

# Kvantitatívne profilovanie génov asociovaných s dráhami vzniku mozgových nádorov

## Quantitative profiling of genes associated with cancer pathways in brain tumors

Majerčíková Z.<sup>1</sup>, Dibdiaková K.<sup>1</sup>, Galanda M.<sup>2</sup>, Galanda T.<sup>2</sup>, Richterová R.<sup>3</sup>, Kolarovszki B.<sup>3</sup>, Račay P.<sup>1</sup>, Hatok J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta UK v Martine, Martin, Slovenská republika

<sup>2</sup> Neurochirurgická klinika SZU, Fakultná nemocnica s poliklinikou F. D. Roosevelta, Banská Bystrica, Slovenská republika

<sup>3</sup> Neurochirurgická klinika, Jesseniova lekárska fakulta UK a UN v Martine, Martin, Slovenská republika

### Súhrn

**Východiská:** Mozgové nádory tvoria rôznorodú skupinu malignit charakterizovaných intertumorálnou aj intratumorálnou heterogenitou. Medzi najagresívnejší z nich radíme glioblastóm, ktorý je napriek pokrokom v súčasnej medicíne stále neliečiteľný. Jedným z dôvodov je vysoký stupeň rekurencie ochorenia a rezistencia na štandardne využívané chemoterapeutikum temozolomid. Preto mapovanie dráh zodpovedných za tumorigenézu na transkripčnej úrovni môže prispieť k determinovaniu príčin a stupňa agresivity medzi jednotlivými typmi gliálnych malignit. **Súbor pacientov a metódy:** Do súboru vzoriek boli zaradené biopsie od pacientov s astrocytómom (n = 6), glioblastómom (n = 22) a meningiómom (n = 14). Kontrolnú skupinu predstavovali RNA izolované zo zdravého ľudského mozgu (n = 3). Reverznou transkripciou získanú cDNA sme využili na kvantitatívnu analýzu pomocou Human Cancer PathwayFinder™ real-time PCR Array v 96 jamkovom formáte a pre každú vzorku sme stanovili expresiu 84 génov patriacich do 9 regulačných dráh (angiogenéza, apoptóza, bunkový cyklus a starnutie, poškodenie a oprava DNA, epiteliálno-mezenchymálny prechod, hypoxia, celkový metabolizmus a dynamika telomér). **Výsledky:** Určením relatívnej expície vybraných génov sme charakterizovali profil jednotlivých mozgových malignit v kontexte signálnych dráh ovplyvňujúcich tumorigenézu. Zo všetkých sledovaných génov jednotlivých dráh sme zaznamenali dereguláciu u glioblastómov v 50 %, u meningiómov v 52,4 % a u astrocytómov v 53,6 %. Celkovo sme najvýraznejšie zmeny so štatistickou signifikanciou oproti kontrole zaznamenali u génov spájaných s epiteliálno-mezenchymálnou tranzíciou (*CDH2*, *FOXC2*, *GSC*, *SNAI2* a *SOX10*), bunkovým starnutím (*BMI1*, *ETS2*, *MAP2K1* a *SOD1*), opravou DNA (*DDB2*, *ERCC3*, *GADD45G* a *LIG4*) a dynamikou telomér (*TEP1*, *TERF2IP*, *TNKS* a *TNKS2*). **Záver:** Na základe získaných dát môžeme konštatovať, že jednotlivé diagnózy sa líšia v transkriptomickom profile. Prihladnúc na tento fakt, je preto nevyhnutná potreba individuálneho molekulového prístupu s cieľom komplexnej a cielenej terapie na viacerých stupňoch nádorového metabolizmu.

### Kľúčové slová

nádory mozgu – mRNA – profilovanie dráh tumorigenézy

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare that they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



doc. RNDr. Jozef Hatok, PhD.

Univerzita Komenského v Bratislave  
Jesseniova lekárska fakulta v Martine  
Ústav lekárskej biochémie  
Malá Hora 11161/4D  
036 01 Martin  
Slovenská republika  
e-mail: hatok@jfmed.uniba.sk

Obdržané/Submitted: 8. 6. 2022

Prijaté/Accepted: 13. 10. 2022

doi: 10.48095/ccko2023224

## Summary

**Background:** Brain tumors are a heterogeneous group of malignancies characterized by inter- and intratumoral heterogeneity. Among them, the most aggressive and, despite advances in medicine, still incurable remains glioblastoma. One of the reasons is the high recurrence rate of the disease and resistance to temozolomide, a golden standard in chemotherapy of brain tumors. Therefore, mapping the pathways responsible for tumorigenesis at the transcriptional level may help to determine the causes and aggressive behavior among different glial tumors. **Patients and methods:** Biopsies from patients with astrocytoma (N = 6), glioblastoma (N = 22), and meningioma (N = 14) were included in the sample set. A control group consisted of RNA isolated from healthy human brain (N = 3). The reverse-transcribed cDNAs were analyzed using the Human Cancer PathwayFinder™ real-time PCR Array in a 96-well format. The expression of 84 genes belonging to 9 signaling pathways (angiogenesis, apoptosis, cell cycle and senescence, DNA damage and repair, epithelial-to-mesenchymal transition, hypoxia, overall metabolism, and telomere dynamics) was determined for each sample. **Results:** By determining the relative expression of selected genes, we characterized the transcriptomic profile of individual brain malignancies in the context of signaling pathways involved in tumorigenesis. We observed deregulation in 50, 52.4 and 53.6% % of the genes in glioblastomas, meningiomas and astrocytomas, respectively. The most pronounced changes with statistical significance compared to control were observed in the genes associated with epithelial-to-mesenchymal transition (*CDH2*, *FOXC2*, *GSC*, *SNAI2*, and *SOX10*), cellular senescence (*BMI1*, *ETS2*, *MAP2K1*, and *SOD1*), DNA repair (*DDB2*, *ERCC3*, *GADD45G*, and *LIG4*), and dynamic of telomeres (*TEP1*, *TERF2IP*, *TNKS*, and *TNKS2*). **Conclusion:** Based on the obtained data, we can conclude that individual diagnoses differ in transcriptomic profile. An individual molecular approach is therefore necessary in order to provide comprehensive and targeted therapy on multiple metabolic pathways in the diagnosis of brain tumors.

## Key words

brain tumors – mRNA – profiling of tumorigenesis pathways

## Úvod

Mozgové nádory sa líšia stupňom malignity od pomaly rastúcich a liečiteľných nádorov po rýchlo proliferujúce, agresívne tumory charakterizované vysokou mierou heterogenity a invazívnosti. Podľa najnovšej klasifikácie mozgových nádorov vydanéj v roku 2021 Svetovou zdravotníckou organizáciou sú klasifikované na základe histopatologických znakov, ako aj podľa zavedených molekulárnych parametrov [1]. Klinicky sú z glií odvodené tumory rozdelené do štyroch stupňov malignity, z ktorých najagresívnejší je glioblastóm (GBM, WHO IV). Glioblastóm sa vyznačuje svojou vysoko infiltračnou povahou často poškodzujúcou hematoencefalickú bariéru, aberantnou vaskularizáciou a odolnosťou voči multimodálnej liečbe [1–3]. Molekulové charakterizovanie nových terapeutických cieľov a spôsobov je kritické pre zvládnutie úspešnej klasifikácie a liečby tak neľahkej diagnózy akou mozgové nádory sú. Preto sme si stanovili za cieľ na molekulárnej úrovni charakterizovať rôzne typy mozgových nádorov (glioblastómy, astrocytomy a meningiomy ako zástupcov prevažne benígnych tumorov) a sledovať expresiu komerčne dostupných génov podieľajúcich sa na všeobecnom procese vzniku rakoviny pomocou polymerázovej reťazovej reakcie v reálnom čase (real-time polymerase chain reaction – RT PCR).

Záverom možno konštatovať, že zistenia tejto štúdie poskytujú pohľad do patogenézy astrocytómov s dôrazom na glioblastóm a benígne meningiomy a môžu byť podkladom pre potenciálne terapeutické ciele ďalšieho výskumu.

## Súbor pacientov a metódy

Pacientske vzorky pochádzajú z tkanivovej banky nášho pracoviska (tkanivové biopsie nádorov mozgu sme získali v spolupráci s Neurochirurgickou klinikou FNsP F. D. Roosevelta v Banskej Bystrici a Neurochirurgickou klinikou Univerzitnej nemocnice v Martine v rokoch 2018–2021). Do súboru boli zaradené bioptické vzorky od pacientov s glioblastómom (GBM; IV; n = 22), astrocytómom (AST; III; n = 6) a meningiómom (MNG; I – III; n = 14) ženského aj mužského pohlavia rôzneho veku v celkovom počte 42. Základná charakteristika súboru pacientov je uvedená v tab. 1. Kontrolnú skupinu tvorili komerčne dostupné RNA izolované zo zdravých ľudských mozgov (n = 3). Práca bola schválená Etickou komisiou Jesseniovej lekárskej fakulty v Martine pod číslom EK 75/2018. Pacienti boli oboznámení s účelom štúdie a podpísali informovaný súhlas.

## Spracovanie patientskych biopsii

Nádorové tkanivo získané od pacientov uskladnené pri teplote  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  sme nechali rozmraziť na lade, po rozmra-

zení sme do sterilných skúmaviek navážili 15–35 mg tkaniva, ktoré sme použili na izoláciu nukleových kyselín. Do každej vzorky sme pridali lyzačný roztok a homogenizovali 20 sekundovou sonifikáciou v ultrasonickom homogénizátore SONOPULS HD 3100 (Bandelin, Nemecko).

## Izolácia celkovej RNA a prepis do cDNA

Celkovú RNA sme z tkanivových homogenátov izolovali použitím AllPrep® DNA/RNA Mini Kitu. Pre odstránenie zvyškovej DNA z RNA frakcie sme zmes inkubovali s DNázou podľa inštrukcií výrobcu. Koncentráciu a čistotu izolovanej RNA sme následne stanovili na spektrofotometri (Implen, Nemecko) pri vlnovej dĺžke 260 nm. RNA bola uskladnená po pridaní 96% etanolu pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Kvalitu izolovanej RNA sme určili pomocou čipovej elektroforézy MCE®-202 MultiNA (Shimadzu Biotech, Japonsko). Prepisom 2  $\mu\text{g}$  izolovanej celkovej RNA sme metódou reverznej transkripcie nasynthetizovali cDNA s využitím RT2 First Strand Kitu na cykléri TProfessional TRIO (Biometra, Nemecko). Pripravená cDNA bola nariadená do celkového objemu 111  $\mu\text{l}$  sterilnou  $\text{dH}_2\text{O}$  bez nukleáz a uskladnená pri teplote  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## Real-time PCR array

Nasynthetizovanú cDNA sme zriedili na koncentráciu 50 ng/ $\mu\text{l}$  vo vode bez nuk-

Tab. 1. Charakteristika súboru pacientov.

	Glioblastóm	Astrocytóm	Meningióm
počet	22	6	14
medián veku počas stanovenia diagnózy (roky)	60	28	60
pohlavie (muž/žena)	12/10	5/1	3/11
stupeň malignity (I/II/III/IV/neznámy)	-/-/-22/-	-/-/6/-/-	11/1/1/-/1

leáz a 40 µl takto zriedenej cDNA sme pridali do 1 340 µl RT2 SYBR® Green Rox™ qPCR Master Mixu (Qiagen, USA) a 1 290 µl sterilnej vody bez nukleáz. V 96-jamkovom formáte bola analyzovaná iba jedna vzorka. Pripravený premix sme jemne zamiešali a po 25 µl napipetovali do jednotlivých jamiek Human Cancer PathwayFinder™ PCR Array 96-jamkovej platničky (Qiagen, USA). Reakcia prebehla v cykléri ViiA 7 Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA) s detekciou fluorescenčnej farbičky SYBR Green.

#### Analýza dát

Namerané Ct hodnoty boli analyzované na základe 2-ΔΔCt metódy v online nástroji od firmy QIAGEN. Údaje boli normalizované k hodnotám priemeru endogénnych kontrol (housekeeping génom) *ACTB* (β-aktín), *B2M* (β-2-mikroglobulín), *GAPDH* (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza) a *RPLP0* (kyslý proteín P0 veľkej ribozomálnej podjednotky). Z normalizovaných hodnôt boli ďalej vypočítané násobné zmeny v regulácii expresie nádorových vzoriek oproti kontrolnej skupine. Hodnoty násobnej zmeny expresie väčšie ako 2 naznačujú zvýšenú expresiu (nadreguláciu); hodnoty < -2 vyjadrujú zníženú expresiu (podreguláciu). Štatistická významnosť je vyjadrená pomocou Studentovho t-testu p-hodnotou.

#### Výsledky

Na testovanie génov, ktoré pozitívne alebo negatívne ovplyvňujú tumorigenézu mozgových nádorov (meningiómov, glioblastómov a astrocytómov) sme využili komerčne dostupnú RT-PCR array od firmy Qiagen, USA. Celkovo sme stanovovali expresiu 84 génov zapojených do procesov angiogenézy, apoptózy, regulácie bunkového cyklu, star-

nutia a nesmrteľnosti, opráv poškodenej DNA, migrácie a invazívnosti cez epitelialno-mezenchymálnu tranzíciu, odpovede na hypoxiu a regulácie energetického metabolizmu (tab. 2).

#### Angiogenéza

Adaptácia nádorových buniek na prostredie so slabým krvným zásobením, hypoxiou a obmedzeným prísunom živín procesom angiogenézy je jednou zo základných charakteristík nádorov. Na tomto procese sa podieľa široká škála angiogénnych faktorov zabezpečujúcich vývoj krvných ciev. Nadregulácia génu *PGF* sa ukázala byť prítomná vo všetkých nádorových skupinách, avšak iba u GBM je táto zmena štatisticky významná (14,10; p < 0,05). Jediným významne podregulovaným je gén *FLT1* (-4,20; p < 0,05) a iba u meningiómov (tab. 3).

#### Apoptóza

Apoptóza hrá kľúčovú úlohu v nádorových procesoch. Z 10 skúmaných apoptotických génov (tab. 3) sme najvýraznejšiu dereguláciu zaznamenali u astrocytómov. Zvýšená expresia bola zistená u 8 génov, z toho 3 sú štatisticky významné – gén kódujúci kaspázu 9 (*CASP9*), *CASP8* a *FADD* podobný regulátor apoptózy (*CFLAR*) a gén pre X-chromozómový inhibitor apoptózy (*XIAP*). Bez významnosti, no so stovkovými hodnotami nadregulácie sa prejavil Fas ligand (*FASLG*), gén patriaci do superrodiny TNF. Záporná regulácia nebola prítomná u žiadneho génu. U meningiómov ani glioblastómov nedošlo ku štatisticky významnej zmene v regulácii expresie.

#### Bunkový cyklus

Nerovnováha v signalizácii DNA replikácie a regulácii zastavenia bunkového cyklu je dôležitá pre získanie malígneho

fenotypu, preto musia byť tieto procesy prísne regulované. Spomedzi vyšetrovaných génov (n = 10), najvyšší nárast expresie (avšak bez štatistickej významnosti) sme zaznamenali pre proliferačný marker Ki-67 a to vo všetkých nádorových skupinách (tab. 3). Zníženú expresiu v géne *STMN1* sme zaznamenali u MNG (-10,7; p < 0,001) a GBM (-8,67; p < 0,001) skupiny. Ďalším génom so štatisticky dôležitou zmenou expresie, konkrétne nadreguláciou, je u AST *CDC20* a u GBM *WEE1*.

#### Bunkové starnutie

Starnutie buniek (bunková senescencia) možno interpretovať ako spontánnu počiatočnú bariéru v tumorigenéze. Hlavnou úlohou starnutia pri ochrane pred rakovinou je zabezpečiť, aby bunky stratili schopnosť trvalo sa množiť, hoci môžu byť metabolicky plne aktívne. Rozdielnu reguláciu expresie sme zaznamenali pri géne *BMI1* – u MNG (-3,71; p < 0,001) a GBM (-2,47; p < 0,05) je tento gén podregulovaný, u AST je naopak jeho expresia oproti kontrolnej skupine zvýšená (3,28; p < 0,05). Okrem *BMI1* sme identifikovali ďalšie 3 podregulované gény – *ETS2*, *MAP2K1* a *SOD1*, z ktorých len u *MAP2K1* bola zmena regulácie štatisticky významná u všetkých sledovaných skupín nádorov. Zmena expresie ostatných nadregulovaných génov nebola významná (tab. 3).

#### Poškodenie a oprava DNA

Poškodenie DNA je jednou z prvých udalostí, ktoré prispievajú k progresii rakoviny. Nesprávna oprava DNA vedie ku genetickým aberáciám v onkogénoch a bunky prechádzajú malígnou transformáciou. U meningiómovej a glioblastómovej skupiny sme identifikovali dva podregulované gény (*ERCC3* a *LIG4*),

Tab. 2. Zoznam sledovaných génov a ich rozdelenie do metabolických dráh.

Dráha	Gén	Proteínový produkt	Dráha	Gén	Proteínový produkt
Angiogenéza	<i>ANGPT1</i>	angiopoetín 1	Poškodenie a oprava DNA	<i>DDB2</i>	proteín 2 viažuci poškodenú DNA
	<i>ANGPT2</i>	angiopoetín 2		<i>DDIT3</i>	DNA poškodením indukovaný transkript 3 proteín
	<i>CCL2</i>	chemokínový ligand 2 (C-C motív)		<i>ERCC3</i>	proteín excíznej opravy 3
	<i>FGF2</i>	fibroblastový rastový faktor 2		<i>ERCC5</i>	proteín excíznej opravy 5
	<i>FLT1</i>	Fms-podobná tyrozínkináza 1		<i>GADD45G</i>	DDIT2 proteín gama
	<i>KDR</i>	VEGF-receptor 2		<i>LIG4</i>	DNA ligáza 4, ATP-závislá
	<i>PGF</i>	placentárny rastový faktor		<i>POLB</i>	DNA polymeráza β
	<i>SERPINF1</i>	serpin peptidázový inhibítor		<i>PPP1R15A</i>	proteín fosfatáza 1, podj. 15A
	<i>TEK</i>	endoteliálna tyrozínkináza		<i>CDH2</i>	kadherín 2 (neurálny)
	<i>VEGFC</i>	vaskulárny endoteliálny rastový faktor C		<i>DSP</i>	desmoplakín
Apoptóza	<i>APAF1</i>	apoptotický proteazómový aktivačný faktor 1	Epiteliálno-mezenchymálna tranzícia	<i>FOXC2</i>	forkhead box proteín C2
	<i>BCL2L11</i>	Bcl2-podobný proteín 11		<i>GSC</i>	gooseoid homeobox proteín
	<i>BIRC3</i>	bakulovirálny proteín 3		<i>KRT14</i>	keratín 14
	<i>CASP2</i>	kaspáza 2		<i>OCLN</i>	okludín
	<i>CASP7</i>	kaspáza 7		<i>SNAI1</i>	snail homológ 1 (drozofila)
	<i>CASP9</i>	kaspáza 9		<i>SNAI2</i>	snail homológ 2 (drozofila)
	<i>CFLAR</i>	CASP8 a FADD podobný regulátor apoptózy		<i>SNAI3</i>	snail homológ 3 (drozofila)
	<i>FASLG</i>	Fas ligand		<i>SOX10</i>	SRY box 10
	<i>NOL3</i>	nukleolárny proteín 3		<i>ACLY</i>	ATP citrát lyáza
	<i>XIAP</i>	X-chromozómový inhibítor apoptózy		<i>ACSL4</i>	Acyl-CoA syntetáza dlhých reťazcov 4
Bunkový cyklus	<i>AURKA</i>	aurora kináza A	Metabolizmus	<i>ATP5A1</i>	mitoch. ATP syntáza α podj. 1
	<i>CCND2</i>	cyklín D2		<i>COX5A</i>	cytochróm c oxidáza, podj. 5A
	<i>CCND3</i>	cyklín D3		<i>CPT2</i>	karnitín palmitoyl transferáza 2
	<i>CDC20</i>	CDC20 homológ ( <i>S. cerevisiae</i> )		<i>G6PD</i>	glukóza-6-P dehydrogenáza
	<i>E2F4</i>	E2F transkripčný faktor 4		<i>GPD2</i>	glycerol-3-P dehydrogenáza 2
	<i>MCM2</i>	komponent komplexu údržby mini-chromozómov 2		<i>LPL</i>	lipoproteínová lipáza
	<i>MKI67</i>	marker proliferácie Ki-67		<i>PFKL</i>	pečeňová fosfofruktokináza
	<i>SKP2</i>	proteín 2 asociovaný s S-fázovou kinázou		<i>UQCRF51</i>	Rieskeho Fe-S proteín
	<i>STMN1</i>	stathimín 1		<i>DKC1</i>	dyskerín
	<i>WEE1</i>	wee1 homológ ( <i>S. pombe</i> )		Teloméry a telomerázy	<i>PINX1</i>
<i>BMI1</i>	BMI1 proto-onkogén	<i>TEP1</i>	s telomerázou asoc. proteín 1		
<i>ETS2</i>	ETS proto-onkogén 2, transkripčný faktor	<i>TERF1</i>	na telomérne opakovania viažuci sa faktor 1		
<i>IGFBP3</i>	inzulínu podobný rastový faktor-viažuci proteín 3	<i>TERF2IP</i>	teloméry proteín 1 interagujúci s TERF2		
<i>IGFBP5</i>	IGFB proteín 5	<i>TINF2</i>	TERF1-interagujúci jadrový faktor 2		
<i>IGFBP7</i>	IGFB proteín 7	<i>TNKS</i>	tankyráza		
<i>MAP2K1</i>	MAP kináza kináza 1	<i>TNKS2</i>	tankyráza 2		
<i>MAP2K3</i>	MAP kináza kináza 3	Hypoxia	<i>ADM</i>		adrenomedulín
<i>MAPK14</i>	MAP kináza 14		<i>ARNT</i>		jadrový translokátorový proteín
<i>SERPINB2</i>	inhibítor typu 2 plazmogénového aktivátora		<i>CA9</i>		karbonická anhydráza 9
<i>SOD1</i>	superoxid dizmutáza 1		<i>EPO</i>	erytropoetín	
<i>TBX2</i>	T-box 2		<i>HMOX1</i>	hemoxygenáza 1	
			<i>LDHA</i>	laktát dehydrogenáza A	
		<i>SLC2A1</i>	glukózový transportér 1		

ATP – adenosíntrifosfát, Bcl-2 – B-cell lymphoma 2, CoA – koenzým A, FADD – Fas associated death domain, MAP – mitogen protein activated, VEGF – vaskulárny endoteliálny rastový faktor

Tab. 3. Násobky zmien regulácie génov.

Deregulované gény jednotlivých typov nádorov korelované oproti kontrolnej skupine (n = 3) sú identifikované hrubým písmom. Podregulované zmeny sú vyjadrené znamienkom „mínus“ pred číselnou hodnotou. Pri štatisticky významných rozdieloch je znázornená príslušná p-hodnota: \* < 0,05; \*\* < 0,01 a \*\*\* < 0,001.

Dráha	Gén	Násobná podregulácia/nadregulácia			Dráha	Gén	Násobná podregulácia/nadregulácia		
		MNG	AST	GBM			MNG	AST	GBM
Angiogenéza	ANGPT2	<b>4,73</b>	<b>3,35</b>	1,76	Epiteliálno-mezenchymálna tranzícia	CDH2	<b>-2,13</b>	-1,86	<b>-23,68***</b>
	CCL2	<b>3,07</b>	1,99	-1,14		DSP	<b>-2,21</b>	1,00	<b>35,13</b>
	FGF2	1,11	<b>3,19</b>	-1,48		FOXC2	-1,23	1,09	<b>54,77*</b>
	FLT1	<b>-4,20*</b>	1,46	<b>-3,55</b>		GSC	<b>128,47*</b>	<b>305,28*</b>	<b>24,05</b>
	KDR	-1,27	2,5	1,46		KRT14	1,42	<b>8,29</b>	<b>4,00</b>
	PGF	<b>3,81</b>	<b>21,02</b>	<b>14,10*</b>		OCLN	<b>-2,26</b>	<b>2,04</b>	-1,45
	SERPINF1	-1,01	-1,7	<b>5,18</b>		SNAI1	<b>1,08</b>	<b>2,51</b>	-1,16
	TEK	<b>-4,21</b>	-1,74	1,05		SNAI2	<b>5,29</b>	1,76	<b>12,67*</b>
	VEGFC	<b>-15,54</b>	<b>-3,76</b>	-1,46		SNAI3	<b>-3,14</b>	1,51	<b>-3,85</b>
Apoptóza	APAF1	-1,71	<b>5,87</b>	1,41		SOX10	<b>-28,7</b>	<b>-5,04</b>	<b>-247,79***</b>
	BCL2L11	<b>2,16</b>	<b>4,11</b>	1,74	ADM	<b>2,79</b>	<b>-3,47</b>	-1,51	
	BIRC3	2,01	1,79	1,16	CA9	<b>24,34</b>	<b>5,14</b>	<b>2,03</b>	
	CASP2	2,44	<b>2,89</b>	1,89	EPO	<b>2,56</b>	<b>2,94</b>	-1,39	
	CASP9	1,22	<b>2,85*</b>	1,02	HMOX1	<b>8,49</b>	<b>5,11*</b>	<b>2,11</b>	
	CFLAR	1,58	<b>4,46*</b>	2,21	SLC2A1	<b>-2,58</b>	<b>-4,02</b>	<b>-12,83***</b>	
	FASLG	<b>132,54</b>	<b>608,45</b>	<b>125,23</b>	ACSL4	<b>-2,78**</b>	-1,43	<b>-2,48***</b>	
	XIAP	-1,44	<b>2,60*</b>	-1,47	COX5A	-1,78	-1,37	<b>-2,75***</b>	
	BMI1	<b>-3,71***</b>	<b>3,28*</b>	<b>-2,47*</b>	CPT2	-1,26	<b>3,46</b>	-1,62	
Bunkové starnutie	ETS2	<b>-4,67***</b>	<b>-2,06</b>	<b>-2,57</b>	Metabolizmus	GPD2	-1,94	1,12	<b>-2,43</b>
	IGFBP3	<b>4,78</b>	1,06	<b>-2,32</b>		LPL	<b>4,1</b>	<b>6,72</b>	-1,5
	IGFBP5	<b>5,06</b>	-1,27	<b>11,35</b>		PFKL	-1,85	-1,18	-2,14
	IGFBP7	<b>4,56</b>	<b>2,81</b>	<b>2,28</b>		UQCRCF1	<b>-2,57*</b>	<b>-2,26</b>	<b>-2,99*</b>
	MAP2K1	<b>-6,32***</b>	<b>-3,58**</b>	<b>-5,68***</b>		DDB2	1,89	1,73	<b>2,97*</b>
	MAP2K3	<b>4,17</b>	<b>2,01</b>	<b>3,15</b>	DDIT3	<b>2,67</b>	1,23	-1,09	
	SERPIN2	1,34	<b>2,7</b>	-1,32	ERCC3	<b>-2,21</b>	-1,19	<b>-2,95**</b>	
	SOD1	<b>-2,33</b>	-1,65	<b>-2,00*</b>	ERCC5	1,16	<b>4,05</b>	1,63	
	TBX2	<b>8,59</b>	<b>5,76</b>	<b>4,21</b>	GADD45G	1,33	<b>7,78*</b>	-1,72	
Bunkový cyklus	AURKA	1,36	<b>2,51</b>	-1,16	Poškodenie a oprava DNA	LIG4	-3,16	<b>2,08</b>	-2,71*
	CCND2	1,96	<b>4,34</b>	-1,42		DKC1	-1,03	<b>2,78</b>	1,92
	CCND3	-1,42	-1,01	<b>-2,38</b>		PINX1	1,14	<b>3,87</b>	-1,28
	CDC20	<b>7,14</b>	<b>6,85*</b>	<b>2,3</b>		TEP1	<b>2,66</b>	<b>4,34*</b>	<b>4,70***</b>
	MCM2	1,6	<b>2,34</b>	-1,33		TERF2IP	<b>-3,75***</b>	<b>-3,91</b>	<b>-4,79***</b>
	MKI67	<b>228,63</b>	<b>183,63</b>	<b>32,55</b>		TNKS	-1,63	1,12	<b>-3,71***</b>
	STMN1	<b>-10,70***</b>	1,22	<b>-8,67***</b>		TNKS2	<b>-4,32**</b>	-1,14	<b>-2,24***</b>
	WEE1	<b>14,07</b>	<b>51,29</b>	<b>12,60*</b>					

AST – astrocytóm, GBM – glioblastóm, MNG – meningióm

avšak signifikantná negatívna regulácia sa potvrdila iba u GBM. U AST skupiny bol ale gén *LIG4* mierne nadregulovaný (2,08;  $p > 0,05$ ). Gén *DDB2* (2,97) u glioblastómov, *DDIT3* (2,67) u meningiómov a gény *ERCC5* (4,05) a *GADD45G* (7,78) u astrocytómov sme identifikovali ako nadregulované a to s rôznou hodnotou štatistickej významnosti (tab. 3).

### Epiteliálno-mezenchymálna tranzícia

Epiteliálno-mezenchymálna tranzícia alebo prechod (EMT) je vysoko dynamický proces, ktorým epitelové bunky získavajú mezenchymálny fenotyp. Hoci bunky glioblastómu nie sú epitelové, môžu podstúpiť proces podobný EMT. Táto udalosť je taktiež spojená s metastatickou expanziou nádorových buniek s charakteristikami kmeňových buniek, čo v konečnom dôsledku ovplyvňuje odpoveď na terapiu a spôsobuje rezistenciu. Najvýraznejšie zmeny v expresii sme zaznamenali v génoch *GSC* a *SOX10* (tab. 3). U meningiómov a astrocytómov sme zaznamenali vysoké hodnoty nadregulácie *GSC* so štatistickou významnosťou (128,47\* a 305,28\*). Expresia génu *SOX10* bola výrazne podregulovaná (−247,79;  $p < 0,001$ ) u glioblastómovej skupiny. Štatisticky významné deregulácie sme ďalej zaznamenali u génov *CDH2*, *FOXC2* a *SNAI2* všetky prítomné v skupine glioblastómov.

### Hypoxia

Hypoxia je bežným znakom solídnych nádorov spojená so zvýšenou chemoradiorezistenciou a zlou prognózou pacienta. Bunky na hypoxiu odpovedajú prostredníctvom hypoxiou indukovateľných faktorov (HIF). HIF kontrolujú expresiu mnohých génov, zabezpečujúc tak ich prežitie aj pri nízkych koncentráciách kyslíka. V súčasnosti bolo identifikovaných niekoľko alternatívnych dráh, ktoré prispievajú k celkovej reakcii a adaptácii na hypoxické prostredie. Zo siedmich vyšetovaných génov sme identifikovali 2 štatisticky významné – *HMOX1* (5,11;  $p < 0,05$ ) u astrocytómov a *SLC2A1* (−12,83;  $p < 0,001$ ) u glioblastómov (tab. 3).

### Metabolizmus

V tejto skupine sa nachádzajú reprezentatívne gény spojené s mitochondriál-

nou funkciou a metabolizmom glukózy a mastných kyselín. Vo väčšine sledovaných génov sme detegovali zníženie expresie (tab. 3) z toho medzi štatisticky významné gény patria *ACSL4* (MNG a GBM), *COX5A* a *UQCRCF1* (GBM). U žiadneho zo sledovaných génov bunkového metabolizmu, ktorého expresia bola zvýšená, nebola identifikovaná  $p$ -hodnota  $< 0,05$ .

### Teloméry a telomerázy

Čo sa týka skupiny génov kódujúcich telomerázu a génov regulujúcich predĺžovanie telomér, nadregulácia *TEP1* génu bola zaznamenaná vo všetkých vyšetovaných skupinách, u GBM a AST so štatistickou významnosťou (4,70;  $p < 0,001$  a 4,34;  $p < 0,05$ ). Naproti tomu expresia génov *TERF2IP* a *TNKS2*, pre MNG a GBM, ako aj glioblastómová *TNKS*, boli oproti kontrolnej skupine signifikantne znížené (tab. 3).

### Diskusia

Glioblastóm je najrozšírenejšou formou primárneho mozgového nádoru a jeden z najsmrteľnejších ľudských nádorov [4], ktorý predstavuje maximálne štádium progresie astrocytómu klasifikovaného podľa histopatologických a molekulárnych charakteristík do štyroch stupňov malignity (I–IV) [1]. Zároveň, tento najčastejšie sa vyskytujúci gliálny nádor je asociovaný so zlou prognózou [5]. Napriek agresívnej multimodálnej terapii pozostávajúcej z chirurgickej resekcie, ožarovania a chemoterapie alkylačným činidlom temozolomid, je priemerná doba prežívania pacientov s GBM približne 12–15 mesiacov od diagnostikovania ochorenia [5,6]. Navzdory desaťročiam výskumu je neustále potrebné detailné pochopenie molekulárnych mechanizmov zapojených do tumorigenézy, invazívneho správania rakovinových buniek a progresie nádoru s možnosťou odhalenia potenciálnych markerov a prispenia k efektívnejšej terapii.

Cieľom našich experimentov bola všeobecná charakterizácia mozgových nádorov na transkriptomickú úroveň. Testovanú skupinu tvorili biopsie od pacientov s histologicky potvrdeným meningiómom, glioblastómom a as-

trocytómom. Kontrolnú skupinu reprezentovali komerčne dostupné RNA izolované zo zdravých ľudských mozgov. Takto jednoznačne definovaná kontrolná skupina predstavovala výnimočnosť našej korelačnej analýzy oproti viacerým štúdiám, kde brali do úvahy RNA získanú od epileptických pacientov alebo astrocytovej línie [7,8]. Výber správnej biologickej kontroly je jedným z rozhodujúcich faktorov pri definovaní výsledkov transkriptomických analýz a selekcie deregulovaných génov, na čo sme poukázali aj nedávnou štúdiou na nádorových líniiach mozgu [9]. Metódou kvantitatívnej RT-PCR sme pomocou array-e v 96-jamkovom formáte Cancer PathwayFinder™ sledovali relatívnu expresiu génov rozdelených do 9 signálnych dráh, ktorých deregulácia môže mať vplyv na tumorigenézu. Zo všetkých sledovaných génov sme zaznamenali dereguláciu v 44 génoch u meningiómov, v 42 génoch u glioblastómov a v 45 génoch u astrocytómov. Z nich deregulácia 23 % (MNG), 47 % (GBM) a 22 % (AST) génov bola aj štatisticky významná. Nadreguláciu sme identifikovali v 24 génoch u meningiómov, 20 (GBM) a 37 u AST, naopak zníženú expresiu sme zachytili u 20 (MNG), 22 (GBM) a 8 (AST) sledovaných prípadov.

Angiogenéza, ako jeden z charakteristických znakov rakoviny [2,10], hrá kľúčovú úlohu pri raste nádoru prostredníctvom aktivácie onkogénov a/alebo podregulácie tumor supresorových génov, čo v konečnom dôsledku vedie k nadregulácii angiogénnych dráh [11]. Spomedzi rôznych solídnych nádorov je glioblastóm jedným z vysoko angiogénnych a vyznačuje sa nadmernou vaskulárnou proliferáciou [12], čo však neplatí u gliómoch a meningiómoch nízkeho stupňa [13]. Na rozdiel od publikovaných výsledkov, kde identifikovali prevažne zvýšenú produkciu proteínov rodiny VEGF [14–16], sme potvrdili zníženie expresie génu *VEGFC* a to vo všetkých sledovaných skupinách nádorov. Vysoké hladiny mRNA pre VEGF boli pozorované práve v centrálnych oblastiach glioblastómov [17,18]. Na základe tohto zistenia by sme mohli predpokladať, že nami analyzované biopsické tkanivo pochádzalo z okrajovej časti nádoru a nie

z jeho nekrotického jadra, resp. že do angiogenézy sú zapojené aj ďalšie proteíny z rodiny VEGF, ktorých expresiu sme nestanovovali. Na druhej strane expresia *PGF* bola konštantne zvýšená u všetkých sledovaných skupín, u GBM aj so štatistickou významnosťou. Výsledky sa zhodujú aj s prácou iných vedeckých skupín, ktoré identifikovali zvýšenú expresiu *PGF* u gliómov [19] a meningiómov [20], bez ohľadu na grading.

Rakovinové bunky v okolí nekrotického jadra trpia nedostatkom živín a kyslíka. Transkripčný faktor HIF-1 reguluje správanie nádoru za hypoxických podmienok ovplyvňujúc génovú expresiu rastových faktorov [21]. Jedným z mnohých génov, ktorých expresia je počas hypoxie indukovaná HIF-1 je *HMOX1*. Nakoľko činnosť *HMOX1* indukuje angiogenézu, je tento enzým vhodným markerom neovaskularizácie gliómov [22,23]. Naše zistenia sú v súlade so súčasnou literatúrou [24,25], no štatistická významnosť bola preukázaná iba v prípade zvýšenej expresie *HMOX1* u AST. Za hypoxických a v niektorých prípadoch aj normoxických podmienok rakovinové bunky preferujú ako zdroj energie molekuly ATP získané glykolýzou. Energetická bilancia glykolýzy je v porovnaní s oxidatívnou fosforyláciou veľmi nízka, rakovinové bunky preto potrebujú zvýšiť príjem glukózy a to nadprodukciou glukózových prenášačov, najmä GLUT1 a GLUT3, ktoré sú indukované hypoxiou [26,27]. Napriek preukázateľnej expresii génu *SLC2A1* (kódujúci GLUT1) v mozgových nádoroch [28,29], sa nám nepodarilo identifikovať zvýšenú hladinu génu v našich vzorkách, dokonca sme so štatistickou významnosťou identifikovali pokles expresie génu u GBM; čo môže naznačovať aeróbnu tvorbu energie, pretože je známe, že nádorové bunky sú schopné voľne „prepínať“ medzi aeróbnym a anaeróbnym metabolizmom [28], či anaplerotické dopĺňanie metabolitov Krebsovej cyklu napr. z glutamínu [30]. Zaujímavou je štúdia Silvu a kolektívu, ktorí vo vzorkách meningiómov identifikovali znížené množstvo GLUT1 u žien v porovnaní s mužmi [31]. To môže podporovať naše výsledky, nakoľko väčšina bioptických vzoriek nášho súboru meningiómov pochádzala od pacientiek.

Väčšina úmrtí u pacientov súvisiacich s onkologickým postihnutím je spájaná s metastatickým charakterom nádoru [32]. U mozgových nádorov a GBM sú extrakraniálne metastázy zriedkavé [33]. Častejším javom je migrácia gliómových buniek do oblastí mozgu vzdialených od primárneho tumoru [3,34]. Epiteliálno-mezenchymálna tranzícia je proces, v ktorom epiteliálne bunky stratia epiteliálne charakteristiky získajúc mezenchymálny fenotyp vedúci ku zvýšenej mobilite a rezistencii [35]. Kadheríny tvoria skupinu transmembránových proteínov podieľajúcich sa na stavbe medzibunkových spojov [36]. Expresia génu *CDH2* kódujúceho N-kadherín, proteín zabezpečujúci bunkovú adhéziu, bola u MNG, AST aj GBM znížená (u GBM štatisticky významne). Strata expresie *CDH2* ale vedie ku polarizácii a abnormálnej pohyblivosti, čo významne zvyšuje migráciu a invazívny charakter nádorových buniek [37,38]. Na druhej strane, u arachnoidálnych buniek a meningiómov je prevažne exprimovaný *CDH1* kódujúci E-kadherín [36], čo vysvetľuje nami zaznamenanú zníženú expresiu *CDH2* v patientskych biopsiách MNG. medzi transkripčné faktory zapojené do EMT-podobného procesu patria proteíny *SNAI* rodiny, najmä *SNAI1* a *SNAI2* [39,40], na rozdiel od *SNAI3*, ktorého schopnosť indukcie EMT je veľmi slabá [41]. Z vyšetovaných *SNAI* génov sa nám podarilo identifikovať nadreguláciu génu *SNAI1* a *SNAI2* a podreguláciu *SNAI3*. Štatisticky významná zmena bola pozorovaná iba pri nadexpresii *SNAI2* u GBM. Ďalším proteínom pozitívne ovplyvňujúcim EMT a invazívny charakter nádorových buniek je protoonkogénom kódovaný transkripčný faktor *FOXC2*. Zaujímavé zistenia publikovali Wang et al., ktorí RT-PCR metódou analyzovali expresiu *FOXC2* u astrocytómov (I–III) a glioblastómov (IV). Ich výsledky naznačujú pozitívnu závislosť medzi stupňom malignity a vysokou expresiou *FOXC2* [42]. Tieto zistenia korelujú s výsledkami našich analýz – u GBM sme identifikovali až 54-násobne zvýšenú ( $p < 0,05$ ) expresiu *FOXC2* oproti kontrolnej vzorke; u AST bola expresia výrazne nižšia (1,09-násobne vyššia na oproti kontrole).

Apoptóza je proces programovanej bunkovej smrti charakterizovanej nezápalovou bunkovou fragmentáciou. Proces apoptózy môže byť iniciovaný vnútornou alebo vonkajšou dráhou, čo vedie k proteolytickej aktivácii kaspáz a riadenej bunkovej smrti. Nádorové bunky si však vyvinuli mechanizmus na udržanie proliferatívnej signalizácie a vyhýbanie sa bunkovej smrti [43]. Signifikantnú zmenu expresie prokaspázových génov sme zaznamenali iba v prípade *CASP9* (2,85;  $p < 0,05$ ) a výlučne u astrocytómov. Tirapelli et al. sledovali zmeny v expresii apoptotických génov v bioptickom tkanive meningiómov. U *CASP9* nezachytili v zmenách žiadnu signifikanciu, naopak z antiapoptotických génov pozorovali nadexpresiu v *XIAP* [44]. *XIAP*, člen rodiny apoptotických inhibítorov, inhibuje apoptózu väzbou na kaspázu 9 a efektorové kaspázy 3 a 7 [45]. Murphy et al. identifikovali zníženú expresiu *XIAP* génu u pacientov s GBM a rôzne hladiny expresie v glioblastómových bunkových líniiach [46]. Podreguláciu v géne *XIAP* sme identifikovali v GBM a MNG skupine, no u pacientov s astrocytómom bola expresia *XIAP* zvýšená viac ako dvojnásobne (2,60;  $p < 0,05$ ). Rôznorodosť výsledkov môže vysvetľovať výber kontrolnej skupiny, ale aj fakt, že niektorí pacienti podstúpili pred operáciou liečbu, čo sa mohlo odraziť na odpovedi nádoru apoptózou. *CFLAR* je ďalším z mnohých antiapoptotických génov. Kóduje štruktúrny homolog iniciatívnej kaspázy 8, čím zabráňuje šíreniu apoptotického signálu [47]. Nadreguláciu v tomto géne sme pozorovali vo všetkých skúmaných skupinách nádorov (AST 4,46;  $p < 0,05$ ), čo naznačuje ochranu nádorových buniek pred apoptózou vyvolanou vonkajšími podnetmi na receptoroch smrti.

Starnutie bunky je ireverzibilný proces zastavenia rastu [48]. *BMI1* pôsobí ako transkripčný represor génov regulujúcich bunkovú diferenciáciu a proliferáciu [49]. Jeho absencia má na tieto procesy negatívny dopad [50]. Expresia *BMI1* je zvýšená u viacerých typov nádorov vrátane mozgových [51,52]. Nám sa však podarilo zachytiť nárast expresie iba u AST (3,28;  $p < 0,05$ ). Ďalším transkripčným faktorom regulujú-

cim apoptotické, angiogénne a diferenciácie zabezpečujúce gény je *ETS2* [53]. Výsledky našej práce sa zhodujú s transkriptomickou analýzou Babalu et al., kde od pacientov s gliómom zaznamenali zníženú expresiu *ETS2* a to bez ohľadu na stupeň malignity [54]. My sme navyše u MNG vzoriek potvrdili aj štatistickú významnosť ( $p < 0,001$ ). Superoxid dizmutáza 1 kódovaná génom *SOD1* je enzým premieňajúci voľné superoxidové radikály na telu menej škodlivý peroxid vodíka a kyslík [55]. U glioblastómov bol identifikovaný pokles v expresii *SOD1*, ktorý je spájaný s lepšou odpoveďou na rádioterapiu a prognózou pre pacientov [56,57]. Rovnaké výsledky sme analýzou získali aj my – expresia *SOD1* bola u GBM oproti zdravému mozgovému tkanivu 2× znížená ( $p < 0,05$ ). Mitogénom aktivovaná proteín kináza 1 (*MAP2K1*) je súčasťou Ras/*MAPK* dráhy, zohrávajúcou kľúčovú úlohu v prenose chemických signálov v rámci bunky [58]. Jej expresia bola vo všetkých vyšetovaných vzorkách štatisticky významne znížená (MNG  $-6,32$ ,  $p < 0,001$ ; GBM  $-5,68$ ,  $p < 0,001$ ; AST  $-3,58$ ,  $p < 0,01$ ), čo koreluje aj s výsledkami na gliónoch s nižším stupňom malignity [58,59].

Hlavným cieľom bunkového cyklu je zabezpečenie presnej replikácie DNA v S fáze a konečné vytvorenie dvoch identických dcérskych buniek v mitotickej fáze. Deregulácie dráh bunkového cyklu sú charakteristické pre viaceré nádorové ochorenia. Vďaka tomu môžu rakovinové bunky uniknúť bunkovej smrti a starntiu, čo sa prejaví nadmernou proliferáciou a rastom nádoru [60]. *STMN1* je onkoproteín distribuovaný v cytoplazme buniek regulujúci kinetiku mikrotubulov [61]. Tým vplyva na riadenie bunkového cyklu, proliferácie a diferenciácie [62]. Mnohé štúdie poukazujú na zvýšenú expresiu *STMN1* u rôznych ľudských malignít [63–65], ako aj u glioblastómov [66] a meningiómov. Autori Wang et al. korelovali expresiu *STMN1* so stupňom malignity. V porovnaní s benignými meningiómami (WHO stupeň malignity I) bola expresia *STMN1* u MNG II/III signifikantne zvýšená [67]. Našími analýzami sme identifikovali signifikantnú podreguláciu *STMN1* u MNG a GBM, čo naznačuje zníženú bunkovú proliferáciu

a migráciu nádorových buniek. Ďalším kľúčovým regulátorom bunkového cyklu je Wee1 kináza. Jej hlavnou úlohou je zastavenie progresie bunkového cyklu na prechode z G2 do mitotickej fázy u buniek s poškodenou DNA [68]. Nadregulácia expresie *WEE1* spojená so zhoršeným prežívaním pacientov [69,70] bola dokázaná aj u glioblastómov [71,72]. Naše zistenia potvrdzujú predchádzajúce poznatky – niekoľkonásobný nárast expresie *WEE1* bol identifikovaný vo všetkých sledovaných nádorových skupinách.

Ľudské teloméry sú tandemové nukleotidové opakovania krátkej DNA sekvencie asociované s rôznymi teloméry-viažucimi proteínmi, ktoré majú zväčša ochrannú funkciu [73]. V bunkách vyžadujúcich nepretržitú obnovu (napr. v kmeňových bunkách) je dĺžka časom skrácovaných telomér udržiavaná telomerázou. Telomeráza je neaktívna vo väčšine maturovaných buniek, avšak je často reaktivovaná u buniek rakovinových [74]. S telomerázou asociovaný proteín 1 (*TEP1*) sa považuje za štrukturálnu podjednotku telomerázy a je spájaný s jej aktiváciou. Vo vzorkách GBM, AST aj MNG sme identifikovali výrazne zníženú expresiu génu *TEP1*. Iní autori však nezaznamenali rozdiely v jeho expresii oproti zdravému tkanivu, či bunkám normálnych ľudských astrocytov [75]. Tankyrázy (*TNKS*, *TNKS2*) sú proteíny podieľajúce sa na udržiavaní dĺžky telomér [76], čo je spolu s reguláciou Wnt/ $\beta$ -katenín dráhy dôležité pre obnovu a prežívanie rakovinových buniek [77]. Shervington et al. pozorovali zvýšenú expresiu *TNKS* u glioblastómových bunkových línií v porovnaní s normálnymi ľudskými astrocytmi, pri bioptických vzorkách však rozdiely v expresii nestanovili, nakoľko *TNKS* bol exprimovaný u GBM aj v zdravom mozgovom tkanive [75]. Táto skutočnosť môže vysvetľovať prečo sme vo všetkých nádorových skupinách identifikovali zníženie expresie *TNKS* aj *TNKS2*.

Hlavnou úlohou DNA opravných mechanizmov je odpoveď na poškodenie DNA indukované vonkajšími faktormi prostredia [78]. Mutácie v týchto génoch môžu viesť k obmedzenej až defektnej schopnosti opravy DNA a akumulácii poškodenej DNA, čo v konečnom dôsledku zvyšuje riziko vzniku rakoviny.

Na druhej strane, nádorové bunky nadmerne exprimujú gény DNA opravných mechanizmov, čo má za následok väčšiu opravnú kapacitu spojenú s rezistenciou na liečbu [79]. *DDB2* je považovaný za tumor supresorový gén [80]. Jeho proteínový produkt *DDB2* sa podieľa na mechanizme opravy DNA vytváraním medzivilákových krížových väzieb, ktorého funkčnosť je spájaná s dobrou prognózou u pacientov s glioblastómom. Naproti tomu nízka expresia *DDB2* znamená zhoršenú prognózu [81,82]. Nami získané výsledky boli v súlade s údajmi v dostupnej literatúre, avšak štatisticky signifikantné násobné zvýšenie expresie *DDB2* sme zaznamenali iba u glioblastómov (2,97;  $p < 0,05$ ).

Jedným z charakteristických znakov nádorových ochorení je reprogramovanie metabolických dráh [83]. *ACSL4* patrí do rodiny syntetáz acyl-CoA s dlhým reťazcom [84], ktorej primárnym substrátom je arachidonát [85]. Expresia *ACSL4* sa v rôznych typoch nádorov líši – zatiaľ čo u nádorových ochorení močového mechúra, prsníka alebo pľúc je expresia znížená, u kolorektálnych karcinómov, myelómov či tumorov pečene je expresia výrazne zvýšená [86]. U mozgových nádorov je gén *ACSL4* podregulovaný, čo je vo všeobecnosti spájané so zlou prognózou pre pacientov [86,87]. Výsledky získané našou analýzou sa zhodujú s poznatkami ostatných autorov, nakoľko u všetkých 3 skupín sme identifikovali pokles v expresii *ACSL4*, u AST a GBM aj so signifikanciou.

V nádorových bunkách je prítomná vysoká glykolytická aktivita aj za aeróbnych podmienok, pričom samotné glykolytické enzýmy sa môžu využívať ako terapeutické ciele pri liečbe glioblastómu [88]. Rozsiahlu štúdiu expresie vybraných metabolických génov zapojených do glukózového metabolizmu a oxidačnej fosforylácie u gliómov iba nedávno publikoval kolektív autorov Stanke, Wilson a Kidambi [89]. Glukóza-6-fosfát dehydrogenáza (*G6PD*) je enzým pentózového cyklu katalyzujúci redukciu  $NADP^+$  na  $NADPH$ . Expresia *G6PD* bola u GBM pacientov oproti kontrolnej skupine signifikantne znížená a v porovnaní s astrocytómami s nižším gradingom zas zvýšená. Naše výsledky



korelujú so štúdiou Stankeho et al., avšak pravdepodobne kvôli nízkemu počtu vzoriek v jednotlivých skupinách nie sú pozorované zmeny signifikantné.

COX5A je jednou z troch podjednotiek cytochróm c oxidázy – komplexu IV dýchacieho reťazca kódovaných mitochondriálnou DNA [90]. COX5A aj gén kódujúci ďalšiu podjednotku komplexu III UQCRB, sú u pacientov s glioblastómom v porovnaní so zdravými jedincami podregulované. Naopak, pri porovnaní s expresiou u gliómov s nižším stupňom malignity je expresia COX5A u GBM signifikantne zvýšená a UQCRB na približne rovnakej úrovni. Znížená expresia bola tiež korelovaná so zlou prognózou [89]. Aj v našom súbore sme boli schopní identifikovať poklesy v expresii týchto génov a to vo všetkých skúmaných skupinách. Zvýšenie expresie génov glykolyzy, pentózoového cyklu a dýchacieho reťazca u GBM naznačuje metabolické zmeny pri progresii z astrocytómom s nižším gradíngom. Avšak pokles v expresii génov oxidácej fosforylácie by mohol vysvetľovať prítomnosť hypoxických oblastí obklopených pseudopalisádovými bunkami hlavne u nádorov s vyšším stupňom malignity (GBM) naznačujúc, že cieleňenie na glykolytické enzýmy môže byť zaujímavou stratégiou pre liečbu agresívnych mozgových nádorov [88].

## Záver

V ostatných rokoch bolo študovaných množstvo látok, ktoré vykazovali rôznu mieru úspešnosti v predklinických, či klinických testoch, avšak žiadna neprekázala dostatočne pozitívne výsledky pre predĺženie života alebo zlepšenie jeho kvality u pacientov s mozgovými nádormi. Preto je dôležité neustále hľadať nové terapeutické ciele, ktorých inhibícia by mohla zamedziť invazívnemu charakteru a rastu mozgového nádoru a zlepšiť prežívanie pacientov. Najvýraznejšia zmena expresie bola zaznamenaná v génoch EMT, kedy sme zachytili zníženie expresiu v génoch *CDH2* a *SOX10* so štatistickou významnosťou v glioblastómovej skupine a štatisticky zvýšenú expresiu génov *FOXC2* (u GBM), *GSC* (u AST a MNG) a *SNAI2* (u GBM). Ďalšími génmi, u ktorých sme zaznamenali štatisticky významné zmeny v expresii sú gény re-

gulujúce bunkové starnutie, dynamiku telomér a opravné mechanizmy DNA poškodenia. Našou kvantitatívnou analýzou sme poukázali na odlišne exprimované gény kódujúce proteíny, ktorých inhibícia by mohla mať vplyv na prežívanie mozgových rakovinových buniek a prispieť k personalizovanej terapii.

## Podporujúca agentúra a sponzori

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-18-0088.

## Literatúra

- Louis DN, Perry A, Wesseling P et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro Oncol* 2021; 23(8): 1231–1251. doi: 10.1093/neuonc/noab106.
- Norøxe DS, Poulsen HS, Lassen U. Hallmarks of glioblastoma: a systematic review. *ESMO Open* 2017; 1(6): e000144. doi: 10.1136/esmoopen-2016-000144.
- Altieri R, Zenga F, Fontanella MM et al. Glioma surgery: technological advances to achieve a maximal safe resection. *Surg Technol Int* 2015; 27: 297–302.
- Agnihotri S, Burrell KE, Wolf A et al. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2013; 61(1): 25–41. doi: 10.1007/s00005-012-0203-0.
- Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 2008; 359(5): 492–507. doi: 10.1056/NEJMra0708126.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352(10): 987–996. doi: 10.1056/NEJMoa043330.
- Blahovcova E, Richterova R, Kolarovszki B et al. Apoptosis-related gene expression in tumor tissue samples obtained from patients diagnosed with glioblastoma multiforme. *Int J Mol Med* 2015; 36(6): 1677–1684. doi: 10.3892/ijmm.2015.2369.
- Narsia N, Ramagiri P, Ehrmann J et al. Transcriptome analysis reveals distinct gene expression profiles in astrocytoma grades II–IV. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2017; 161(3): 261–271. doi: 10.5507/bp.2017.020.
- Majercikova Z, Dibdiakova K, Gala M et al. Different approaches for the profiling of cancer pathway-related genes in glioblastoma cells. *Int J Mol Sci* 2022; 23(18): 10883. doi: 10.3390/ijms231810883.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1): 57–70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
- Takano S, Yamashita T, Ohneda O. Molecular therapeutic targets for glioma angiogenesis. *J Oncol* 2010; 2010: 351908. doi: 10.1155/2010/351908.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007; 114(2): 97–109. doi: 10.1007/s00401-007-0243-4.
- Siedlecki Z, Nowak K, Grzyb S et al. Angiogenesis in brain tumors: gliomas and meningiomas – a review. *Eur J Mol Clin Med* 2021; 8(2): 2354–2359.
- Winter RC, Antunes ACM, de Oliveira FH. The relationship between vascular endothelial growth factor and histological grade in intracranial meningioma. *Surg Neurol Int* 2020; 11: 328. doi: 10.25259/SNI\_528\_2020.
- Reszec J, Hermanowicz A, Rutkowski R et al. Expression of MMP-9 and VEGF in meningiomas and their correlation with peritumoral brain edema. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 646853. doi: 10.1155/2015/646853.
- Loureiro LVM, Neder L, Callegaro-Filho D et al. The immunohistochemical landscape of the VEGF family and its

- receptors in glioblastomas. *Surg Exp Pathol* 2020; 3(9). doi: 10.1186/s42047-020-00060-5.
- Plate KH, Breier G, Weich HA et al. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 1992; 359(6398): 845–848. doi: 10.1038/359845a0.
- Phillips H, Armani M, Stavrou D et al. Intense focal expression of vascular endothelial growth-factor messenger-RNA in human intracranial neoplasms – association with regions of necrosis. *Int J Oncol* 1993; 2(6): 913–919. doi: 10.3892/ijo.2.6.913.
- Schneider K, Weyerbrock A, Doostkam S et al. Lack of evidence for PlGF mediating the tumor resistance after anti-angiogenic therapy in malignant gliomas. *J Neurooncol* 2015; 121(2): 269–278. doi: 10.1007/s11060-014-1647-3.
- Hess K, Spille DC, Adeli A et al. Occurrence of fibrotic tumor vessels in grade I meningiomas is strongly associated with vessel density, expression of VEGF, PlGF, IGFBP-3 and tumor recurrence. *Cancers (Basel)* 2020; 12(10): 3075. doi: 10.3390/cancers12103075.
- Liao D, Johnson RS. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26(2): 281–290. doi: 10.1007/s10555-007-9066-y.
- Nishie A, Ono M, Shono T et al. Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clin Cancer Res* 1999; 5(5): 1107–1113.
- El Andaloussi A, Lesniak MS. CD4+ CD25+ FoxP3+ T-cell infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with tumor grade in human gliomas. *J Neurooncol* 2007; 83(2): 145–152. doi: 10.1007/s11060-006-9314-y.
- Sferrazzo G, Di Rosa M, Barone E et al. Heme oxygenase-1 in central nervous system malignancies. *J Clin Med* 2020; 9(5): 1562. doi: 10.3390/jcm9051562.
- Ye W, Liu Z, Liu F et al. Heme oxygenase-1 predicts risk stratification and immunotherapy efficacy in lower grade gliomas. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 760800. doi: 10.3389/fcell.2021.760800.
- Airley RE, Mobasher A. Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics. *Chemotherapy* 2007; 53(4): 233–256. doi: 10.1159/000104457.
- Pliszka M, Szablewski L. Glucose transporters as a target for anticancer therapy. *Cancers (Basel)* 2021; 13(16): 4184. doi: 10.3390/cancers13164184.
- van de Nes JA, Griewank KG, Schmid KW et al. Immunocytochemical analysis of glucose transporter protein-1 (GLUT-1) in typical, brain invasive, atypical and anaplastic meningioma. *Neuropathology* 2015; 35(1): 24–36. doi: 10.1111/neup.12148.
- Komaki S, Sugita Y, Furuta T et al. Expression of GLUT1 in pseudopalisaded and perivascular tumor cells is an independent prognostic factor for patients with glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2019; 78(5): 389–397. doi: 10.1093/jnen/nly124.
- Marie SK, Shinjo SM. Metabolism and brain cancer. *Clinics (Sao Paulo)* 2011; 66 (Suppl 1): 33–43. doi: 10.1590/s1807-59322011001300005.
- Silva JM, Wippel HH, Santos MDM et al. Proteomics pinpoints alterations in grade I meningiomas of male versus female patients. *Sci Rep* 2020; 10(1): 10335. doi: 10.1038/s41598-020-67113-3.
- Xu W, Yang Z, Lu N. A new role for the PI3K/Akt signaling pathway in the epithelial-mesenchymal transition. *Cell Adh Migr* 2015; 9(4): 317–324. doi: 10.1080/19336918.2015.1016686.
- Johansen MD, Rochat P, Law I et al. Presentation of two cases with early extracranial metastases from glioblastoma and review of the literature. *Case Rep Oncol Med* 2016; 2016: 8190950. doi: 10.1155/2016/8190950.
- Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 2011; 331(6024): 1559–1564. doi: 10.1126/science.1203543.

35. Armento A, Ehlers J, Schötterl S et al. (2017) Molecular mechanisms of glioma cell motility. In: De Vleeschouwer S (ed). *Glioblastoma*. Brisbane: Codon Publications 2017: 73–93.
36. Noronha C, Ribeiro AS, Taipa R et al. Cadherin expression and EMT: a focus on gliomas. *Biomedicines* 2021; 9(10): 1328. doi: 10.3390/biomedicines9101328.
37. Asano K, Duntsch CD, Zhou Q et al. Correlation of N-cadherin expression in high grade gliomas with tissue invasion. *J Neurooncol* 2004; 70(1): 3–15. doi: 10.1023/b:neon.0000040811.14908.f2.
38. Camand E, Peglion F, Osmani N et al. N-cadherin expression level modulates integrin-mediated polarity and strongly impacts on the speed and directionality of glial cell migration. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 4): 844–857. doi: 10.1242/jcs.087668.
39. Wang HW, Menon LG, Black PM et al. SNAI2/Slug promotes growth and invasion in human gliomas. *BMC Cancer* 2010; 10: 301. doi: 10.1186/1471-2407-10-301.
40. Liu B, Dong H, Lin X et al. RND3 promotes Snail 1 protein degradation and inhibits glioblastoma cell migration and invasion. *Oncotarget* 2016; 7(50): 82411–82423. doi: 10.18632/oncotarget.12396.
41. Gras B, Jacquoud L, Wierinckx A et al. Snail family members unequally trigger EMT and thereby differ in their ability to promote the neoplastic transformation of mammary epithelial cells. *PLoS One* 2014; 9(3): e92254. doi: 10.1371/journal.pone.0092254.
42. Wang YW, Yin CL, Zhang HY et al. High expression of forkhead box protein C2 is related to poor prognosis in human gliomas. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(24): 10621–10625. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.24.10621.
43. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30(1): 87. doi: 10.1186/1756-9966-30-87.
44. Tirapelli DP, Menezes SB, Franco IM et al. High expression of anti-apoptotic genes in grade I and II meningiomas. *Arq Neuropsiquiatr* 2017; 75(4): 209–215. doi: 10.1590/0004-282X20170027.
45. Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR et al. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 1998; 17(8): 2215–2223. doi: 10.1093/emboj/17.8.2215.
46. Murphy AC, Weyhenmeyer B, Schmid J et al. Activation of executioner caspases is a predictor of progression-free survival in glioblastoma patients: a systems medicine approach. *Cell Death Dis* 2013; 4(5): e629. doi: 10.1038/cddis.2013.157.
47. Irmiler M, Thome M, Hahne M et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997; 388(6638): 190–195. doi: 10.1038/40657.
48. Sharpless NE, Sherr CJ. Forging a signature of in vivo senescence. *Nat Rev Cancer* 2015; 15(7): 397–408. doi: 10.1038/nrc3960.
49. Schuringa JJ, Vellenga E. Role of the polycomb group gene BMI1 in normal and leukemic hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr Opin Hematol* 2010; 17(4): 294–299. doi: 10.1097/MOH.0b013e328338c439.
50. Molofsky AV, Pardoll R, Iwashita T et al. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 2003; 425(6961): 962–967. doi: 10.1038/nature02060.
51. Abdouh M, Facchino S, Chatoo W et al. BMI1 sustains human glioblastoma multiforme stem cell renewal. *J Neurosci* 2009; 29(28): 8884–8896. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0968-09.2009.
52. Vora P, Seyfrid M, Venugopal C et al. Bmi1 regulates human glioblastoma stem cells through activation of differential gene networks in CD133+ brain tumor initiating cells. *J Neurooncol* 2019; 143(3): 417–428. doi: 10.1007/s11060-019-03192-1.
53. Fry EA, Inoue K. Aberrant expression of ETS1 and ETS2 proteins in cancer. *Cancer Rep Rev* 2018; 2(3): 10.15761/CRR.1000151. doi: 10.15761/CRR.1000151.
54. Babal YK, Kandemir B, Kurnaz IA. Gene regulatory network of ETS domain transcription factors in different stages of glioma. *J Pers Med* 2021; 11(2): 138. doi: 10.3390/jpm11020138.
55. Noor R, Mittal S, Iqbal J. Superoxide dismutase – applications and relevance to human diseases. *Med Sci Monit* 2002; 8(9): RA210–RA215.
56. Gao Z, Sarsour EH, Kalen AL et al. Late ROS accumulation and radiosensitivity in SOD1-overexpressing human glioma cells. *Free Radic Biol Med* 2008; 45(11): 1501–1509. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.08.009.
57. Lu WC, Xie H, Yuan C et al. Identification of potential biomarkers and candidate small molecule drugs in glioblastoma. *Cancer Cell Int* 2020; 20: 419. doi: 10.1186/s12935-020-01515-1.
58. Zhou Z, Peng B, Li J et al. Integrative pan-cancer analysis of MEK1 aberrations and the potential clinical implications. *Sci Rep* 2021; 11(1): 18366. doi: 10.1038/s41598-021-97840-0.
59. Cheaney B 2nd, Bowden S, Krause K et al. An unusual recurrent high-grade glioneuronal tumor with MAP2K1 mutation and CDKN2A/B homozygous deletion. *Acta Neuropathol Commun* 2019; 7(1): 110. doi: 10.1186/s40478-019-0763-x.
60. Gousias K, Theocharous T, Simon M. Mechanisms of cell cycle arrest and apoptosis in glioblastoma. *Biomedicines* 2022; 10(3): 564. doi: 10.3390/biomedicines10030564.
61. Ozon S, Maucuer A, Sobel A. The stathmin family – molecular and biological characterization of novel mammalian proteins expressed in the nervous system. *Eur J Biochem* 1997; 248(3): 794–806. doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.t01-2-00794.x.
62. Devred F, Tsvetkov PO, Barbier P et al. Stathmin/Op18 is a novel mediator of vinblastine activity. *FEBS Lett* 2008; 582(17): 2484–2488. doi: 10.1016/j.febslet.2008.06.035.
63. Howitt BE, Nucci MR, Drapkin R et al. Stathmin-1 expression as a complement to p16 helps identify high-grade cervical intraepithelial neoplasia with increased specificity. *Am J Surg Pathol* 2013; 37(1): 89–97. doi: 10.1097/PAS.0b013e3182753f5a.
64. Hemdan T, Lindén M, Lind SB et al. The prognostic value and therapeutic target role of stathmin-1 in urinary bladder cancer. *Br J Cancer* 2014; 111(6): 1180–1187. doi: 10.1038/bjc.2014.427.
65. Sun R, Liu Z, Wang L et al. Overexpression of stathmin is resistant to paclitaxel treatment in patients with non-small cell lung cancer. *Tumour Biol* 2015; 36(9): 7195–7204. doi: 10.1007/s13277-015-3361-y.
66. Dong B, Mu L, Qin X et al. Stathmin expression in glioma-derived microvascular endothelial cells: a novel therapeutic target. *Oncol Rep* 2012; 27(3): 714–718. doi: 10.3892/or.2011.1525.
67. Wang H, Li W, Wang G et al. Overexpression of STMN1 is associated with the prognosis of meningioma patients. *Neurosci Lett* 2017; 654: 1–5. doi: 10.1016/j.neulet.2017.06.020.
68. Ghelli Luserna di Rorà A, Cerchione C, Martinelli G et al. A WEE1 family business: regulation of mitosis, cancer progression, and therapeutic target. *J Hematol Oncol* 2020; 13(1): 126. doi: 10.1186/s13045-020-00959-2.
69. Magnussen GI, Holm R, Emilsen E et al. High expression of Wee1 is associated with poor disease-free survival in malignant melanoma: potential for targeted therapy. *PLoS One* 2012; 7(6): e38254. doi: 10.1371/journal.pone.0038254.
70. Slipicevic A, Holth A, Hellesylt E et al. Wee1 is a novel independent prognostic marker of poor survival in post-chemotherapy ovarian carcinoma effusions. *Gynecol Oncol* 2014; 135(1): 118–124. doi: 10.1016/j.ygyno.2014.07.102.
71. Lescarbeau RS, Lei L, Bakken KK et al. Quantitative phosphoproteomics reveals Wee1 kinase as a therapeutic target in a model of proneural glioblastoma. *Mol Cancer Ther* 2016; 15(6): 1332–1343. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0692.
72. Tashnizi AH, Jaberipour M, Razmkhah M et al. Tumour suppressive effects of WEE1 gene silencing in neuroblastomas. *J Cancer Res Ther* 2016; 12(1): 221–227. doi: 10.4103/0973-1482.165861.
73. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 1999; 97(4): 503–514. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80760-6.
74. Wang C, Meier UT. Architecture and assembly of mammalian H/ACA small nucleolar and telomerase ribonucleoproteins. *EMBO J* 2004; 23(8): 1857–1867. doi: 10.1038/sj.emboj.7600181.
75. Shervington A, Patel R, Lu C et al. Telomerase subunits expression variation between biopsy samples and cell lines derived from malignant glioma. *Brain Res* 2007; 1134(1): 45–52. doi: 10.1016/j.brainres.2006.11.093.
76. Canudas S, Houghtaling BR, Kim JY et al. Protein requirements for sister telomere association in human cells. *EMBO J* 2007; 26(23): 4867–4878. doi: 10.1038/sj.emboj.7601903.
77. Clevers H, Loh KM, Nusse R. Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: wnt signaling and stem cell control. *Science* 2014; 346(6205): 1248012. doi: 10.1126/science.1248012.
78. Wood RD, Mitchell M, Sgouras J et al. Human DNA repair genes. *Science* 2001; 291(5507): 1284–1289. doi: 10.1126/science.1056154.
79. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. *Mutat Res Rev Mutat Res* 2015; 763: 212–245. doi: 10.1016/j.mrrev.2014.11.002.
80. Zhao R, Cui T, Han C et al. DDB2 modulates TGF- $\beta$  signal transduction in human ovarian cancer cells by down-regulating NEDD4L. *Nucleic Acids Res* 2015; 43(16): 7838–7849. doi: 10.1093/nar/gkv667.
81. Batista LF, Roos WP, Christmann M et al. Differential sensitivity of malignant glioma cells to methylating and chloroethylating anticancer drugs: p53 determines the switch by regulating xpc, ddb2, and DNA double-strand breaks. *Cancer Res* 2007; 67(24): 11886–11895. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2964.
82. Kun S, Duan Q, Liu G et al. Prognostic value of DNA repair genes based on stratification of glioblastomas. *Oncotarget* 2017; 8(35): 58222–58230. doi: 10.18632/oncotarget.17452.
83. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
84. Soupene E, Kuypers FA. Mammalian long-chain acyl-CoA synthetases. *Exp Biol Med* (Maywood) 2008; 233(5): 507–521. doi: 10.3181/0710-MR-287.
85. Lopes-Marques M, Cunha I, Reis-Henriques MA et al. Diversity and history of the long-chain acyl-CoA synthetase (Acs) gene family in vertebrates. *BMC Evol Biol* 2013; 13: 271. doi: 10.1186/1471-2148-13-271.
86. Chen WC, Wang CY, Hung YH et al. Systematic analysis of gene expression alterations and clinical outcomes for long-chain acyl-coenzyme A synthetase family in cancer. *PLoS One* 2016; 11(5): e0155660. doi: 10.1371/journal.pone.0155660.
87. Cheng J, Fan YQ, Liu BH et al. ACSL4 suppresses glioma cells proliferation via activating ferroptosis. *Oncol Rep* 2020; 43(1): 147–158. doi: 10.3892/or.2019.7419.
88. Sanzey M, Abdul Rahim SA, Oudin A et al. Comprehensive analysis of glycolytic enzymes as therapeutic targets in the treatment of glioblastoma. *PLoS One* 2015; 10(5): e0123544. doi: 10.1371/journal.pone.0123544.
89. Stanke KM, Wilson C, Kidambi S. High expression of glycolytic genes in clinical glioblastoma patients correlates with lower survival. *Front Mol Biosci* 2021; 8: 752404. doi: 10.3389/fmolb.2021.752404.
90. Bai X, Tan TY, Li YX et al. The protective effect of cordyceps sinensis extract on cerebral ischemic injury via modulating the mitochondrial respiratory chain and inhibiting the mitochondrial apoptotic pathway. *Biomed Pharmacother* 2020; 124: 109834. doi: 10.1016/j.biopha.2020.109834.