Čimbenici transkripcije TCF-1 i LEF-1 uključeni u signalni put Wnt izraženi su u tumorima mozga astrocitomima

Marković, Leon

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:669602

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Leon Marković

Čimbenici transkripcije TCF-1 i LEF-1 uključeni u signalni put Wnt izraženi su u tumorima mozga astrocitomima

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za neuro-onkologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga i Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Nives Pećina-Šlaus, u sklopu znanstvenog projekta „Uloga signalnog puta Wnt u tumorigenezi i embriogenezi mozga“, šifra projekta: 108-1081870-1905 , voditelj: prof. dr. sc. Nives Pećina-Šlaus , i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2015./2016. Rad je izrađen zajedno sa studentom Petrom Krešimirom Okštajnerom kao drugim autorom te je godine 2013. nagrađen Dekanovom nagradom.

POPIS KRATICA

LEF: limfoidni pojačavajući protein (prema engl. *lymphoid enhancer factor)*

TCF: T-stanični čimbenik (prema engl. *T cell factor)*

WRE: Wnt element odgovora (prema engl. *Wnt response element*)

DVL: prema engl. *dishevelled*

FZD: prema engl. *frizzled*

LRP: lipoproteinskom receptoru srodan protein (prema engl. *lipoprotein receptor related protein)*

HMG: visoko pokretljiva skupina (prema engl. *high mobility group)*

CRD: regulatorna domena ovisna o kontekstu (prema engl. *context-dependent regulatory domain)*

INT-1: prema engl. *integration 1*

CKI: prema engl. *casein kinase 1*

GSK-3β: glikogen sintaza kinaza 3 beta (prema engl. *glycogen synthase kinase 3 betha*)

APC: adenomatozna polipoza kolona (prema engl. *adenomatous polyposis coli*)

$G_{\alpha o}$ i $G_{\alpha q}$: G-proteini

DNA: deoksiribonukleinska kiselina (prema engl. *deoxyribonucleic acid*)

PARP-1: poli[ADP-riboza] polimeraza 1 (prema engl. *poly[ADP-ribose] polymerase I*)

Topo IIα: tip II topoizomeraza alfa (prema engl. *type II topoisomerase alpha*)

SF-1: prekrajajući čimbenik 1 (prema engl. *splicing factor 1*)

CBP: CREB-vezujući protein (prema engl. *cAMP response element binding protein*)

PIASy: protein inhibitor aktiviranog STAT proteina gama (prema engl. *protein inhibitor of activated STAT protein gamma*)

c-myc: gen stanične mijelocitomatoze (prema engl. cellular mylelocytomatosis)

MRI: prema engl. *magnetic resonance imaging*

WHO: prema engl. *World health organisation*

SZO: Svjetska zdravstvena organizacija

DAB: 3,3'-diaminobenzidin

SADRŽAJ

1. SAŽETAK .....

2. SUMMARY .....

3. UVOD 1

3.1. Signalni put Wnt 1

3.1.1. Signalizacijski slijed-citoplazma 2

3.1.2. Signalizacijski slijed-jezgra 4

3.2. Transkripcijski čimbenici TCF/LEF 6

3.2.1. Struktura 6

3.2.2. Prepoznavanje ciljnih gena 6

4. HIPOTEZA 8

5. CILJEVI RADA 8

6. MATERIJALI I METODE 9

6.1. Tumorski uzorci 9

6.2. Imunohistokemija 9

6.3. Analiza razine ekspresije transkricjskih čimbenika TCF/LEF u jezgi 10

7. REZULTATI 10

8. RASPRAVA 16

9. ZAKLJUČCI 19

10. ZAHVALE 20

11. LITERATURA..... 21

12. ŽIVOTOPIS 26

Leon Marković

ČIMBENICI TRANSKRIPCIJE TCF-1 I LEF-1 UKLJUČENI U SIGNALNI PUT WNT IZRAŽENI SU U TUMORIMA MOZGA ASTROCITOMIMA

1. SAŽETAK

Obitelj transkripcijskih faktora TCF/LEF od velikog je značaja u biologiji tumora. Predmet istraživanja u ovom radu bila je razina ekspresije TCF-1 i LEF-1, u astrocitomima različitih histopatoloških gradusa (I, II i III). Razine ekspresije TCF-1 i LEF-1 određene su metodom imunohistokemije. Utvrđena je ekspresija transkripcijskih čimbenika TCF-1 i LEF-1 lokalizirana u jezgrama stanica astrocitoma. Za TCF-1 određen je porast udjela stanica u kategorijama jake i srednje razine ekspresije, koji je u pozitivnoj korelaciji sa porastom gradusa, sa najvišim vrijednostima u astrocitomima gradusa III -jaka (4,67%), srednja (51,85%), a u njima je očekivano smanjen udio stanica niske ekspresije (43,46%). Za LEF-1 utvrđen je pad ekspresije u kategorijama srednje i niske razine ekspresije, dok je za razinu jake ekspresije određen porast ekspresije koji korelira sa porastom gradusa astrocitoma, sa najvišom vrijednošću jake ekspresije u astrocitomima III (3,73%). Prema našim rezultatima zaključujemo da je porast ekspresije TCF-1 i LEF-1 u pozitivnoj korelaciji sa porastom gradusa astrocitoma. Izraženost transkripcijskih čimbenika TCF-1 i LEF-1 upućuje na uključenost signalnog puta Wnt u nastanku i progresiji tumora mozga astrocitoma.

Ključne riječi: astrocitomi, transkripcijski faktori TCF-1, LEF-1, signalni put Wnt

Leon Marković

TRANSCRIPTION FACTORS TCF-1 AND LEF-1 INVOLVED IN WNT SIGNALING IN ASTROCYTE BRAIN TUMORS

2. SUMMARY

TCF/LEF family of transcription factors is of great significance in tumor biology. The subject of this research was to determine the levels of expression of TCF-1 and LEF-1, in astrocytoma of different histopathologic grade (I, II and III). Immunohistochemistry was the method of choice for determining the levels of expression of TCF-1 and LEF-1. The expression of transcription factors TCF-1 and LEF-1 was localised within the nuclei of astrocytic tumor cells. In case of TCF-1, there was an increase in percentage of cells in categories of strong and intermediate levels of expression, which is in positive correlation with the increasement of grade, with peak values in astrocytoma grade III -strong (4,67%), intermediate (51,85%), as expected there was decreasement in percentage of cells with low expression (43,46%). On the other hand, results for LEF-1 displayed decreased expression in categories with intermediate and low levels of expression, while for the level of strong expression was determined increase in expression which correlated with the increasement of astrocytomic grade, with the peak value in astrocytoma III (3,73). Based on our results, we conclude that the increase in expression of TCF-1 and LEF-1 is in positive correlation with the increase in astrocytoma grade. The expression of transcription factors TCF-1 and LEF-1 suggests activation of Wnt signaling pathway in formation and progression of astrocytic brain tumors.

Keywords: astrocytic brain tumors, transcription factors TCF-1, LEF-1, Wnt signaling

3. UVOD

3.1. Signalni put Wnt

Signalni put Wnt odgovoran je za međustanično signaliziranje u brojnim razvojnim procesima. Komponenta Int-1 Wnt signalnog puta otkrivena je 1984. u mišjim tumorima (Nusse et al.- 1984.). Paralelno otkriću Int-1, otkriven je Wingless, homologni gen *Drosophila melanogaster* (Klaus i Birchmeier - 2008.). Sintezom dvaju imena nastaje ime Wnt. Homolognost Wnt gena određena je specifičnim rasporedom dvadeset i jednog cisteina u primarnom proteinskom slijedu. Filogenetski gledano, Wnt geni su široko rasprostranjeni, *Drosophila* ih ima sedam, pet ima *Caenorhabditis elegans*, dok u ljudi i miševa nalazimo devetnaest. Takva rasprostranjenost među vrstama upućuje na ranu evoluciju gena (Cadigan2008.). Proteini Wnt sekretorni su glikoproteini. Signalni put Wnt odgovoran je za brojne embrionalne razvojne procese, primjerice ekspresija Wnt11 koji inducira apoptozu potrebna je za fuziju nepca (Lee et al.- 2008.). Zamjećena je također ekspresija Wnt11 u mišjim ventrikularnim kardiomiocitima tijekom embrionalnog razvoja, gdje smanjena ekspresija Wnt11 dovodi do promjenjene distribucije N-kadherina i β-katenina, poslijedično uzrokujući poremećaje citoskeleta i sarkomera (Nagy et al.- 2010.). Embrinalni razvoj mišjeg mozga također je povezan sa ekspresijom Wnt-a i pridruženih molekula, poput onih iz obitelji TCF i LEF, čija je ekspresija povećana u ranim stadijima razvoja mozga u neuronima i astrocitima, a kasnije njihova razina opada (Coyle-Rink et al.- 2002.). Posljedično ovoj ranoj ekspresiji, u okvirima razvitka, postoji potencijal povišene ekspresije istih molekula i u tumorskim stanicama, koje su prošle proces svojevrsne dediferencijacije. U pokusima rađenima sa knockout miševima ustanovljeno je da TCF-1 -/- miševi imaju poremećaj u razvoju T-stanica, i razvijaju adenome gastrointestinalnog sustava i dojke. LEF-1 -/- knockout miševi umiru u vrijeme rođenja (Ravindranath- 2008.).

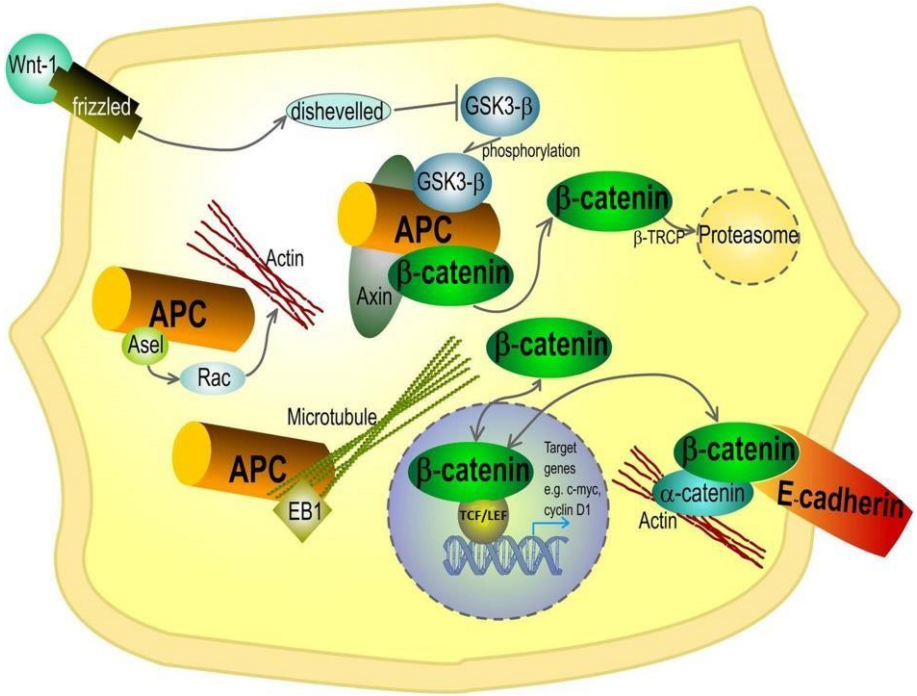
Tablica 1. Bolesti povezane s mutacijama gena Wnt (Fahiminiya et al.- 2013.; Nieman et al.- 2004.; Biason-Lauber- 2004; Kanazawa- 2004.; Adamy - 2007.; Christodoulides - 2006.; Ugur - 2008.; Mandel- 2008.)

GEN	BOLEST
WNT-1	Osteogenesis imperfecta
WNT-3	Tetra amelia
WNT-4	Perzistencija Müllerovih kanala i virilizacija SERKAL sindrom
WNT-5B	Dijabetes tip II
WNT-7A	Fuhrmannov sindrom
WNT-10A	Odono-onyho-dermalna displazija
WNT-10B	Split hand/foot malformacija Mutacija u pretilih bolesnika

3.1.1.Signalizacijski slijed-citoplazma

Signalni put Wnt uključuje složeni niz interakcija nekoliko proteina kojima je jedan od ishoda aktivacija transkripcijskih čimbenika TCF/LEF u jezgri stanice (Rampazzo et al.- 2013.). Signalizacija započinje vezivanjem Wnt molekule na površinu transmembranskih proteina Frizzled(Fzd) i lipoprotein receptor povezanih proteina (LRP5 i LRP6). Obitelj Fzd dio je velike skupine receptora sa sedam transmembranskih domena povezanih s Gproteinima (Malbon- 2004.). Povezivanjem proteina iz obitelji Fzd i LRP preko Wnt liganda primjer je dimerizacije s unakrsnom fosforilacijom koja je posredovana tirozin-kinazom ili TGF-β receptorom. To je zbog činjenice da ni Fzd ni LRP5/6 nemaju dokazanu enzimatsku aktivnost. Daljnji signalizacijski slijed dovodi do aktivacije skupine proteina Dishevelled (Dvl) čija je uloga fosforilacija LRP-a i regrutacija axina prema staničnoj membrani . Središnji događaj u Wnt signalizaciji uključuje promjenu koncentracije βkatenina. Ova promjena utječe na difuziju β-katenina u jezgru nakon čega slijedi njegovo vezivanje za transkripcijske čimbenike TCF/LEF (Clevers- 2006.). β-katenin ne pokazuje samo važnost u signalnom putu Wnt već ima i esencijalnu ulogu u vezama među stanicama tzv. zonulama adherens , stvarajući vezu između E-kadherina i aktinskog citoskeleta (Haftek et al.- 1996.). Koncentracija β-katenina vezana je uz nekoliko proteina koji formiraju tzv. B-kateninski razarajući kompleks. Razaranje β-katenina

započinje binarnim kinazim mehanizmom, gdje kasein kinaza I (CKI) fosforilira domene koje sadržavaju serinske aminokiselinske ostatke dovodeći do fosforilacije serin/treoninskih ostataka putem glikogen sintaze kinaze 3-β (GSK-3β). Za fosforilaciju β-katenina preko CKI i GSK-3β , nužno je i vezivanje proteina adenomatozne polipoze kolona (APC) i axina. Ova dva proteina služe kao usmjerivači preko kojih se β-katenin i kinaze pozicioniraju u svrhu učinkovite interakcije. Tako vezani β-katenin se spaja za β-TrCP, komponentu E3 ubikvitin ligaza kompleksa, što dovodi do poliubikvitinacije i razgradnje u proteasomu (Aberle et al.-1997.). Regrutacija axina prema fosforiliranom citoplazmatskom repu LRP5/6 onemogućuje funkciju β-kateninskog razarajućeg kompleksa i stabilizira koncentraciju β-katenina u citoplazmi. Postoje indikacije da i Fzd kao član obitelji receptora povezanih s G-proteinima, dovodi do aktivacije $G_{\alpha o}$ i $G_{\alpha q}$ potrebnih za aktivnost Wnt-signalnog puta. Nakon stabilizacije i povećanja koncentracije citoplazmatskog β-katenina dolazi do njegovog premještanja u jezgru preko kompleksa jezgrinih pora. Unatoč izrazito potentim domenama na C- i N- kraju, intrinzična mogućnost vezanja β-katenina je zanemariva. Postoje mnogi transkripcijski čimbenici sposobni vezati β-katenin. Istraživanja ukazuju porodicu transkripcijskih fakora TCF/LEF kao glavne medijatore Wnt-signala. Kako bi se β-katenin vezao na DNA, potrebna je njegova asocijacija s jednim od specifičnih transkripcijkih faktora iz obitelji TCF/LEF (Clevers- 2006.).



Slika 1. Signalni put Wnt

3.1.2.Signalizacijski slijed-jezgra

Proteini TCF/LEF se vežu direktno na DNA, no vezivanje zahtijeva prisutnost β-katenina iz razloga što je vezivanje samo TCF/LEF-a nedostatno za gensku transaktivaciju. TCF/LEF pokazuju izvanredno konzervirane aminokiselinske sljedove u HMG-DNAvezujućoj domeni i jezgrinom lokalizacijskom signalu (NLS-nuclear localization signal). Svi TCF/LEF-ovi, prijenosom u jezgru putem alfa importina, naposlijetku se vezuju za sekvencu 5'-CCTTTGWW. Pokusi s DNA-vezujućim mjestom dTCF/pangolin i TCF-1 ukazuju na identičnost DNA-sekvenci za sve TCF/LEF-ove i dokazuje visoku konzerviranost HMG-DNA vezujućih domena (van de Wetering i Clevers- 1992.). Jedna od često zanemarivanih činjenica je savijanje DNA prilikom vezanja od 130° za transkripcijski faktor LEF-1 (Giese et al.- 1991.). Rane studije aktivnosti TCF/LEF ukazuju na važnost savijanje DNA prilikom regulacije transkripcije ciljnih gena kod limfocita. Savijanje je nužno radi kontakta između transkripcijskih faktora vezanih za bilo koju stranu DNA. Vezivanje β-katenina slijedi preko izrazito konzervirane domene na amino kraju transkripcijskih čimbenika TCF/LEF, uključujući konformacijske promjene u prvih 50 aminokiselina preko alfa uzvojnice i nekoliko vodikovih i elektrostatskih interakcija središnje Armadillo ponavljajuće domene (Graham et al.- 2000.). TCF/LEF mogu također vezati i γ-katenin/plakoglobin (Zhurinsky et al.- 2000.) , no mnogo slabije. Spajanje se odvija preko njihovog C-terminalnog kraja (aminokiseline 51-80) (Miravet et al.- 2002.). Osim vezujućih mjesta na TCF/LEF-u, istraživanja pokazuju da i na β-kateninu postoje vezna mjesta, preko kojih mnogi koaktivatori i korepresori transkripcije, ali i antagonisti mijenjaju funkcionalnost kompleksa β-katenin/TCF/LEF/DNA. Ovisno o kontekstu ovo može pojačavajati ili inhibirajati transkripciju ciljnih proteina. Za većinu koaktivatora otkriveno je se vežu direktno na N- i C- krajeve β-katenina (Hurlstone i Clevers- 2002.). Zanimljivo je da je većina interakcija vezana za transkripcijski čimbenik LEF-1.

Proteomička istraživanja identificirala su FUS/TLS, PARP-1, Ku70, Ku80, Topo IIα i SF-1 kao bitnije proteine koji utječu na aktivnost β-katenin-TCF-4 kompleksa (Shitashige et al.- 2008.). Dok su FUS/TLS i Ku70 identificirani kao represori, dokazano je da su TopoIIα i PARP-1 pojačivači TCF/LEF/β-katenin transkripcijskog kompleksa. PARP-1 je enzim koji katalizira poliADP-ribozilaciju nekolicine proteina u odgovoru na DNA oštećenje, igrajući bitnu ulogu u očuvavanju integriteta genoma . Tijekom apoptoze PARP-1 se cijepa pomoću kaspaze-3 (Idogawa et al.- 2007.). Čini se da to cijepanje inhibira interakciju PARP-1 s TCF4 (Idogawa et al.- 2005.). Uklanjanje PARP-1 iz kompleksa β-katenin-TCF-4, vjeruje se, inhibira

transkripcijsku aktivnost. U odgovoru na DNA oštećenje, PARP-1 katalizira poliADP-ribozilaciju vlastite domene inhibirajući interkaciju s TCF-4. Ku70 natječe se s PARP-1 za vezno mjesto na TCF-4, dovodeći do inhibicije transkripcije. Disocijacija PARP-1 omogućuje vezanje Ku70, koji čini se, inhibira interakciju TCF-4 i β-katenina. Povećana ekspresija PARP-1 i smanjena ekspresija Ku70, uočena je u kolorektalnom adenokarcinomu, pojačavajući TCF-4/β-katenin posredovanu transkripciju gena (Shitashige et al.- 2008.). Još jedan način mijenjanja transkripcijske aktivnosti je i kovalentna modifikacija. U *Drosophile melanogaster*, transkripcijski koaktivator dCBP može se vezati za HMG DNA-vezujuću domenu dTCF/pana i acetilirati lizinske ostatke u Armadillo/β-katenin vezujućoj domeni te tako interferirati aktivnošću kompleksa (Waltzer i Bienz- 1998.). Kod *C. Elegans*, POP-1 je acetiliran pomoću CBP/p300 u blizini HMG-domene te ova modifikacija povećava transport u jezgru. Obje acetilacije smanjuju izražaj Wnt ciljnih gena, no da li ovaj mehanizam vrijedi i za kralježnjake još nije poznato, ali zanimljivo je istaknuti da su lizinski ostatci (K25) koji su acetilirani u *Drosophile*, SUMOlirani kod mišjeg LEF-1 pomoću E3 ligaze PIASy. TCF-1 i TCF-3 ne posjeduju analogne aminokiselinske ostatke. Početna istraživanja ukazuju da SUMO modifikacija vodi do slične inhibicije. Fosforilacija je još jedan mehanizam s negativnim odjekom. Fosforilacija serina u β-katenin vezujućoj domeni LEF-1 putem kasein kinaze onemogućuje vezanje transkripcijskih TCF/LEF za DNA , a fosforilacija nizvodnih aminokiselinski ostataka putem kazein kinaze 2 na TCF-4 onemogućuju vezanje β-katenina (Miravet et al.- 2002.) .Naposlijetku, aktivacija transkripcije dovodi do ekspresije Wnt ciljnih gena poput c-myc, cyclin D2, CD44, c-jun, cyclin D1, axin2, survivin(BIRC5), matrilysin(MMP7) i mnogih drugih (Shitashige et al.- 2008.). Posebice je zanimljiva aktivacija c-myc protoonkogena. C-myc je pleotropni transkripcijski faktor koji regulira mnoštvo staničnih procesa kao što su apoptoza, progresija staničnog ciklusa, stanični rast i DNA replikacija. Vjeruje se da c-myc regulira ekspresiju 15% ljudskih gena (Gearhart et al.- 2007.). U početku je otkriven kao Wnt ciljni gen gdje je dokazano postojanje regulatornog genetičkog elementa WRE (engl. Wnt regulatory element) unutar promotora za c-myc gena (Tong-Chuan He et al.- 1998.). Nedavni radovi sugeriraju da ovisne o β-kateninu interakcije izmeĐu Wnt elementa odgovora (WRE) i c-myc locusa , kontroliraju ekspresiju β-katenina. Navedena istraživanja provedena su većinom na kolorektalnom karcinomu, ali ovi radovi koji se bave različitim neoplazmama pa tako i tumorima središnjeg živčanog sustava daju naslutiti da prekomjerna aktivacija signalnog puta Wnt igra ulogu u nastanku i progresiji neuroepitelnih tumora mozga, posebice astrocitoma.

3.2. Transkripcijski čimbenici TCF/LEF

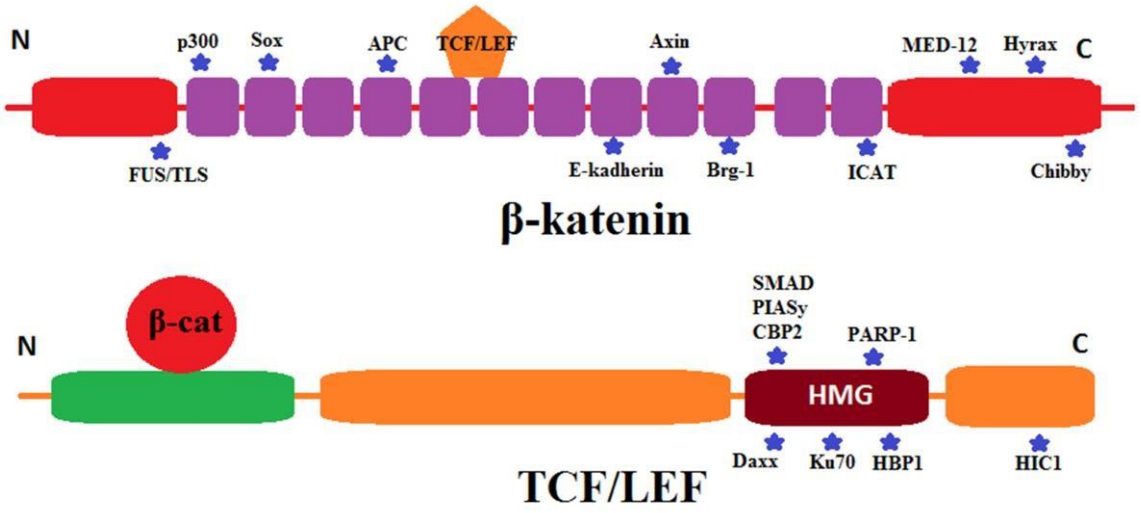
3.2.1.Struktura

LEF (od engl. Lymphoid enhancer factor) i TCF (od engl. T cell factor) proteini, medijatori su Wnt signalnog puta i djeluju u jezgri stanice. Signalni proteini Wnt spregnuti su putem β-catenina, a djeluju na Wnt response elements 6 (WRE). U viših organizama postoje 4 predstavnika obitelji: TCF-1, LEF-1, TCF-3 i TCF-4. Svi članovi obitelji nastaju kao izoforme istog gena putem alternativnog prekrajanja, ili upotrebe različitog promotora (Arce - 2006.). N-terminalna β-catenin-vezujuća domena je visokoočuvana, 60% sličnosti među ortolozima, a svi članovi LEF/TCF obitelji vežu β-catenin. LEF/TCF također mogu vezati i kompleks γ-katenin/plakoglobin (Zhurinsky et al.- 2000.). Premda uloga ove interakcije nije u potpusnosti razjašnjena. Između β-katenin vezujuće domene i HMG vezujuće domene smjestila se CRD domena, context-dependant regulatory domain. U području CRD smješten je jedan alternativni egzon (Arce- 2006.). Štoviše, CRD djeluje kao vezno mjesto za represor Groucho (Roose et al.- 1998.). HMG-DNA vezujuća domena prisutna je u svim članovima LEF/TCF obitelji. Ova domena prepoznaje sekvencu 5'-CCTTTGWW, smještenu na malom utoru DNA, a signal lokalizacije u jezgri, NLS (od engl. nuclear localization signal) interagira sa fosfatnim skupinama postranično na DNA, povećavajući tako afinitet višestruko. Važno je istaknuti da ova interakcija snažno savija DNA poslijedično omogućujući vezanje transkripcijskih faktora (Giese et al.- 1991. ; van de Wetering i Clevers- 1992.). Uklanjanje N-terminalne domene, za koju je kasnije utvrđeno da je β-katenin vezujuća, ima za poslijedicu aktivaciju gena izvan "normalnog" konteksta Wnt signalnog puta (Carlsson et al.- 1993.). C-terminalni krajevi podložni su alternativnom prekrajanju unutar pojedinih gena LEF/TCF obitelji (Hovanes et al.- 2000.). Jedan od najčešćih je "B" kraj koji je prisutan u svim članovima obitelji, osim TCF-3, funkcija mu je nepoznata, kao i većini alternativnih krajeva. S druge strane "E" kraj, koji se nalazi u svim TCF genima, osim u LEF-1, sadrži nespecifičnu veznu domenu za DNA i regiju odgovornu za interakciju sa p300, stvarajući tako TCF, β-katenin, p300 transkripcijski kompleks (Atcha et al.- 2003. ; Hecht i Stemmler- 2003.).

3.2.2.Prepoznavanje ciljnih gena

Iako postoji intrizično prepoznavanje DNA od strane TCF/LEF proteina, ono je slabog afiniteta, stoga su potrebni drugi čimbenici koji će pojačati afinitet vezanja, poput β-katenina.

Upravo alternativni C-terminalni krajevi se dovode u vezu sa prepoznavanjem ciljnih gena, posebice "E" kraj, koji je prisutan u izoformama TCF-1 i TCF-4, koje stoga imaju sposobnost vezanja za varijabilnije WRE. Za izoforme bez "E" kraja, predviđa se da postoje neki drugi faktori koji utječu na njihovu interakciju sa DNA. Na slici 2. prikazana su mjesta vezivanja i molekule koja ta vezivanja ostvaruju. Zanimljivo je da ortolozi u muhe, crva, hidre obligatno sadržavaju C-terminalni DNA vezujući motiv, što daje za pretpostavku da je u 7 sisavaca došlo do razvoja novih C-terminusa kako bi se postigla interakcija sa većim brojem molekula i čimbenika koji sudjeluju u različitim signalnim putovima. (Arce- 2006.)



Slika 2. Mjesta vezivanja. Shematska reprezentacija TCF/LEF i β-katenin domena nužnih za interakciju s indiciranim proteinima

4. HIPOTEZA

U posljednjih 20-ak godina, bilježi se povećan razvoj novih histološko-biokemijskih markera tumorskog rasta koji omogućuju poboljšanje dijagnostike, te također doprinose točnijoj prognozi slijeda bolesti. Promatrajući tumorski rast prema profilu ekspresije pojedinih gena, možemo ustvrditi svojevrsnu dediferencijaciju tumorskih stanica, uz ostale citogenetičke promjene. Shodno tome realno je očekivati aktivaciju pojedinih unutarstaničnih signalnih putova, koji su bili aktivni u vrijeme diferencijacije pojedinih stanica. Zbog toga očekujemo da će ekspresija TCF-1 i LEF-1 biti povišena u astrocitomima, shodno njihovoj efektorskoj funkciji na transkripciju u sklopu aktivacije WNT signalnog puta.

5. CILJEVI RADA

Cilj istraživanja je odrediti lokalizaciju u stanici i usporediti razinu ekspresiju proteina TCF-1 i LEF-1 različitih gradusa astrocitoma te prema tome zaključiti u kojoj su mjeri proteini TCF-1 I LEF-1 kao transkripcijski čimbenenici signalnog puta Wnt uključen u regulaciju maligne preobrazbe astrocitoma.

6. MATERIJALI I METODE

6.1. Tumorski uzorci

Uzorci od 52 astrocitoma prikupljeni su od strane Zavoda za patologiju "Ljudevit Jurak", Kliničkog bolničkog centra "Sestre milosrdnice", Zagreb, Hrvatska. Tumori su pronađeni većinom u temporalnim, frontalnim, parijetalnim i cerebelarnim regijama mozga, pomoću magnetske rezonance MRI (magnetic resonance imaging). U pacijenata nije postojala obiteljska povijest tumora mozga. Svi tumori su klasificirani od strane patologa prema kriterijima Svjetske zdravstvene ogranizacije (WHO), u astrocitome gradusa I, astrocitome gradusa II, astrocitome gradusa III. 28 pacijenata su bili muškarci, a 24 žene. Dob pacijenata sezala je od 3 do 81, sa srednjom vrijednošću od 38.28; a središnjom vrijednošću od 34.50 (median). Prosječna dob u vrijeme dijagnoze je bila 38.89 za muškarce, a 37.58 za žene.

Etički odbor je odobrio istraživanje, a pacijenti su potpisali informirani pristanak.

6.2. Imunohistokemija

U svrhu određivanja staničnog smještaja TCF-1 i LEF-1 proteina, te određivanja razine njihove ekspresije, primijenjena je metoda imunohistokemije. Uzorci su bili fiksirani u formalinu, prožeti parafinom, te izrezani na 4-μm debele preparate pomoću Capillary gap microscope (DakoCytomation, Denmark). Preparati su imunohistokemijski obojeni prema streptavidin horseradish peroxidase/DAB metodom. (LSAB+, Dako REAL^{TM}).

Deparafinizirani i rehidrirani preparati stavljeni su u (citratni pufer) Dako Target Retrieval Solution (DakoCytomation, Denmark) unutar mikrovalne komore, dva puta po 3 min pri snazi od 700W i jednom na 4 min pri snazi od 350W, kako bi se prikazali skriveni epitopi.

Inaktivacija endogene peroksidazne aktivnosti postignuta je pomoću otopine metanola i 3% H_2O_2. Nespecifično vezanje protutjela blokirano je pomoću inkubacije peparata u goat serumu tijekom 30 min na 4°C. Primarna protutijela primijenjena su u optimiziranim razrjeĐenjima po 30 min na sobnoj temperaturi. Korištena su mišja monoklonalna protutijela anti-human TCF-1 (1:50) i anti-human LEF-1 (1:50), Santa Cruz Biotechnology, USA. Nakon inkubacije preparati su tri puta ispirani u fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatom/kozjem serumu.

Sekundarno protutijelo primjenjeno je tijekom 16 min. Korišteno je biotinizirano protumišje sekundarno protutijelo. Ispiranje je ponovljeno, a nakon toga preparati su bili inkubirani u otopini supstrat kromogen (sadržava supstrat pufer i streptavidin konjugiran sa peroksidazom/DAB+) po 30 sekundi po preparatu. Ispiranje je ponovljeno tri puta po 10 min. Upotrijebljene su kemikalije od DakoCytomation. Negativne kontrole su bili preparati koji su prošli cijeli postupak imunohistokemije izuzevši korak inkubacije sa primarnim protutijelom. Kao pozitivne kontrole korišteni su preparati, korteksa frontalnog lobusa normalnog mozga, normalne kože, bubrega i kolona.

6.3. Analiza razine ekspresije transkripcijskih faktora TCF/LEF u jezgri

Analizu su obavila dva promatrača, kojima su bili nepoznati uvjeti eksperimenta, na Olympus BH-2 mikroskopu. Preparati bez ekspresije ili sa vrlo slabom ekspresijom označeni su sa 0/+, srednja razina ekspresije označena je kao ++, a vrlo izražena ekspresija kao +++. Analizirano je 200 stanica po preparatu. Za svaki uzorak, intenzitet bojenja na izraženim dijelovima preparata ocijenjen je koristeći ImageJ software (NIH, SAD). Odabrana su središnja područja preparata koja su prikazivala najviše karakteristika malignog tkiva.

7. REZULTATI

Utvrđena je ekspresija oba transkripcijska faktora u većini analiziranih uzoraka kao i heterogena distribucija kroz tumor, s lokalizacijom u jezgri, sugerirajući povećanu transkripcijsku aktivnost. Na razini svih uzoraka astrocitoma, naša analiza je pokazala da srednje vrijednosti ekspresije TCF-1 za jaku ekspresiju iznose nešto manje od 4 % , malo manje od 46 % pokazuje srednju ekspresiju, dok otprilike 50 % iskazuje slabu ekspresiju ovog transkripcijskog faktora. Rezultati vezani za LEF-1 slijede ovaj obrazac gdje jaku ekspresiju pokazuje nešto manje od 3 %, malo manje od 42 % pokazuje srednju ekspresiju, dok otprilike 55 % iskazuje slabu ekspresiju ili nedostatak ekspresije . Intenzitet obojenja 200 stanica

svakog primjerka je analiziran koristeći ImageJ (NIH, SAD) i ravrstan u kategorije prema broju stanica koje su pokazivale određeni intenzitet obojenja, što ukazuje na razinu ekspresije pojedinog transkripcijskog faktora. Naša istraživanja za oba transkripcijska faktora kod astrocitoma I pokazuju da udio stanica s izrazitom ekspresijom za TCF-1 iznosi 3,1 %, umjerena ekspresija 39,31 %, a slaba ili bez ekspresije dokazana je u 57,57 % stanica. Rezultati na LEF-1 u astrocitomima I iznose kako slijedi: izrazita ekspresija 1,71 %, umjerena ekspresija 35,86 %, slaba ili bez ekspresije 62,34 %. Rezultati za astrocitome II za TCF-1 iznose: izrazita ekspresija 4,19 %, umjerena ekspresija 45,53 %, slaba ili bez ekspresije 50,26 %. Sličan obrazac pokazuje i ekspresija LEF-1 kod astrocitoma II gdje je udio stanica s izrazitom ekspresijom 3,07 %, umjerenom 53,15 % i slabom ili bez ekspresije 43,32 %. Konačno najmaligniji gradus astrocitoma odnosno gradus III astrocitoma pokazuje da je udio stanica s izrazitom ekspresijom za TCF-1 4,67 %, s umjerenom ekspresijom 51,85 %, dok udio sa slabom ili bez ekspresije iznosi 43,46 %.

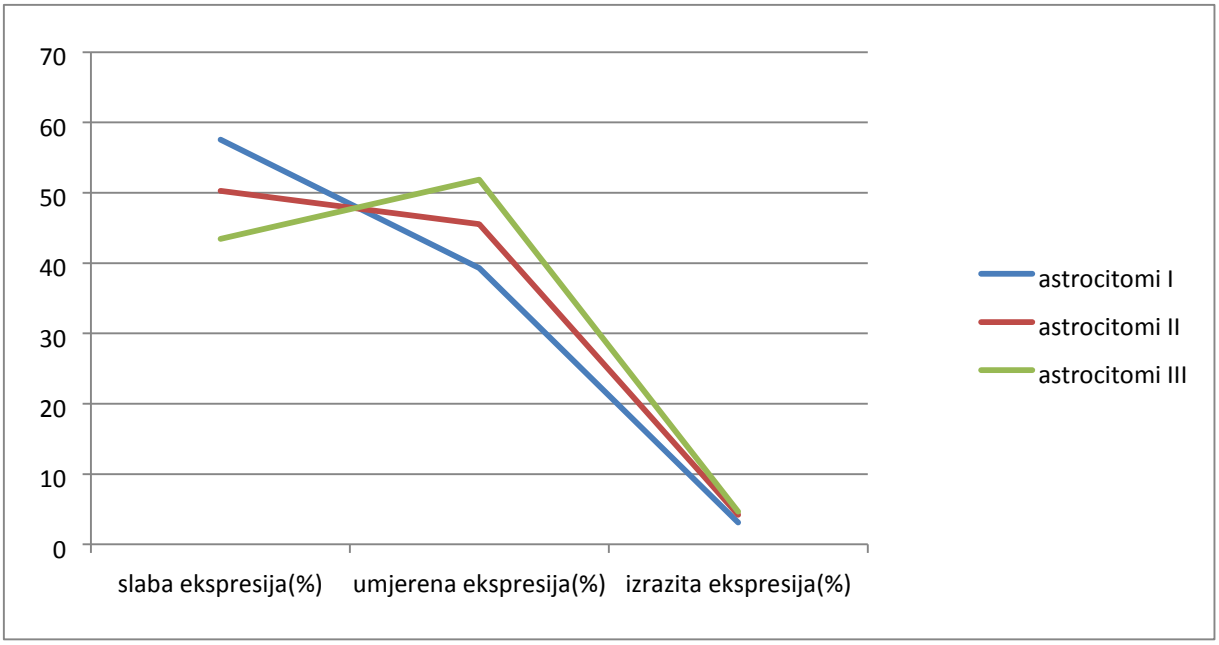
Rezultati gradusa III astrocitoma za LEF-1 pokazuju sljedeće vrijednosti: izrazita ekspresija 3,73%, umjerena eksprsija 35,87%, slaba ili bez ekspresije 60,39 %. Primijetili smo da se nagli porast prepoznatljive ekspresije dogodio odmah u gradusu II astrocitoma, dok su rezultati ekspresije za gradus III nisu bili toliko izraženi. Utvrdili smo relevantne korelacije između intenziteta ekspresije za dva promatrana proteina. Razine dvaju proteina bile su u pozitivnoj korelaciji u našem ukupnom uzorku tumorskih uzoraka gdje izrazita ekspresija ili umjerena ekspresija pokazuju da su oba proteina prisutna u različitim gradusima. Razina ekspresije dvaju istraživanih proteina pozitivno koreliraju s histološkom malignosti. Prikupljeni rezultati u ukupnom uzorku demonstriraju razlike u razini ekspresije ponajprije povezane s ekspresijom TCF-1 slaba ekspresija, TCF-1 izrazita ekspresija i LEF-1 izrazita ekspresija u različitim gradusima. Ekspresija TCF-1 kod astrocitoma III pokazuje najniži postotak zastupljenosti stanica sa slabom ekspresijom, dok je postotak zastupljenosti visoke ekspresije TCF-1 najviši kod astrocitoma III, a kod astrocitoma II blago povišen pozitivno korelirajući sa stupnjem malignosti tih tumora. U suprotnosti, udio stanica sa slabom ili bez ekspresije, 43,46 %, bili su najniži kod astrocitoma III, pri tome ukazujući da udio stanica koje ne eksprimiraju ovaj transkripcijski faktor je u ovom gradusu smanjen. Rezultati također pokazuju pravilni porast postotka stanica s izrazitom ekspresijom LEF-1 s porastom malignosti astrocitoma I do III.

Dobivene vrijednosti za TCF-1 nešto su manje izražene zbog porasta udjela stanica s 3,1 % kod astrocitoma I do vrjednosti od 4,19% kod astrocitoma II, a udio stanične populacije astrocitoma III slijedi trend blagog porasta udjela stanica s visokom ekspresijom 4,67 %, nasuprot tome događa se izrazito smanjenje stanične populacije sa slabom ili bez ekspresije kod TCF-1 gdje astrocitomi I posjeduju 57,57 % stanične populacije s niskom ili bez ekspresije, astrocitomi II

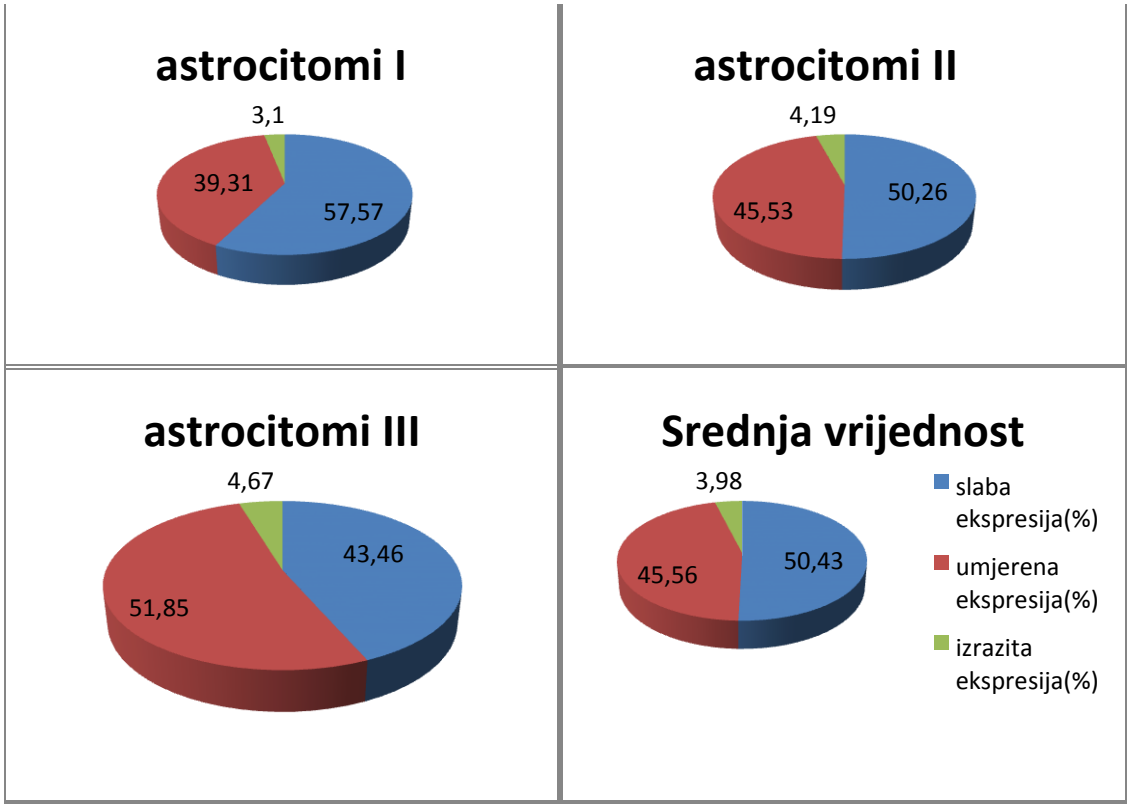
50,26 %, a astrocitomi III uvjerljivo najnižu vrijednost, 43,46% . Udio stanica s umjerenom ekspresijom linearno raste za TCF-1, dok dobiveni rezultati za LEF-1 pokazuju da je najveći udio takvih stanica kod astrocitoma II, a astrocitomi I i III posjeduju sličan postotak stanične populacije s umjerenom ekspresijom. Slike 4. i 7. jasno pokazuju da s povećanjem gradusa astrocitoma dolazi do povećanja udjela stanica s izrazitom odnosno umjerenom ekspresijom transkripcijskih faktora TCF-1 i LEF-1, a smanjenja udjela stanica sa slabom ili bez ekspresije. Na slici 3. i 6. prikazani su postotci razine ekspresije transkripcijskih faktora TCF-1 odnosno LEF-1 gdje za TCF-1 jasno uočavamo porast razine ekspresije s porastom gradusa astrocitoma, dok rezultati za LEF-1 nisu tako jasni.

Tablica 2. Postotak razine ekspresije transkripcijskih faktora kod različitih gradusa astrocitoma

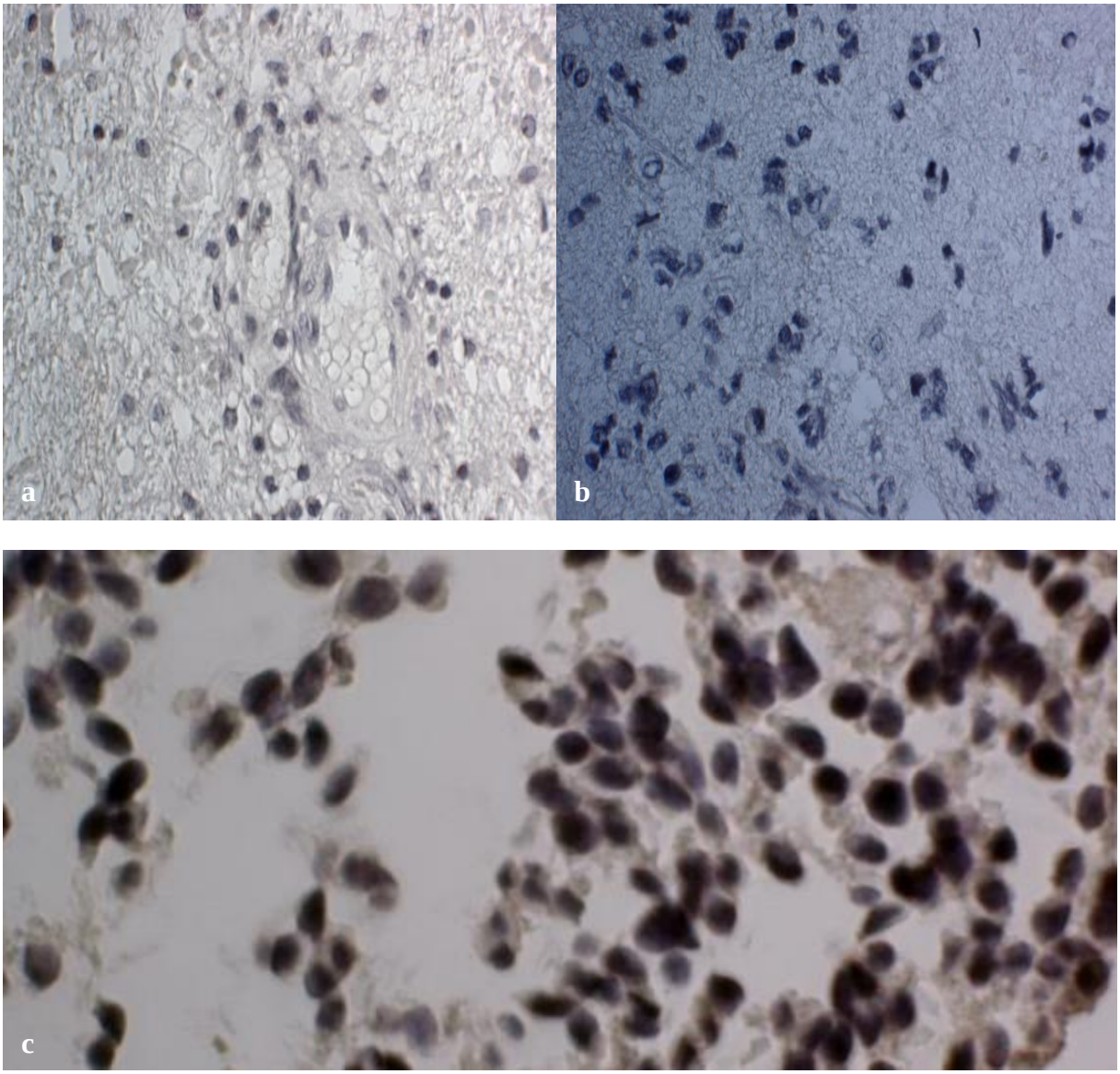
		Jaka ekspresija	**Umjerena ekspresija**	**Slaba ili bez ekspresije**
Astrocitomi I	**TCF-1**	3,10%	39,31 %	57,57 %
	LEF-1	1,71 %	35,86 %	62,34 %
Astrocitomi II	**TCF-1**	4,19 %	45,53 %	50,26 %
	LEF-1	3,07 %	53,15 %	43,32 %
Astrocitomi III	**TCF-1**	4,67 %	51,85 %	43,46 %
	LEF-1	3,73 %	35,87 %	60,39 %



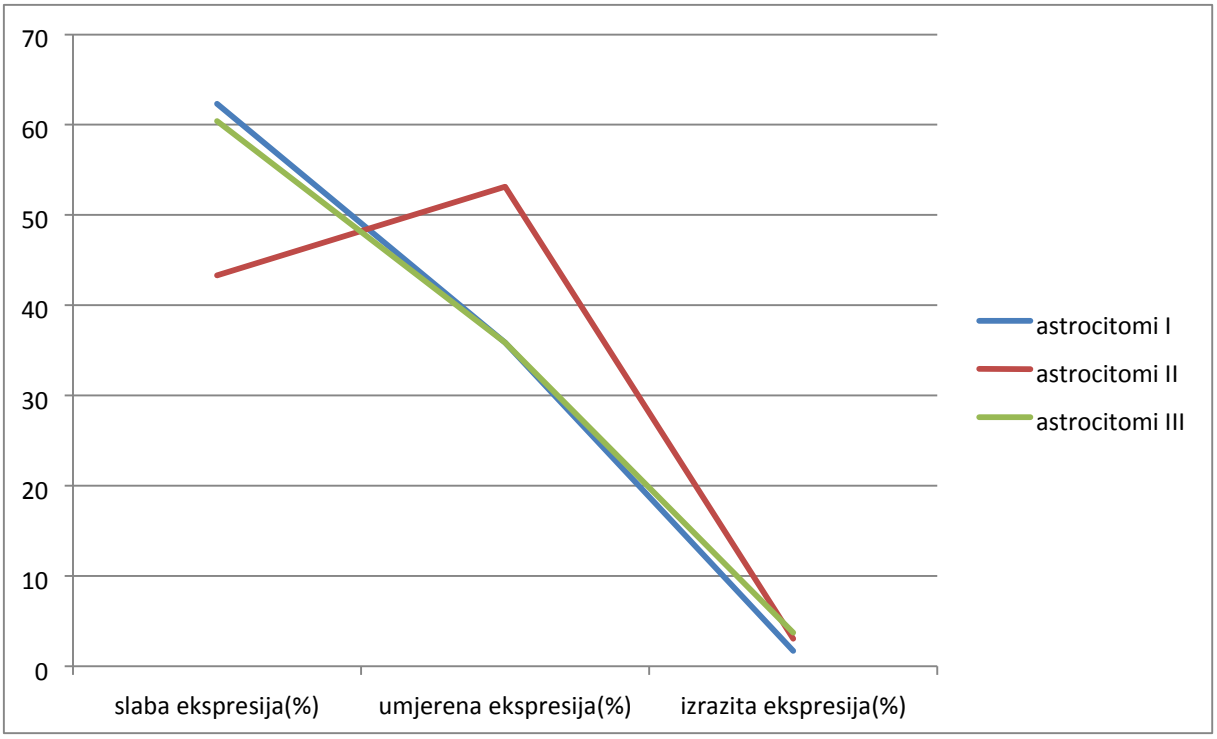
Slika 3. Postotak razine ekspresije trankripcijskog faktora TCF-1 kod različitih gradusa astrocitoma



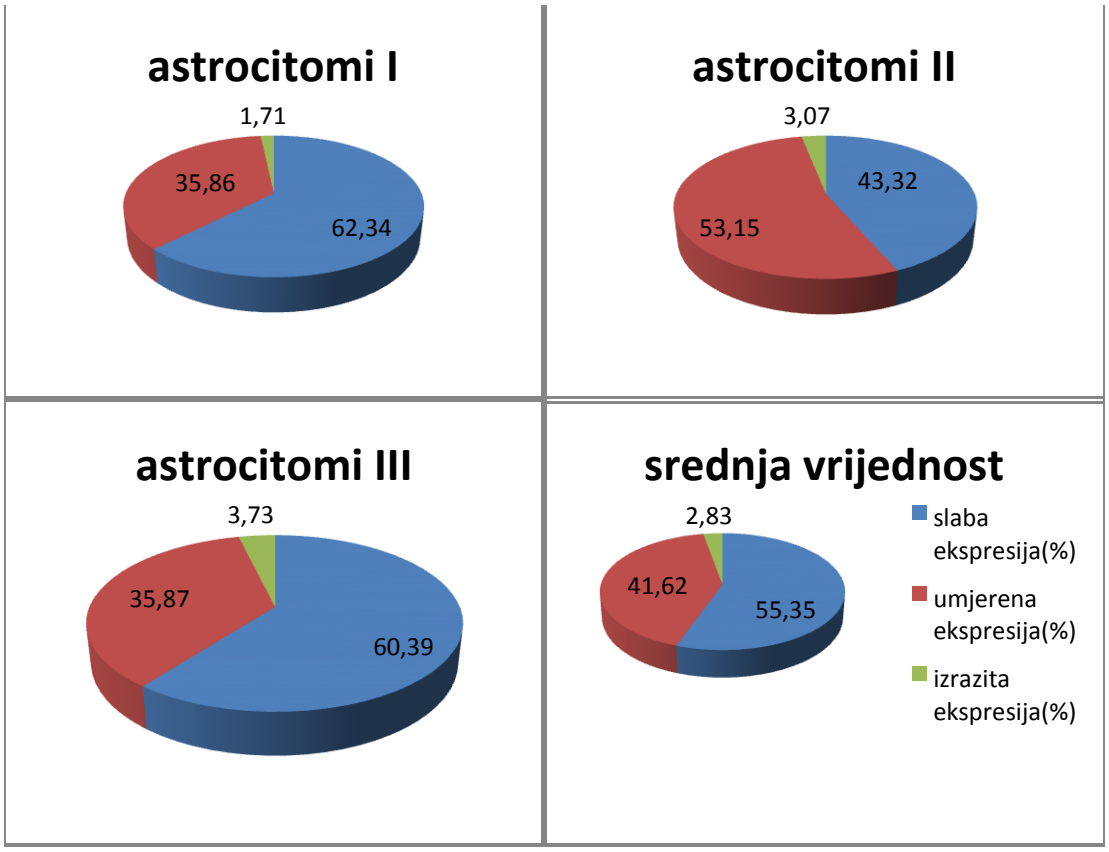
Slika 4. Postotak udjela stanica u tumorskom tkivu s izrazitom ekspresijom (zeleno), umjerenom ekspresijom (crvena), slabom ekspresijom ili bez ekspresije (plavo) transkripcijskog faktora TCF-1



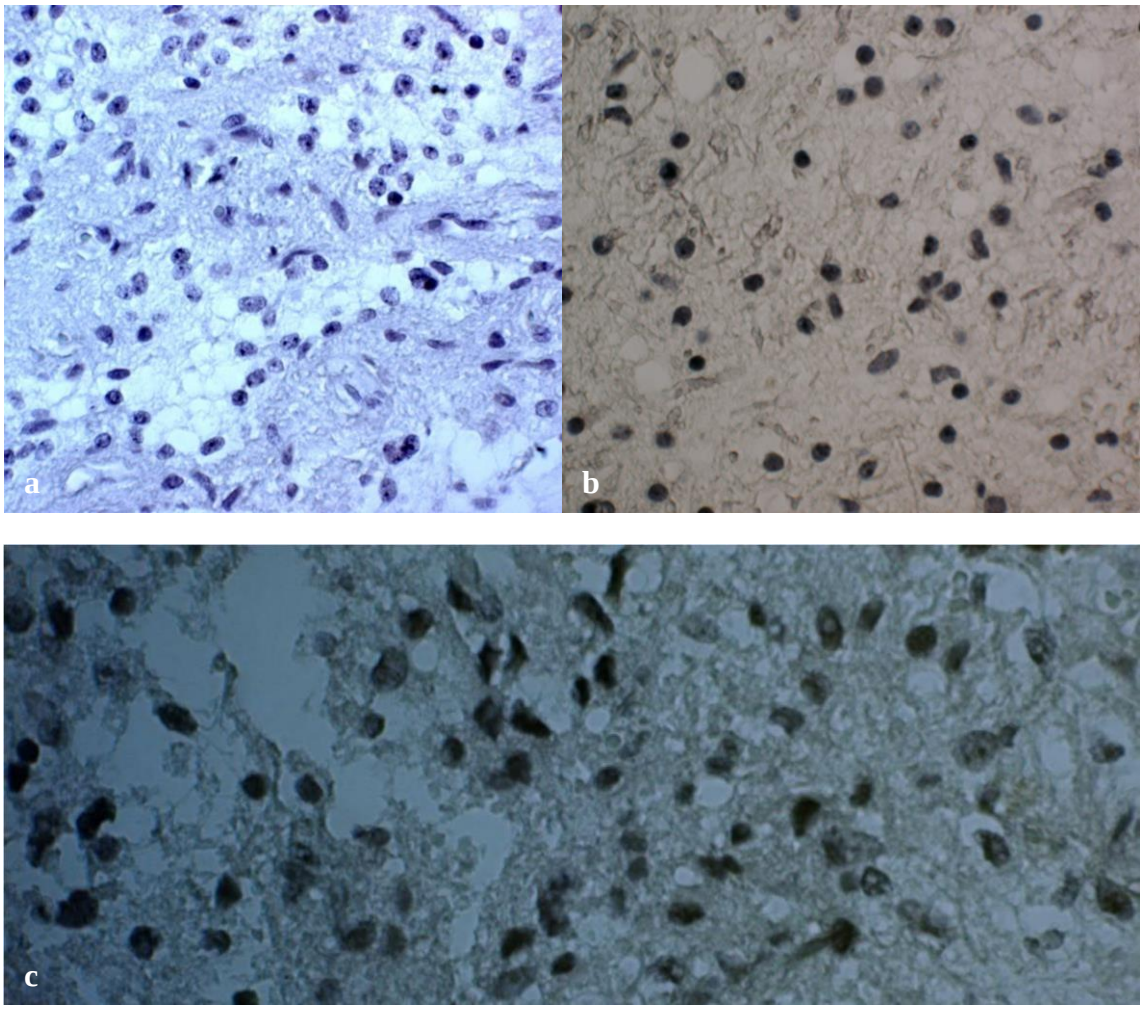
Slika 5. Prikaz ekspresije transkripcijskog faktora TCF-1 u različitim gradusima astrocitoma, slika a- astrocitomi I, b- astrocitomi II, c- astrocitomi III



Slika 6. Postotak razine ekspresije trankripcijskog faktora LEF-1 kod različitih gradusa astrocitoma



Slika 7. Postotak udjela stanica u tumorskom tkivu s izrazitom ekspresijom (zeleno), umjerenom ekspresijom (crvena), slabom ekspresijom ili bez ekspresije (plavo) transkripcijskog faktora LEF-1



Slika 8. Prikaz ekspresije transkripcijskog faktora LEF-1 u različitim gradusima astrocitoma, slika a-astrocitomi I, b-astrocitomi II, c-astrocitomi III

8. RASPRAVA

Raspravljajući o signalnom putu Wnt možemo ustvrditi činjenicu da je glavni izvršni medijator kompleks transkripcijskih faktora iz obitelji TCF/LEF. Unutar jezgre, TCF/LEF obitelj transkripcijskih faktora stvara kompleksni signal aktivirajući procese bitne za međustaničnu komunikaciju u životu embrija i odraslog čovjeka, a također posjeduju i važnost u staničnoj diferencijaciji i proliferaciji (Logan i Nusse- 2004. ; Lie et al.- 2005.).

Naši rezultati s transkripcijskim čimbenicima TCF-1 i LEF-1 pokazuju važnost signalnog puta Wnt u tumorima mozga astrocitomima. U navedenom radu pokazali smo ekspresijski uzorak transkripcijskih faktora TCF/LEF u astrocitomima različite malignosti. Broj stanica s izrazitom

ekspresijom TCF-1 faktora iznosi 4,67 % u astrocitomima III najvišeg stupnja malignosti, dok onih s niskom ili bez ekspresije iznosi 43,46 % . Analiza transkripcijskog faktora LEF-1 pokazala je izrazitu ekspresiju u 3,73 %, a slabu ili bez ekspresije u 60,39 % populacije neoplastičnih stanica. Najniži stupanj malignosti astrocitoma, gradus I, pokazuje znantno povećanje stanica sa slabom ili bez ekspresije, za ekspresiju TCF-1 sa 57,57 %, a u slučaju LEF-1 ekspresija 62,34 %, dok se stanična populacija s izrazitom ekspresijom smanjuje u slučaju TCF-1 na 3,1 %, a za LEF-1 na 1,71 %. Rezultati dobiveni za astrocitome
II također ukazuju na postupni porast udjela stanica s visokom, a pad stanica s niskom ekspresijom, gdje je taj obrazac za TCF-1 linearno pada odnosno raste kroz porast stupnja malignosti. Izraženost LEF-1 pokazuje eksponencijalni porast broja stanica s izrazitom ekspresijom i najniži udio stanica s niskom ili bez ekspresije upravu u gradusu II, gdje gradus I i III imaju podjednak postotak stanica s niskom ekspresijom. Astrocitomi gradusa I i II su spororastući, slabo agresivni tumori, dok je gradus III maligni tumor karakteriziran visokim proliferacijskim indeksom. Pojašnjenje aberantne aktivnosti LEF-1 odnosno TCF-1 u i njihove interakciju u pacijenata s astrocitomom je još uvijek nedovoljno istraženo.

Postoji mali broj znanstvenih radova (Sareddy et al.- 2009. ; Sareddy et al.- 2012.) koji se odnose na ulogu signalnog puta Wnt u ljudskim astrocitomima. Sareddy et aladnici (2009.) su istraživali LEF-1 i TCF-4 i pokazali da su oba transkripcijska faktora bila pojačano eksprimirana i pozitivno korelirala sa stupnjem histološke malignosti astrocitoma. Ovaj je rezultat u s skladu s našim nalazima, iako je istraživana kombinacija TCF/LEF različita od naše. Iako naši rezultati s TCF-1 i LEF-1 podupiru razmišljanje da svi članovi obitelji transkripcijskih čimbenika TCF/LEF imaju podudarnu ulogu omogućujući jednom članu ove obitelji obavljanje funkcije nekog drugog člana, dokazano je da ovo nije točno. Pokazano je da je ekspresijski obrazac TCF/LEF različit u zdravim stanicama debelog crijeva čovjeka u usporedbi s tkivom zahvaćenim tumorom. Kao primjer, u normalnom debelom crijevu TCF-1 i TCF-4 su eksprimirani, a LEF-1 i TCF-3 nisu (Najdi et al.- 2011.). Kod tumora debelog crijeva TCF-4 je eksprimiran u izoformi s 2 DNA vezujuće domene, dok se ekspresija TCF-1 mijenja, on se pojavljuje kao drukčija izoforma koja omogućuje maksimalno vezivanje β-katenina i onkogeni efekt. Napravljeno je nekoliko istraživanja s ciljem identifikacije molekula koje interferiraju s β-katenin i TCF/LEF jezgrinog kompleksa. Emami et aladnici (2004.) su otkrili molekulu ICG-001, za koju se pokazalo da se specifično veže za CBP i inhibira njegovu interakciju s β-kateninom. ICG-001 efikasno reducira rast stanica kolorektalnog karcinoma i inducira apoptozu. Poznato je da CBP funkcionira kao koaktivator širokog spektra transkripcijskih faktora, a specifičnost i klinička korisnost ICG-001 ostaje još nerazjašnjena (Shitashige et al.- 2008.). Uzimajući u obzir činjenicu da β-katenin nakon translokacije u jezgru

ulazi u interakciju s obitelji transkripcijskih čimbenika TCF/LEF (Daniels i Weis - 2005.), definitivno je zanimljivo pratiti i ekspresijske obrasce i lokalizaciju βkatenina. Pećina Šlaus et aladnici (2010.) pokazali su na studiji 72 neuroepitelna tumora mozga, od čega su 79 % bili astrocitomi, povišenu ekspresiju β-katenina u 51,1 % ispitanih uzoraka.

Štoviše, akumulacija β-katenina u jezgri je pronađena u 59,4 % uzoraka, od čega kod astrocitoma 33,3 %. Istraživanje Schülea et aladnika (2012.) pokazuje kako ekspresija β-katenina značajno korelira s višim astrocitomskim gradusom SZO, dok Western blot analize napravljene od Sareddyja et aladnika (2012.) pokazuju kako stupanj izražaja β-katenina progresivno raste od niskog gradusa (II) do visokog gradusa (III,IV) astrocitoma.. Naša istraživanja po prvi put pokazuju pozitivne korelacije razine ekspresije TCF-1 i LEF-1 u astrocitomima. Bazirajući se na našim rezultatima, možemo jasno zaključiti da su astrocitomi tumori s povišenom razinom ekspresije transkripcijskih čimbenika TCF-1 i LEF-1 uključenih u signalni put Wnt, s posebnim osvrtom na TCF-1 čija je ekspresija pravilnija i izraženija u većem dijelu tumorskih uzoraka. Sukladno našim rezultatima i istraživanjima koja pokazuju mogućnost ciljane terapije postoji nada za mogući razvoj terapije kojoj bi ciljne molekule bile upravo proteini iz obitelji transkripcijskih faktora TCF/LEF (Shitashige et al.- 2008.).

9. ZAKLJUČCI

1. U ukupnom uzorku koji smo analizirali čimbenici transkripcije TCF-1 i LEF-1 izraženi su i lokalizirani u jezgrama stanica astrocitoma.

2. Izraženost ovih proteina međusobno se ne isključuje, nego naprotiv izraženost oba proteina prisutna je u našem uzorku.

3. Razine ekspresije TCF-1 bilježe porast, u kategorijama jake izraženosti i umjerene izraženosti ovog proteina, s porastom gradusa astrocitoma. Porast je u skladu s našim očekivanjima i pretpostavkama.

4. Razine ekspresije LEF-1 kategoriji jake ekspresije bilježe porast ekspresije, dok postotak stanica sa slabom ili nedostatkom ekspresije pada od gradusa I do III.

5. Naši rezultati upućuju da dolazi do aktivacije signalnog puta Wnt u tumorima mozga astrocitoma čovjeka.

10. ZAHVALE

Zahvaljujem prof. dr. sc. Nives Pećina Šlaus koja mi je omogućila izradu ovoga rada.

Također se zahvaljujem Zavodu za patologiju "Ljudevit Jurak", Kliničkog bolničkog centra "Sestre milosrdnice", Zagreb, Hrvatska na donaciji materijala, kojim je učinjen laboratorijski dio ovoga istraživanja.

11. LITERATURA

1. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. Beta-catenin is a target of the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J. 1997*;16:3797-3804

2. Adamy L, Chouery E, Megarbane H, Mroueh S, Delague V, Nicolas E, Belguith H, de Mazancourt P, Megarbane A. Mutation in WNT10A is associated with an autosomal recessive ectodermal dysplasia: the odonto-onycho-dermal dysplasia. *Am J Hum Genet. 2007*;81:821-8

3. Arce L, Yokoyama NN, Walterman ML. Diversity of LEF/TCF action in development and

   disease. *Oncogene 2006*;25:7492:504

4. Atcha FA, Munguia JE, Li TW, Hovanes K, Waterman ML. A new beta-catenindependent activation domain in T cell factor. *J Biol Chem. 2003*;278:16169-75

5. Biason-Lauber A, Konrad D, Navratil F, Schoenle EJ. A WNT4 mutation associated with Müllerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *N Engl J Med. 2004*;19:792-8

6. Cadigan KM. Wnt-beta-catenin signaling. *Curr Biol 2008*;18:943-7
7. Carlsson P, Waterman ML, Jones KA. The hLEF/TCF-1 alpha HMG protein contains a context-dependent transcriptional activation domain that induces the TCR alpha enhancer in T cells. *Genes Dev. 1993*;7:2418-30
8. Christodoulides C, Scarda A, Granzotto M, Milan G, Dalla Nora E, Keogh J, De Pergola G, Stirling H, Pannacciulli N, Sethi JK, Federspil G, Vidal-Puig A, Farooqi IS, O'Rahilly S, Vettor R. WNT10B mutations in human obesity. *Diabetologia 2006*;49:678-84
9. Clevers H. Wnt/β-catenin signaling in development and disease. *Cell 2006*;3:469-480
10. Clevers H, van de Wetering M. TCF/LEF factor earn their wings. *Trends Genet. 1997*;13:485-9

11. Coyle-Rink J, Del Valle L, Sweet T, Khalili K, Amini S. Development expression of Wnt signaling factors in mouse brain. *Cancer Biol Ther. 2002*;1:640-5
12. Daniels DL, Weis WI. β-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors form Tcf/Lef in Wnt-mediated trancription activation. *Nat Struct Mol Biol 2005*;12:364371.

13. Emami KH, Nguyen C, Ma H *et al*. A small molecule inhibitor of β-catenin/CREBbinding protein transcription. *Proc Natl Acad Sci USA 2004*;101:12 682–7
14. Fahiminiya S, Majewski J, Mort J, Moffatt P, Glorieux FH, Rauch F. Mutations in WNT1 are a cause of osteogenesis imperfecta. *J Med Genet. 2013*;50:345-348
15. Gearhart J, Pashos EE, Prasad MK. Pluripotency redux--advances in stem-cell research. *N Engl J Med. 2007*;357:1469-72
16. Giese K, Amsterdam A, Grosschedl R. DNA-binding properties of the HMG domain of the lymphoid-specific transcriptional regulator LEF-1. *Genes Dev. 1991*;5:2567-78
17. Giese K, Cox J, Grosschedl R. Assembly and function of TCR alpha enhancer complexs is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes Dev. 1995*;9:995-1008
18. Graham TA, Weaver C, Mao F, Kimelman D, Xu W. Crystal structure od a betacatenin/TCF complexs. *Cell. 2000*;103:885-96
19. Haftek M, Hansen MU, Kaiser HW, Kreysel HW, Schmitt D. Interkeratinocyte adherens junctions: immunocytochemical visualization of cell-cell junctional structures, distinct from desmosomes, in human epidermis. *J invest Dermatol. 1996*;106:498-504
20. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science 1998*;281:1509-12
21. Hecht A, Stemmler MP. Identification of a promoter-specific transcriptional activation domain at the C terminus of the Wnt effector protein T-cell factor 4. *J Biol Chem. 2003*;278:3776-85
22. Hovanes K, Li TW, Waterman ML. The human LEF-1 gene contains a promoter preferentially active in lymphocytes and encodes multiple isoforms derived from alternative splicing. *Nuclei Acids Res. 2000*;28:1994-2003
23. Hurlstone A, Clevers H. T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *EMBO J. 2002*;21:2303-11
24. Idogawa M, Masutani M, Shitashige M. *et al*. Ku70 and poly (ADP-ribose) polymerase-1 competitively regulate β-catenin and T-cell factor-4-mediated gene transactivation: possible linkage of DNA damage recognition and Wnt signaling.

Cancer Res 2007; 67: 911–18.

25. Idogawa M, Yamada T, Honda K, Sato S, Imai K, Hirohashi S. Poly(ADPribose) polymerase-1 is a component of the oncogenic T-cell factor-4/β- catenin complex. *Gastroenterology 2005*; 128: 1919–36.
26. Kanazawa A, Tsukada S, Sekine A, Tsunoda T, Takahashi A, Kashiwagi A, Tanaka Y, Babazono T, Matsuda M, Kaku K, Iwamoto Y, Kawamori R, Kikkawa R,Nakamura Y, Maeda S. Association of the gene encoding wingless-type mammary tumor virus integration-site family member 5B (WNT5B) with type 2 diabetes. *Am J Hum Genet. 2004*;75:832-43
27. Klaus A, Birchmeier W. Wnt signaling and its impact on development and cancer. *Nature 2008*;8:387-98
28. Lee JM, Kim JY, Cho KW, Lee MJ, Cho SW, Kwak S, Cai J, Jung HS. Wnt11/Fgfr1b cross-talk modulates the fate of cells in palate development. *Dev Biol. 2008*;314:34150
29. Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Désiré L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR, Gage FH. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature 2005*;437:1370–5
30. Liu Y, Yan W, Zhang W, et al. MiR-218 reverses high invasiveness of glioblastoma cells by targeting the oncogenic transcription factor LEF1. *Oncol Rep 2012*;28:10131021.
31. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2004*;20:781–810
32. Malbon CC. Frizzleds:new members of the superfamily of G-protein-coupled receptors. *Front Biosci 2004*;9:1048-1058
33. Mandel H, Shemer R, Borochowitz ZU, Okopnik M, Knopf C, Indelman M, Drugan A, Tiosano D, Gershoni-Baruch R, Choder M, Sprecher E. SERKAL syndrome: an autosomal-recessive disorder caused by a loss-of-function mutation in WNT4. *Am J Hum Genet. 2008*;82:39-47
34. Miravet S, Piedra J, Miró F, Itarte E, García de Herreros A, Duñach M. The transcriptional factor Tcf-4 contains different binding sites for beta-catenin and plakoglobin. *J Biol Chem. 2002*;277:1884-91

35. Nagy II, Railo A, Rapila R, Hast T, Sormunen R, Tavi P, Räsänen J, Vainio SJ. Wnt-11 signalling controls ventricular myocardium development by patterning N-cadherin and β-catenin expression. *Cardiovascular res. 2010*;85:100-109
36. Najdi R, Holcombe RF, Waterman ML. Wnt signaling and colon carcinogenesis:Beyond APC. *J Carcinog 2011*;10:5
37. Niemann S, Zhao C, Pascu F, Stahl U, Aulepp U, Niswander L, Weber JL, Müller U. Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *Am J Hum Genet. 2004*;74:558-63
38. Nikuševa Martić T, Pećina-Šlaus N, Kušec V, et al. Changes of AXIN-1 and β-catenin in neuroepithelial brain tumors. *Pathol Oncol Res 2010*;16:75-79.
39. Nusse R, van Ooyen A, Cox D., Funk YK, Varmus H. Mode of proviral activation od a putative mammary oncogene (int-1) on mouse chromosome 15. *Nature 1984*;307:131-6
40. Rampazzo E, Persano L, Pistollato F, Moro E, Frasson C, Porazzi P, Della Puppa A, Bresolin S, Battilana G, Indraccolo S, Te Kronnie G, Argenton F, Tiso N, Basso G. Wnt activation promotes neuronal differentiation of glioblastoma. *Cell Death Dis. 2013*;4:500-32
41. Ravindranath A, O'Connel A, Johnston PG, et al. The role of LEF/TCF factors in neoplastic transformation. *Current Mol Med 2008*;8:38-50.
42. Roose J, Molenaar M, Peterson J, Hurenkamp J, Brantjes H, Moerer P, van de Wetering M, Destrée O, Clevers H. The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature 1998*;395:608-12
43. Sareddy GR, Geeviman K, Panigrahi M, et al. Increased beta-catenin/Tcf signaling in pilocytic astrocytomas: a comparative study to distinguish pilocytic astrocitomas from low-grade diffuse astrocytomas. *Neurochem Res 2012*;37:96-104.
44. Sareddy GR, Panigrahi M, Challa S, et al. Activation of Wnt/b-catenin/Tcf signaling pathways in human astrocytomas. *Neurochem Int 2009*;55:307-317.
45. Schüle R, Dictus C, Campos B, et al. Potential canonical Wnt pathway activation in high-grade astrocytomas. *ScientificWorld Journal. 2012*;2012:697313
46. Shitashige M,Hirohashi S,Yamada T. Wnt signaling inside the nucleus. *Cancer Sci. 2008*;99:631-637

47. Ugur SA, Tolun A. Homozygous WNT10b mutation and complex inheritance in SplitHand/Foot Malformation. *Hum Mol Genet. 2008*;17:2644-53

48. van de Wetering M, Clevers H. Sequence-specific interaction of the HMG box proteins TCF-1 and SRY occurs within the minor groove of a Watson-Crick double helix. *EMBO J. 1992*;11:3039-44

49. Waltzer L, Bienz M. *Drosophila* CBP represses the transcription factor TCF to antagonize Wingless signalling. *Nature 1998*;395:521-5

50. Zhurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze'ev A. Differential mechanisms od LEF/TCF family - dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin. *Mol Cell Biol. 2000*;20:4238-52

12. ŽIVOTOPIS

Leon Marković

Rođen sam u Banja Luci 23. rujna 1991. Pohađao sam Gimnaziju u Požegi koju sam završio 2010. Iste godine upisao sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2011. dobio sam Dekanovu nagradu za najboljeg studenta prve godine. 2013. godine nagrađen sam Dekanovom nagradom za znanstveni rad na temu „Čimbenici transkripcije TCF-1 i LEF-1 uključeni u signalni put Wnt izrađeni su u tumorima mozga astrocitomima“. Trenutno sam student 6. godine Medicinskog fakulteta. U projektu „Signalni put Wnt“ sudjelujem od akademske godine 2011/2012. Aktivno sam sudjelovao kao ko-autor na 2. konferenciji s međunarodnim sudjelovanjem: HDIR-2 : „Od bazičnih istraživanja do klinike.“