

In silico analiza molekularnih biljega epitelno-mezenhimske tranzicije u gliomima

Škripek, Željko

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:909438>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Željko Škripek

***In silico* analiza molekularnih biljega epitelno-mezenhimske
tranzicije u gliomima**

Diplomski rad



Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Nives Pećina-Šlaus i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2022./2023.

SADRŽAJ

SAŽETAK

SUMMARY

1. UVOD	1
1.1 Epitelno-mezenhimska tranzicija	1
1.1.1 Hibridna (djelomična) EMT	2
1.2 Gliomi	4
1.3 Molekularni biljezi	5
1.3.1 Molekularni biljezi epitelnog fenotipa	5
1.3.2 Molekularni biljezi mezenhinskog fenotipa	6
2. HIPOTEZA	10
3. CILJEVI RADA	11
4. MATERIJALI I METODE	12
4.1 cBioPortal	12
4.2 Analizirane studije	12
4.3 Statistička analiza	15
5. REZULTATI	15
5.1 Zbir promjena prema tipu glioma	15
5.2 Promjene gena <i>CDH1</i>	17
5.3 Promjene gena <i>CDH2</i>	18
5.4 Promjene gena <i>CTNNB1</i>	19
5.5 Promjene gena <i>LEF1</i>	20
5.6 Promjene gena <i>NOTCH1</i>	21
5.7 Promjene gena <i>SNAI1</i>	22
5.8 Promjene gena <i>SNAI2</i>	23
5.9 Promjene gena <i>SOX2</i>	24
5.10 Promjene gena <i>TJP1/ZO-1</i>	25
5.11 Promjene gena <i>TWIST1</i>	26
5.12 Promjene gena <i>VIM</i>	27
5.13 Promjene gena <i>ZEB1</i>	28
5.14 Promjene gena <i>ZEB2</i>	29
5.15 Ekspresija mRNA	30
5.16 Zbirni rezultati promjena biljega epitelnog i mezenhinskog fenotipa	30
6. RASPRAVA	34
7. ZAKLJUČCI	39
8. ZAHVALE	40
9. LITERATURA	41
10. ŽIVOTOPIS	49

SAŽETAK

In silico analiza molekularnih biljega epitelno-mezenhimske tranzicije u gliomima

Željko Škripek

CILJ: Prikupiti podatke o mutacijama, amplifikacijama i delecijama gena uključenih u EMT te pridružiti učestalost genetičkih promjena s gliomima nižih (LGG) i viših gradusa (HGG).

MATERIJALI I METODE: Retrospektivno prikupljeni podaci 13 odabranih gena u gliomima različitih patohistoloških tipova i gradusa korištenjem podataka u bazi cBioPortal. Analiza je uključivala mutacije pojedinog gena, promjene u broju kopija (CNA - *copy number alteration*) te razine transkripta (mRNA).

REZULTATI: U istraživanju su obrađeni podaci od 3497 uzoraka. Samo glioblastomi i difuzni gliomi imaju promjene na svih 13 analiziranih gena. Anaplastični oligodendrogliom i anaplastični astrocitom imaju promjene u 46,15% analiziranih gena, oligodendrogliom u 23,08%, a oligoastrocitom u 15,38% analiziranih gena. Gen *NOTCH1* bio je statistički značajno češće promijenjen u odnosu na gene *CDH1*, *CTNNB1* i *ZEB1* ($p < 0,05$).

ZAKLJUČAK: Iz analize zaključujemo da su geni sudionici EMT promijenjeni u gliomima različitih gradusa. Najčešće mutirani i amplificirani bili su geni *NOTCH1* i *SOX2*. Dodatna istraživanja i validacija rezultata dobivenih iz cBioPortal baze potrebna su kako bi potvrdila spoznaje koje je ovaj rad donio.

Ključne riječi: gliom, biljeg, gradus, EMT, cBioPortal

SUMMARY

In silico analysis of molecular markers of epithelial to mesenchymal transition in gliomas

Željko Škripek

OBJECTIVES: Collect data of mutations, amplifications and deletions of genes involved in EMT and associate the frequency of genetic changes with low-grade (LGG) and high-grade (HGG) gliomas.

MATERIALS AND METHODS: Retrospectively collected data of 13 selected genes in gliomas of different pathohistological types and grades using data in the cBioPortal database. The analysis included mutations of individual genes, changes in the copy number alteration (CNA) and transcript levels (mRNA).

RESULTS: The research processed data from 3497 samples. Only glioblastoma and diffuse glioma have changes in all 13 analyzed genes. Anaplastic oligodendroglioma and anaplastic astrocytoma have changes in 46.15% of the analyzed genes, oligodendroglioma in 23.08% and oligoastrocytoma have changes in 15.38% of the analyzed genes. *NOTCH1* gene was statistically more frequently changed compared to the *CDH1*, *CTNNB1* and *ZEB1* genes ($p < 0,05$).

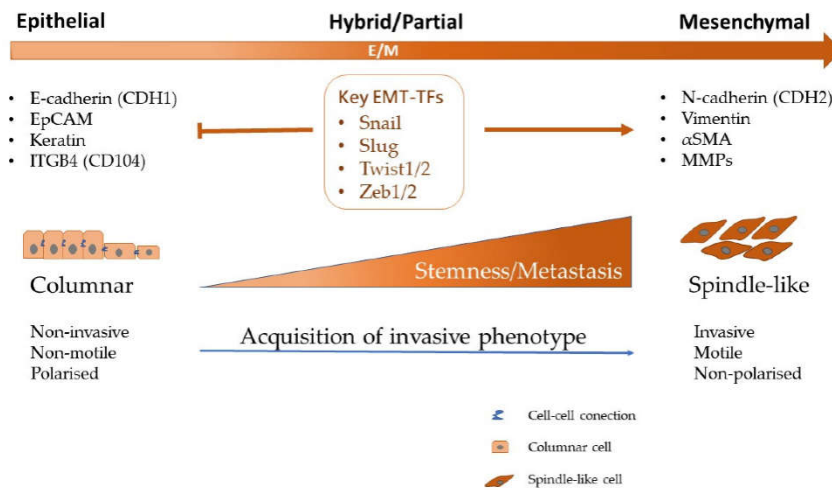
CONCLUSION: From the analysis, we conclude that genes involved in EMT are changed in gliomas of different grades. The most frequently mutated and amplified genes were *NOTCH1* and *SOX2*. Additional research and validation of the results obtained from the cBioPortal database are needed to confirm the knowledge this paper has brought.

Key words: glioma, marker, grade, EMT, cBioPortal

1. UVOD

1.1 Epitelno-mezenhimska tranzicija

Epitelno-mezenhimska tranzicija (EMT) molekularni je program kojim stanica dobiva migratorne sposobnosti. Proces epitelno-mezenhimske tranzicije je ključan za embrionalnu morfogenezu. Stanice koje prolaze tranziciju gube epitelne karakteristike i integritet, a dobivaju mezenhimski fenotip [1]. EMT se normalno odvija tijekom razvoja organizma uključujući gastrulaciju i neurulaciju. Treba napomenuti da se tijekom embrionalnih faza EMT izmjenjuje s mezenhimsko-epitelnom tranzicijom (MET), obrnutim procesom kojim stanice koje su došle na ciljnu destinaciju ponovo zadobivaju epitelni fenotip i molekularne karakteristike koje povezuju stanice [2]. Osim u razvoju, EMT je također vrlo bitna u zacjeljivanju rana i fibrozi tkiva, ali isto tako i u procesima tumorigeneze. U tumorigenezi EMT je odgovorna za procese invazivnosti i metastaziranja tumorskih stanica [3]. U zdravom tkivu, stanice su povezane i pričvršćene jedna za drugu tijesnim spojevima, adherentnim spojevima i dezmosomima, dok su hemidezmosomima usidrene za bazalnu membranu. U tkivima tumora dolazi do preoblikovanja stanica iz nepokretnih (imobilnih) stanica u mezenhimske koje se mogu pokretati. Tipovi molekula koje su uzročno povezane s EMT-om su raznoliki, uključujući faktore transkripcije, molekule staničnih sveza, izvanstaničnog matriksa, citoskeleta, molekule uključene u epigenetske modifikacije te mikroRNA. Kod raka, istraživanja su pokazala da je EMT povezana s invazijom, metastaziranjem, ali i rezistencijom na terapiju [4-6].

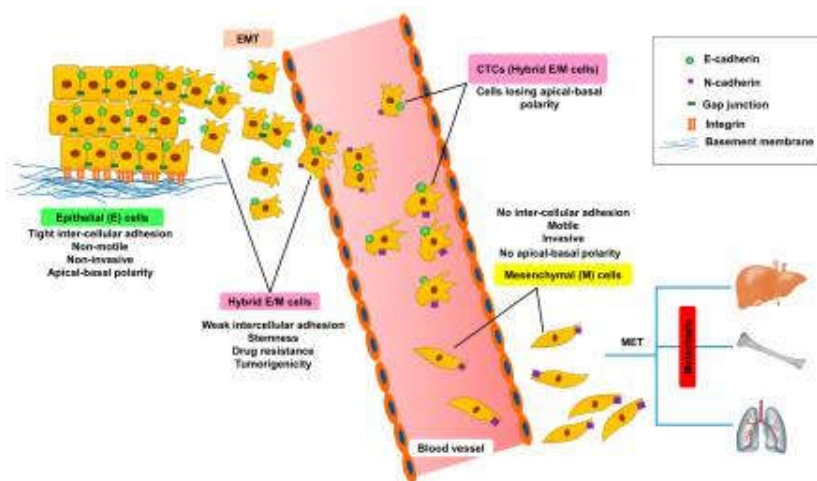


Slika 1. Prikazani su biljezi epitelnog, hibridnog i mezenhinskog fenotipa. EMT program zahtijeva aktivaciju raznih transkripcijskih faktora što dovodi do smanjene ekspresije epitelnih biljega kao što je E-kadherin i povećanja ekspresije mezenhinskih biljega kao što je N-kadherin. Preuzeto iz [7] uz dopuštenje Dr. Liang.

1.1.1 Hibridna (djelomična) EMT

Novija istraživanja pokazala su da EMT nije binaran proces, te da postoji hibridno E/M stanje povezano s povećanom staničnom plastičnošću, kolektivnom migracijom, svojstvima matičnosti i izraženijim metastatskim potencijalom [8-10]. U proteklim desetljećima većina eksperimentalnih modela definira EMT ispitivanjem ekspresije epitelnih i mezenhinskih biljega, morfoloških promjena i transkripcijskih čimbenika EMT-a (EMT-TFs) kao npr. SNAIL, TWIST1, ZEB1 i ZEB2. Epitelni biljezi uključuju E-kadherin, adhezijske molekule epitelnih stanica (EpCAM), citokeratin i okludin, dok su mezenhinski biljezi N-kadherin i vimentin. Međutim, ovaj binarni sustav nije zadovoljavajuć i ne može objasniti stvarne fenomene u kliničkom

okruženju, a sve više dokaza otkriva koncept EMT-a kao "spektra", što naglašava važnost djelomične ili "hibridne EMT (hibridni E/M)" [11]. Plastičnost hibridne EMT omogućuje stanicama raka prilagodbu na okolišni stres tijekom maligne progresije. Također tumorske stanice koje su u hibridnom statusu imaju određene mezenhimske i epitelne značajke što ih čini fleksibilnima u prilagodbi novoj tumorskoj mikrookolini. Prebacivanje programa transkripcije između epitelnih, mezenhimskih i hibridnih E/M fenotipova inducirano je različitim signalnim putevima koji su posredovani TGF- β , koštanim morfogenskim proteinom (BMP), Wnt- β -kateninom, Notch, Hedgehog, receptorskim tirozin kinazama i drugima [12]. Ti se putevi aktiviraju različitim dinamičkim podražajima iz lokalnog mikrookruženja, uključujući faktore rasta i citokine, kao i hipoksiju i kontaktima s okolnim izvanstaničnim matriksom.



Slika 2. Stanice u hibridnom E/M tranzicijskom stanju EMT. Specifični biljezi epitelnog, mezenhinskog i hibridnog fenotipa se izmjenjuju. Stanice postaju pokretne i ulaze u cirkulaciju te odlaze u sekundarna sijela. Prilagođeno prema [12].

1.2 Gliomi

Epitelno-mezenhimska tranzicija je ključni čimbenik u invaziji i migraciji stanica brojnih tumora uključujući i gliome, te je interes za proučavanjem EMT-a u gliomima znatno porastao u proteklom desetljeću [13]. Gliomi su primarni tumori koji nastaju iz moždanog parenhima tj. potječu od stanica glije. To su potporne stanice mozga i leđne moždine. U gliome spadaju astrocitomi, oligodendrogliomi, oligoastrocitomi, ependimomi i neuronski i miješani neuronsko-glijalni tumori (kao što su gangliogliomi), a najčešći gliomi su astrocitomi u koje spada i glioblastom [14].

Postoje tri vrste glija stanica: astrociti, oligodendrociti i ependimalne stanice. Tumori koji potječu iz astrocita nazivaju se astrocitomi ili glioblastomi. Tumori koji potječu iz oligodendrocita nazivaju se oligodendrogliomi, a oni koji potječu iz ependimalnih stanica nazivaju se ependimomi [15,16]. Gliomi su jedan od najčešćih intrakranijalnih tumora s karakteristikama velike agresivnosti i invazivnosti. Glijalne tumore središnjeg živčanog sustava (SŽS) razvrstavamo prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2021. godine [16]. Klasifikacija se temelji na morfološkoj sličnosti tumorskih stanica sa stanicama iz kojih tumor nastaje. Klasifikacija je obnovljena te su također u nju uključeni molekularni i genetički događaji specifični za svaki patohistološki tip tumora mozga. Gliomi se prema toj klasifikaciji dijele u četiri stupnja: gradus I čine pilocitni astrocitomi, subependimalni astrocitomi orijaških stanica; gradus II čine pleomorfni ksantoastrocitomi, oligodendrogliomi i difuzni astrocitomi; gradus III čine anaplastični astrocitomi, anaplastični oligodendrogliomi, anaplastični oligoastrocitom; i gradus IV čine glioblastomi, a upravo su glioblastomi (GMB) najčešći i najmaligniji [14]. Gliome možemo grupirati u dvije skupine, gliome niskog stupnja (engl. *low grade gliomas*,

LGG) i gliome visokog stupnja (engl. *high grade gliomas*, HGG). LGG su tumori mozga koji uglavnom pogađaju mlade odrasle osobe. Sporijeg su rasta i povezuje ih se s povoljnijom prognozom izlječenja u odnosu na gliome višeg stupnja (engl. *high grade gliomas*, HGG). Važan razlog za visoku invaziju glioma je EMT. Stanice glioma koje prolaze EMT zadobivaju mezenhimske osobine i mogućnost stanične invazije i migracije. To postižu ekspresijom EMT biljega uključujući N-kadherin, vimentin, TWIST1, SNAIL/SLUG i ZEB1/ZEB2 [13,14].

1.3 Molekularni biljezi

1.3.1 Molekularni biljezi epitelnog fenotipa

Gen *CDH1* kodira E-kadherin, transmembranski glikoprotein od 120 kDa, koji je jedan od najvažnijih proteina međustanične adhezije. Lokaliziran je na površini stanica, najčešće u epitelnim tkivima u regijama bliskog međustaničnog kontakta zvanim zonulae adherens (engl. *adherens junctions*). U čovjeka gen *CDH1* smješten je na kromosomu 16q22.1 i obuhvaća 16 egzona [17]. Gubitak ekspresije i mutacije ovoga gena pronađeni su u velikom broju karcinoma čovjeka [18-20] te mu je dodijeljena uloga tumor supresorskog gena posebice uključenog u mehanizme invazivnosti. S obzirom na smještaj i funkciju, E-kadherin je proglašen osnovnim biljegom EMT, te se smatra glavnim biljegom epitelnog fenotipa.

TJP1/ZO-1 (TJP1, *Zonula occludens-1*, ZO-1), također poznat kao protein tijesnog spoja-1, protein je stanične membrane od 220 kD koji je kod ljudi kodiran genom *TJPI*. Gen se nalazi na kromosomu 15q13.1. Ovaj gen kodira člana obitelji gvanilat

kinaze povezane s membranom (MAGUK) i djeluje kao adaptorski protein čvrstog spoja koji također regulira i adherentne spojeve. U stanici ovaj adaptorski protein povezuje membranu s aktinskim citoskeletom. Čvrsti spojevi osim što predstavljaju međustaničnu barijeru, također reguliraju kretanje iona i makromolekula između susjednih stanica [21].

1.3.2 Molekularni biljezi mezenhimskog fenotipa

Gen koji smo također odlučili pobliže istražiti u gliomima je *CDH2*. Radi se o genu koji kodira molekulu N-kadherin [22], a smješten je na kromosomu 18q12.1. U embriogenezi N-kadherin igra važnu ulogu u formaciji živčanog tkiva, a također je uključen u osteogenezu i miogenezu. Za razliku od E-kadherina, ekspresija ovog proteina karakteristična je za mezenhimski fenotip i može se naći u neuralnom, endotelnom i stromalnom tkivu ili u osteoblastima [23]. N-kadherin daje tumorskim stanicama poboljšanu sposobnost migracije i invazije [24]. N-kadherin se primarno nalazi u neuralnim tkivima i fibroblastima gdje se smatra da posreduje u manje stabilnom i dinamičnijem obliku stanično-stanične adhezije.

VIM (VIMENTIN) je gen koji se nalazi na kromosomu 10p13. Kodira intermedijarni filamentni protein tipa III koji s mikrotubulima i mikrofilamentima aktina čini citoskelet. Vimentin je odgovoran za održavanje oblika stanice i cjelovitost citoplazme, kao i stabilizaciju citoskeletnih interakcija. Uključen je u neuritogenezu i transport kolesterola, a funkcionira kao organizator niza drugih ključnih proteina uključenih u pričvršćivanje stanica, migraciju i signalizaciju [25].

Slijedeći gen koji je pridružen kasnim stadijima EMT je *SOX2* (SRY-Box Transcription Factor 2). To je gen bez introna koji se nalazi na kromosomu 3q26.33, a

kodira člana obitelji transkripcijskih faktora *high-mobility groupbox* (HMG-box , SOX) povezanih sa SRY (*Sex Determining Region-Y*) [26]. Ovi transkripcijski faktori uključeni su u regulaciju embrionalnog razvoja i određivanja sudbine stanica. Produkt gena *SOX2* potreban je za održavanje matičnih stanica u SŽS, a također regulira ekspresiju gena u želucu [25].

U radu su analizirana i tri gena koji kodiraju za transkripcijske faktore. To su *TWIST1*, *SNAIL* i *SLUG*, koji se vežu za E-box, cis regulatorni element E-kadherinskog gena i tako djeluju kao represori izraženosti *CDH1*.

Gen koji kodira transkripcijski faktor *TWIST1* smješten je na kromosomu 7q21.2. U embriogenezi igra važnu ulogu u regulaciji gastrulacije i specifikacije mezoderma. Transkripcijski je represor ekspresije E-kadherina, tako što se veže na njegovo promotorsko mjesto ili inducira *SNAIL1*. U tumorogenezi promiče kromosomsku nestabilnost, angiogenezu, invaziju, metastaziranje i rezistenciju na kemoterapiju [25]. *SNAIL* (*SNAIL1*) kodira gen *SNAIL1* koji je isto tako uključen u ovo istraživanje. Gen se nalazi na kromosomu 20q13.2, a održava mezenhimske matične stanice i nediferencirani fenotip kroz kontrolu invazivnih karakteristika te također potiče angiogenezu [25].

SLUG (*SNAIL2*) kodiran je genom *SNAIL2* koji se nalazi na kromosomu 8q11.21. Uloga mu je da inhibira diferencijaciju stanica, a to je izuzetno važno kod formiranja tkiva u embriogenezi [25].

U biljege mezenhinskog fenotipa svakako spada i gen *CTNNB1* (Catenin Beta 1) koji kodira protein beta-katenin, a nalazi se na kromosomu 3p22.1. Protein kodiran ovim genom dio je kompleksa proteina koji čine *zonulae adherens* (adherentne spojeve, AJ). AJ su neophodni za stvaranje i održavanje slojeva epitelnih stanica reguliranjem adhezije među njima. Kodirani protein također sidri aktinski citoskelet te može biti

odgovoran za prijenos signala za kontaktnu inhibiciju koji uzrokuje prestanak diobe stanica nakon što je epitelni sloj potpun [25]. Beta-katenin je uz ovu ulogu i glavna signalna molekula puta prijenosa signala Wnt, te u tumorskom tkivu njegova prekomjerna izraženost ima onkogeno svojstvo i promiče progresiju i invazivnost tumora.

Partner beta-katenina u signalnom putu Wnt je LEF1 (*Lymphoid Enhancer Binding Factor 1*) čiji se gen nalazi na kromosomu 4q25, a kodira faktor transkripcije koji pripada obitelji proteina koji dijele homologiju s HMBG-1. Protein kodiran ovim genom se može vezati na funkcionalno važno mjesto u pojačivaču TCR α , čime se postiže maksimalna aktivnost pojačivača (E α). Ovaj faktor transkripcije uključen je u Wnt signalni put i ima funkciju u diferencijaciji stanica dlake i morfogenezi folikula [25], a poznata je njegova onkogeno uloga u brojnim karcinomima čovjeka primjerice kolona i leukemijama.

NOTCH1 je jedan od četiri poznata gena koji kodiraju obitelj proteina NOTCH, skupinu receptora uključenih u signalni put Notch, a nalazi se na kromosomu 9q34.3. Proteine NOTCH karakteriziraju ponavljanja slična N-terminalnom EGF-u praćena LNR domenama koje tvore kompleks s ligandima za sprječavanje signalizacije. Signalni put Notch uključen je u procese vezane uz određivanje stanične sudbine, diferencijaciju, proliferaciju i preživljavanje [25]. Iako su studije pokazale da je signalni put Notch odgovoran za poticanje EMT i u zdravim i neoplastičnim stanicama, njegova uloga kao biljega mezenhinskog fenotipa još uvijek je kontroverzna. Posebno u gliomima, gdje do sada s aspekta uključenosti u EMT, *NOTCH1* još nije istraživana [27].

ZEB1 je gen koji kodira faktor transkripcije s motivom cinkovog prsta, a nalazi se na kromosomu 10p11.22. Kodirani protein djeluje kao supresor transkripcije. Inhibira

ekspresiju gena interleukina 2 (*IL-2*). Pojačava ili potiskuje aktivnost promotora gena *ATP1A1* ovisno o tipu stanice. Potiskuje promotor E-kadherina i inducira epitelno-mezenhimsku tranziciju (EMT) regrutiranjem SMARCA4/BRG1 [25].

ZEB2 je gen koji je smješten na kromosomu 2q22.3. Nalazi se u jezgri i funkcionira kao DNA-vezujući transkripcijski represor koji je u interakciji s aktiviranim SMAD-ovima [25]. Poznato je da su *Zeb1/2* visoko regulirani u ranom stadiju hibridne EMT te se njihova visoka razina održava u populacijama mezenhimskih stanica [28].

Ovaj rad je analizirao relevantne studije čiji podaci su dostupni u javnoj bazi cBioPortal kroz *in silico* analizu molekularnih biljega epitelno-mezenhimske tranzicije i dao usporedbu njihovih uloga u LGG i HGG.

2. HIPOTEZA

Promjene gena koji kodiraju biljege mezenhimskog fenotipa pridružene su višim gradusima glioma, a promjene gena za biljege epitelnog fenotipa nižim gradusima glioma.

3. CILJEVI RADA

1. Prikupiti podatke o mutacijama, amplifikacijama i delecijama gena uključenih u EMT.
2. Analizirati tip i učestalost promjena za svaki odabrani gen.
3. Pridružiti učestalost genetičkih promjena s gliomima nižih (LGG) i viših gradusa (HGG).

4. MATERIJALI I METODE

4.1 cBioPortal

Analiza odabranih gena u gliomima različitih patohistoloških tipova i gradusa, učinjena je korištenjem podataka u bazi cBioPortal [29]. cBioPortal je javna baza za interaktivno istraživanje višedimenzionalnih skupova podataka u genomici raka. Cilj cBioPortala je značajno smanjiti prepreke između složenih genomskih podataka i istraživačkih studija pružanjem brzog i visokokvalitetnog pristupa molekularnim profilima i kliničkim parametrima prikupljenih iz velikih projekata i eksperimentalnih studija genomike raka. Na taj način nastoje potaknuti istraživače da prevedu velike skupove podataka u biološki smisao i kliničke primjene. Ova baza omogućuje obradu podataka velikih razmjera, statističku analizu i grafički pregled promjena uočenih u tumorima čovjeka od razine gena do razine proteina. Portal podržava i pohranjuje mutacije, podatke o broju kopija DNA (engl. *copy number alteration*, CNA), podatke o ekspresiji mRNA i mikroRNA, podatke o razini proteina i fosfoproteina, podatke o metilaciji DNA te kliničke podatke.

4.2 Analizirane studije

Ovaj rad je obuhvatio osam studija u genskoj bazi cBioPortal koje su sadržavale 3497 uzoraka od kojih je 3143 pacijenata (pojedini pacijenti imali su više uzoraka). Usredotočili smo se na slijedeće gene s važnom ulogom u epitelno-mezenhimskoj tranziciji koji su pretraženi i analizirani: *CDH1*, *CDH2*, *CTNNB1*, *LEF1*, *NOTCH1*,

SNAIL1, *SNAIL2*, *SOX2*, *TJP1/ZO-1*, *TWIST1*, *VIM*, *ZEB1* i *ZEB2*. Studije kojima su geni pretraženi u *in silico* analizi su: *Diffuse Glioma* (GLASS Consortium, Nature 2019); *Glioma* (MSK, Clin Cancer Res 2019); *Low-Grade Gliomas* (UCSF, Science 2014); *Merged Cohort of LGG and GBM* (TCGA, Cell 2016); *Brain Tumor patient-derived xenografts* (PDXs), (Mayo Clinic, Clin Cancer Res 2020); *Glioblastoma* (CPTAC, Cell 2021); *Glioblastoma* (Columbia, Nat Med. 2019) i *Glioblastoma Multiforme* (TCGA, Firehose Legacy) [30,31]. Analiza je uključivala mutacije pojedinog gena, promjene u broju kopija (CNA - *copy number alteration*) te razine transkripta (mRNA). Svi podaci cBioPortala imaju iste kliničke kriterije te jednako obrađene i normalizirane podatke, što omogućuje usporednu analizu uzoraka između različitih studija. Nakon izrade virtualne studije, CNA, podaci o mutacijama pojedinog gena te ekspresije mRNA preuzeti su i ispitani kao klasična studija. Grafički prikazi analize gena izrađeni su u programu Excel 2016 (Microsoft). Podaci preuzeti iz javno dostupne baze podataka cBioPortal ne zahtijevaju etičko odobrenje. Svi pacijenti čiji su uzorci korišteni u ovoj analizi potpisali su informirani pristanak. Naša virtualna studija, izrađena u svibnju 2023., ima podatke za preuzimanje dostupne na [32]. Trenutna verzija humanog genoma koji cBioPortala koristi kao referencu je hg19/GRCh37. Podaci o RNA i DNA na portalu dobiveni su iz uzoraka tumora i susjednog normalnog tkiva korištenjem prilagodbe kompleta DNA/RNA AllPrep (QIAGEN). Patolozi su sustavno pregledavali uzorke kako bi potvrdili histopatološku dijagnozu i bilo kakve nepravilnosti u histologiji, primjenjujući kriterije najnovijeg izdanja SZO klasifikacije za svaki tip tumora. Podaci o broju kopija generirani su na čipovima Affymetrix SNP 6.0 korištenjem standardnih protokola iz Platforme za analizu genoma Instituta Broad. CNA su kontinuirane vrijednosti broja kopija gena dobivene kao razlika između broja kopija tumorskog

gena i referentnog. Normalizirane kontinuirane vrijednosti CNA obrađene su pomoću algoritma *Genomic Identification of Significant Targets in Cancer* (GISTIC 2.0), a kontinuirane vrijednosti niže od -2.0 navedene su kao homozigotne ili duboke delecije (HOMDEL), dok su vrijednosti između -2.0 i -1.0 navedene kao hemizigotne ili plitke delecije (HETLOSS). Delecija je vrsta mutacije koja uključuje gubitak jednog ili više nukleotida molekule DNA. Brisanje može uključivati gubitak bilo kojeg broja nukleotida, od jednog nukleotida do cijelog dijela kromosoma. Nasuprot tome, vrijednosti između 1,0 i 2,0 proglašene su amplifikacijama (GAIN), a više od 2,0 višestrukim amplifikacijama (AMP). Uz to, uzorci čija je kontinuirana vrijednost CNA bila između -1,0 i 1,0 proglašeni su diploidnim uzorcima koji nemaju promjene u broju kopija gena. Za podatke o razini ekspresije mRNA, preuzeto je sekvenciranje sljedeće generacije RNASeq V2 RSEM (*RNA-seq by Experimentation Maximization*). RSEM određuje ukupni RNA transkript. Podaci o ekspresiji koje je dodijelila Illumina skupno su ispravljani kako bi se ispravile varijacije platforme između GAI i HiSeq Illumina sekvencera. Dodatne korekcije su napravljene za različite centre za sekvencioniranje (*British Columbia Cancer Agency* i Sveučilište Sjeverne Karoline). Točnije, podaci RNASeq V2 u cBioPortalu odgovaraju datoteci *rsem.genes.normalized_results* iz TCGA. Podaci o ekspresiji mRNA cBioPortal izračunavaju se kao relativna ekspresija specifičnog gena u uzorku tumora u odnosu na distribuciju ekspresije gena u referentnoj (svi uzorci koji su diploidni za dotični gen) populaciji uzoraka.

4.3 Statistička analiza

Svi uzorci su statistički obrađeni prema sljedećim varijablama: patohistološka dijagnoza, učestalost i tip promjena (mutacija, CNA). Statistička analiza provedena je pomoću softvera IBM SPSS Statistics 23.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) sa značajnošću $p < 0,05$. Genske promjene analizirane su u specifičnim tipovima tumora koristeći χ^2 kvadrat test.

5. REZULTATI

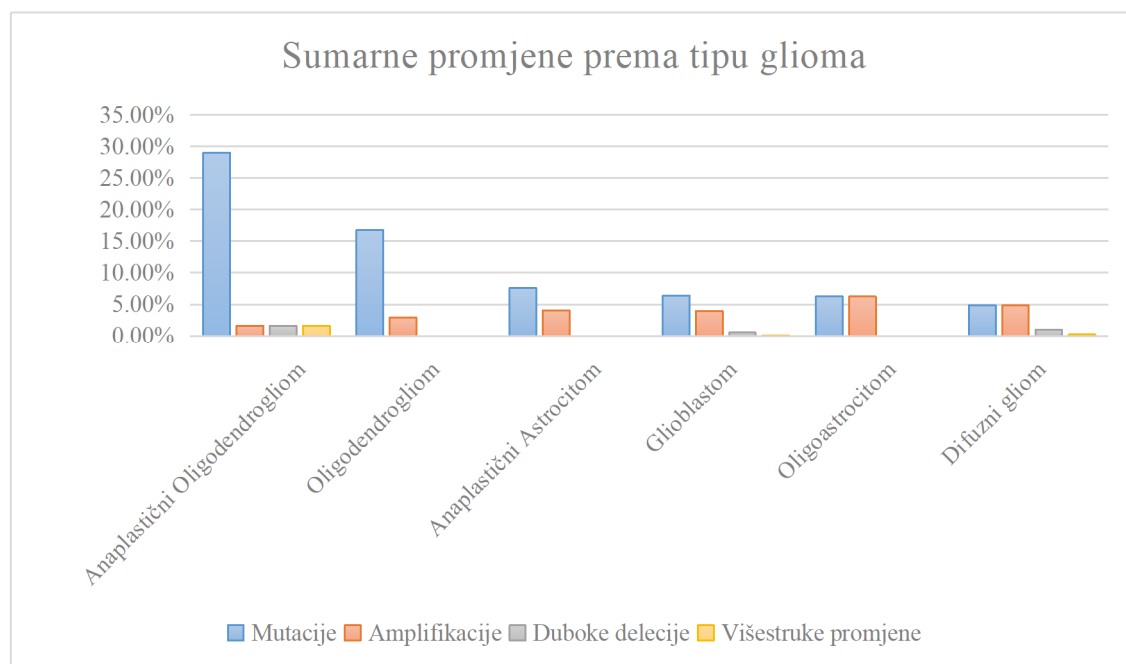
5.1 Zbir promjena prema tipu glioma

Naša prva analiza sumirala je sve genetičke promjene u pojedinom tipu glioma. Tablica 1 daje uvid u zbirni prikaz promjena 13 gena uključenih u EMT u gliomima niskog i visokog gradusa (LGG i HGG) dobivenih objedinjenom analizom osam studija. Kao što se može iščitati iz Tablice 1 i Slike 3, u visokom postotku prevladavaju mutacije u odnosu na amplifikacije i duboke delecije, dok je mali broj glioma imao višestruke promijene. Anaplastični oligodendrogliomi (gradus III) sadržavali su najveći postotak mutacija u 29,03% (18/62 slučaja). Mutacije u glioblastomu su prisutne u 6,39% (106/1659 slučaja). Kada promotrimo CNA, vidljivo je da su amplifikacije najučestalije kod oligoastrocitoma (gradus II), i čine 6,25% (1/16 slučaja), te kod difuznih glioma (gradus II), 4,91% (65/1324 slučaja). Višestrukih promjena je najmanje, a prisutne su svega u 0,23% difuznih glioma

(3/1324 slučaja), 0,12% glioblastoma (2/1659 slučaja), te 1,61% anaplastičnih oligodendroglioma (1/62 slučaja).

Tablica 1. Zbirni rezultati analize svih gena uključenih u istraživanje

Sumarne promjene prema tipu glioma	Anaplastični Oligodendrogliom	Oligodendrogliom	Anaplastični Astroцитom	Glioblastom	Oligoastroцитom	Difuzni gliom
Mutacije	29,03%	16,79%	7,58%	6,39%	6,25%	4,91%
Amplifikacije	1,61%	2,92%	4,04%	3,98%	6,25%	4,91%
Duboke delecije	1,61%			0,54%		0,98%
Višestruke promjene	1,61%			0,12%		0,23%



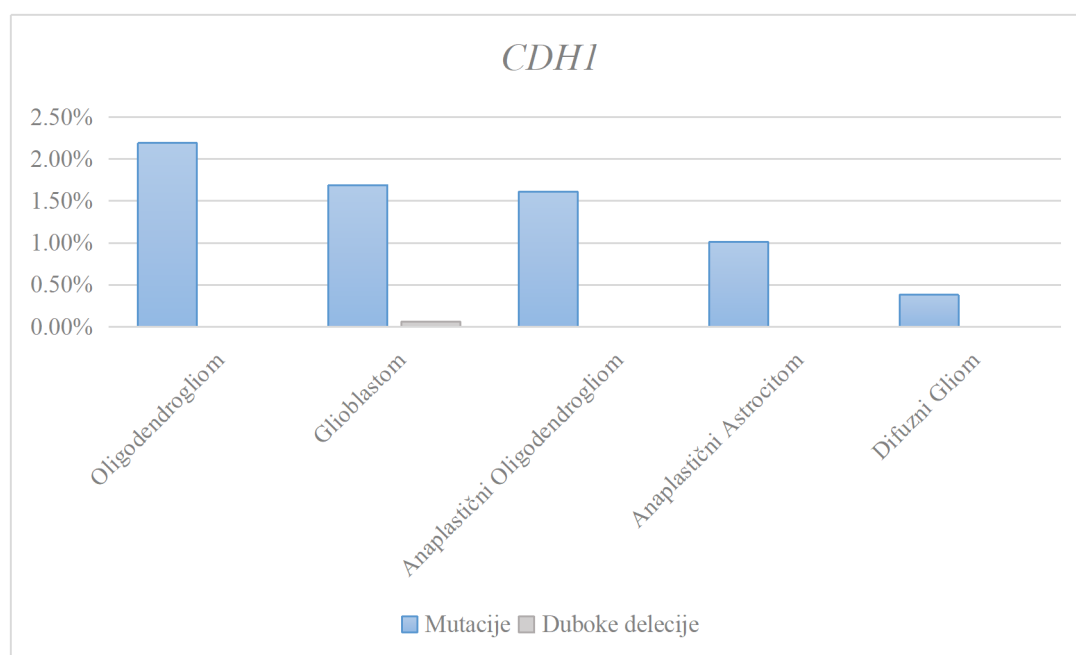
Slika 3. Grafički prikaz zbirnih rezultata analize svih gena uključenih u istraživanje

5.2 Promjene gena *CDH1*

Tablica 2 i Slika 4 prikazuju rezultate promjena gena *CDH1*. Prisutne su gotovo isključivo mutacije ovoga gena uz svega jedan slučaj duboke delecije nađene u glioblastomu (gradus IV). Gen je najčešće mutiran u oligodendrogliomima u 2,19% (3/137 slučajeva), te u glioblastomima u 1,69% (28 slučajeva). Kako gradus glioma pada tako se i smanjuje broj slučajeva u kojih je prisutna mutacija *CDH1*. Iz toga proizlazi da je najmanji broj mutacija prisutan kod difuznih glioma (gradus II) sa svega 0,38% (5/1324 slučajeva).

Tablica 2. Rezultati analize gena *CDH1*

<i>CDH1</i>	Oligodendrogliom	Glioblastom	Anaplastični Oligodendrogliom	Anaplastični Astroцитom	Difuzni Gliom
Mutacije	2,19%	1,69%	1,61%	1,01%	0,38%
Duboke delecije		0,06%			



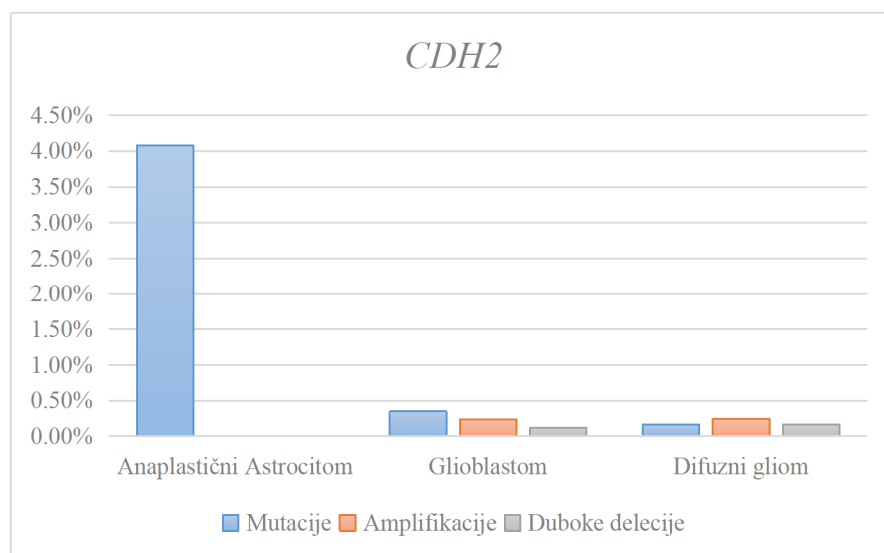
Slika 4. Grafički prikaz analize gena *CDH1*

5.3 Promjene gena *CDH2*

Rezultati analize gena *CDH2* su donekle recipročni dobivenim rezultatima za gen *CDH1*. Za razliku od *CDH1* gdje prevladavaju mutacije u glioblastomu (gradus IV), mutacije *CDH2* su u glioblastomu prisutne u svega 0,35%. *CDH2* je međutim najčešće mutiran u anaplastičnom astrocitomu (gradus III) u 4,08%. Za razliku od *CDH1* gdje amplifikacija nije bilo, ovdje su one prisutne u malom postotku kod difuznih glioma (gradus II) i glioblastoma (gradus IV). Također u ta dva gradusa su zabilježene i duboke delecije gena *CDH2*, kod difuznog glioma u 0,17%, a kod glioblastoma u 0,12%. Rezultati su prikazani u Tablici 3 i Slici 5.

Tablica 3. Rezultati analize gena *CDH2*

<i>CDH2</i>	Anaplastični Astroцитom	Glioblastom	Difuzni gliom
Mutacije	4,08%	0,35%	0,17%
Amplifikacije		0,24%	0,25%
Duboke delecije		0,12%	0,17%



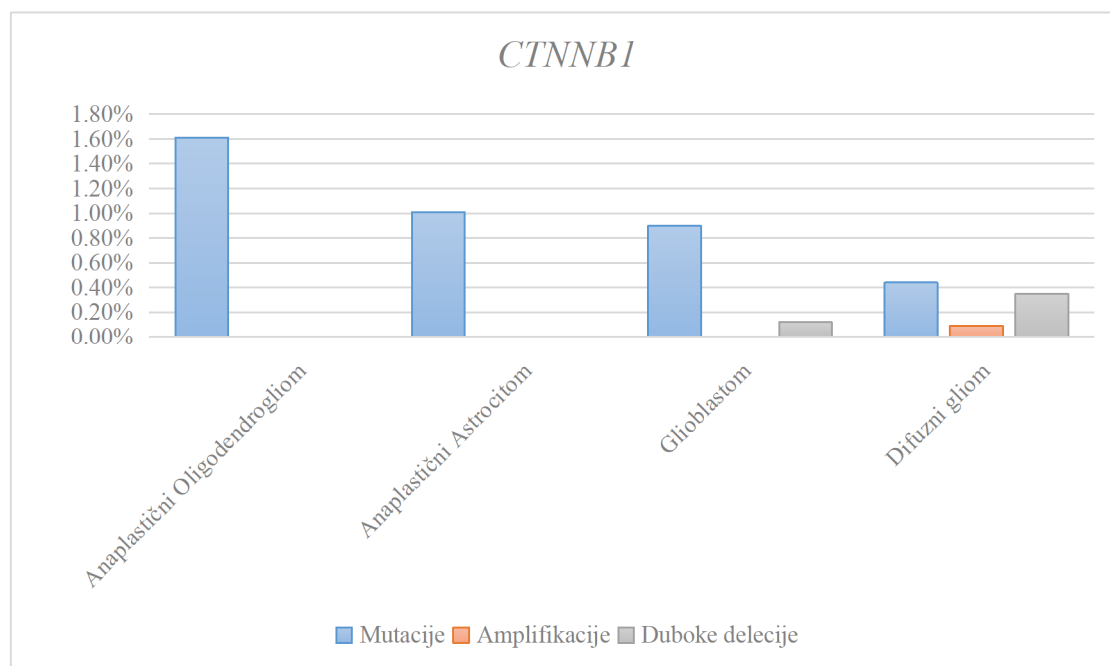
Slika 5. Grafički prikaz analize gena *CDH2*

5.4 Promjene gena *CTNNB1*

Promjene beta-katenina 1 (*CTNNB1*) koje prevladavaju su mutacije kojih je najviše nađeno u anaplastičnom oligodendrogliomu s 1,61%. Rezultati dobiveni analizom gena beta-katenin 1 pokazuju da su učestale promjene pridružene anaplastičnim gliomima (gradus III) (Tablica 4, Slika 6). Slični rezultati dobiveni su i za *CDHI* gen, gdje također prevladavaju mutacije kao dominantne promjene. Amplifikacije ovoga gena su nađene u samo jednom difuznom gliomu (gradus II) (0,09%; 1/1146 slučaja).

Tablica 4. Rezultati analize beta-katenina 1

<i>CTNNB1</i>	Anaplastični Oligodendrogliom	Anaplastični Astroцитom	Glioblastom	Difuzni gliom
Mutacije	1,61%	1,01%	0,90%	0,44%
Amplifikacije				0,09%
Duboke delecije			0,12%	0,35%



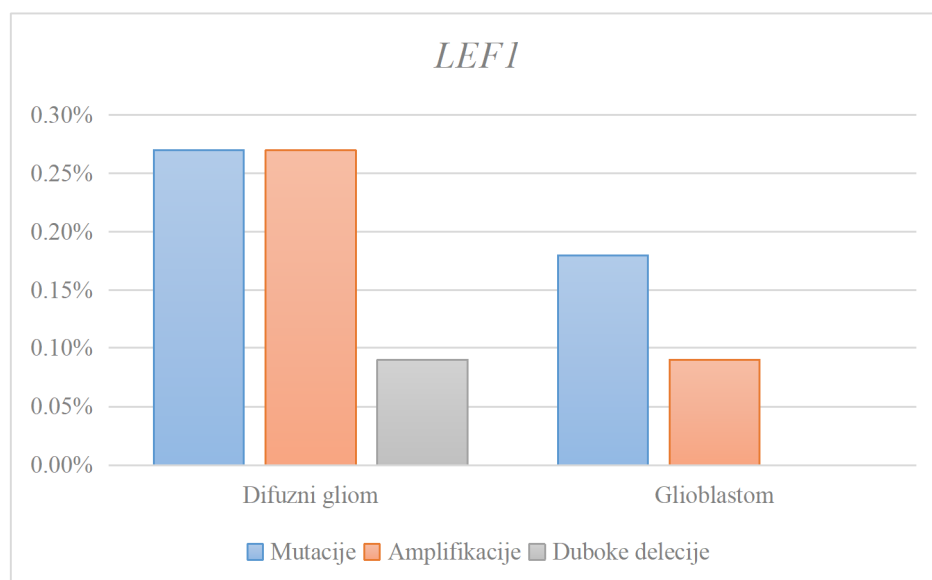
Slika 6. Grafički prikaz analize beta-katenina 1

5.5 Promjene gena *LEF1*

Rezultati dobiveni analizom promjena gena *LEF1* također prikazuju najveću učestalost mutacija (Tablica 5). Gen je u najvećem postotku promijenjen u difuznom gliomu (gradus II). Mutacije su prisutne u 0,27%. Isto tako, amplifikacije su nešto učestalije kod difuznih glioma (gradus II) u 0,27% u odnosu na 0,09% kod glioblastoma. Također je zabilježen i 1 slučaj difuznog glioma (0,09%) s dubokom delecijom ovog gena (Slika 7).

Tablica 5. Rezultati analize gena *LEF1*

<i>LEF1</i>	Difuzni gliom	Glioblastom
Mutacije	0,27%	0,18%
Amplifikacije	0,27%	0,09%
Duboke delecije	0,09%	



Slika 7. Grafički prikaz analize gena *LEF1*

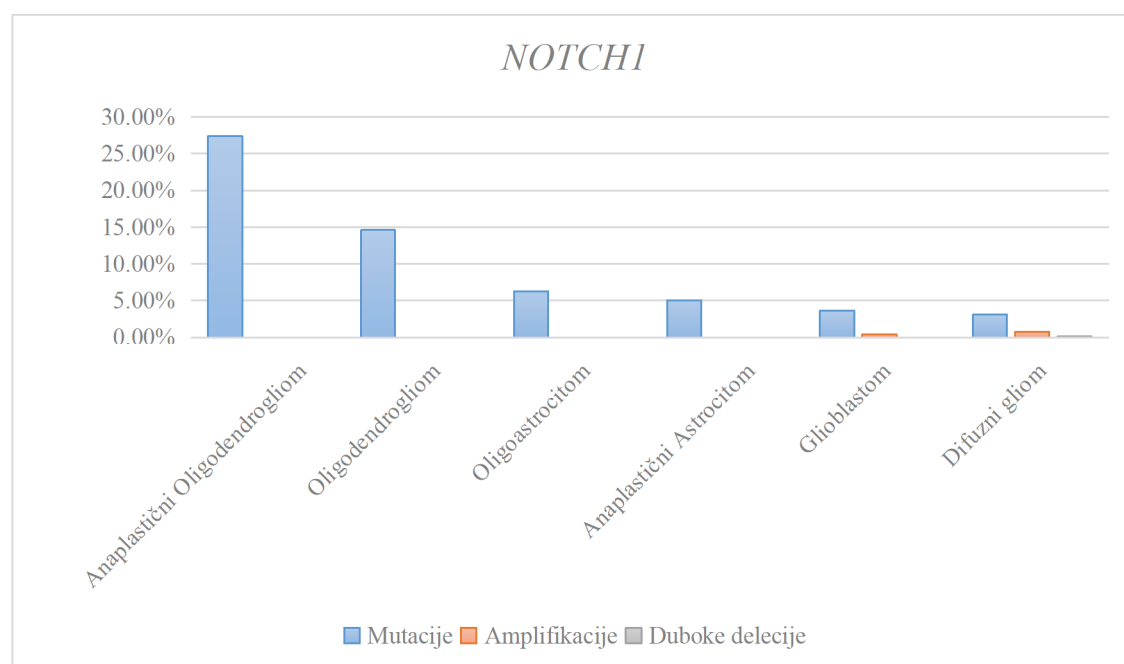
5.6 Promjene gena *NOTCH1*

NOTCH1 je slijedeći gen koji je uključen u analizu. Dobiveni rezultati ukazuju kako je gen najčešće mutiran, a amplifikacije i duboke delecije su prisutne iznimno rijetko. Najveći broj mutacija je registriran kod anaplastičnog oligodendroglioma (gradus III) u 27,42% (17 slučajeva). Velik broj mutacija je nađen i u glioblastomima (gradus IV) (60 slučajeva) (3,62%), dok su amplifikacije bile zastupljene u 0,42% (7 slučajeva).

Rezultati promjena *NOTCH1* prikazani su u Tablici 6 i Slici 8.

Tablica 6. Rezultati analize gena *NOTCH1*

<i>NOTCH1</i>	Anaplastični Oligodendrogliom	Oligodendrogliom	Oligoastrocitom	Anaplastični Astrocitom	Glioblastom	Difuzni gliom
Mutacije	27,42%	14,60%	6,25%	5,05%	3,62%	3,09%
Amplifikacije					0,42%	0,76%
Duboke delecije						0,15%



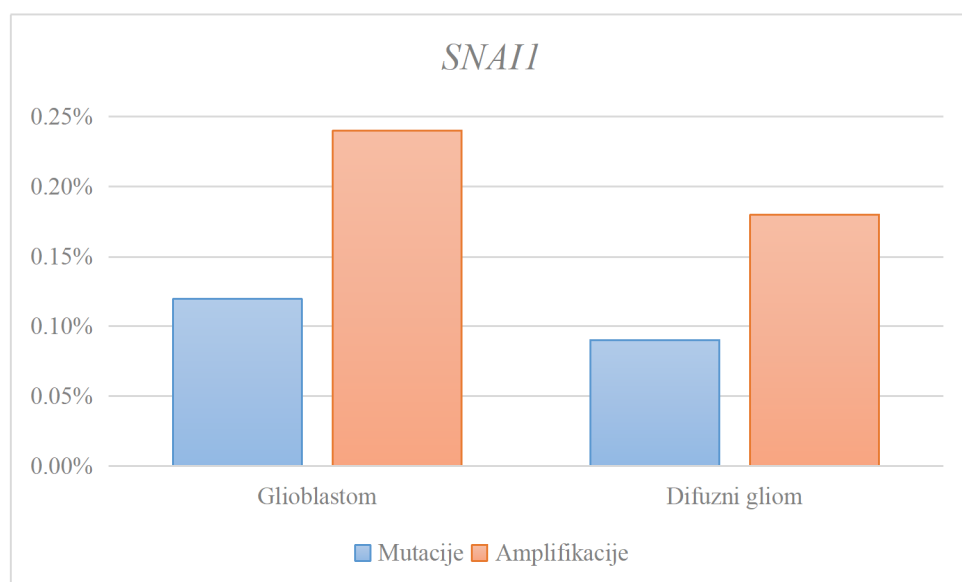
Slika 8. Grafički prikaz analize gena *NOTCH1*

5.7 Promjene gena *SNAIL*

Interesantni rezultati su dobiveni analizom gena *SNAIL*. Naime, za razliku od prethodnih gena gdje su prevladavale mutacije, u ovom slučaju su najučestalije bile amplifikacije gena (Tablica 7). Kada se usporede HGG i LGG, promjene gena su češće u visokom gradusu tj glioblastomu (gradus IV) u odnosu na difuzne gliome (gradus II). Mutacije ovoga gena u glioblastomu su zabilježene u 0,12%, a u difuznom gliomu su bile u svega 0,09%. Amplifikacije gena *SNAIL* u glioblastomima se javljaju u 0,24% (2 slučaja), a u difuznim gliomima u 0,18% (2 slučaja) (Slika 9).

Tablica 7. Rezultati analize gena *SNAIL*

<i>SNAIL</i>	Glioblastom	Difuzni gliom
Mutacije	0,12%	0,09%
Amplifikacije	0,24%	0,18%



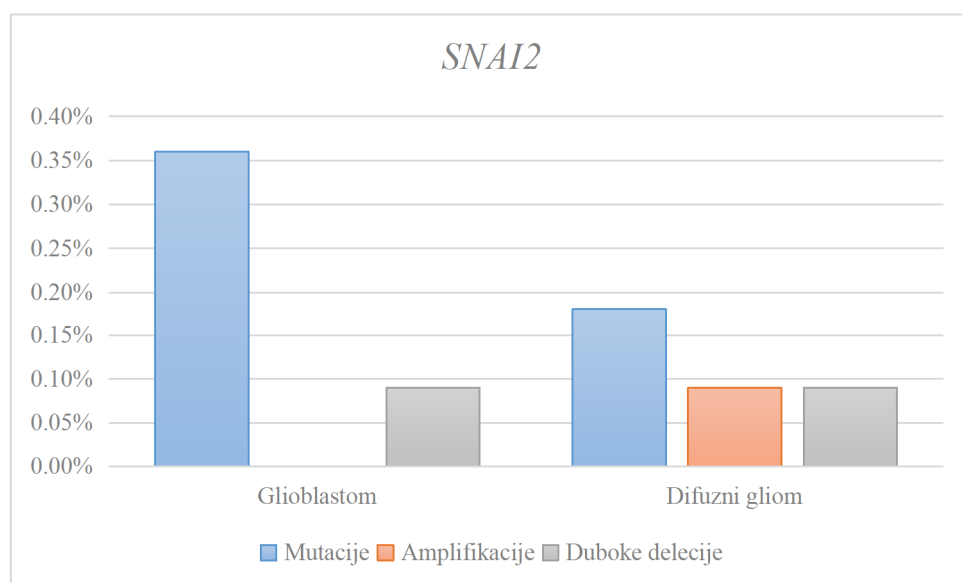
Slika 9. Grafički prikaz analize gena *SNAIL*

5.8 Promjene gena *SNAI2*

Slijedeći gen uključen u analizu je transkripcijski represor *SNAI2*. Kao i *SNAI1*, promjene u genu su zabilježene samo kod glioblastoma (gradus IV) i difuznih glioma (gradus II). No, za razliku od *SNAI1*, gdje prevladavaju amplifikacije, ovdje su najučestalije mutacije. Gen je češće mutiran u glioblastomu u odnosu na difuzne gliome i to u 0,36% (4 slučaja). Za razliku od glioblastoma, gen *SNAI2* je mutiran u 0,18% difuznih glioma (2 slučaja). Ono što je također drugačije u odnosu na *SNAI1* je prisutvo dubokih delecija gena *SNAI2* u glioblastomu (1 slučaj) i difuznom gliomu (1 slučaj) (Tablica 8, Slika 10).

Tablica 8. Rezultati analize gena *SNAI2*

<i>SNAI2</i>	Glioblastom	Difuzni gliom
Mutacije	0,36%	0,18%
Amplifikacije		0,09%
Duboke delecije	0,09%	0,09%



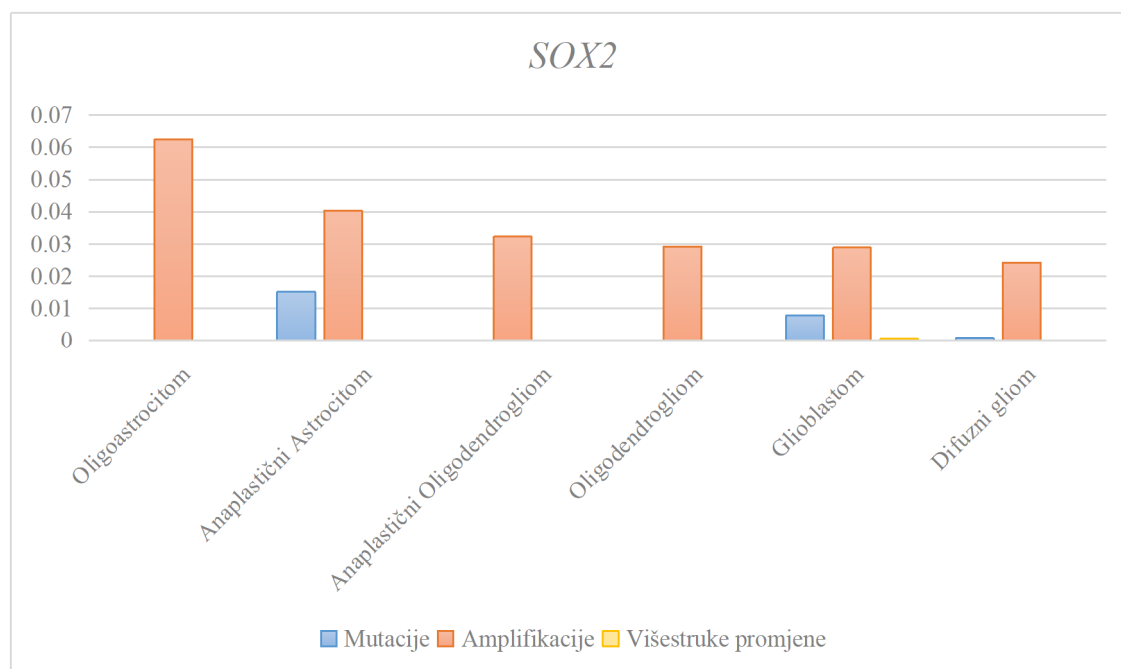
Slika 10. Grafički prikaz analize gena *SNAI2*

5.9 Promjene gena *SOX2*

Rezultati analize gena *SOX2* vrlo su slični rezultatima dobivenim analizom gena *SNAI1*, obzirom da su u oba gena najučestalije promjene amplifikacije (Tablica 9). Gen je najčešće amplificiran u gradusima II i III, u 6,25% oligoastrocitoma (gradus II) i 4,04% (8 slučajeva) anaplastičnih astrocitoma (gradus III). Jedan slučaj glioblastoma (gradus IV) pokazao je višestruke promjene gena *SOX2* (0,06%). Mutacije *SOX2* prisutne su u 0,78% glioblastoma (13 slučajeva), dok su amplifikacije prisutne u 2,89% (48 slučajeva) (Slika 11).

Tablica 9. Rezultati analize gena *SOX2*

<i>SOX2</i>	Oligoastrocitom	Anaplastični Astroцитom	Anaplastični Oligodendrogliom	Oligodendrogliom	Glioblastom	Difuzni gliom
Mutacije		1,52%			0,78%	0,08%
Amplifikacije	6,25%	4,04%	3,23%	2,92%	2,89%	2,42%
Višestruke promjene					0,06%	



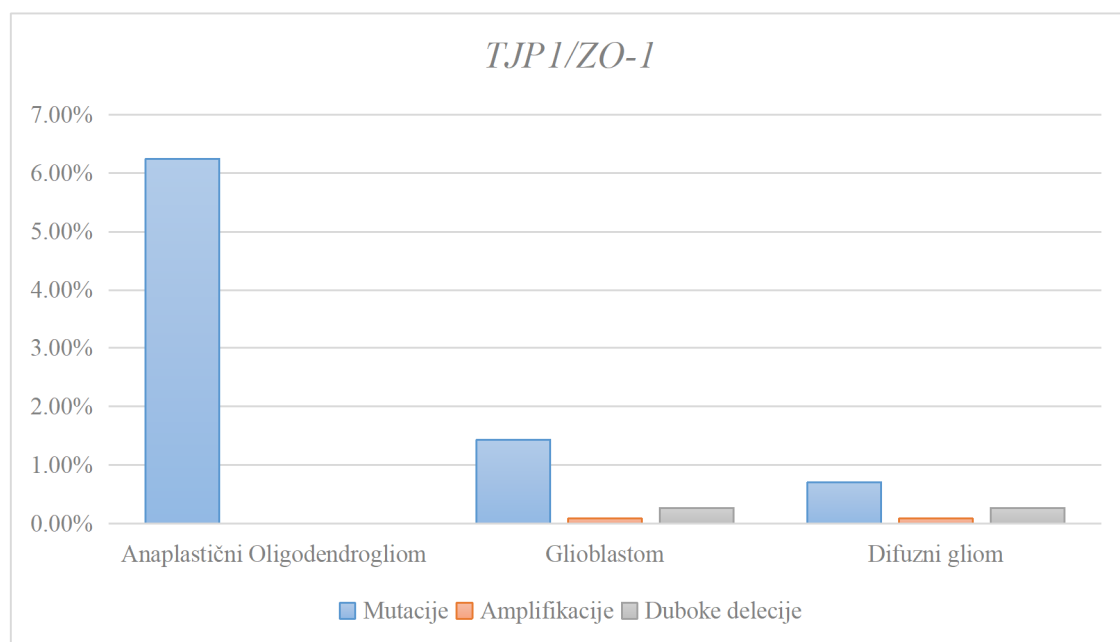
Slika 11. Grafčki prikaz analize gena *SOX2*

5.10 Promjene gena *TJPI/ZO-1*

Gen za adaptorski protein tijesnih spojeva, *TJPI/ZO-1*, bio je mutiran, amplificiran i duboko deletiran. Rezultati analize ukazuju (Tablica 10) da su mutacije i ovdje najčešći tip promjena. One su najizraženije kod anaplastičnog oligodendroglioma (gradus III) u 6,25%. Slijedeći po učestalosti promjena gena *TJPI/ZO-1* su glioblastomi (gradus IV) kod kojih su mutacije prisutne u 1,43% (16 slučajeva), amplifikacije u 1 slučaju, a duboke delecije u 3 slučaja (Slika 12).

Tablica 10. Rezultati analize gena *TJPI/ZO-1*

<i>TJPI</i>	Anaplastični Oligodendrogliom	Glioblastom	Difuzni gliom
Mutacije	6,25%	1,43%	0,71%
Amplifikacije		0,09%	0,09%
Duboke delecije		0,27%	0,27%



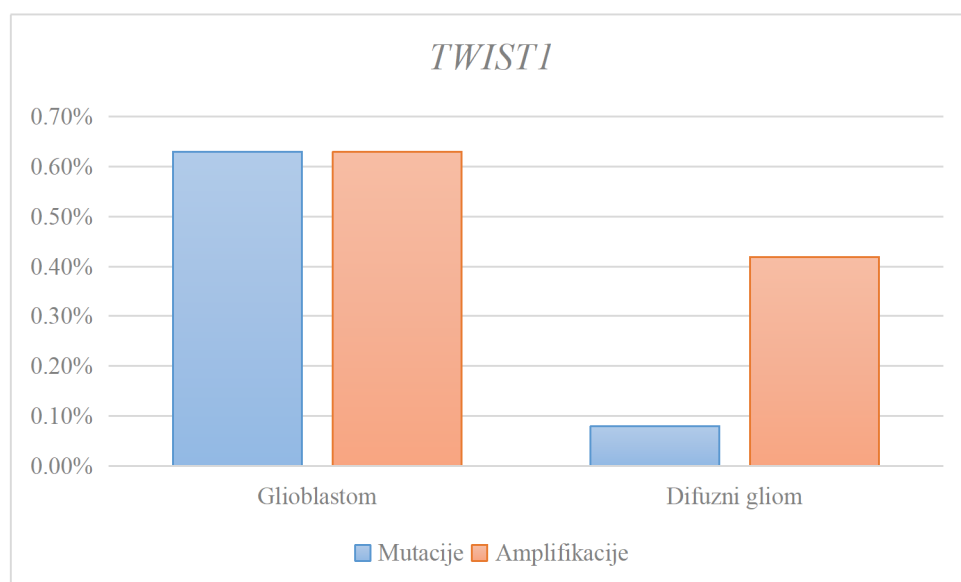
Slika 12. Grafički prikaz analize gena *TJPI/ZO-1*

5.11 Promjene gena *TWIST1*

Rezultati dobiveni analizom gena *TWIST1* pokazuju veću učestalost njegovih promjena u glioblastomu u usporedbi s difuznim gliomom. Prevladavaju amplifikacije u odnosu na mutacije gena. Kod difuznih glioma (gradus II) gen je bio mutiran u 0,08% (1 slučaj), a amplificiran u 0,42% (5 slučajaja). Kod glioblastoma (gradus IV) gen je češće amplificiran u odnosu na gradus II i to u 0,63% (7 slučajaja). Gen je bio mutiran u 0,63% glioblastoma (7 slučajaja). Rezultati su prikazani u Tablici 11 i Slici 13.

Tablica 11. Rezultati analize gena *TWIST1*

<i>TWIST1</i>	Glioblastom	Difuzni gliom
Mutacije	0,63%	0,08%
Amplifikacije	0,63%	0,42%



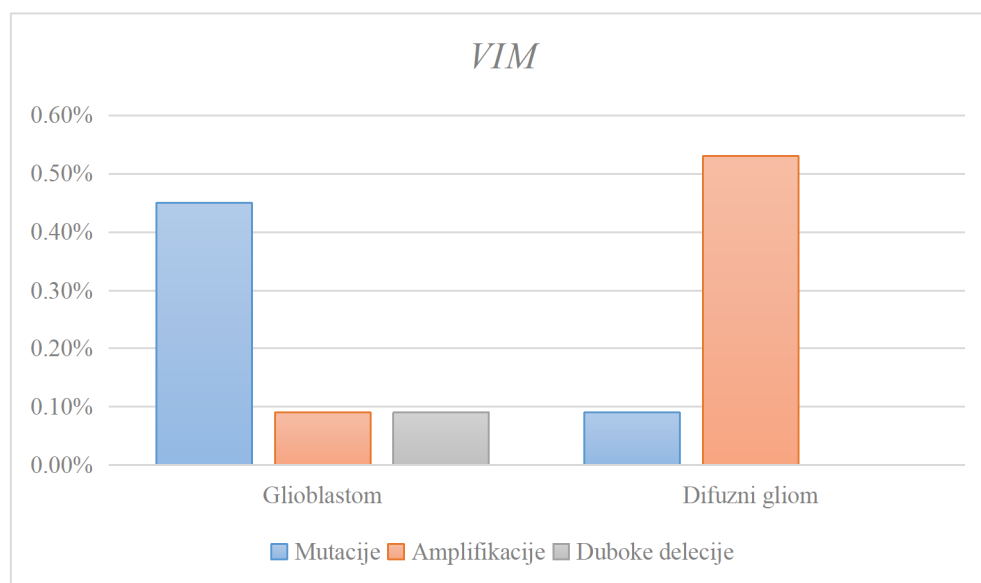
Slika 13. Grafički prikaz analize gena *TWIST1*

5.12 Promjene gena *VIM*

Rezultati dobiveni analizom gena *VIM* koji kodira za vimentin, ukazuju na znatno češće promjene ovog gena u bolesnika gradusa IV u odnosu na gliome gradusa II. Zabilježene su mutacije, amplifikacije i duboke delecije ovoga gena. Gen u glioblastomu (gradus IV) je bio mutiran u 0,45% (5 slučajeva), amplificiran u 0,09% (1 slučaj) te također u isto toliko slučajeva i istom postotku zabilježena je duboka delecija. S druge strane, difuzni gliomi (gradus II), bili su puno češće amplificirani u odnosu na mutacije, u 0,53% (6 slučajeva). Rezultati su prikazani u Tablici 12 i Slici 14.

Tablica 12. Rezultati analize gena *VIM*

<i>VIM</i>	Glioblastom	Difuzni gliom
Mutacije	0,45%	0,09%
Amplifikacije	0,09%	0,53%
Duboke delecije	0,09%	



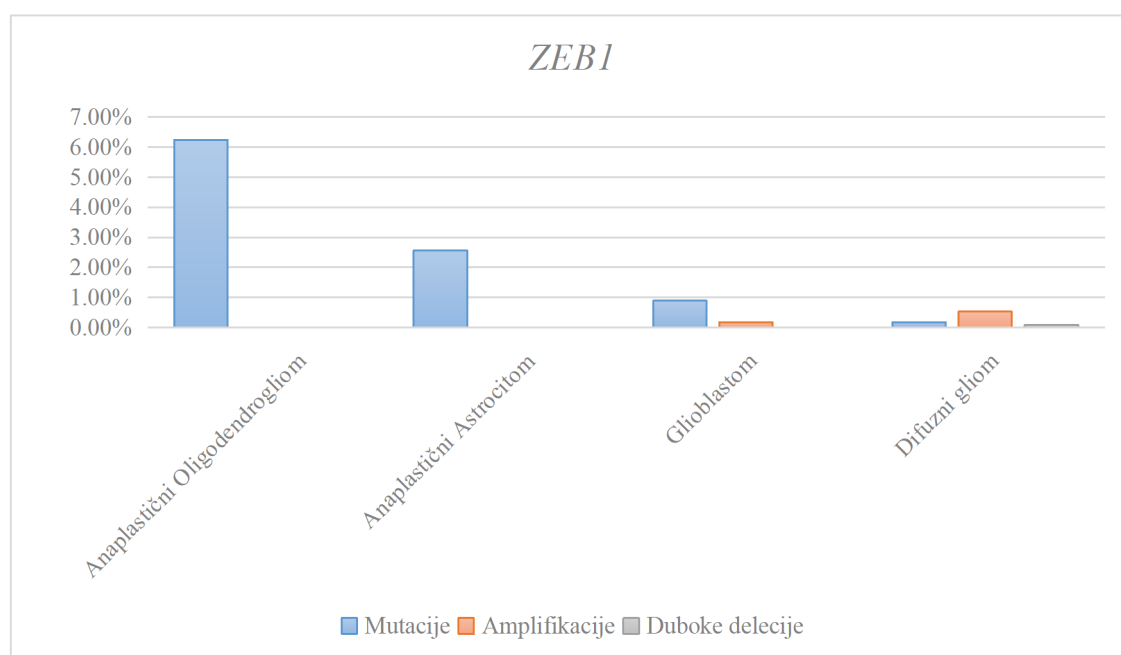
Slika 14. Grafički prikaz analize gena *VIM*

5.13 Promjene gena *ZEB1*

Iz Slike 15 se jasno vidi kako je gen *ZEB1* u najvećem postotku mutiran u gliomima, znatno manje amplificiran dok je u vrlo malom postotku riječ o dubokoj deleciji. Najveći postotak mutacija ovog gena pridružen je anaplastičnim oligodendrogliomima (gradus III) u 6,25%. Slijedi anaplastični astrocitom (gradu III) kod kojeg su mutacije zabilježene u 2,56%. Glioblastom je uz mutacije (0,89%) posjedovao i amplifikacije ovoga gena (0,18%). Jedina duboka delecija gena *ZEB1* bila je prisutna kod difuznog glioma (gradus II) u 0,09% (Tablica 13).

Tablica 13. Rezultati analize gena *ZEB1*

<i>ZEB1</i>	Anaplastični Oligodendrogliom	Anaplastični Astrocitom	Glioblastom	Difuzni gliom
Mutacije	6,25%	2,56%	0,89%	0,18%
Amplifikacije			0,18%	0,53%
Duboke delecije				0,09%



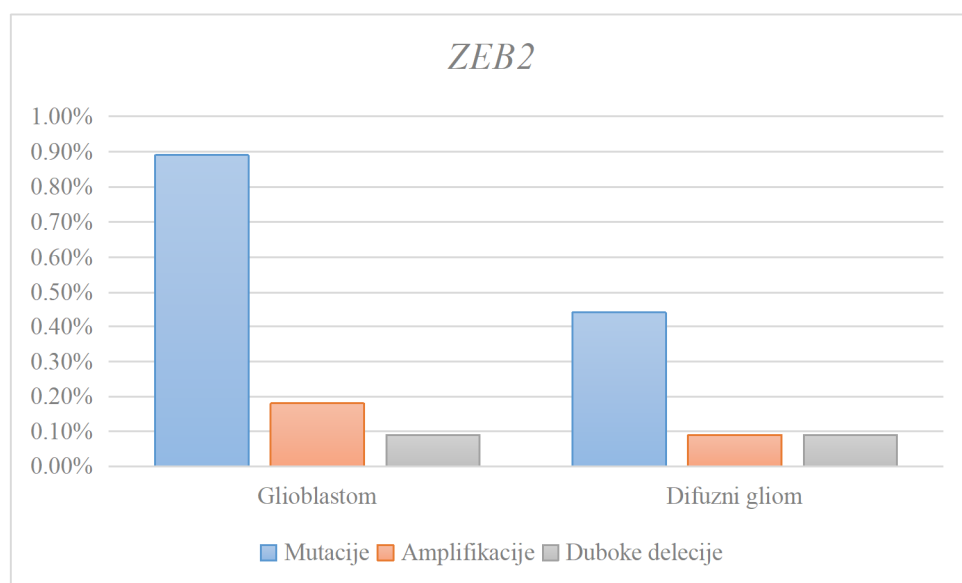
Slika 15. Grafički prikaz analize gena *ZEB1*

5.14 Promjene gena *ZEB2*

Posljednji gen uključen u analizu je *ZEB2*. Za razliku od *ZEB1* gdje je glioblastom zauzimao treće mjesto po učestalosti promjena gena, ovdje zauzima prvo mjesto. Prevladavaju mutacije u 0,89% (10 slučajeva). Amplifikacije gena su prisutne u 0,18% glioblastoma (2 slučaja), a duboke delecije u 0,09% (1 slučaj). Kod difuznih glioma (gradus II) su promjene ovoga gena znatno rjeđe u odnosu na gradus IV. Gen je mutiran u gradusu II kod 5 slučajeva (0,44%), amplificiran kod 1 slučaja (0,09%), te u istom postotku duboko deletiran. Rezultati su prikazani u Tablici 14 i Slici 16.

Tablica 14. Rezultati analize gena *ZEB2*

<i>ZEB2</i>	Glioblastom	Difuzni gliom
Mutacije	0,89%	0,44%
Amplifikacije	0,18%	0,09%
Duboke delecije	0,09%	0,09%



Slika 16. Grafički prikaz analize gena *ZEB2*

5.15 Ekspresija mRNA

U sklopu ovog rada se također istražila i razina transkripta u 13 pretraživanih gena tj. ekspresija njihove mRNA. Za analizu ekspresije mRNA se koristila studija *Glioblastoma Multiforme* (TCGA, Firehose Legacy) koja je obuhvatila 136 uzoraka. Kod gena *TWIST1*, *SNAI1*, *SNAI2*, *CDH1* te *LEF1* prevladava visoka razina ekspresije mRNA, dok su geni *CDH2*, *VIM*, *NOTCH1*, *ZEB1* i *SOX2* pokazali sniženu razinu mRNA transkripta. Za gene *CTNNB1*, *ZEB2* i *TJP1/ZO-1* je podjednak broj uzoraka s povišenom razinom mRNA kao i onih sa sniženom razinom mRNA. Rezultati su prikazani na Slici 17.



Slika 17. Ekspresija mRNA

5.16 Zbirni rezultati promjena biljega epitelnog i mezenhinskog fenotipa

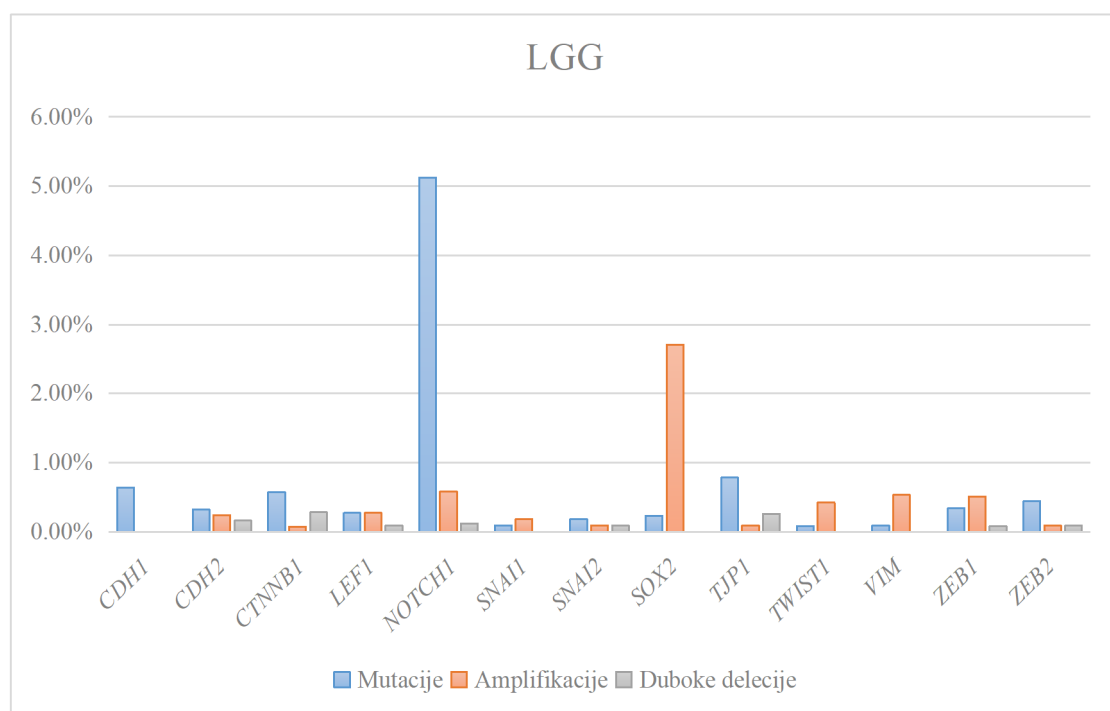
Kako bismo ilustrirali sve promjene pridružene svakom genu te ih razdijelili u skupine glioma niskog i visokog gradusa, napravili smo zbirni prikaz u Tablici 15 i 16 i Slici 18 i 19.

Tablica 15. Tipovi genskih promjena i njihova učestalost u LGG

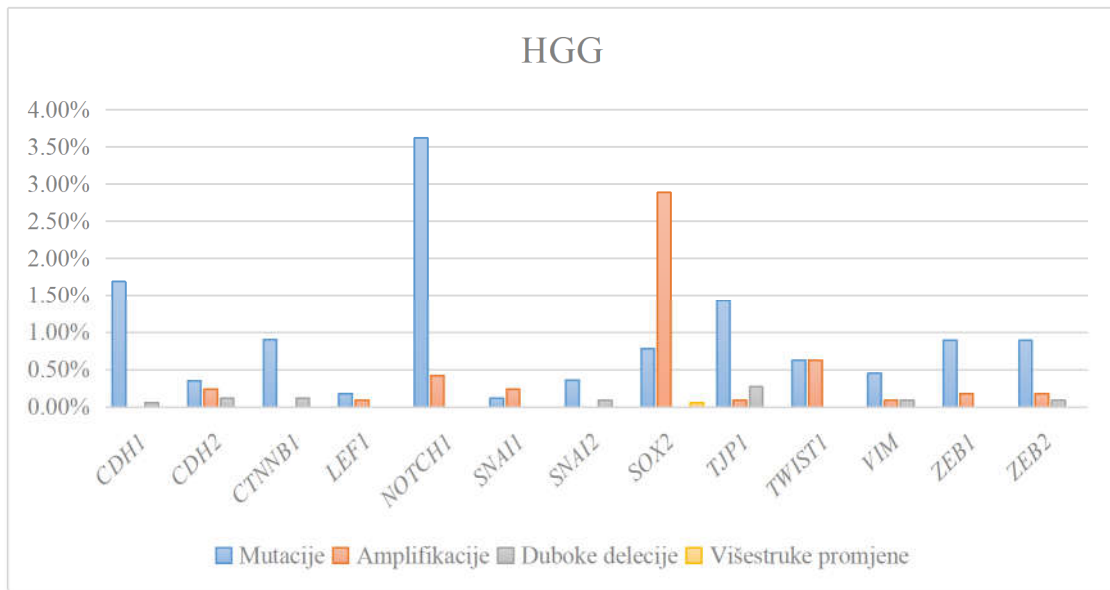
LGG	CD HI	CD H2	CTN NB1	LE F1	NOT CHI	SN A11	SN A12	SO X2	TJ P1	TWI ST1	VI M	ZE B1	ZE B2
Mutacije	0,6 4%	0,3 2%	0,57 %	0,2 7%	5,12 %	0,0 9%	0,1 8%	0,2 3%	0,7 8%	0,08 %	0,0 9%	0,3 4%	0,4 4%
Amplifikacije		0,2 4%	0,07 %	0,2 7%	0,58 %	0,1 8%	0,0 9%	2,7 1%	0,0 9%	0,42 %	0,5 3%	0,5 1%	0,0 9%
Duboke delecije		0,1 6%	0,28 %	0,0 9%	0,12 %		0,0 9%		0,2 6%			0,0 8%	0,0 9%

Tablica 16. Tipovi genskih promjena i njihova učestalost u HGG

HGG	CD HI	CD H2	CTN NB1	LE F1	NOT CHI	SN A11	SN A12	SO X2	TJ P1	TWI ST1	VI M	ZE B1	ZE B2
Mutacije	1,6 9%	0,3 5%	0,90 %	0,1 8%	3,62 %	0,1 2%	0,3 6%	0,7 8%	1,4 3%	0,63 %	0,4 5%	0,8 9%	0,8 9%
Amplifikacije		0,2 4%		0,0 9%	0,42 %	0,2 4%		2,8 9%	0,0 9%	0,63 %	0,0 9%	0,1 8%	0,1 8%
Duboke delecije	0,0 6%	0,1 2%	0,12 %				0,0 9%		0,2 7%		0,0 9%		0,0 9%
Višestruke promjene								0,0 6%					



Slika 18. Ukupan prikaz promjena u LGG



Slika 19. Ukupan prikaz promjena u HGG

Iz tablica i slika vidljivo je da su u obje skupine glioma promjenama najpogođeniji geni *NOTCH1* i *SOX2*. Mutacije *CDH1*, *CTNNB1*, *TJP1*, *ZEB1* i *ZEB2* češće su u gliomima viših gradusa. Samo glioblastom i difuzni gliom imaju promjene na svih 13 analiziranih gena. Nakon njih slijede anaplastični oligodendrogliom i anaplastični astroцитom koji imaju promjene na 6/13 (46,15%) analiziranih gena, pa oligodendrogliom s 3/13 (23,08%) analiziranih gena i oligoastroцитom s promjenama na 2/13 (15,38%) analiziranih gena. U manje od pola (6/13 ili 46%) analiziranih gena promjene su pronađene samo kod glioblastoma i difuznih glioma. Kod 7 analiziranih gena: *CDH1*, *CDH2*, *CTNNB1*, *NOTCH1*, *SOX2*, *TJP1/ZO-1* i *ZEB1* promjene su prisutne kod više patohistoloških dijagnoza u rasponu od 3 do svih 6. Geni kod kojih su promjene prisutne u svih 6 patohistoloških dijagnoza su *NOTCH1* i *SOX2*. Kod gena *CDH1* promjene su prisutne kod 5/6 patohistoloških dijagnoza, kod gena *CTNNB1* i *ZEB1* promjene su prisutne kod 4/6 patohistoloških dijagnoza a kod gena *CDH2* i *TJP1/ZO-1* promjene su prisutne kod 3/6 patohistoloških dijagnoza.

Što se tiče gena kod kojih su promjene pridružene bilo kojoj od ovih 6 patohistoloških dijagnoza, najkorisniji su *NOTCH1* i *SOX2* jer su promjene na tim genima prisutne u svim dijagnozama. Nadalje, učestalost promjena onih gena na kojima su promjene prisutne statistički su značajno veće na *NOTCH1* genu nego li na *CDHI* genu kod anaplastičnog oligodendroglioma ($\chi^2=14,623$; $P=0,00013$), oligodendroglioma ($\chi^2=12,15$; $P=0,00049$), glioblastoma ($\chi^2=14,685$; $P=0,00012$), anaplastičnog astrocitoma ($\chi^2=4,247$; $P=0,0393$) i difuznog glioma ($\chi^2=38,939$; $P<0,000001$). Isti trend prisutan je kada se učestalost promjena na genu *NOTCH1* usporedi s onim na genu *CTNNB1* - učestalost promjena na *NOTCH1* genu statistički je značajno viša kod anaplastičnog oligodendroglioma ($\chi^2=14,623$; $P=0,00013$), glioblastoma ($\chi^2=29,326$; $P<0,000001$), anaplastičnog astrocitoma ($\chi^2=4,247$; $P=0,0393$) i difuznog glioma ($\chi^2=22,976$; $P<0,00001$). Usporedba učestalosti promjena na genu *NOTCH1* i genu *ZEB1* pokazuje da su učestalosti promjena na *NOTCH1* genu statistički značajno više kod glioblastoma ($\chi^2=20,252$; $P=0,00006$) i difuznog glioma ($\chi^2=24,202$; $P<0,00001$). Interesantno je međutim, da kod anaplastičnog oligodendroglioma i anaplastičnog astrocitoma učestalost promjena na ova dva gena je slična.

6. RASPRAVA

Ova *in silico* studija gena uključenih u EMT pokazala je učestalost i tip genskih promjena u gliomima čovjeka te razlike u transkripcijskoj aktivnosti. Istraživanje provedeno na ukupnom uzorku od 3143 bolesnika s glialnim tumorima različitih stupnjeva malignosti pokazalo je različite frekvencije promjena odabranih gena. EMT je regulirana na više razina od kojih je najizraženija razina transkripcije. Transkripcijski faktori iz obitelji proteina SNAIL (SNAI1, SNAI2/SLUG), ZEB (ZEB1/TCF8), TWIST, suprimiraju ekspresiju E-kadherina (CDH1) tako da se vežu na njegovo promotorsko mjesto i zaustavljaju transkripciju [33]. Naša studija je pokazala da su transkripcijski faktori bili najviše promijenjeni u gliomima višeg stupnja malignosti (gradus III i IV), a promjene koje su prevladavale su mutacije i amplifikacije. U radu Guetta-Terrier i sur, [34] istraživao je specifičan utjecaj molekule Chi311 u staničnim linijama glioma na molekularni profil matičnih stanica glioma. Pokazali su da anti-Chi311 protutijelo ima učinak smanjene regulacije molekula bitnih za invazivnost i metastaziranje, točnije SOX2 i NOTCH1 što su potvrdili i rezultati ovoga rada. Nisko ukupno preživljenje autori pripisuju prekomjernoj ekspresiji NOTCH1. Također je uočeno da ekspresija NOTCH1 postoji u stanicama glioblastoma na invazivnim rubovima tumora. U isto vrijeme, faktor transkripcije SOX2 bio je pojačano reguliran te je djelovao na smanjenje razine metilacije promotora NOTCH1 i pojačanje ekspresije NOTCH1 u matičnim stanicama glioblastoma. Razine NOTCH4 i NOTCH1 bile su povezane s vimentinom i glijalnim fibrilarnim kiselim proteinom (GFAP). Razina ekspresije NOTCH2 u glioblastomu bila je u pozitivnoj korelaciji s genom neuralnih matičnih stanica *SOX2*, GFAP-om, vimentinom i anti-apoptotskim proteinom [35]. U svome radu Hang Song

i sur, [36] su istraživali regulatore Wnt/ β -katenina odnosno PI3K/Akt signalnih puteva. S obzirom da su ta dva puta uvijek aktivirana u stanicama glioma i matičnim stanicama glioma, pretpostavili su da su oni izravne mete miR-92a. Dokazali su višestruke funkcije miR-92a-3p na malignitet stanica glioma i samoobnavljanje matičnih stanica glioma na način da kontrolira te fenotipe ciljajući na CDH1 i NOTCH1, molekule koje smo i mi istraživali. *CDH1*, koji kodira E-kadherin, nije izražen u astrocitomima i oligodendrogliomima, što bi bilo sukladno nalazu iz literature [37] o čestoj hipermetilaciji promotora. Smanjena ekspresija E-kadherina smatra se jednim od glavnih molekularnih događaja odgovornih za gubitak stanično-stanične adhezije, što direktno utječe na invaziju raka i metastaze [38]. Rezultati ovoga rada pokazali su da je *CDH1* bio često mutiran i da su mutacije bile češće u gliomima višeg stupnja malignosti. Novija istraživanja pokazuju da postoji obilna ekspresija prekursora N-kadherina - proN-kadherina u staničnoj membrani većine ispitivanih glioma. ProN-kadherin služi kao učinkovita transmembranska signalna molekula koja posreduje unutarstanični prijenos signala neurotrofnim čimbenicima kao što je GDNF tijekom migracije i invazije stanica glioma. Pretpostavlja se da bi proN-kadherin mogao uzrokovati gubitak homotipske adhezije unutar susjednih stanica i promicati heterotipsku adheziju unutar izvanstaničnog matriksa [39]. Gen *CDH2* koji kodira protein N-kadherin, također je marker EMT-a. Sve veći broj dokaza ukazuje da je N-kadherin usko povezan sa stupnjem glioma prema SZO. Nasuprot tome, prethodna studija pokazala je da glioblastomi izražavaju niže razine N-kadherina od glioma niskog stupnja [40]. Naša studija je pokazala da je gen *CDH2* bio najčešće mutiran u anaplastičnom astrocitomu (gradus III), a od ostalih promjena ovoga gena su prisutne amplifikacije te duboke delecije kod difuznih glioma (gradus II) i glioblastoma (gradus IV). Nekoliko komponenti Notch puta je jako izraženo na

invazivnim rubovima tumora, posebice biljeg EMT vimentin, što ukazuje na važnu ulogu Notch puta u regulaciji EMT-a. Notch regulira transkripciju ZEB-a, Snail-a i Slug-a, koji potiskuju ekspresiju E-kadherina i induciraju ekspresiju vimentina i fibronektina [41]. Ovdje smo pokazali da je gen *NOTCH1* bio izrazito mutiran i u gliomima nižeg i višeg stupnja što može ukazivati na njegovu konstantnu prisutnost kroz stadije progresije glioma. Neispravna aktivacija signalnog puta Wnt otkrivena je u raznim vrstama raka, kao što su maligni tumori dojke, prostate, pluća, hematopoeze i GBM [42], a pokazalo se da je nuklearno nakupljanje β -katenina u pozitivnoj korelaciji s lošim kliničkim ishodima, kao što je progresija raka, invazija, metastaze i recidiv, što rezultira nižom stopom preživljenja [43]. β -katenin i C-myc su aktivirani u gliomima, njihova aktivnost je bila veća u relapsu glioma nego u primarnom tumoru, a proteini su pridonijeli malignosti. Povećane aktivnosti β -katenina i C-myc bile su povezane i s lošom prognozom glioma [44]. Naši rezultati analize gena *CTNNB1* pokazuju da su mutacije najučestalije u anaplastičnim gliomima (gradus III). Studije su pokazale da je neispravno funkcioniranje gena *LEF1* bilo značajno povezano s ukupnim preživljenjem pacijenata s gliomom, posebno onih starije dobi i višeg stupnja prema SZO, IDH statusa divljeg tipa i statusa kodelecije 1p19q [45]. LEF1 preko signalizacije TGF β /SMAD pridonosi malignosti GBM [46]. Također je potvrđeno da miR-381 izravno cilja na *LEF1* i negativno regulira njegovu ekspresiju u stanicama glioblastoma. Smanjena ekspresija LEF1 također je inhibirala migraciju stanica, invaziju i EMT u stanicama glioblastoma [47]. Nedavno je objavljeno [48] da transkripcijski represor snail 1 iz obitelji snail (SNAI1) igra ulogu u stjecanju i povećanju invazivnosti kod malignih glioma. Objavljeno je da SNAI1 pojačava ekspresiju gena *MMP2* i/ili *MMP9*, koji razgrađuju kolagen tipa IV u perifernim bazalnim membranama kako bi pospješili invaziju stanica [49]. Pokazalo se da SNAI1

inducira EMT, kroz ekspresiju biljega EMT, uključujući vimentin i E-kadherin. Kao što se očekivalo, primjena SNAI1 siRNA smanjila je ekspresiju vimentina, a povećala ekspresiju CDH1 [48]. SNAI2 (Slug) transkripcijski je faktor povezan s migracijom u ljudskim glioblastomima čija ekspresija je povećana u usporedbi sa zdravim tkivom mozga. Učestalost i opseg prekomjerne ekspresije mRNA SNAI2/Slug postignuta je kod 26 od 30 ispitivanih transkripcijskih faktora povezanih s invazijom/migracijom u gliomu. Među njima bio je i gen *TWIST1* [50]. Radovi koji istražuju nuklearni represor transkripcije ZHX1, a koji je uključen u diferencijaciju stanica i tumorigenezu, pokazali su da je ZHX1 značajno smanjio razine ekspresije SNAI1, SNAI2, TWIST1 i TWIST2 u staničnim linijama U373MG i GBM05, dok je prekomjerna ekspresija ZHX1 značajno povećala razine mRNA SNAI2 i TWIST1, ali ne i razine SNAI1 i TWIST2, u liniji U373MG. Također, ZHX1 je povećao proliferaciju, migraciju i invaziju stanica glioblastoma, te je zaključeno da su razine ekspresije TWIST1 i SNAI2 regulirane pomoću ZHX1 [51]. Pojedinačni geni koje regulira TWIST1 za koje je poznato da promiču EMT i invaziju glioblastoma su *SNAI2*, *MMP2*, *HGF*, *FAP* i *FNI*. Iako promiče EMT u staničnim linijama GBMZ, TWIST1 nije bio uključen u tzv. "izmjeni kadherina" E- u N-kadherin [52]. U ovom radu pokazali smo da je gen *TWIST1* promijenjen u glioblastomu i difuznom gliomu, a prevladavaju amplifikacije u odnosu na mutacije ovoga gena. Još jedna interesantna poveznica s biljezima EMT je receptor BDKRB2 (bradikinin receptor B2) koji se ponaša kao onkogen u nekoliko malignih bolesti. Većina EMT biomarkera, uključujući N-kadherin, snail, slug, vimentin, TWIST1 i TWIST2, bili su u značajnoj korelaciji s BDKRB2, što je sugeriralo da bi BDKRB2 mogao biti u interakciji s ovim ključnim molekulama EMT-a, dodatno potvrđujući uključenost BDKRB2 u EMT glioma [53]. TWIST1, bHLH transkripcijski faktor i glavni regulator EMT-a, povezan

je s višim gradusom glioma te potiče invaziju i fenotipove matičnih stanica glioma [54]. ZEB2 je kritični faktor transkripcije uključen u proces EMT, a prethodno je potvrđeno da je ZEB2 povezan s malignim fenotipom glioma. Nasuprot tome, miR-637 identificirana je kao marker povoljne prognoze kod glioma. Rezultati drugih autora predložili su da bi ZEB2 mogao promovirati maligni fenotip glioma izravnim suzbijanjem miR-637 [55]. Faktori transkripcije kao što su Snail, Twist, ZEB1/2 itd., reguliraju proces EMT. Studije su pokazale da je razina ekspresije ZEB1 u pozitivnoj korelaciji s klasifikacijom glioma SZO i razinom ekspresije u tkivima glioma [56]. U ovom radu pokazali smo da su mutacije *ZEB1* i *ZEB2* češće u gliomima viših gradusa. Naša *in silico* studija pokazala je da su svi geni predstavnici EMT mutirani ili promijenjeni na neki drugi način u gliomima, te da neki pokazuju izrazitu uključenost i povezani su s višim gradusom glioma. Iz statističke analize vidljivo je da kada se gleda na ukupne promjene pathohistološke skupine pokazuju razlike, što je u skladu s različitim ishodišnim stanicama za razvoj glioma. Tako će astocitomi pokazivati puno više promjena odabranih gena tj svi geni bili su pogođeni promjenama, od oligodendroglioma, koji imaju promjene u 6 od 13 analiziranih gena. Nadalje jasno je vidljiva akumulacija promjena od difuznih glioma do glioblastoma u svim ispitivanim genima, gdje su promjene gena *NOTCH1* i *SOX2* najviše prisutne. Dodatna istraživanja i validacija rezultata dobivenih iz cBioPortal baze potrebna su kako bi potvrdila spoznaje koje je ovaj rad donio.

7. ZAKLJUČCI

Iz analize zaključujemo da su geni sudionici EMT promijenjeni u gliomima različitih gradusa. Najčešće mutirani i amplificirani bili su geni *NOTCH1* i *SOX2*. U LGG su jače mutirani bili geni *CDH1*, *CTNNB1*, *TJP1*, a amplificirani geni *TWIST1*, *VIM* i *ZEB1*, dok su u HGG bili jače promijenjeni geni: *CDH1*, *CTNNB1*, *TJP1*, *ZEB1* i *ZEB2*.

8. ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Nives Pećina-Šlaus na savjetima i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji, posebice roditeljima i sestri Magdaleni na neizmjernej potpori i strpljenju.

Hvala i svim mojim prijateljima na razumijevanju i podršci.

9. LITERATURA

1. Brabletz S, Schuhwerk, H, Brabletz T, Stemmler MP. Dynamic EMT: a multi-tool for tumor progression, EMBO J. 2021 Sep 15;40(18):e108647. doi: 10.15252/embj.2021108647.
2. Chen T, You Y, Jiang H, Wang ZZ. Epithelial–mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis. J. Cell. Physiol. 2017, 232, 3261–3272. doi:10.1002/jcp.25797.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell 2011, 144, 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
4. Çelen I, Ross KE, Arighi CN, Wu CH. Bioinformatics knowledge map for analysis of beta-catenin function in cancer. PLoS ONE 2015, 10, e0141773. doi:10.1371/journal.pone.0141773.
5. Nieto MA. The Ins and Outs of the Epithelial to Mesenchymal Transition in Health and Disease. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2011, 27, 347–376. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154036.
6. Loh CY, Chai JY, Tang TF, Wong WF, Sethi G, Shanmugam MK, i sur. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. Cells 2019. 8, 1118. doi:10.3390/cells8101118.
7. Liang L, Kaufmann AM. The Significance of Cancer Stem Cells and Epithelial–Mesenchymal Transition in Metastasis and Anti-Cancer Therapy. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 2555. doi:10.3390/ijms24032555.
8. Saitoh M. Involvement of partial EMT in cancer progression. J. Biochem. 2018, 164, 257–264. doi:10.1093/jb/mvy047.

9. Aiello NM, Kang Y. Context-dependent EMT programs in cancer metastasis. *J. Exp. Med.* 2019, 216, 1016–1026. doi:10.1084/jem.20181827.
10. Pastushenko I, Blanpain C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol.* 2019, 29, 212–226. doi:10.1016/j.tcb.2018.12.001.
11. Liao TT, Yang MH. Hybrid Epithelial/Mesenchymal State in Cancer Metastasis: Clinical Significance and Regulatory Mechanisms, *Cells* 2020 Mar 4;9(3):623. doi: 10.3390/cells9030623.
12. Sinha D, Saha P, Samanta A, Bishayee A. Emerging Concepts of Hybrid Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Progression, *Biomolecules.* 2020 Nov 16;10(11):1561. doi: 10.3390/biom10111561.
13. Xing Y, He M, Su Z, Yasinjan F, Liu J, Wang H, i sur. Emerging trends and research foci of epithelial–mesenchymal transition in gliomas: A scientometric analysis and review. *Front Oncol.*12:1015236. doi:10.3389/fonc.2022.1015236.
14. Chen R, Smith-Cohn M, L Cohen A, Colman H. Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance, *Neurotherapeutics.* 2017 Apr;14(2):284-297. doi: 10.1007/s13311-017-0519-x.
15. WHO Classification of Tumours Editorial Board. World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System. 5th ed.Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2021. [[Google Scholar](#)]
16. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, i sur. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 2021 Aug 2;23(8):1231-1251. doi: 10.1093/neuonc/noab106.
17. Haerincx J, Berx G. Partial EMT takes the lead in cancer metastasis. *Dev Cell.* 2021 Dec 6;56(23):3174-3176. doi: 10.1016/j.devcel.2021.11.012.

18. Pećina-Šlaus N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int.* 2003 Oct 14;3(1):17. doi: 10.1186/1475-2867-3-17.
19. Na TY, Schecterson L, Mendonsa AM, Gumbiner BM. The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Mar 17;117(11):5931-5937. doi: 10.1073/pnas.1918167117.
20. Venhuizen JH, Jacobs FJC, Span PN, Zegers MM. P120 and E-cadherin: Double-edged swords in tumor metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2020 Feb;60:107-120. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.07.020.
21. Runkle EA, Mu D. Tight junction proteins: from barrier to tumorigenesis. *Cancer Lett.* 2013 Aug 28;337(1):41-8. doi: 10.1016/j.canlet.2013.05.038.
22. Mrozik KM, Blaschuk OW, Cheong CM, Zannettino ACW, Vandyke K. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC Cancer.* 2018 Oct 1;18(1):939. doi: 10.1186/s12885-018-4845-0.
23. Pećina-Šlaus N, Cicvara-Pećina T, Kafka A. Epithelial-to-mesenchymal transition: possible role in meningiomas. *Front Biosci (Elite Ed).* 2012 Jan 1;4(3):889-96. doi: 10.2741/E427.
24. Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K. Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1014:155–63. doi: 10.1196/annals.1294.016.
25. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses, Stelzer G, Rosen R, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, Iny Stein T, Nudel R, Lieder I, Mazor Y, Kaplan S, Dahary D, Warshawsky D, Guan - Golan Y, Kohn A, Rappaport N, Safran M, and Lancet D. *Current Protocols in Bioinformatics*(2016), 54:1.30.1 - 1.30.33.doi: 10.1002 / cpbi.5.

26. Xu YR, Yang WX. SOX-mediated molecular crosstalk during the progression of tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2017 Mar;63:23-34. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.07.028.
27. Hinton K, Kirk A, Paul P, and Sujata Persad S. Regulation of the Epithelial to Mesenchymal Transition in Osteosarcoma, *Biomolecules.* 2023 Feb; 13(2): 398. doi: 10.3390/biom13020398.
28. Korpál M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2, *J Biol Chem.* 2008 May 30;283(22):14910-4. doi: 10.1074/jbc.C800074200.
29. The cBioPortal for Cancer Genomics [Internet] [pristupljeno ožujak-svibanj, 2023.]. Dostupno na: <https://www.cbioportal.org/>
30. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012 May;2(5):401-4. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0095.
31. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal.* 2013 Apr 2;6(269):p11. doi: 10.1126/scisignal.2004088.
32. cBioPortal omogućuje istraživanje i prikaz studije pomoću korisničkog popisa uzoraka/pacijenata [Internet] [pristupljeno u Svibnju, 2023.]. Dostupno na: https://www.cbioportal.org/results/comparison?cancer_study_list=difg_glass_2019%2Cglioma_mskcc_2019%2Clgggbm_tcga_pub%2Cgbm_mayo_pdx_sarkaria_2019%2Cgbm_cptac_2021%2Cgbm_columbia_2019%2Cgbm_tcga%2Clgg_ucsf_2014&Z_SCORE_THRESHOLD=2.0&RPPA_SCORE_THRESHOLD=2.0&profileFilter=mut

[ations%2Cstructural_variants%2Cgistic%2Ccna&case_set_id=all&gene_list=CDH1%250ACDH2%250ACTNNB1%250ALEF1%250ANOTCH1%250ASNAI1%250ASNAI2%250ASOX2%250ATJP1%250ATWIST1%250AVIM%250AZEB1%250AZEB2&geneset_list=%20&tab_index=tab_visualize&Action=Submit&comparison_subtab=survival&comparison_selectedGroups=%5B%22CDH1%22%2C%22CDH2%22%2C%22CTNNB1%22%2C%22LEF1%22%2C%22NOTCH1%22%2C%22SNAI1%22%5D.](#)

33. Das V, Bhattacharya S, Chikkaputtaiah C, Hazra S, Pal M (2019). The basics of epithelial–mesenchymal transition (EMT): A study from a structure, dynamics, and functional perspective. *J Cell Physiol* 1-21. doi: 10.1002/jcp.28160.

34. Guetta-Terrier C, Karambizi D, Akosman B, Zepecki JP, Chen JS, Kamle S, et al. Chi311 is a modulator of glioma stem cell states and a therapeutic target in glioblastoma. *Cancer Res.* 2023 Apr 27;CAN-21-3629. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-3629.

35. Wu H, Wei M, Li Y, Ma Q, Zhang H. Research Progress on the Regulation Mechanism of Key Signal Pathways Affecting the Prognosis of Glioma, *Front Mol Neurosci.* 2022 Jul 22;15:910543. doi: 10.3389/fnmol.2022.910543.

36. Song H, Zhang Y, Liu N, Zhao S, Kong Y, Yuan L. miR-92a-3p Exerts Various Effects in Glioma and Glioma Stem-Like Cells Specifically Targeting CDH1/ β -Catenin and Notch-1/Akt Signaling Pathways, *Int J Mol Sci.* 2016 Oct 27;17(11):1799. doi: 10.3390/ijms17111799.

37. Schwechheimer K, Zhou L, Birchmeier WE. Cadherin in human brain tumours: loss of immunoreactivity in malignant meningiomas. *Virchows Arch* 1998; 432: 163–7. doi: 10.1007/s004280050151.

38. Uhlmann K, Rohde K, Zeller C, Szymas J, Vogel S, Marczinek K, i sur. Distinct methylation profiles of glioma subtypes, *Int J Cancer*. 2003 Aug 10;106(1):52-9. doi: 10.1002/ijc.11175.
39. Xiong Y, Liu L, Zhu S, Zhang B, Qin Y, Yao R, i sur. Precursor N-cadherin mediates glial cell line-derived neurotrophic factor-promoted human malignant glioma, *Oncotarget*. 2017 Apr 11;8(15):24902-24914. doi: 10.18632/oncotarget.15302.
40. Chen Q, Cai J, Jiang C. CDH2 expression is of prognostic significance in glioma and predicts the efficacy of temozolomide therapy in patients with glioblastoma, *Oncol Lett*. 2018 May;15(5):7415-7422. doi: 10.3892/ol.2018.8227.
41. Hinton K, Kirk A, Paul P, Persad S. Regulation of the Epithelial to Mesenchymal Transition in Osteosarcoma, *Biomolecules*. 2023 Feb; 13(2): 398. Published online 2023 Feb 20. doi: 10.3390/biom13020398
42. Pećina-Šlaus N, Kafka A, Tomas D, Marković L, Okštajner PK, Sukser V, i sur. Wnt signaling transcription factors TCF-1 and LEF-1 are upregulated in malignant astrocytic brain tumors. *Histol Histopathol*. 2014 Dec;29(12):1557-64. doi: 10.14670/HH-29.1557.
43. Du L, Lee J-H, Jiang H, Wang C, Wang S, Zheng Z, i sur. β -Catenin induces transcriptional expression of PD-L1 to promote glioblastoma immune evasion, *J Exp Med*. 2020 Nov 2;217(11):e20191115. doi: 10.1084/jem.20191115.
44. Yu X, Xiao F, Wei Y, Miao L, Zhang W, Zhang X, i sur. Elevated β -catenin and C-myc promote malignancy, relapse, and indicate poor prognosis in patients with relapsed glioma, *J Cancer Res Ther*. 2022 Apr;18(2):553-559. doi: 10.4103/jcrt.jcrt_246_22.

45. Yuan Y-S, Jin X, Chen L, Liao J-M, Zhang Y, Yu K-W, i sur. A novel model based on necroptosis-related genes for predicting immune status and prognosis in glioma, *Front Immunol.* 2022 Oct 25;13:1027794. doi: 10.3389/fimmu.2022.1027794.
46. Zhou X, Li X, Wang R, Hua D, Sun D, Yu L, i sur. Recruitment of LEF1 by Pontin chromatin modifier amplifies TGFBR2 transcription and activates TGF β /SMAD signalling during gliomagenesis, *Cell Death Dis.* 2022 Sep 24;13(9):818. doi: 10.1038/s41419-022-05265-y.
47. Min R-Q , Ma Q. MicroRNA-381 inhibits metastasis and epithelial-mesenchymal transition of glioblastoma cells through targeting LEF1, *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020 Jun;24(12):6825-6833. doi: 10.26355/eurev_202006_21672.
48. Han S-P, Kim J-H, Han M-E, Sim H-E, Kim K-S, Yoon S, i sur. SNAI1 is involved in the proliferation and migration of glioblastoma cells, *Cell Mol Neurobiol.* 2011 Apr;31(3):489-96. doi: 10.1007/s10571-010-9643-4.
49. Kaji T, Arito M, Tsutiya A, Sase T, Onodera H, Sato T, i sur. Layilin enhances the invasive ability of malignant glioma cells via SNAI1 signaling, *Brain Res.* 2019 Sep 15;1719:140-147. doi: 10.1016/j.brainres.2019.05.034.
50. Yang HW, Menon LG, Black PM, Carroll RS, Johnson MD. SNAI2/Slug promotes growth and invasion in human gliomas, *BMC Cancer.* 2010 Jun 17;10:301. doi: 10.1186/1471-2407-10-301.
51. Kwon R-Y, Han M-E, Kim Y-J, Kim YH, Kim J-Y, Liu L, i sur. Roles of zinc-fingers and homeoboxes 1 during the proliferation, migration, and invasion of glioblastoma cells, *Tumour Biol.* 2017 Mar;39(3):1010428317694575. doi: 10.1177/1010428317694575.

52. Mikheeva SA, Mikheev AM, Petit A, Beyer R, Oxford RG, Khorasani L, i sur. TWIST1 promotes invasion through mesenchymal change in human glioblastoma, *Mol Cancer*. 2010 Jul 20;9:194. doi: 10.1186/1476-4598-9-194.
53. Yang Y, Wang J, Shi F, Shan A, Xu S, Lv W. BDKRB2 is a novel EMT-related biomarker and predicts poor survival in glioma, *Aging (Albany NY)*. 2021 Mar 3;13(5):7499-7516. doi: 10.18632/aging.202614.
54. Mikheev AM, Mikheeva SA, Severs LJ, Funk CC, Huang L, McFaline-Figueroa JL, i sur. Targeting TWIST1 through loss of function inhibits tumorigenicity of human glioblastoma, *Mol Oncol*. 2018 Jun;12(7):1188-1202. doi: 10.1002/1878-0261.12320.
55. Zeng Y, Que T, Lin J, Zhan Z, Xu A, Wu Z, i sur. Oncogenic ZEB2/miR-637/HMGA1 signaling axis targeting vimentin promotes the malignant phenotype of glioma, *Mol Ther Nucleic Acids*. 2021 Jan 5;23:769-782. doi: 10.1016/j.omtn.2020.12.029.
56. Sun Y, Jiang Y, Wang Y, Yu P, Su X, Song Y, i sur. The epithelial-mesenchymal transition of glioma cells promotes tissue factor expression via the miR200a/ZEB1 axis, *Brain Res*. 2022 Mar 1;1778:147782. doi: 10.1016/j.brainres.2022.147782.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Željko Škripek

E-mail: zeljkoskripek@gmail.com

Datum i mjesto rođenja: 14.06.1991. Slavonski Brod, Republika Hrvatska

OBRAZOVANJE

Fakultet: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; Zdravstveno veleučilište Zagreb -

Radiološka tehnologija

Srednja škola: Srednja medicinska škola- fizioterapeutski tehničar, Slavonski Brod

Osnovna škola: Osnovna škola Ivan Goran Kovačić, Slavonski Brod

STRANI JEZICI

Engleski