. doi: 10.3892/ol.2024.14551. PMID: 39006948; PMCID: PMC11240269.

Fazekasné Kis M.-Góth L. (1999): A ROC analízis alkalmazása az enzim diagnosztikában. *Klin. Kísérl. Lab. Med.*, 26. 184-186

Feng E, Sui C, Wang T, Sun G. Temozolomide with or without Radiotherapy in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme: A Meta-Analysis. *Eur Neurol.* 2017;77(3-4):201-210. doi: 10.1159/000455842. Epub 2017 Feb 14. PMID: 28192785.

Fernandes C, Costa A, Osório L, et al. Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy. In: De Vleeschouwer S, editor. *Glioblastoma* [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2017 Sep 27. Chapter 11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK469987/>

Finotti A, Allegretti M, Gasparello J, Giacomini P, Spandidos DA, Spoto G, Gambari R. Liquid biopsy and PCR-free ultrasensitive detection systems in oncology (Review). *Int J Oncol.* 2018 Oct;53(4):1395-1434. doi: 10.3892/ijo.2018.4516. Epub 2018 Aug 6. PMID: 30085333; PMCID: PMC6086621.

Friedman HS, Kerby T, Calvert H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res.* 2000 Jul;6(7):2585-97. PMID: 10914698.

Fu J, Peng J, Tu G. Knockdown MTDH Inhibits Glioma Proliferation and Migration and Promotes Apoptosis by Downregulating MYBL2. *Mediators Inflamm.* 2022 Sep 12;2022:1706787. doi: 10.1155/2022/1706787. PMID: 36133745; PMCID: PMC9484958.

Gabriely G, Yi M, Narayan RS, Niers JM, Wurdinger T, Imitola J, Ligon KL, Kesari S, Esau C, Stephens RM, Tannous BA, Krichevsky AM. Human glioma growth is controlled by microRNA-10b. *Cancer Res.* 2011 May 15;71(10):3563-72. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3568. Epub 2011 Apr 6. PMID: 21471404; PMCID: PMC3096675.

Garcia-Diaz C, Pöysti A, Mereu E, Clements MP, Brooks LJ, Galvez-Cancino F, Castillo SP, Tang W, Beattie G, Courtot L, Ruiz S, Roncaroli F, Yuan Y, Marguerat S, Quezada SA, Heyn H, Parrinello S. Glioblastoma cell fate is differentially regulated by the microenvironments of the tumor bulk and infiltrative margin. *Cell Rep.* 2023 May 30;42(5):112472. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112472. Epub 2023 May 5. PMID: 37149862.

Garrett M, Sperry J, Braas D, Yan W, Le TM, Mottahedeh J, Ludwig K, Eskin A, Qin Y, Levy R, Breunig JJ, Pajonk F, Graeber TG, Radu CG, Christofk H, Prins RM, Lai A, Liao LM, Coppola G, Kornblum HI. Metabolic characterization of isocitrate dehydrogenase (IDH) mutant and IDH wildtype gliomaspheres uncovers cell type-specific vulnerabilities. *Cancer Metab.* 2018 Apr 17;6:4. doi: 10.1186/s40170-018-0177-4. PMID: 29692895; PMCID: PMC5905129.

Gatto L, Franceschi E, Di Nunno V, Tosoni A, Lodi R, Brandes AA. Liquid Biopsy in Glioblastoma Management: From Current Research to Future Perspectives. *Oncologist*. 2021 Oct;26(10):865-878. doi: 10.1002/onco.13858. Epub 2021 Jun 23. PMID: 34105205; PMCID: PMC8488799.

Ghiaseddin A, Peters KB. Use of bevacizumab in recurrent glioblastoma. *CNS Oncol*. 2015;4(3):157-69. doi: 10.2217/cns.15.8. Epub 2015 Apr 23. PMID: 25906439; PMCID: PMC6088330.

Ghosh D, Nandi S, Bhattacharjee S. Combination therapy to checkmate Glioblastoma: clinical challenges and advances. *Clin Transl Med*. 2018 Oct 16;7(1):33. doi: 10.1186/s40169-018-0211-8. PMID: 30327965; PMCID: PMC6191404.

Gilad S, Lithwick-Yanai G, Barshack I, Benjamin S, Krivitsky I, Edmonston TB, Bibbo M, Thurm C, Horowitz L, Huang Y, Feinmesser M, Hou JS, St Cyr B, Burnstein I, Gibori H, Dromi N, Sanden M, Kushnir M, Aharonov R. Classification of the four main types of lung cancer using a microRNA-based diagnostic assay. *J Mol Diagn*. 2012 Sep;14(5):510-7. doi: 10.1016/j.jmoldx.2012.03.004. Epub 2012 Jun 27. PMID: 22749746.

Gilard V, Tebani A, Dabaj I, Laquerrière A, Fontanilles M, Derrey S, Marret S, Bekri S. Diagnosis and Management of Glioblastoma: A Comprehensive Perspective. *J Pers Med*. 2021 Apr 1;11(4):258. doi: 10.3390/jpm11040258. PMID: 33915852; PMCID: PMC8065751.

Gilbert MR, Wang M, Aldape KD, Stupp R, Hegi ME, Jaeckle KA, Armstrong TS, Wefel JS, Won M, Blumenthal DT, Mahajan A, Schultz CJ, Erridge S, Baumert B, Hopkins KI, Tzuk-Shina T, Brown PD, Chakravarti A, Curran WJ Jr, Mehta MP. Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial. *J Clin Oncol*. 2013 Nov 10;31(32):4085-91. doi: 10.1200/JCO.2013.49.6968. Epub 2013 Oct 7. PMID: 24101040; PMCID: PMC3816958.

Giotta Lucifero A, Luzzi S. Against the Resilience of High-Grade Gliomas: The Immunotherapeutic Approach (Part I). *Brain Sci*. 2021 Mar 18;11(3):386. doi: 10.3390/brainsci11030386. PMID: 33803885; PMCID: PMC8003180.

Gonçalves CS, Le Boiteux E, Arnaud P, Costa BM. HOX gene cluster (de)regulation in brain: from neurodevelopment to malignant glial tumours. *Cell Mol Life Sci*. 2020 Oct;77(19):3797-3821. doi: 10.1007/s00018-020-03508-9. Epub 2020 Apr 1. PMID: 32239260; PMCID: PMC11105007.

Grigore IA, Rajagopal A, Chow JT, Stone TJ, Salmena L. Discovery of miRNA-mRNA regulatory networks in glioblastoma reveals novel insights into tumor microenvironment remodeling. *Sci Rep.* 2024 Nov 11;14(1):27493. doi: 10.1038/s41598-024-78337-y. PMID: 39528571; PMCID: PMC11555236.

Grochans S, Cybulska AM, Simińska D, Korbecki J, Kojder K, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I. Epidemiology of Glioblastoma Multiforme-Literature Review. *Cancers (Basel).* 2022 May 13;14(10):2412.

Guo X, Shi Y, Liu D, Li Y, Chen W, Wang Y, Wang Y, Xing H, Xia Y, Li J, Wu J, Liang T, Wang H, Liu Q, Jin S, Qu T, Guo S, Li H, Yang T, Zhang K, Wang Y, Ma W. Clinical updates on gliomas and implications of the 5th edition of the WHO classification of central nervous system tumors. *Front Oncol.* 2023 Mar 14;13:1131642. doi: 10.3389/fonc.2023.1131642. PMID: 36998447; PMCID: PMC10043404.

Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM, Simjee ShU. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017 Jan 1;18(1):3-9. doi: 10.22034/APJCP.2017.18.1.3. PMID: 28239999; PMCID: PMC5563115.

He Z, Cen D, Luo X, Li D, Li P, Liang L, Meng Z. Downregulation of miR-383 promotes glioma cell invasion by targeting insulin-like growth factor 1 receptor. *Med Oncol.* 2013;30(2):557. doi: 10.1007/s12032-013-0557-0. Epub 2013 Apr 6. PMID: 23564324.

He J, Jiang Y, Liu L, Zuo Z, Zeng C. Circulating MicroRNAs as Promising Diagnostic Biomarkers for Patients With Glioma: A Meta-Analysis. *Front Neurol.* 2021 Feb 1;11:610163. doi: 10.3389/fneur.2020.610163. PMID: 33597912; PMCID: PMC7882507.

Hill M, Tran N. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer. *Dis Model Mech.* 2021 Apr 1;14(4):dmm047662. doi: 10.1242/dmm.047662. Epub 2021 Apr 15. PMID: 33973623; PMCID: PMC8077553.

Honda T, Kobayashi K, Mikoshiba K, Nakajima K. Regulation of cortical neuron migration by the Reelin signaling pathway. *Neurochem Res.* 2011 Jul;36(7):1270-9. doi: 10.1007/s11064-011-0407-4. Epub 2011 Jan 21. PMID: 21253854.

Hsu SD, Lin FM, Wu WY, Liang C, Huang WC, Chan WL, Tsai WT, Chen GZ, Lee CJ, Chiu CM, Chien CH, Wu MC, Huang CY, Tsou AP, Huang HD. miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* 2011

Jan;39(Database issue):D163-9. doi: 10.1093/nar/gkq1107. Epub 2010 Nov 10. PMID: 21071411; PMCID: PMC3013699.

Hu Z, Mi Y, Qian H, Guo N, Yan A, Zhang Y, Gao X. A Potential Mechanism of Temozolomide Resistance in Glioma-Ferroptosis. *Front Oncol.* 2020 Jun 23;10:897. doi: 10.3389/fonc.2020.00897. PMID: 32656078; PMCID: PMC7324762.

Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4(1):44-57. doi: 10.1038/nprot.2008.211. PMID: 19131956.

Huang J, Zhang Q, Shen J, Chen X, Ma S. Multi-omics analysis identifies potential mechanisms of AURKB in mediating poor outcome of lung adenocarcinoma. *Aging (Albany NY).* 2021 Feb 17;13(4):5946-5966. doi: 10.18632/aging.202517. Epub 2021 Feb 17. PMID: 33612479; PMCID: PMC7950220.

Ilango S, Paital B, Jayachandran P, Padma PR, Nirmaladevi R. Epigenetic alterations in cancer. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2020 Mar 1;25(6):1058-1109. doi: 10.2741/4847. PMID: 32114424.

Il'yasova D, McCarthy B, Marcello J, Schildkraut JM, Moorman PG, Krishnamachari B, Ali-Osman F, Bigner DD, Davis F. Association between glioma and history of allergies, asthma, and eczema: a case-control study with three groups of controls. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Apr;18(4):1232-8. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0995. Epub 2009 Mar 31. PMID: 19336556; PMCID: PMC2700947.

Jámbor I, Szabó K, Zeher M, Papp G. [The importance of microRNAs in the development of systemic autoimmune disorders]. *Orv Hetil.* 2019; 160(15): 563–572.

Jia Y, Tian Y, An S, Yang D. Effects of microRNA-195 on the Prognosis of Glioma Patients and the Proliferation and Apoptosis of Human Glioma Cells. *Pathol Oncol Res.* 2020 Apr;26(2):753-763. doi: 10.1007/s12253-019-00622-3. Epub 2019 Feb 26. PMID: 30806889.

Jiang G, Mu J, Liu X, Peng X, Zhong F, Yuan W, Deng F, Peng X, Peng S, Zeng X. Prognostic value of miR-21 in gliomas: comprehensive study based on meta-analysis and TCGA dataset validation. *Sci Rep.* 2020 Mar 6;10(1):4220. doi: 10.1038/s41598-020-61155-3. PMID: 32144351; PMCID: PMC7060265.

Johansson M, Brännström T, Bergenheim AT, Henriksson R. Spatial expression of VEGF-A in human glioma. *J Neurooncol.* 2002 Aug;59(1):1-6. doi: 10.1023/a:1016317407043. PMID: 12222833.

John D, Alshalalfa M, Almeida T, Murray A, Marques J, Azzam G, Mellon EA, Benjamin CG, Komotar RJ, Ivan M, Mahal B, Rich BJ. Racial Disparities in Glioblastoma Genomic Alterations: A Comprehensive Analysis of a Multi-Institution Cohort of 2390 Patients. *World Neurosurg.* 2024 Aug;188:e625-e630. doi: 10.1016/j.wneu.2024.05.183. Epub 2024 Jun 4. PMID: 38843966.

Juarez P. Regulatory mechanisms of mexEF-oprN efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: from mutations in clinical isolates to its induction as response to electrophilic stress. <https://www.researchgate.net/publication/326504441>

Juarez P. Regulatory mechanisms of mexEF-oprN efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa* : from mutations in clinical isolates to its induction as response to electrophilic stress 2017.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009 Jun;119(6):1420-8. doi: 10.1172/JCI39104. Erratum in: *J Clin Invest.* 2010 May 3;120(5):1786. PMID: 19487818; PMCID: PMC2689101.

Kannan R, Lyon I, Baker N. Dietary control of lipogenesis in vivo in host tissues and tumors of mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. *Cancer Res.* 1980 Dec;40(12):4606-11. PMID: 7438094.

Kanderi T, Munakomi S, Gupta V. Glioblastoma Multiforme. [Updated 2024 May 6]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558954/>

Kandil E, Metz TA, Issa PP, Aboueisha M, Omar M, Attia AS, Chabot B, Hussein M, Moroz K, Shama M, Toraih E. Diagnostic Performance of Afirma and Interpace Diagnostics Genetic Testing in Indeterminate Thyroid Nodules: A Single Center Study. *Cancers (Basel).* 2023 Mar 31;15(7):2098. doi: 10.3390/cancers15072098. PMID: 37046759; PMCID: PMC10093254.

Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ.* 2004 Apr;11(4):448-57. doi: 10.1038/sj.cdd.4401359. PMID: 14713959.

Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*. 2002 Apr;2(4):301-10. doi: 10.1038/nrc780. PMID: 12001991.

Kayabolen A, Yilmaz E, Bagci-Onder T. *IDH* Mutations in Glioma: Double-Edged Sword in Clinical Applications? *Biomedicines*. 2021 Jul 10;9(7):799. doi: 10.3390/biomedicines9070799. PMID: 34356864; PMCID: PMC8301439.

Kazazi-Hyseni F, Beijnen JH, Schellens JH. Bevacizumab. *Oncologist*. 2010;15(8):819-25. doi: 10.1634/theoncologist.2009-0317. Epub 2010 Aug 5. PMID: 20688807; PMCID: PMC3228024.

Kefas B, Godlewski J, Comeau L, Li Y, Abounader R, Hawkinson M, Lee J, Fine H, Chiocca EA, Lawler S, Purow B. microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. *Cancer Res*. 2008 May 15;68(10):3566-72. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6639. PMID: 18483236.

Kesari S. Understanding glioblastoma tumor biology: the potential to improve current diagnosis and treatments. *Semin Oncol*. 2011 Dec;38 Suppl 4:S2-10. doi: 10.1053/j.seminoncol.2011.09.005. PMID: 22078644.

Khan S, Ayub H, Khan T, Wahid F. MicroRNA biogenesis, gene silencing mechanisms and role in breast, ovarian and prostate cancer. *Biochimie*. 2019 Dec;167:12-24. doi: 10.1016/j.biochi.2019.09.001. Epub 2019 Sep 4. PMID: 31493469.

Kim YK, Kim VN. Processing of intronic microRNAs. *EMBO J*. 2007 Feb 7;26(3):775-83. doi: 10.1038/sj.emboj.7601512. Epub 2007 Jan 25. PMID: 17255951; PMCID: PMC1794378.

Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol*. 1999 Jan;1(1):44-51. doi: 10.1093/neuonc/1.1.44. PMID: 11550301; PMCID: PMC1919466.

Kovács Á. External radiation therapy of primary central nervous system tumors – current trends and practice. *Magy Onkol* 68:37-50, 2024

Kowthavarapu VK, Sunil KD, Gautam S, Gaurav G, Prashant K. MAPK pathway: Potential role in glioblastoma multiforme, *Interdiscip Neurosurg*. Volume 23, 2021, 100901. <https://doi.org/10.1016/j.inat.2020.100901>.

Kreth S, Heyn J, Grau S, Kretschmar HA, Egensperger R, Kreth FW. Identification of valid endogenous control genes for determining gene expression in human glioma. *Neuro Oncol*.

2010 Jun;12(6):570-9. doi: 10.1093/neuonc/nop072. Epub 2010 Feb 5. PMID: 20511187; PMCID: PMC2940642.

Lao TD, Le TAH. MicroRNAs: Biogenesis, Functions and Potential Biomarkers for Early Screening, Prognosis and Therapeutic Molecular Monitoring of Nasopharyngeal Carcinoma. Processes. 2020; 8(8):966. <https://doi.org/10.3390/pr8080966>

Łaszczych D, Czernicka A, Gostomczyk K, Szyłberg Ł, Borowczak J. The role of IL-17 in the pathogenesis and treatment of glioblastoma-an update on the state of the art and future perspectives. Med Oncol. 2024 Jun 25;41(8):187. doi: 10.1007/s12032-024-02434-1. PMID: 38918274; PMCID: PMC11199243.

Lee SY. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. Genes Dis. 2016 May 11;3(3):198-210. doi: 10.1016/j.gendis.2016.04.007. PMID: 30258889; PMCID: PMC6150109.

Li M, Xiao A, Floyd D, Olmez I, Lee J, Godlewski J, Bronisz A, Bhat KPL, Sulman EP, Nakano I, Purow B. CDK4/6 inhibition is more active against the glioblastoma proneural subtype. Oncotarget. 2017 Jul 21;8(33):55319-55331. doi: 10.18632/oncotarget.19429. PMID: 28903422; PMCID: PMC5589661.

Lin D, Wang M, Chen Y, Gong J, Chen L, Shi X, Lan F, Chen Z, Xiong T, Sun H, Wan S. Trends in Intracranial Glioma Incidence and Mortality in the United States, 1975-2018. Front Oncol. 2021 Nov 1;11:748061. doi: 10.3389/fonc.2021.748061. PMID: 34790574; PMCID: PMC8591029.

Lin B, Ziebro J, Smithberger E, Skinner KR, Zhao E, Cloughesy TF, Binder ZA, O'Rourke DM, Nathanson DA, Furnari FB, Miller CR. EGFR, the Lazarus target for precision oncology in glioblastoma. Neuro Oncol. 2022 Dec 1;24(12):2035-2062. doi: 10.1093/neuonc/noac204. Erratum in: Neuro Oncol. 2023 Jan 5;25(1):213. doi: 10.1093/neuonc/noac254. PMID: 36125064; PMCID: PMC9713527.

Linos E, Raine T, Alonso A, Michaud D. Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis. J Natl Cancer Inst. 2007 Oct 17;99(20):1544-50. doi: 10.1093/jnci/djm170. Epub 2007 Oct 9. PMID: 17925535.

Little RB, Madden MH, Thompson RC, Olson JJ, Larocca RV, Pan E, Browning JE, Egan KM, Nabors LB. Anthropometric factors in relation to risk of glioma. Cancer Causes Control. 2013

May;24(5):1025-31. doi: 10.1007/s10552-013-0178-0. Epub 2013 Mar 3. PMID: 23456313; PMCID: PMC3633685.

Liu B, Li J, Cairns MJ. Identifying miRNAs, targets and functions. *Brief Bioinform.* 2014 Jan;15(1):1-19. doi: 10.1093/bib/bbs075. Epub 2012 Nov 22. PMID: 23175680; PMCID: PMC3896928.

Liu CC, Xia M, Zhang YJ, Jin P, Zhao L, Zhang J, Li T, Zhou XM, Tu YY, Kong F, Sun C, Shi L, Zhao MQ. Micro124-mediated AHR expression regulates the inflammatory response of chronic rhinosinusitis (CRS) with nasal polyps. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Jun 2;500(2):145-151. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.204. Epub 2018 Apr 18. PMID: 29605298.

Liu Y, Li X, Zhang Y, Wang H, Rong X, Peng J, He L, Peng Y. An miR-340-5p-macrophage feedback loop modulates the progression and tumor microenvironment of glioblastoma multiforme. *Oncogene.* 2019 Dec;38(49):7399-7415. doi: 10.1038/s41388-019-0952-x. Epub 2019 Aug 19. PMID: 31427735.

Liu A, Zhao H, Sun B, Han X, Zhou D, Cui Z, Ma X, Zhang J, Yuan L. A predictive analysis approach for paediatric and adult high-grade glioma: miRNAs and network insight. *Ann Transl Med.* 2020 Mar;8(5):242. doi: 10.21037/atm.2020.01.12. PMID: 32309389; PMCID: PMC7154480.

Liu J, Cheng C, Jiao J, Huang W, Huang J, Sun J, Shao J. MircoRNA-129-5p suppresses the development of glioma by targeting HOXC10. *Pathol Res Pract.* 2020 Apr;216(4):152868. doi: 10.1016/j.prp.2020.152868. Epub 2020 Feb 12. PMID: 32111444.

Liu R, Dai W, Wu A, Li Y. CircCDC45 promotes the malignant progression of glioblastoma by modulating the miR-485-5p/CSF-1 axis. *BMC Cancer.* 2021 Oct 9;21(1):1090. doi: 10.1186/s12885-021-08803-7. PMID: 34627193; PMCID: PMC8501713.

Liu Y, Xiang J, Peng G, Shen C. PRLHR Immune Genes Associated With Tumor Mutation Burden can be Used as Prognostic Markers in Patients With Gliomas. *Front Oncol.* 2022 Jun 21;12:620190. doi: 10.3389/fonc.2022.620190. PMID: 35800054; PMCID: PMC9253814.

Liu Y, Su Z, Tavana O, Gu W. Understanding the complexity of p53 in a new era of tumor suppression. *Cancer Cell.* 2024 Jun 10;42(6):946-967. doi: 10.1016/j.ccell.2024.04.009. Epub 2024 May 9. PMID: 38729160; PMCID: PMC11190820.

Liu Y, Wang Z, Tang Z, Fu Y, Wang L. miRNA-383-5p Functions as an Anti-oncogene in Glioma through the Akt/mTOR Signaling Pathway by Targeting VEGFA. *Curr Cancer Drug Targets*. 2024;24(4):463-475. doi: 10.2174/1568009623666230817102104. PMID: 37592783; PMCID: PMC10964077.

Loh JK, Hwang SL, Lieu AS, Huang TY, Howng SL. The alteration of prostaglandin E2 levels in patients with brain tumors before and after tumor removal. *J Neurooncol*. 2002 Apr;57(2):147-50. doi: 10.1023/a:1015782809966. PMID: 12125976.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016 Jun;131(6):803-20. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1. Epub 2016 May 9. PMID: 27157931.

Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G, Soffietti R, von Deimling A, Ellison DW. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol*. 2021 Aug 2;23(8):1231-1251. doi: 10.1093/neuonc/noab106. PMID: 34185076; PMCID: PMC8328013.

Lu Y, Chen X, Liu F, Yu H, Zhang Y, Du K, Nan Y, Huang Q. Systematic pan-cancer analysis identifies CDC45 as having an oncogenic role in human cancers. *Oncol Rep*. 2022 Oct;48(4):185. doi: 10.3892/or.2022.8400. Epub 2022 Sep 9. PMID: 36082823; PMCID: PMC9478988.

Luo H, Zhang H, Zhang Z, Zhang X, Ning B, Guo J, Nie N, Liu B, Wu X. Down-regulated miR-9 and miR-433 in human gastric carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2009 Jun 16;28(1):82. doi: 10.1186/1756-9966-28-82. PMID: 19531230; PMCID: PMC2739520.

Luo X, Xu S, Zhong Y, Tu T, Xu Y, Li X, Wang B, Yang F. High gene expression levels of VEGFA and CXCL8 in the peritumoral brain zone are associated with the recurrence of glioblastoma: A bioinformatics analysis. *Oncol Lett*. 2019 Dec;18(6):6171-6179. doi: 10.3892/ol.2019.10988. Epub 2019 Oct 14. PMID: 31788092; PMCID: PMC6865749.

Ma C, Nguyen HPT, Luwor RB, Stylli SS, Gogos A, Paradiso L, Kaye AH, Morokoff AP. A comprehensive meta-analysis of circulation miRNAs in glioma as potential diagnostic biomarker. *PLoS One*. 2018 Feb 14;13(2):e0189452. doi: 10.1371/journal.pone.0189452. PMID: 29444091; PMCID: PMC5812551.

Ma HF, Lv GX, Zhang DH. miR-381 Mediates the Development of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma via Targeting STC2. *Onco Targets Ther.* 2020 May 21;13:4485-4493. doi: 10.2147/OTT.S246289. PMID: 32547079; PMCID: PMC7247612.

Makowska M, Smolarz B, Romanowicz H. microRNAs (miRNAs) in Glioblastoma Multiforme (GBM)-Recent Literature Review. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 9;24(4):3521. doi: 10.3390/ijms24043521. PMID: 36834933; PMCID: PMC9965735.

Maksoud S. The Role of the Ubiquitin Proteasome System in Glioma: Analysis Emphasizing the Main Molecular Players and Therapeutic Strategies Identified in Glioblastoma Multiforme. *Mol Neurobiol.* 2021 Jul;58(7):3252-3269. doi: 10.1007/s12035-021-02339-4. Epub 2021 Mar 4. PMID: 33665742; PMCID: PMC8260465.

McDonald FE, Ironside JW, Gregor A, Wyatt B, Stewart M, Rye R, Adams J, Potts HW. The prognostic influence of bcl-2 in malignant glioma. *Br J Cancer.* 2002 Jun 17;86(12):1899-904. doi: 10.1038/sj.bjc.6600217. PMID: 12085183; PMCID: PMC2375435.

Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics.* 2010 Nov;11(7):537-61. doi: 10.2174/138920210793175895. PMID: 21532838; PMCID: PMC3048316.

Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:289-298. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5_25. PMID: 30539453; PMCID: PMC6749998.

McCarthy BJ, Rankin K, Il'yasova D, Erdal S, Vick N, Ali-Osman F, Bigner DD, Davis F. Assessment of type of allergy and antihistamine use in the development of glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011 Feb;20(2):370-8. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0948. PMID: 21300619; PMCID: PMC3077928.

Meel M, Jindal A, Kumar M, Mathur K, Singh A. *IDH1, ATRX, p53, and Ki67* Expression in Glioblastoma patients: Their Clinical and Prognostic Significance-A Prospective Study. *Asian J Neurosurg.* 2024 Mar 26;19(1):14-20. doi: 10.1055/s-0042-1750783. PMID: 38751398; PMCID: PMC11093636.

Michlewski G, Cáceres JF. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *RNA.* 2019 Jan;25(1):1-16. doi: 10.1261/rna.068692.118. Epub 2018 Oct 17. PMID: 30333195; PMCID: PMC6298569.

miRBase. Homo sapiens miRNAs (1917 sequences). Available from: <https://mirbase.org/browse/results/?organism=hsa> [accessed: November 02, 2023].

Monin L, Gaffen SL. Interleukin 17 Family Cytokines: Signaling Mechanisms, Biological Activities, and Therapeutic Implications. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018 Apr 2;10(4):a028522. doi: 10.1101/cshperspect.a028522. PMID: 28620097; PMCID: PMC5732092.

Nagy Z, Decmann Á, Perge P, Igaz P. [Pathogenic and diagnostic roles of microRNAs in adrenocortical tumours]. *Orv Hetil.* 2018; 159(7): 245–251

Nandakumar P, Mansouri A, Das S. The Role of ATRX in Glioma Biology. *Front Oncol.* 2017 Sep 29;7:236. doi: 10.3389/fonc.2017.00236. PMID: 29034211; PMCID: PMC5626857.

Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol.* 2001 Sep;45(3 Suppl):S116-24. doi: 10.1067/mjd.2001.117432. PMID: 11511861.

O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018 Aug 3;9:402. doi: 10.3389/fendo.2018.00402. PMID: 30123182; PMCID: PMC6085463.

Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2013 Feb 15;19(4):764-72. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3002. Epub 2012 Dec 3. PMID: 23209033.

Ohtsuka M, Ling H, Doki Y, Mori M, Calin GA. MicroRNA Processing and Human Cancer. *J Clin Med.* 2015 Aug 21;4(8):1651-67. doi: 10.3390/jcm4081651. PMID: 26308063; PMCID: PMC4555082.

Okura H, Golbourn BJ, Shahzad U, Agnihotri S, Sabha N, Krieger JR, Figueiredo CA, Chalil A, Landon-Brace N, Riemenschneider A, Arai H, Smith CA, Xu S, Kaluz S, Marcus AI, Van Meir EG, Rutka JT. A role for activated Cdc42 in glioblastoma multiforme invasion. *Oncotarget.* 2016 Aug 30;7(35):56958-56975. doi: 10.18632/oncotarget.10925. PMID: 27486972; PMCID: PMC5302965.

Olar A, Aldape KD. Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *J Pathol.* 2014 Jan;232(2):165-77. doi: 10.1002/path.4282. PMID: 24114756; PMCID: PMC4138801.

Ordóñez-Rubiano EG, Rincón-Arias N, Espinosa S, Shelton WJ, Salazar AF, Cómbita A, Baldoncini M, Luzzi S, Payán-Gómez C, Gómez-Amarillo DF, Hakim F, Patiño-Gómez JG, Parra-Medina R. The potential of miRNA-based approaches in glioblastoma: An update in current advances and future perspectives. *Curr Res Pharmacol Drug Discov.* 2024 Jun 29;7:100193. doi: 10.1016/j.crphar.2024.100193. PMID: 39055532; PMCID: PMC11268206.

Oronsky B, Reid TR, Oronsky A, Sandhu N, Knox SJ. A Review of Newly Diagnosed Glioblastoma. *Front Oncol.* 2021 Feb 5;10:574012. doi: 10.3389/fonc.2020.574012. PMID: 33614476; PMCID: PMC7892469.

Orzan F, De Bacco F, Lazzarini E, Crisafulli G, Gasparini A, Dipasquale A, Barault L, Macagno M, Persico P, Pessina F, Bono B, Giordano L, Zeppa P, Melcarne A, Cassoni P, Garbossa D, Santoro A, Comoglio PM, Indraccolo S, Simonelli M, Boccaccio C. Liquid Biopsy of Cerebrospinal Fluid Enables Selective Profiling of Glioma Molecular Subtypes at First Clinical Presentation. *Clin Cancer Res.* 2023 Apr 3;29(7):1252-1266. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-22-2903. PMID: 36648487; PMCID: PMC10068436.

Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan J. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro Oncol.* 2014 Oct;16 Suppl 4(Suppl 4):iv1-63. doi: 10.1093/neuonc/nou223. PMID: 25304271; PMCID: PMC4193675.

Otmani K, Rouas R, Lewalle P. OncomiRs as noncoding RNAs having functions in cancer: Their role in immune suppression and clinical implications. *Front Immunol.* 2022 Sep 16;13:913951. doi: 10.3389/fimmu.2022.913951. PMID: 36189271; PMCID: PMC9523483.

Otsuji R, Fujioka Y, Hata N, Kuga D, Hatae R, Sangatsuda Y, Nakamizo A, Mizoguchi M, Yoshimoto K. Liquid Biopsy for Glioma Using Cell-Free DNA in Cerebrospinal Fluid. *Cancers (Basel).* 2024 Feb 29;16(5):1009. doi: 10.3390/cancers16051009. PMID: 38473369; PMCID: PMC10930790.

Pai FC, Huang HW, Tsai YL, Tsai WC, Cheng YC, Chang HH, Chen Y. Inhibition of FABP6 Reduces Tumor Cell Invasion and Angiogenesis through the Decrease in MMP-2 and VEGF in Human Glioblastoma Cells. *Cells.* 2021 Oct 17;10(10):2782. doi: 10.3390/cells10102782. PMID: 34685761; PMCID: PMC8534568.

Pajares MJ, Alemany-Cosme E, Goñi S, Bandres E, Palanca-Ballester C, Sandoval J. Epigenetic Regulation of microRNAs in Cancer: Shortening the Distance from Bench to Bedside. *Int J Mol*

Sci. 2021 Jul 8;22(14):7350. doi: 10.3390/ijms22147350. PMID: 34298969; PMCID: PMC8306710.

Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2016 Jan 28;1:15004. doi: 10.1038/sigtrans.2015.4. PMID: 29263891; PMCID: PMC5661652.

Phan, N., Huynh, T., & Lin, Y. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated gene signatures and poor clinical outcome of cancer patient. *Transl Cancer Res.* 2017; 6(4), 698-708. doi:10.21037/tcr.2017.07.22

Phua SL, Sivakamasundari V, Shao Y, Cai X, Zhang LF, Lufkin T, Featherstone M. Nuclear accumulation of an uncapped RNA produced by Drosha cleavage of a transcript encoding miR-10b and HOXD4. *PLoS One.* 2011;6(10):e25689. doi: 10.1371/journal.pone.0025689. Epub 2011 Oct 3. PMID: 21991333; PMCID: PMC3185001.

Plotnikova O, Baranova A, Skoblov M. Comprehensive Analysis of Human microRNA-mRNA Interactome. *Front Genet.* 2019 Oct 8;10:933. doi: 10.3389/fgene.2019.00933. PMID: 31649721; PMCID: PMC6792129.

Priambada D, Thohar Arifin M, Saputro A, Muzakka A, Karlowee V, Sadhana U, Bakhtiar Y, Prihastomo KT, Risdianto A, Brotoarianto HK, Andar E, Muttaqin Z. Immunohistochemical Expression of IDH1, ATRX, Ki67, GFAP, and Prognosis in Indonesian Glioma Patients. *Int J Gen Med.* 2023 Feb 1;16:393-403. doi: 10.2147/IJGM.S397550. PMID: 36756391; PMCID: PMC9900491.

Pudełek M, Król K, Catapano J, Wróbel T, Czyż J, Ryszawy D. Epidermal Growth Factor (EGF) Augments the Invasive Potential of Human Glioblastoma Multiforme Cells via the Activation of Collaborative EGFR/ROS-Dependent Signaling. *Int J Mol Sci.* 2020 May 20;21(10):3605. doi: 10.3390/ijms21103605. PMID: 32443749; PMCID: PMC7279139.

Qazi MA, Salim SK, Brown KR, Mikolajewicz N, Savage N, Han H, Subapanditha MK, Bakhshinyan D, Nixon A, Vora P, Desmond K, Chokshi C, Singh M, Khoo A, Macklin A, Khan S, Tatari N, Winegarden N, Richards L, Pugh T, Bock N, Mansouri A, Venugopal C, Kislinger T, Goyal S, Moffat J, Singh SK. Characterization of the minimal residual disease state reveals distinct evolutionary trajectories of human glioblastoma. *Cell Rep.* 2022 Sep 27;40(13):111420. doi: 10.1016/j.celrep.2022.111420. PMID: 36170831.

Qi ZY, Shao C, Yang C, Wang Z, Hui GZ. Alcohol consumption and risk of glioma: a meta-analysis of 19 observational studies. *Nutrients*. 2014 Jan 27;6(2):504-16. doi: 10.3390/nu6020504. PMID: 24473233; PMCID: PMC3942713.

Qiu S, Huang D, Yin D, Li F, Li X, Kung HF, Peng Y. Suppression of tumorigenicity by microRNA-138 through inhibition of EZH2-CDK4/6-pRb-E2F1 signal loop in glioblastoma multiforme. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Oct;1832(10):1697-707. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.05.015. Epub 2013 May 22. PMID: 23707559.

Reimunde P, Pensado-López A, Carreira Crende M, Lombao Iglesias V, Sánchez L, Torrecilla-Parra M, Ramírez CM, Anfray C, Torres Andón F. Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Glioblastoma and Zebrafish Models for the Discovery of New Treatments. *Cancers (Basel)*. 2021 Mar 3;13(5):1087. doi: 10.3390/cancers13051087. PMID: 33802571; PMCID: PMC7961726.

Rocha Pinheiro SL, Lemos FFB, Marques HS, Silva Luz M, de Oliveira Silva LG, Faria Souza Mendes Dos Santos C, da Costa Evangelista K, Calmon MS, Sande Loureiro M, Freire de Melo F. Immunotherapy in glioblastoma treatment: Current state and future prospects. *World J Clin Oncol*. 2023 Apr 24;14(4):138-159. doi: 10.5306/wjco.v14.i4.138. PMID: 37124134; PMCID: PMC10134201.

Rockne R, Alvord EC Jr, Rockhill JK, Swanson KR. A mathematical model for brain tumor response to radiation therapy. *J Math Biol*. 2009 Apr;58(4-5):561-78. doi: 10.1007/s00285-008-0219-6. Epub 2008 Sep 25. PMID: 18815786; PMCID: PMC3784027.

Rodgers LT, Villano JL, Hartz AMS, Bauer B. Glioblastoma Standard of Care: Effects on Tumor Evolution and Reverse Translation in Preclinical Models. *Cancers (Basel)*. 2024 Jul 24;16(15):2638. doi: 10.3390/cancers16152638. PMID: 39123366; PMCID: PMC11311277.

Roh TH, Kim SH. Supramaximal Resection for Glioblastoma: Redefining the Extent of Resection Criteria and Its Impact on Survival. *Brain Tumor Res Treat*. 2023 Jul;11(3):166-172. doi: 10.14791/btrt.2023.0012. PMID: 37550815; PMCID: PMC10409622.

Roshandel AK, Busch CM, Mullekom JV, Cuoco JA, Rogers CM, Apfel LS, Marvin EA, Sontheimer HW, Umans RA. The predictive capability of immunohistochemistry and DNA sequencing for determining *TP53* functional mutation status: a comparative study of 41 glioblastoma patients. *Oncotarget*. 2019 Oct 22;10(58):6204-6218. doi: 10.18632/oncotarget.27252. PMID: 31692772; PMCID: PMC6817445.

Safi, F., Kohler, I., Beger, H.-G. and Röttinger, E. (1991), The value of the tumor marker CA 15-3 in diagnosing and monitoring breast cancer. A comparative study with carcinoembryonic antigen. *Cancer*, 68: 574-582. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19910801\)68:3<574::AID-CNCR2820680322>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19910801)68:3<574::AID-CNCR2820680322>3.0.CO;2-B)

Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*. 2006 Jun;9(6):435-43. doi: 10.1016/j.ccr.2006.04.020. PMID: 16766263.

Scheurer ME, Amirian ES, Davlin SL, Rice T, Wrensch M, Bondy ML. Effects of antihistamine and anti-inflammatory medication use on risk of specific glioma histologies. *Int J Cancer*. 2011 Nov 1;129(9):2290-6. doi: 10.1002/ijc.25883. Epub 2011 Apr 4. PMID: 21190193; PMCID: PMC3125483.

Schlehofer B, Blettner M, Preston-Martin S, Niehoff D, Wahrendorf J, Arslan A, Ahlbom A, Choi WN, Giles GG, Howe GR, Little J, Ménégos F, Ryan P. Role of medical history in brain tumour development. Results from the international adult brain tumour study. *Int J Cancer*. 1999 Jul 19;82(2):155-60. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19990719)82:2<155::aid-ijc1>3.0.co;2-p. PMID: 10389745.

Scholz N, Kurian KM, Siebzehnruhl FA, Licchesi JDF. Targeting the Ubiquitin System in Glioblastoma. *Front Oncol*. 2020 Nov 25;10:574011. doi: 10.3389/fonc.2020.574011. PMID: 33324551; PMCID: PMC7724090.

Scott J, Tsai YY, Chinnaiyan P, Yu HH. Effectiveness of radiotherapy for elderly patients with glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011 Sep 1;81(1):206-10. doi: 10.1016/j.ijrobp.2010.04.033. Epub 2010 Aug 2. PMID: 20675068.

Shea A, Harish V, Afzal Z, Chijioko J, Kedir H, Dusmatova S, Roy A, Ramalinga M, Harris B, Blancato J, Verma M, Kumar D. MicroRNAs in glioblastoma multiforme pathogenesis and therapeutics. *Cancer Med*. 2016 Aug;5(8):1917-46. doi: 10.1002/cam4.775. Epub 2016 Jun 10. PMID: 27282910; PMCID: PMC4971921.

Shi Y, Liu Z, Lin Q, Luo Q, Cen Y, Li J, Fang X, Gong C. MiRNAs and Cancer: Key Link in Diagnosis and Therapy. *Genes (Basel)*. 2021 Aug 23;12(8):1289. doi: 10.3390/genes12081289. PMID: 34440464; PMCID: PMC8395027.

Shieh LT, Ho CH, Guo HR, Huang CC, Ho YC, Ho SY. Epidemiologic Features, Survival, and Prognostic Factors Among Patients With Different Histologic Variants of Glioblastoma: Analysis of a Nationwide Database. *Front Neurol.* 2021 Nov 24;12:659921. doi: 10.3389/fneur.2021.659921. PMID: 34899553; PMCID: PMC8651548.

Shukla GC, Singh J, Barik S. MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions. *Mol Cell Pharmacol.* 2011;3(3):83-92. PMID: 22468167; PMCID: PMC3315687.

Shukla G, Alexander GS, Bakas S, Nikam R, Talekar K, Palmer JD, Shi W. Advanced magnetic resonance imaging in glioblastoma: a review. *Chin Clin Oncol.* 2017 Aug;6(4):40. doi: 10.21037/cco.2017.06.28. PMID: 28841802.

Sidaway P. CNS cancer: Glioblastoma subtypes revisited. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017 Oct;14(10):587. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.122. Epub 2017 Aug 1. PMID: 28762385.

Silantyev AS, Falzone L, Libra M, Gurina OI, Kardashova KS, Nikolouzakis TK, Nosyrev AE, Sutton CW, Mitsias PD, Tsatsakis A. Current and Future Trends on Diagnosis and Prognosis of Glioblastoma: From Molecular Biology to Proteomics. *Cells.* 2019 Aug 9;8(8):863. doi: 10.3390/cells8080863. PMID: 31405017; PMCID: PMC6721640.

Singh N, Miner A, Hennis L, Mittal S. Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review. *Cancer Drug Resist.* 2021;4(1):17-43. doi: 10.20517/cdr.2020.79. Epub 2021 Mar 19. PMID: 34337348; PMCID: PMC8319838.

Slika H, Karimov Z, Alimonti P, Abou-Mrad T, De Fazio E, Alomari S, Tyler B. Preclinical Models and Technologies in Glioblastoma Research: Evolution, Current State, and Future Avenues. *Int J Mol Sci.* 2023 Nov 14;24(22):16316. doi: 10.3390/ijms242216316. PMID: 38003507; PMCID: PMC10671665.

Solomou G, Finch A, Asghar A, Bardella C. Mutant IDH in Gliomas: Role in Cancer and Treatment Options. *Cancers (Basel).* 2023 May 23;15(11):2883. doi: 10.3390/cancers15112883. PMID: 37296846; PMCID: PMC10252079.

Stoyanov GS, Lyutfi E, Georgieva R, Georgiev R, Dzhenkov DL, Petkova L, Ivanov BD, Kaprelyan A, Ghenev P. Reclassification of Glioblastoma Multiforme According to the 2021 World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors: A Single Institution Report and Practical Significance. *Cureus.* 2022 Feb 1;14(2):e21822. doi: 10.7759/cureus.21822. PMID: 35291535; PMCID: PMC8896839.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987-96. doi: 10.1056/NEJMoa043330. PMID: 15758009.

Sun J, Zhao B, Du K, Liu P. TRAF6 correlated to invasion and poor prognosis of glioblastoma via elevating MMP9 expression. *Neuroreport.* 2019 Jan 16;30(2):127-133. doi: 10.1097/WNR.0000000000001171. PMID: 30571666.

Takkar S, Sharma V, Ghosh S, Suri A, Sarkar C, Kulshreshtha R. Hypoxia-inducible miR-196a modulates glioblastoma cell proliferation and migration through complex regulation of NRAS. *Cell Oncol (Dordr).* 2021 Apr;44(2):433-451. doi: 10.1007/s13402-020-00580-y. Epub 2021 Jan 19. PMID: 33469841.

Tamimi AF, Juweid M. Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. In: De Vleeschouwer S, editor. *Glioblastoma* [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2017 Sep 27. Chapter 8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470003/> doi: 10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch8

Tanzer A, Stadler PF. Molecular evolution of a microRNA cluster. *J Mol Biol.* 2004 May 28;339(2):327-35. doi: 10.1016/j.jmb.2004.03.065. PMID: 15136036.

Tat TT, Maroney PA, Chamnongpol S, Collier J, Nilsen TW. Cotranslational microRNA mediated messenger RNA destabilization. *Elife.* 2016 Apr 8;5:e12880. doi: 10.7554/eLife.12880. PMID: 27058298; PMCID: PMC4859803.

Taylor OG, Brzozowski JS and Skelding KA (2019) Glioblastoma Multiforme: An Overview of Emerging Therapeutic Targets. *Front. Oncol.* 9:963.

Teplyuk NM, Uhlmann EJ, Gabriely G, Volfovsky N, Wang Y, Teng J, Karmali P, Marcusson E, Peter M, Mohan A, Kravtsov Y, Cialic R, Chiocca EA, Godlewski J, Tannous B, Krichevsky AM. Therapeutic potential of targeting microRNA-10b in established intracranial glioblastoma: first steps toward the clinic. *EMBO Mol Med.* 2016 Mar 1;8(3):268-87. doi: 10.15252/emmm.201505495. PMID: 26881967; PMCID: PMC4772951.

Thenuwara G, Curtin J, Tian F. Advances in Diagnostic Tools and Therapeutic Approaches for Gliomas: A Comprehensive Review. *Sensors (Basel)*. 2023 Dec 15;23(24):9842. doi: 10.3390/s23249842. PMID: 38139688; PMCID: PMC10747598.

Teraiya M, Perreault H, Chen VC. An overview of glioblastoma multiforme and temozolomide resistance: can LC-MS-based proteomics reveal the fundamental mechanism of temozolomide resistance? *Front Oncol*. 2023 Apr 26;13:1166207. doi: 10.3389/fonc.2023.1166207. PMID: 37182181; PMCID: PMC10169742.

Tregub PP, Ibrahimli I, Averchuk AS, Salmina AB, Litvitskiy PF, Manasova ZS, Popova IA. The Role of microRNAs in Epigenetic Regulation of Signaling Pathways in Neurological Pathologies. *Int J Mol Sci*. 2023 Aug 17;24(16):12899. doi: 10.3390/ijms241612899. PMID: 37629078; PMCID: PMC10454825.

Tuna M, Machado AS, Calin GA. Genetic and epigenetic alterations of microRNAs and implications for human cancers and other diseases. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016 Mar;55(3):193-214. doi: 10.1002/gcc.22332. Epub 2015 Dec 9. PMID: 26651018.

Urbańska K, Sokołowska J, Szmidt M, Sysa P. Glioblastoma multiforme - an overview. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2014;18(5):307-12. doi: 10.5114/wo.2014.40559. Epub 2014 Aug 4. PMID: 25477751; PMCID: PMC4248049.

Valenzuela M, Amato R, Sgura A, Antoccia A, Berardinelli F. The Multiple Facets of ATRX Protein. *Cancers (Basel)*. 2021 May 5;13(9):2211. doi: 10.3390/cancers13092211. PMID: 34062956; PMCID: PMC8124985.

Valle-Garcia D, Pérez de la Cruz V, Flores I, Salazar A, Pineda B, Meza-Sosa KF. Use of microRNAs as Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Tools for Glioblastoma. *Int J Mol Sci*. 2024 Feb 20;25(5):2464. doi: 10.3390/ijms25052464. PMID: 38473710; PMCID: PMC10931459.

Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN; Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR,

and NF1. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):98-110. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020. PMID: 20129251; PMCID: PMC2818769.

Veryaskina YA, Titov SE, Zhimulev IF. Reference Genes for qPCR-Based miRNA Expression Profiling in 14 Human Tissues. *Med Princ Pract*. 2022;31(4):322-332. doi: 10.1159/000524283. Epub 2022 Mar 30. PMID: 35354155; PMCID: PMC9485981.

Vidigal JA, Ventura A. The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends Cell Biol*. 2015 Mar;25(3):137-47. doi: 10.1016/j.tcb.2014.11.004. Epub 2014 Dec 4. PMID: 25484347; PMCID: PMC4344861.

Vinchure OS, Sharma V, Tabasum S, Ghosh S, Singh RP, Sarkar C, Kulshreshtha R. Polycomb complex mediated epigenetic reprogramming alters TGF- β signaling via a novel EZH2/miR-490/TGIF2 axis thereby inducing migration and EMT potential in glioblastomas. *Int J Cancer*. 2019 Sep 1;145(5):1254-1269. doi: 10.1002/ijc.32360. Epub 2019 May 10. PMID: 31008529.

Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 14;103(7):2257-61. doi: 10.1073/pnas.0510565103. Epub 2006 Feb 3. PMID: 16461460; PMCID: PMC1413718.

Wade A, Robinson AE, Engler JR, Petritsch C, James CD, Phillips JJ. Proteoglycans and their roles in brain cancer. *FEBS J*. 2013 May;280(10):2399-417. doi: 10.1111/febs.12109. Epub 2013 Feb 6. PMID: 23281850; PMCID: PMC3644380.

Wang W, Zhao LJ, Tan YX, Ren H, Qi ZT. Identification of deregulated miRNAs and their targets in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2012 Oct 14;18(38):5442-53. doi: 10.3748/wjg.v18.i38.5442. PMID: 23082062; PMCID: PMC3471114.

Wang Q, Hu B, Hu X, Kim H, Squatrito M, Scarpace L, deCarvalho AC, Lyu S, Li P, Li Y, Barthel F, Cho HJ, Lin YH, Satani N, Martinez-Ledesma E, Zheng S, Chang E, Sauv e CG, Olar A, Lan ZD, Finocchiaro G, Phillips JJ, Berger MS, Gabrusiewicz KR, Wang G, Eskilsson E, Hu J, Mikkelsen T, DePinho RA, Muller F, Heimberger AB, Sulman EP, Nam DH, Verhaak RGW. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell*. 2017 Jul 10;32(1):42-56.e6.

doi: 10.1016/j.ccell.2017.06.003. Erratum in: *Cancer Cell*. 2018 Jan 8;33(1):152. doi: 10.1016/j.ccell.2017.12.012. PMID: 28697342; PMCID: PMC5599156.

Wang J, Che F, Zhang J. Cell-free microRNAs as non-invasive biomarkers in glioma: a diagnostic meta-analysis. *Int J Biol Markers*. 2019 Sep;34(3):232-242. doi: 10.1177/1724600819840033. Epub 2019 Apr 10. PMID: 30968749.

Wang WY, Lu WC. Reduced Expression of hsa-miR-338-3p Contributes to the Development of Glioma Cells by Targeting Mitochondrial 3-Oxoacyl-ACP Synthase (OXSM) in Glioblastoma (GBM). *Onco Targets Ther*. 2020 Sep 24;13:9513-9523. doi: 10.2147/OTT.S262873. PMID: 33061435; PMCID: PMC7522303.

Wang Z, Peet NP, Zhang P, Jiang Y, Rong L. Current Development of Glioblastoma Therapeutic Agents. *Mol Cancer Ther*. 2021 Sep;20(9):1521-1532.

Whitfield BT, Huse JT. Classification of adult-type diffuse gliomas: Impact of the World Health Organization 2021 update. *Brain Pathol*. 2022 Jul;32(4):e13062. doi: 10.1111/bpa.13062. Epub 2022 Mar 14. PMID: 35289001; PMCID: PMC9245936.

Wu S, Wang S, Gao F, Li L, Zheng S, Yung WKA, Koul D. Activation of WEE1 confers resistance to PI3K inhibition in glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2018 Jan 10;20(1):78-91. doi: 10.1093/neuonc/nox128. PMID: 29016926; PMCID: PMC5761544.

Wu J, Yang J, Cho WC, Zheng Y. Argonaute proteins: Structural features, functions and emerging roles. *J Adv Res*. 2020 Apr 29;24:317-324. doi: 10.1016/j.jare.2020.04.017. PMID: 32455006; PMCID: PMC7235612.

Wu W, Klockow JL, Zhang M, Lafortune F, Chang E, Jin L, Wu Y, Daldrup-Link HE. Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance. *Pharmacol Res*. 2021 Sep;171:105780.

Xiao M, Li J, Li W, Wang Y, Wu F, Xi Y, Zhang L, Ding C, Luo H, Li Y, Peng L, Zhao L, Peng S, Xiao Y, Dong S, Cao J, Yu W. MicroRNAs activate gene transcription epigenetically as an enhancer trigger. *RNA Biol*. 2017 Oct 3;14(10):1326-1334. doi: 10.1080/15476286.2015.1112487. Epub 2016 Feb 6. PMID: 26853707; PMCID: PMC5711461.

- Xie B, Ding Q, Han H, Wu D. miRCancer: a microRNA-cancer association database constructed by text mining on literature. *Bioinformatics*. 2013 Mar 1;29(5):638-44. doi: 10.1093/bioinformatics/btt014. Epub 2013 Jan 16. PMID: 23325619.
- Xu D, Ma P, Gao G, Gui Y, Niu X, Jin B. MicroRNA-383 expression regulates proliferation, migration, invasion, and apoptosis in human glioma cells. *Tumour Biol*. 2015 Sep;36(10):7743-53. doi: 10.1007/s13277-015-3378-2. Epub 2015 May 4. PMID: 25936342.
- Yamada D, Fujikawa K, Kawabe K, Furuta T, Nakada M, Takarada T. RUNX2 Promotes Malignant Progression in Glioma. *Neurochem Res*. 2018 Nov;43(11):2047-2054. doi: 10.1007/s11064-018-2626-4. Epub 2018 Sep 10. PMID: 30203400.
- Yang G, Han D, Chen X, Zhang D, Wang L, Shi C, Zhang W, Li C, Chen X, Liu H, Zhang D, Kang J, Peng F, Liu Z, Qi J, Gao X, Ai J, Shi C, Zhao S. MiR-196a exerts its oncogenic effect in glioblastoma multiforme by inhibition of I κ B α both in vitro and in vivo. *Neuro Oncol*. 2014 May;16(5):652-61. doi: 10.1093/neuonc/not307. Epub 2014 Jan 23. PMID: 24463357; PMCID: PMC3984554.
- Yang Y, Wu J, Guan H, Cai J, Fang L, Li J, Li M. MiR-136 promotes apoptosis of glioma cells by targeting AEG-1 and Bcl-2. *FEBS Lett*. 2012 Oct 19;586(20):3608-12. doi: 10.1016/j.febslet.2012.08.003. Epub 2012 Aug 9. PMID: 22967897.
- Yang Z, Zhao C, Zong S, Piao J, Zhao Y, Chen X. A review on surgical treatment options in gliomas. *Front Oncol*. 2023 Mar 16;13:1088484. doi: 10.3389/fonc.2023.1088484. PMID: 37007123; PMCID: PMC10061125.
- Yang Z, Ijaz K, Esebua M. Molecular Testing Using ThyGeNEXT/ThyraMIR in Thyroid Nodules With Indeterminate Cytology: A Single Medical Institute Experience. *Diagn Cytopathol*. 2025 Apr 6. doi: 10.1002/dc.25474. Epub ahead of print. PMID: 40189898.
- Yao, M., Li, S., Wu, X. et al. Cellular origin of glioblastoma and its implication in precision therapy. *Cell Mol Immunol* 15, 737–739 (2018).
- Young RM, Jamshidi A, Davis G, Sherman JH. Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. *Ann Transl Med*. 2015 Jun;3(9):121. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.05.10. PMID: 26207249; PMCID: PMC4481356.

Yun EJ, Kim D, Hsieh JT, Baek ST. Stanniocalcin 2 drives malignant transformation of human glioblastoma cells by targeting SNAI2 and Matrix Metalloproteinases. *Cell Death Discov.* 2022 Jul 5;8(1):308. doi: 10.1038/s41420-022-01090-6. PMID: 35790735; PMCID: PMC9256701.

Zhang W, Dahlberg JE, Tam W. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *Am J Pathol.* 2007 Sep;171(3):728-38. doi: 10.2353/ajpath.2007.070070. PMID: 17724137; PMCID: PMC1959494.

Zhang J, Stevens MF, Bradshaw TD. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol.* 2012 Jan;5(1):102-14. doi: 10.2174/1874467211205010102. PMID: 22122467.

Zhang Y, Han D, Wei W, Cao W, Zhang R, Dong Q, Zhang J, Wang Y, Liu N. MiR-218 Inhibited Growth and Metabolism of Human Glioblastoma Cells by Directly Targeting E2F2. *Cell Mol Neurobiol.* 2015 Nov;35(8):1165-73. doi: 10.1007/s10571-015-0210-x. Epub 2015 May 27. PMID: 26012781; PMCID: PMC11486278.

Zhang K, Fu G, Pan G, Li C, Shen L, Hu R, Zhu S, Chen Y, Cui H. Demethylzeylasteral inhibits glioma growth by regulating the miR-30e-5p/MYBL2 axis. *Cell Death Dis.* 2018 Oct 10;9(10):1035. doi: 10.1038/s41419-018-1086-8. PMID: 30305611; PMCID: PMC6180101.

Zhang F, Wu A, Wang Y, Liu J. miR-490-3p functions as a tumor suppressor in glioma by inhibiting high-mobility group AT-hook 2 expression. *Exp Ther Med.* 2019 Jul;18(1):664-670. doi: 10.3892/etm.2019.7606. Epub 2019 May 23. PMID: 31258704; PMCID: PMC6566118.

Zhang B, Xie L, Liu J, Liu A, He M. Construction and validation of a cuproptosis-related prognostic model for glioblastoma. *Front Immunol.* 2023 Feb 6;14:1082974. doi: 10.3389/fimmu.2023.1082974. PMID: 36814929; PMCID: PMC9939522.

Zhao Y, Huang W, Kim TM, Jung Y, Menon LG, Xing H, Li H, Carroll RS, Park PJ, Yang HW, Johnson MD. MicroRNA-29a activates a multi-component growth and invasion program in glioblastoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 Jan 25;38(1):36. doi: 10.1186/s13046-019-1026-1. PMID: 30683134; PMCID: PMC6347789.

Zhou Q, Liu J, Quan J, Liu W, Tan H, Li W. MicroRNAs as potential biomarkers for the diagnosis of glioma: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Sci.* 2018 Sep;109(9):2651-2659. doi: 10.1111/cas.13714. Epub 2018 Aug 3. PMID: 29949235; PMCID: PMC6125451.

15. Tárgyszavak

Glioblastoma, mikroRNS, agyszövet, vérplazma, új generációs szekvenálás, NanoString analízis, RT-qPCR, tumorgenezis, biomarker, diagnosztikai panel

16. Keywords

Glioblastoma, microRNA, brain tissue, blood plasma, next generation sequencing, NanoString analysis, RT-qPCR, tumorigenesis, biomarker, diagnostic panel

17. Köszönetnyilvánítás

Doktori munkám megvalósulásáért elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek **Hádáné Dr. Birkó Zsuzsannának** belém vetett bizalmáért, továbbá amiért lehetővé tette és türelmes útmutatásával mindvégig támogatta a munkámat. Külön köszönet illeti **Prof. Dr. Balogh István** tanszékvezető urat, amiért hozzájárult és támogatta a tanszéken végzett kutatásomat.

Hálás köszönettel tartozom továbbá **Dr. Penyige Andrásnak** a bioinformatikai analízisek és a publikációk elkészítése során nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért és végtelen türelméért. Továbbá köszönettel tartozom **Menyhártné Solymosi Líviának** a laboratóriumban végzett munkám során nyújtott pontos és önzetlen segítségéért. Külön köszönet illeti **Dr. Póliska Szilárdot** a szekvenálások elvégzéséért, valamint a bioinformatikai elemzésekben nyújtott segítségéért. Ezen felül hálával tartozom **Dr. Márton-Deme Évának, Beke-Varga Alexandrának, Magyarné Trefán Katalinnak** és **Varga Juditnak** a barátságukért, a milliónyi szép pillanatért és a rengeteg segítségért, biztatásért, amit sosem tudok majd meghálálni nekik. Szeretnék továbbá köszönetet mondani TDK hallgatóimnak, **Torner Bernadettnek** és **Adorján Dávidnak**, akik töretlen lelkesedésükkel és határtalan precizitásukkal nagymértékben hozzájárultak doktori munkám létrejöttéhez. Külön köszönöm Bernadettnek – aki ma már PhD hallgatóként a kutatócsoportunk nagyon fontos tagja – a munkáján felül nyújtott lelki támogatását és a kellemes beszélgetéseket. Emellett köszönet illeti az Orvosi Genetikai Tanszék összes munkatársát amiért kedvességükkel, segítségükkel és támogatásukkal hozzájárultak gördülékeny munkavégzésemhez.

Hálás köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Klekner Álmos** felé, aki kollaborációs partnerünként a betegmintákon túl anyagilag is nagymértékben támogatta kutatásunk megvalósulását és sikerességét. Emellett köszönöm végtelen kedvességét és azt, hogy az ajtaja mindig nyitva állt előttem.

Végül, de nem utolsó sorban kifejezhetetlen hálával tartozom a szüleimnek, a páromnak és a barátaimnak, akik mindvégig hittek bennem. Szeretetükkel és önzetlen támogatásukkal a legnehezebb pillanatokon is könnyen átsegítettek. Ez a munka az Ő érdemük is.

Kutatásunk a 2017-1.2.1-NKP-2017-00002 „National Brain Research Program NAP 2.0”, valamint „A Kulturális és Innovációs Minisztérium EKÖP-24-4-I-DE-312 kódszámú Egyetemi Kutatói Ösztöndíj Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.”