

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ana Maria Varošaneć**

**Uloga antagonista signalnog puta Wnt –  
proteina sFRP3 u astrocitnim tumorima  
mozga čovjeka**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2016.**

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za neuro-onkologiju i Laboratoriju za digitalizaciju preparata Zagrebačke neuroembriološke zbirke 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 HRZZ „Uloga signalnog puta Wnt u epitelno mezenhimske tranziciji”, šifra projekta: 6625, WNT4EMT, voditelj: prof. dr. sc. Nives Pećina-Šlaus, i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2015./2016. Rad je izrađen zajedno sa studentom Leonom Markovićem kao drugim autorom te je godine 2015. nagrađen Dekanovom nagradom.

## POPIS KRATICA

<b>sFRP:</b>	izlučeni Frizzledu sličan protein ( prema engl. <i>secreted Frizzled related protein</i> )
<b>LEF:</b>	limfoidni pojačavajući protein (prema engl. <i>lymphoid enhancer factor</i> )
<b>TCF:</b>	T-stanični čimbenik (prema engl. <i>T cell factor</i> )
<b>EMT:</b>	epitelno mezenhaska tranzicija
<b>sWAs:</b>	topljivi Wnt antagonisti ( prema engl. <i>soluble Wnt antagonists</i> )
<b>DVL:</b>	prema engl. <i>dishevelled</i>
<b>FZD:</b>	prema engl. <i>frizzled</i>
<b>LRP:</b>	lipoproteinskom receptoru srodan protein (prema engl. <i>lipoprotein receptor related protein</i> )
<b>INT-1:</b>	prema engl. <i>integration 1</i>
<b>Dkk:</b>	prema engl. <i>dickkopf</i>
<b>Wif1:</b>	Wnt inhibirajući faktor 1
<b>CRD:</b>	domena bogata cisteinom ( prema engl. <i>cysteine rich domain</i> )
<b>Wif1:</b>	Wnt aktivirajući inhibitor faktor 1
<b>IGFBP-4:</b>	inzulinu sličan faktor rasta vezajući protein 4 ( prema engl. <i>insulin like growth factor binding protein 4</i> )
<b>PCP:</b>	prema engl. <i>planar cell polarity</i>
<b>CKI:</b>	kazein kinaza 1 prema engl. <i>casein kinase 1</i>
<b>GSK-3<math>\beta</math>:</b>	glikogen sintaza kinaza 3 beta (prema engl. <i>glycogen synthase kinase 3 betha</i> )
<b>APC:</b>	adenomatozna polipoza kolona (prema engl. <i>adenomatous polyposis coli</i> )
<b>DNA:</b>	deoksiribonukleinska kiselina (prema engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )

- c-myc:** gen stanične mijelocitomatoze (prema engl. *cellular myelocytomatosis*)
- MRI:** prema engl. *magnetic resonance imaging*
- SZO:** Svjetska zdravstvena organizacija
- DAB:** 3,3'-diaminobenzidin tetraklorid

# SADRŽAJ

<b>1. SAŽETAK .....</b>	<b>1</b>
<b>2. SUMMARY .....</b>	<b>1</b>
<b>3. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>3.1. Signalni put Wnt .....</b>	<b>1</b>
<i>3.1.1. Signalizacijski slijed.....</i>	<i>2</i>
<b>3.2. Protein sFRP.....</b>	<b>3</b>
<i>3.2.1. Otkriće i struktura .....</i>	<i>3</i>
<i>3.2.2. Uloga u signalnom putu Wnt .....</i>	<i>4</i>
<b>3.3. Astrocitni tumori središnjeg živčanog sustava.....</b>	<b>6</b>
<b>4. HIPOTEZA .....</b>	<b>8</b>
<b>5.CILJEVI RADA .....</b>	<b>8</b>
<b>6. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>9</b>
<b>6.1. Tumorski uzorci .....</b>	<b>9</b>
<b>6.2. Imunohistokemija .....</b>	<b>9</b>
<b>6.3. Analiza razine ekspresije proteina sFRP3 u stanci .....</b>	<b>10</b>
<b>7. REZULTATI .....</b>	<b>11</b>
<b>8. RASPRAVA .....</b>	<b>18</b>
<b>9. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>20</b>
<b>10.ZAHVALE .....</b>	<b>21</b>
<b>11.LITERATURA .....</b>	<b>22</b>

<b>12.ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>27</b>
---------------------------	-----------

## **ULOGA ANTAGONISTA SIGNALNOG PUTA WNT – PROTEINA sFRP3 U ASTROCITNIM TUMORIMA MOZGA ČOVJEKA**

### **1. SAŽETAK**

Wnt signalizacija regulirana je na više razina, velikim brojem efektora. Modulirajuće molekule funkcioniraju kao agonisti ili antagonisti. Fina uštimanosti njihova odnosa je od velike važnosti za homeostazu stanice i normalno funkcioniranje cjelokupnog organizma. Predmet istraživanja u ovom radu bila je razina ekspresije proteina sFRP3 kao jednog od antagonističkih Wnt molekula, u astrocitomima različitih histopatoloških gradusa ( I, II, III i glioblastoma ). Metodom imunohistokemije određena je razina ekspresije sFRP3 proteina. Na uzorku 200 stanica po preparatu utvrđena je ekspresija proteina sFRP3 s lokalizacijom u jezgrama i citoplazmi stanica astrocitoma. Razina ekspresija u jezgri stanice ukazuje da je smanjen broj stanica u kategorijama umjerene i visoke razine ekspresije za sve graduse astrocitoma, uz dodatni nalaz statistički značajnog smanjenja medijana stanica za više graduse što je u skladu s porastom malignosti astrocitoma, s najvišim vrijednostima kod astrocitoma I i II – visoka (25 odnosno 26.5 stanica), umjerena (14 odnosno 13.5 stanica) , a za visoke graduse broj stanica s visokom i umjerenom razinom ekspresije iznosi za astrocitome III 3 stanice s umjerenom, a 1 stanica s visokom ekspresijom, dok kod glioblastoma nalazimo medijan od 2.5 stanice za umjerenu ekspresiju odnosno 2 stanice za visoku ekspresiju. Analizom razine ekspresije proteina sFRP3 u citoplazmi utvrđen je pad broja stanica u kategorijama umjerene i visoke ekspresije za sve graduse astrocitoma. Uoceno je da broj stanica s visokom razinom ekspresije u malignijih gradusa veći ( glioblastomi – 51 stanica , astrocitomi 42) u odnosu na broj stanica kod nižih gradusa ( astrocitomi II – 26.5 stanica, astrocitomi I – 25 stanica). Prema našim rezultatima zaključujemo da je sniženje ekspresije proteina sFRP3 u jezgri u pozitivnoj korelaciji s porastom gradusa astrocitoma, dok povišenje ekspresije proteina sFRP3 u citoplazmi viših gradusa astrocitoma sugerira dvojnju prirodu sFRP3 u kojoj je u nekim slučajevima antagonist, dok u drugim agonist signalnog puta Wnt.

Ključne riječi: astrocitni tumori mozga, protein sFRP3, signalni put Wnt

## **THE ROLE OF sFRP3 AS WNT ANTAGONIST IN HUMAN ASTROCYTE BRAIN TUMORS**

### **2. SUMMARY**

Wnt signaling is regulated at several levels, by a large number of effectors. Modulating molecules function as antagonist or agonist. Fine tuning of their relationship is of great importance for the cell homeostasis and normal function of the entire organism. The subject of this research was the expression level of sFRP3 as one of the antagonistic Wnt molecules, in astrocytomas of different histopathological grade (I, II, III, and glioblastoma). Immunohistochemistry was the method of choice for determining the levels of sFRP3 expression. On a sample of 200 cells per slide we determined that the expression of sFRP3 was localized in the nuclei and cytoplasm of astrocytic tumor cells. The level of expression in the cell nucleus indicates a decrease of the number of cells with moderate and high levels of expression in all astrocytoma grades, with the additional statistically significant finding that shows a decrease of the median in higher grades which is in accordance with the increase of malignancy in these grades, with the highest values in astrocytomas I and II - high (25 or 26.5 cells), moderate (14 or 13.5 cells) and in the high astrocytoma grades the number of cells with high and moderate levels of expression amounts to astrocytoma III 3 cells with moderate, and 1 cell with high expression, whereas we find in glioblastomas median of 2.5 cells for the expression of moderate or 2 cells for high expression. By analyzing the expression level of sFRP3 in the cytoplasm we determined a decrease in the number of cells in categories of moderate and high expression for all grades of astrocytomas. It was observed that the number of cells with high levels of expression is higher in higher malignant grades (glioblastomas - 51 cells, astrocytoma III - 42) in relation to the number of cells at lower grades (astrocytomas II - 26.5 cells, astrocytoma I - 25 cells). According to our results, we conclude that the decrease of sFRP3 expression in the nucleus is positively correlated with increasing grade of astrocytomas, whereas an increase in protein expression of sFRP3 in the cytoplasm of higher grade astrocytomas suggests a dual nature of sFRP3 where in some cases it acts like an antagonist, while in other cases like an agonist of the Wnt signaling pathway.

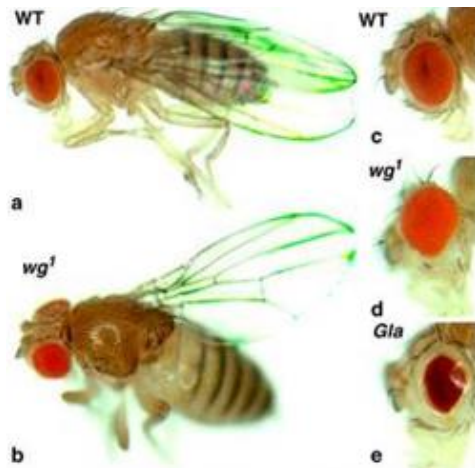
Keywords: astrocytic brain tumors, sFRP3, Wnt signaling



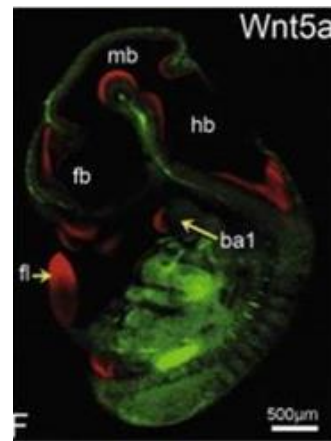
### 3. UVOD

#### 3.1. Signalni put Wnt

Signalni put Wnt je evolucijski sačuvan put koji regulira ključne aspekte određivanja sudbine stanica, stanične migracije, staničnog polariteta, neuronskih obrazaca i organogeneze tijekom embrionalnog razvitka. Otkrićima proteina Int-1 i gena Wingless 1884. godine dolazi prvi put do uporabe imena Wnt nastalog sintezom dvaju imena ( Nusse et al., 1984. )



Slika 1. Wingless mutantni fenotipovi.  
a) fenotip divljeg tipa  
b) wg1 mutacija  
( Bejsovec , 2006. )



Slika 2. Ekspresija Wnt5a u Ts19 mišjem embriju ( Summerhurs et al., 2008. )

Na ranu evoluciju gena upućuje i podatak da su Wnt geni široko rasprostranjeni. U miševa i ljudi nalazimo ih devetnaest, dok ih Drosophila ima sedam (Cadigan, 2008.). Proteini Wnt sekretorni su glikoproteini. Na važnu ulogu Wnt signalnog puta ukazuje mnogobrojnost područja ljudskog tijela u kojima Wnt igra značajnu ulogu, kako u embrionalnom razvitku , tako i u najosnovnijim fiziološkim obrascima. Primjerice, otkriveno je da pojačana ekspresija Wnt5b dovodi do povećanja rizika za diabetes tipa II zbog važne uloge Wnt5b u adipogenezi , jer je poznato da pretilost i dijabetes imaju visoki komorbiditet ( Welters i Kulkarni , 2008.). Zamijećeno je također da je za razvoj nepca neophodan Wnt11 koji inducira apoptozu potrebnu za fuziju nepca ( Lee et al., 2008.). Metastatski tumori dojke također pokazuju povišene vrijednosti komponentni Wnt signalnog puta. Zanimljiva je uloga Wnt signalnog puta u epitelno mezenhimskoj tranziciji ( Welters i Kulkarni, 2008.), procesu u kojem stanice zadobivaju mezenhimski fenotip, postaju pokretne i mogu migrirati na udaljena mjesta. Stanice prolaze brojne molekularne promjene koje će im omogućiti da zadobiju mezenhimski fenotip kojeg

karakterizira migratorni potencijal, promjena citoskeleta i izvanstaničnog matriksa, invazivno ponašanje i otpornost na apoptozu. Prijelaz beta-katenina iz citoplazme u jezgru može izazvati EMT. Time je beta-katenin svrstan u biljege epitelno mezenhimske tranzicije. Stabilizacija i nakupljanje beta-katenina u jezgri povezani su s aktivacijom dvije molekule Snail i Slug , represora transkripcije koji potiskuju izraženost E-kadherina čime se također inducira EMT ( Paw et al. , 2015.). Studije pokazuju da neispravno funkcioniranje Wnt signalnog puta implicira nastanak karcinoma, poput karcinoma želudca ( Cheng et al., 2004. ) i debelog crijeva ( T. Reya et al., 2007.). Ulogu u inicijaciji i održavanju homeostaze Wnt signalnog puta imaju topljivi Wnt antagonisti ( sWAs ), uključujući solubilni Frizzled povezani protein ( sFRP ), dickkopf ( Dkk ) i Wnt inhibirajući faktor-1 ( Wif1 ) ( Byun et al., 2005.). Istraživanja rađena sa sFRP-om pokazuju da u tumorima nalazimo smanjenje razine sFRP-a zbog hipermetilacije promotorske regije gena. U pokusima rađenim s knock out miševima ustanovljeno je da miševi kojima nedostaju oba sFRP1 alela (SFRP1  $-/-$ ) umiru zbog skraćanja anteriorno-posteriorne osi i nepotpune segmentacije somita, a učinak postaje još izrazitiji isključenjem gena SFRP5 ( Satoh et al, 2008.).

### 3.1.1.Signalizacijski slijed

Signalni put Wnt sastavljen je od složenih interakcija brojnih proteina gdje je konačni rezultat aktivacija transkripcijskih čimbenika TCF/LEF u jezgri stanice (Rampazzo et al., 2013.). Vezivanjem solubilne Wnt molekule na površinu proteina koji se protežu kroz membranu počinje signalizacijski slijed. Receptori za Wnt ligande su proteini iz obitelji Frizzled. Obitelj receptora Frizzled ( Fzd ) dio je velike skupine receptora sa sedam transmembranih domena povezanih s G-proteinima ( Malbon, 2004. ). Osim Frizzled proteina u signalizaciju su uključeni i lipoprotein receptor povezani proteini ( LRP5 i LRP6). Povezivanje proteina Fzd i LRP preko Wnt liganda primjer je dimerizacije s unakrsnom fosforilacijom koja je posredovana tirozin-kinazom ili TGF-beta receptorom. U daljem slijedu dolazi do aktivacije proteina Dishevelled ( Dvl ) koji fosforilira LRP i privlači aksin na staničnu membranu. Koncentracija beta-katenina je jedan od važnijih parametara cijele signalizacije. Osim što u stanjima povećane koncentracije difundira u jezgru gdje slijedi njegovo vezivanje za transkripcijske čimbenike TCF/LEF (Clevers, 2006.) , beta-katenin sudjeluje u stvaranju veza među stanicama pomoću tzv. zonula adherens ( Rajasekaran et al., 1996. ). Beta-katenin također ulazi u interakciju s mnogobrojnim

proteinima od kojih su kasein kinaza I ( CKI ), glikogen sintaza kinaza 3-beta ( GSK3-beta), proteinom adenomatozne polipoze kolona ( APC) te aksinom koji pak utječu na koncentraciju beta-katenina na način da stvaraju tzv. beta-katenin razarajući kompleks. Tako vezani beta-katenin se veže za komponentu E3 ubikvitin ligaza kompleksa što dovodi do poliubikvitinacije i razgradnje u proteasomu ( Aberle et al., 1997.). U slučajevima stabilizacije ili pak povećanja koncentracije citoplazmatskog b-katenina dolazi do njegove difuzije u jezgru preko kompleksa jezgrinih pora. Nakon ulaska u jezgru dolazi do vezivanja beta-katenina za proteine iz porodice transkripcijskih faktora TCF/LEF preko kojih zatim beta-katenin ostvaruje svoj učinak na DNA ( Clevers, 2006. ). Aktivacijom transkripcije dolazi do ekspresije Wnt ciljnih gena poput c-myc, c-jun, cyclin D1, aksin2, survivin ( BIRC5 ), cyclin D2, matrilysin ( MMP7) i mnogih drugih ( Shitashige et al., 2008.). Posebice vrijedi spomenuti c-myc onkogen koji regulira mnoštvo staničnih procesa poput progresije staničnog ciklusa, DNA replikaciju, apoptozu i stanični rast. Uočeno je da c-myc regulira ekspresiju preko 15% ljudskih gena ( Gearhart et al., 2007.). Sam c-myc poznati je protoonkogen otkriven kao ciljni gen Wnt signalnog puta ( Tong-Chuan He et al., 1998.). Danas se zna da c-myc neosporivo sudjeluje u tumorigenezi kod sisavaca (D'Cruz et al., 2001.) što pak daje naslutiti snažnu povezanost Wnt signalnog puta i tumorigeneze. Prva istraživanja bila su na karcinomima debelog crijeva i kasnije na karcinomima dojke, no nedavni radovi dokazuju da je razina transkripcijskih cimbenika TCF/LEF proteina također povećana i kod neuroepitelijalnih tumora mozga od kojih su posebice zanimljivi maligni astrocitni tumori mozga ( Pećina Šlaus et al., 2014.).

## **3.2. Protein sFRP**

### **3.2.1. Otkriće i struktura**

sFRP su antagonisti signalnog puta Wnt koji se direktno vežu na Wnt ligande i tako onemogućuju njihovo vezanje za receptore Frizzled. Inicijalno su nazivani nekolicinom imena s obzirom da su otkriveni na nekoliko načina ( Jones i Jomary , 2002.). Trenutno postoji osam poznatih članova obitelji. Jedinstvena nomenklatura postoji za sFRP1 do sFRP5 dok je na primjer sFRP3 bolje poznat kao FrzB. Jednu podgrupu cine sFRP1, sFRP2 i sFRP5, a drugu sFRP3 i sFRP4. Treću podgrupu koja nije indentificirana u sisavaca cine Sizzled, Sizzled2 i Crescent. U literaturi postoje kontradiktorni izvještaji o sposobnosti Sizzleda u inhibiciji Wnt signalnog puta ( Salic et al., 1997.). sFRP3/frzB su prvo pročišćeni kao hondrogenski faktori

nađeni u hrskavici ( Hoang et al., 1996.). FrzB sadrži karakterističnu domenu bogatu cisteinom ( CRD ) koja je u nekim dijelovima homologna sa Fz domenom, što je dovelo do pretpostavke da regulira signalni put Wnt.Ovi nalazi otkriveni su eksperimentima na žabi iz roda *Xenopus* ( Leyns et al., 1997.). CRD sFRPova koji se nalaze na N-terminalom kraju proteina dijele 30-50% sličnosti sekvence s onima Fz proteina i uključuju 10 konzerviranih cisteinskih ostataka ( Melkonyan et al., 1997.). Ostaje nejasno antagonizira li sFRP signalni put Wnt reagirajući sa Wnt ligandima putem CRD ( Lin et al., 1997.) ili pomoću C-terminalne domene koja se nalazi izvan CRD ( Uren et al., 2000.). Kontradiktorni podatci mogu nastati zbog različitih afiniteta unutar sFRPa i njihovih liganada ili zbog upotrebe različitih liganada ( Wg prema Uren et al., i Wnt-1 prema Lin et al.). CRD iz sFRP1 može također biti u interakciji sa samim sobom i s drugim Fz ( Bafico et al., 1999.). Tako sFRPovi mogu blokirati signalni put na dva načina , tako da reagiraju s Wnt proteinima i onemogućuju njihovo vezanje na Fz receptor, ili tako da utječu na vezani Wnt ligand i tvore nefunkcionalne komplekse sa Fz proteinim. C- terminalna domena sFRPa sadrži dijelove koji nemaju sličnosti s terminalnim krajem NTR. NTR domena koja je definirana sa šest cisteinskih ostataka i nekoliko konzerviranih segmenata hidrofobnih ostataka također je nađena u tkivnim inhibitorima metaloproteinaza i nekim komplementarnim proteinima ( Banyai i Patthy, 1999.). Također je poznato da povezivanje sFRPa s heparin sulfat proteoglikanima stabilizira sFRP- Wnt kompleks i određuje lokalizaciju antagonista ( Uren et al., 2000.).

### 3.2.2. Uloga sFRP u signalnom putu Wnt

Wnt signalizacija regulirana je na više razina i uključuje veliki broj efektor. Molekule koje moduliraju signalizaciju mogu funkcionirati kao agonisti ili antagonisti. Fina uštimanost njihova odnosa od velike je važnosti za homeostazu stanice i normalno funkcioniranje cjelokupnog organizma. Poznavajući važnu ulogu Wnt-a u embriogenezi poput razvitka AP-osi, somitogeneze , angiogeneze, vaskulogeneze i formacije očiju, zuba i udova dolazimo do zaključka da homeostatski mehanizmi ne samo da utječu na normalne razvojne procese već i da njihov poremećaj uzrokuje razvoj patoloških oboljenja, poput karcinoma ( Jones i Jomary , 2002.). Istraživanja pokazuju da postoji nekoliko obitelji Wnt antagonista, od kojih četiri obitelji pripadaju tzv. transmembranskim Wnt antagonistima, a šest obitelji pripada izlučenim Wnt antagonistima. Od transmembranskih spominju se Tiki1, protein APCDD1, Wnt-aktivirajući inhibitor faktor 1 (Wif1/5T4) i Shisa, dok su izlučeni antagonisti Dickkopf proteini ( Dkk ), Wise/SOST proteini, Cerberus, inzulinu sličan faktor rasta vezujući protein 4 (IGFBP-4), Wnt-inhibirajući faktor 1 ( WIF-1 ) i izlučeni Frizzledu sličan protein ( sFRP ).

Obitelji izlučenih proteina možemo dalje podijeliti u dvije grupe od kojih se članovi grupe sFRP koji uključuju sFRP, WIF-1 i Cerberus vežu se direktno na Wnt čime onemogućuju njegovo vezanje na receptorski kompleks. Članovi skupine Dickkopf inhibiraju signalizaciju vezujući se na LRP5/LRP6 komponente Wnt receptorskog kompleksa (Niehrs et al., 2001.). Uloga sFRP-a u signalnom putu Wnt ostvaruje se preko receptora Frizzled ( Fzd ) koji je dio obitelji receptora povezanih s membranskim G-proteinom. Frizzled proteini uključuju domene bogate cisteinom koje služe kao konzervirane receptorske tirozin kinaze ( Saldanha et al., 1998.). Na izvanstanične domene bogate cisteinom ( CRD ) na amino kraju vežu se osim Wnt proteina i sekretorni antagonisti poput sFRP- a ( Dann et al., 2001.). Početna biokemijska istraživanja uporabom embrija *Xenopus* i kultiviranjem stanica pokazuju da sFRP svoj antagonistički učinak ostvaruje poglavito preko CRD domene čiji je učinak smanjenje Wnt-a te onemogućavanje pristupa receptorskom kompleksu ( Lin et al., 1997.). U prilog ovoj činjenici govori da mutanti *Drosophila* kojima je nedostajala CRD domena u sFRP1 nisu mogle vezati za Wnt ( Uren et al., 2000.). Studije na matičnim stanicama ukazuju i na važnost N-terminalne regije ( NTR ) proteina sFRP gdje je pokazano da NTR domena oponaša funkciju cjelokupne molekule u vezivanju Wnt8 proteina i inhibiciji Wnt signalizacije ( Lopez-Rios et al., 2008. ). Navedeni rezultati ukazuju da sFRP-ovi vjerojatno posjeduju višestruka vezujuća mjesta za Wnt i/ili da Wnt vezivanjem za različita mjesta na sFRP ostvaruje različite afinitete prema receptorskom kompleksu ( Wawrzak et al., 2007. ; Galli et al., 2006. ; Bradley et al., 2000. ; Pera i De Robertis , 2000. ). Sukladno djelovanju antagonista, uočeno je da je lokacija sFRP gena na kromosomu 8p21 , mjestu često pogođenog gubitkom heterozigotnosti ( Wright et al., 1998.). Snižena koncentracija sFRP-a je također pronađena u cervikalnih karcinoma ( Ko et al., 2002.), karcinoma dojke( Ugolini et al., 2001 ), karcinoma jajnika i bubrega ( Zhou et al., 1998.). Povrh toga, hipermetilacija sFRP1 promotora se učestalo događa kod kolorektalnog karcinoma ( Matsuyama et al., 2009.). Dodatni razlog snižavanja koncentracije sFRP-a u tumorskim stanicama je i indukcija apoptoze uz pomoć sFRP proteina. Primjerice sFRP1 uzrokuje senzibilizaciju stanica karcinoma dojke na apoptozu induciranu TNF proteinima( Matsuyama et al., 2009.). Ipak, razmatrajući opaženu izraženost ne bismo uvijek trebali zaključivati da oni funkcioniraju kao Wnt antagonisti. Istraživanja s kulturama tkiva pokazuju da pri niskim koncentracijama, sFRP3 mogu potencirati Wnt aktivnost ( Uren et al., 2000.). Navedena istraživanja odnose na ometanje funkcije proteina Wingless (Wg) u beskrlešnjaka. Unatoč tome, visoka podudarnost konzerviranih domena između Wg i Wnt-a kralješnjaka ukazuje da obrazac djelovanja može biti specifičan za vrstu. Studije također pokazuju da kod kolorektalnog karcinoma, karcinoma bubrega, karcinoma dojke i prostate opažen je i pad razine

, ali i porasta razine ekspresije sFRP-a ovisno o stupnju malignosti. To ukazuje na vjerojatnost da visoke koncentracije inhibiraju, a niske koncentracije potenciraju Wnt signalizaciju (Wawrzak et al., 2007.). Provedena istraživanja također ukazuju da pošto sFRP djeluju prvenstveno vezivanjem na Wnt i ometanjem njegove interakcije s Frizzled receptorskim kompleksom, inhibicija kreće već na razini citoplazmetske membrane te se stoga može inhibitorno djelovati i na klasični beta-kateninski signalni put Wnt ali i na drugi ogranak ovog puta tzv. planar cell polarity put ( PCP ) ( Matsuyama et al., 2009.). Jedna studija sugerira da sFRP1 stimulira i treći Wnt put preko Frizzled 2 receptora neovisno o endogenoj koncentraciji Wnt proteina ( Rodriguez et al., 2005.). Osim djelovanja na ponašanje stanica, učinak sFRP3 proteina ostvaruje se i preko djelovanja na izvanstanične proteaze i trombospondin 1 preko kojih modulira međustaničnu adheziju i pokretljivost ( Martin-Manso et al., 2011. ). Naposljetku, nedavna istraživanja ukazuju da sFRP kao Wnt antagonist djeluje jedino u stanjima gdje mu je koncentracija daleko iznad fiziološke ( Willert et al., 2003.). Bolje bi dakle razumijevanje obrazaca djelovanja sFRP-a zahtijevalo iscrpnije i detaljnije studije ekspresije i ponašanja sFRP proteina uz pomoću kojih bismo mogli lakše identificirati i u budućnosti razviti anti-Wnt molekulu koje bi spriječila tumorsku progresiju uzrokovanu povećanom aktivnošću signalnog puta Wnt ( Surana et al., 2014.).

### **3.3. Astrocitni tumori središnjeg živčanog sustava**

Nakon cerebrovaskularnih bolesti, tumori središnjeg živčanog sustava drugi su po učestalosti uzrok smrti od neuroloških oboljenja ( Kohler et al., 2011.). Astrocitni tumori središnjeg živčanog sustava su najčešći primarni tumori mozga u odraslih. Spadaju u skupinu glijalnih tumora ili glioma, u kojoj osim astrocitnih tumora tu pripadaju i ependimomi, oligodendrogliomi, gliomi moždanog debla, gliomi optičkog živca i miješani gliomi poput oligoastrocitoma koji se sastoje od različitih tipova glijalnih stanica. Unutar ove grupe, astrocitomi imaju najveći raspon diferenciranosti. Tako prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji ( SZO ) na temelju histoloških i citoloških karakteristika astrocitomima pripadaju dobro diferencirani dobroćudni pilocitni tumori čiji je gradus I, ali i glioblastom koji je najzlocudniji tumor koji se razvija u čovjeka i čiji je gradus IV. Osim navedenih gradusa, u astrocitome spadaju i difuzni astrocitomi gradusa II i anaplastični astrocitomi gradusa III ( Pazanin , 2011.). U dječjoj i mlađoj dobi pretežito se javljaju spororastući pilocitički astrocitomi

( SZO gradus I ). Predilekcijsko mjesto javljanja su cereberalne hemisfere ( Minehan et al., 1995.). Difuzni astrocitom je tumor gradusa II. Javlja se u svakoj životnoj dobi, ali je najčešći kod ljudi starosti između 30 i 40 godina života. Od ukupnog broja astrocitnih tumora, 35% spada u difuzne astrocitome. Tumor je većinom smješten u bijeloj moždanoj tvari, dok se kod manjeg broja oboljelih razvija u dubljim strukturama sive tvari. Karakterizirani su sporim, ali infiltrativnim načinom rasta što ih čini teško resektabilnim te povećava učestalost recidiva ( Pazanin , 2011.). Zajedno s astrocitomima gradusa I ( pilocitičkim astrocitomima ) spadaju u astrocitome niskog stupnja malignosti. Uz povoljne čimbenike bolesnici mogu preživjeti 6-8 godina kod difuznih astrocitoma ( Ohgaki et al., 1999.), dok izrazito spori rast pilocitnih astrocitoma omogućuje da neki bolesnici prežive i više od 40 godina nakon nepotpunog odstranjenja tumora ( Pollack et al., 1994.). Astrocitomi visokog stupnja malignosti su karakterizirani izrazitom celularnošću i značajnom staničnom atipijom te lokalnim invazivnim i agresivnim širenjem. U njih spadaju anaplastični astrocitomi ( SZO gradus III) i glioblastomi ( SZO gradus IV). Karakteristika astrocitoma visokog stupnja malignosti je i mogućnost progresije iz glioma nižeg stupnja malignosti ili „*de novo*“ nastanak bez znakova postojanja manje zloćudnog prekursora. Najčešće su lokalizirani u cerebralnim hemisferama, a kompletno kirurško odstranjenje rijetko je moguće zbog njihove infiltrativne prirode ( Burger et al., 2007. ). Anaplastični astrocitom ima veliku sklonost zloćudnoj progresiji u glioblastome za što mu prosječno treba dvije godine. Glioblastom ( SZO gradus IV ) najčešći je i najzloćudniji primarni tumor mozga. Prosječno je preživljenje približno 12 mjeseci i ne ovisi o primijenjenom liječenju. Manje od 20% bolesnika preživi godinu dana, a manje od 3% preživi tri godine ( Ohgaki et al., 2004.).

## **4. HIPOTEZA**

U zadnjih nekoliko desetljeća bilježimo porast novih molekularnih histološko-biokemijskih biljega tumorigeneze koji omogućuju bolje razumijevanje i predviđanje patohistološkog ponašanja tumora. Otkrivanjem novih molekularnih biljega poboljšava se dijagnostika i prognoza bolesti. Promatrajući tumorski rast prema obrascima ekspresije pojedinih gena i proteina, možemo slobodno reći da specifični proteini mijenjaju svoju razinu izraženosti ovisno o tipu tumora i dediferencijaciji tumorskih stanica. Sukladno saznanjima o povišenoj aktivnosti signalnog puta Wnt u tumorskim stanicama, pretpostavljamo da će razina antagonista ovoga signalnog puta - sFRP3 biti smanjena shodno njegovoj inhibitornoj funkciji u Wnt signalizaciji.

## **5. CILJEVI RADA**

Cilj istraživanja je odrediti te usporediti razinu ekspresiju proteina sFRP3 u jezgri i citoplazmi različitih gradusa astrocitoma te prema tome zaključiti u kojoj je mjeri protein sFRP3 kao antagonist signalnog puta Wnt uključen u regulaciju maligne preobrazbe astrocitoma.



## 6. MATERIJALI I METODE

### 6.1. Tumorski uzorci

Uzorci od 56 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 organizacije (SZO), u astrocitome gradusa I (pilocitni astroцитomi), astrocitome gradusa II ( difuzni astroцитomi ), astrocitome gradusa III ( anaplastični astroцитomi ) te astroцитomi gradusa IV ( glioblastome ). 25 pacijenata su bili muškarci, a 31 žene. Dob pacijenata sezala je od 3 do 73 godine , sa srednjom vrijednošću od 41.45 godina ; a središnjom vrijednošću od 47 godina ( median ). Prosječna dob u vrijeme dijagnoze je bila za muškarce 43.12 , a za žene 40.11 godina. Etička povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveucilista u Zagrebu i KBC Sestre Milosrdnice odobrila su istraživanje, a pacijenti su potpisali informirani pristanak.

### 6.2. Imunohistokemija

U svrhu određivanja staničnog smještaja sFRP3 proteina, te određivanja razine njegove ekspresije, primijenjena je metoda imunohistokemije. Uzorci su bili fiksirani u formalinu, prožeti parafinom, te izrezani na 4 µm debele rezove na Capillary gap mikroskopskim staklima ( DakoCytomation, Denmark ). Preparati su imunohistokemijski obojeni metodom streptavidin horseradish peroxidase/DAB metodom. ( LSAB+, Dako REALTM). Deparafinizirani i rehidrirani preparati stavljeni su u Dako Target Retrieval Solution (DakoCytomation, Denmark) unutar mikrovalne pecnice, 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 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nespecifično vezanje protutijela blokirano je pomoću inkubacije preparata u kozjem serumu tijekom 30 min na 4°C. Primarna protutijela primijenjena su u optimiziranim razrjeđenjima po 30 min na sobnoj temperaturi. Korištena su mišja

monoklonska protutijela anti-human FRP3 (1:200), Santa Cruz Biotechnology, USA . Nakon inkubacije preparati su tri puta ispirani u puferu PBSu. 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 proteina sFRP3 u stanicima**

Preparati su skenirani na digitalnom skeneru visoke rezolucije NanoZoomer 2.0RS (Hamamatsu) u Laboratorij za digitalnu obradu preparata Zagrebačke neuroembriološke zbirke pri Hrvatskom institutu za istraživanje mozga. 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/+, umjerena 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. Rezultati su statistički obrađeni metodom studentovog t-testa koristeći program Excel (Microsoft Office, 2014. ).

## 7. REZULTATI

Naši rezultati su pokazali prisutnost proteina sFRP3 u većini analiziranih uzoraka astrocitnih tumora mozga. Analizom ekspresije utvrđen je obrazac izraženosti, te je nađeno da je protein sFRP3 heterogeno distribuiran u tumorskom tkivu s lokalizacijom u jezgri i citoplazmi. Intenzitet obojenja u 200 stanica svakog uzorka analiziran je nakon digitalnog skeniranja na visokoj rezoluciji na skeneru NanoZoomer 2.0RS (Hammamatsu), a koristeći ImageJ (NIH, SAD). Rezultati su razvrstani u 2 kategorije od kojih je jedna pokazivala stanice s ekspresijom u jezgri, a druga stanice s ekspresijom u citoplazmi. Daljnja kategorizacija stanica kod kojih smo našli ekspresiju u jezgri odnosno citoplazmi temeljena je na intenzitetu obojenja, što ukazuje na razinu ekspresije ovoga antagonista signalnog puta Wnt ( Tablica 1. ). Računajući medijan ekspresije, rezultati pokazuju da 90 stanica od 200 prebrojanih posjeduje nisku ekspresiju odnosno bez ekspresije u jezgri i citoplazmi, njih 13 sadržava umjerenu ekspresiju u jezgri dok samo 8 stanica u jezgri pokazuje visoku ekspresiju. Analizom ekspresije u citoplazmi dokazano je da je medijan stanica s visokom ekspresijom u citoplazmi 36 dok 54 stanice pokazuju srednju razinu ekspresije u citoplazmi. Naši rezultati pokazuju kad smo ukupni uzorak analizirali po gradusima da kod astrocitoma I medijan stanica s niskom ili bez ekspresije u jezgri i citoplazmi iznosi 90 stanica, median stanica s umjerenom ekspresijom u jezgri iznosi 23, dok 14 stanica pokazuje visoku ekspresiju u jezgri. Analizom medijana ekspresije u citoplazmi astrocitoma I, median od 44 stanice pokazuju umjerenu ekspresiju, a visoku ekspresiju pokazuje 25 stanica. Osim analize ekspresije astrocitoma gradusa I ili pilocitičnog tumora, analiza viših gradusa pokazuje da kod astrocitoma II od ukupno prebrojenih 200 stanica nalazimo medijan od 96 stanica s niskom ili bez ekspresije u jezgri i citoplazmi, njih 49,5 umjerenu ekspresiju u citoplazmi, a medijan od 26,5 stanica pokazuje visoku ekspresiju. Kod astrocitoma II median broja stanica sa umjerenom ekspresijom u jezgri je 25,5 stanica dok 13,5 stanica pokazuje visoku ekspresiju. Median ekspresije astrocitoma III kako slijedi iznosi: 94 stanice niske ili bez ekspresije u jezgri i citoplazmi, 3 stanice s umjerenom ekspresijom u jezgri, 1 stanica s visokom ekspresijom u jezgri, 51 stanica s umjerenom ekspresijom u citoplazmi te konačno 42 stanice s visokom ekspresijom u citoplazmi. Naposljetku, najmaligniji stupanj astrocitoma, glioblastom ( gradus IV) , posjeduju median od 80,5 stanica u niskom ili bez ekspresije u jezgri, median umjerene ekspresije u citoplazmi iznosi 72,5 stanica, a postoji 51 stanica koje posjeduju visoku ekspresiju u citoplazmi. U jezgri iznos mediana stanica s umjerenom ekspresijom iznosi 2,5, a samo su 2 stanice s visokom razinom ekspresije u jezgri

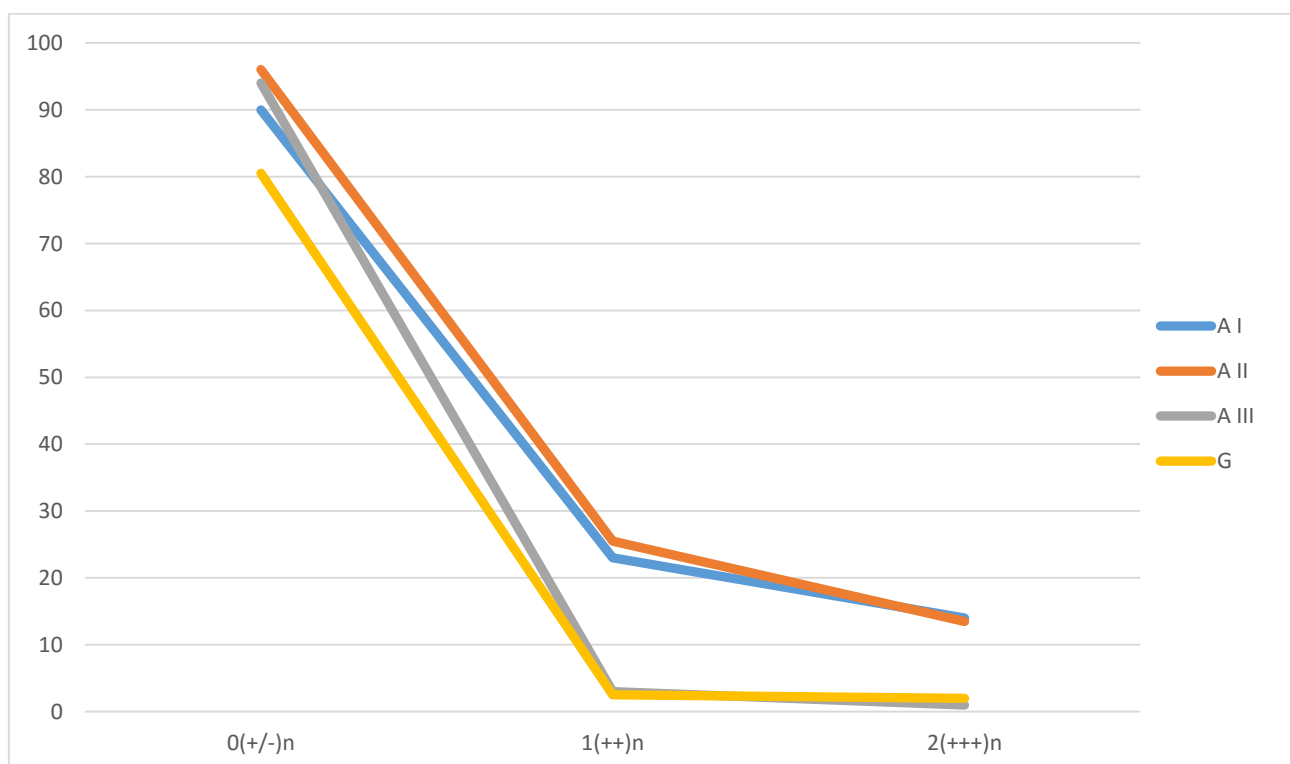
( Tablica 2.) Upotrebom studentovog t-testa primijetili smo da statistički značajno smanjenje razine ekspresije slijedi iz stadija s niskom ili bez ekspresije u jezgri ili citoplazmi u stadij s umjerenom ekspresijom u jezgri odnosno citoplazmi. Ovim statističkim testom dobili smo statističku značajnost za astrocitome I za stadij s niskom ekspresijom ili bez ekspresije u jezgri i citoplazmi naspram stadija s umjerenom ekspresijom u jezgri (  $p=0,0001$  ) dok je rezultat odnosa broja stanica niske ili bez ekspresije u jezgri i citoplazmi i broja stanica u umjerenom ekspresijom (  $p=0,002$  ). Također, analizom ostalih gradusa astrocitoma dobivamo statističku značajnost odnosa broja stanica niske ili bez ekspresije u citoplazmi i jezgri i broja stanica s umjerenom ekspresijom u jezgri za astrocitome II (  $p=0,000017$  ), astrocitome III (  $p=0,00001$  ) i glioblastome (  $p=0,000009$  ). Statistička značajnost također je uočena u odnosu broja stanica s niskom ili bez ekspresije u jezgri i citoplazmi i broja stanica s umjerenom ekspresijom u citoplazmi za astrocitome II (  $p= 0,0001$  ) i astrocitome III (  $p=0,0023$  ). Također je uočena statistička značajnost u padu broju stanica umjerene ekspresije u jezgri između astrocitoma I i astrocitoma III (  $p= 0,03$  ) te također pada broja stanica s visokom ekspresijom u jezgri između astrocitoma I i III (  $p=0,017$  ). Dodatnom analizom uočavamo da ekstrapolacijom rezultata pozitivnog nalaza ekspresije u jezgri naspram broja stanica bez ekspresije u jezgri i citoplazmi nailazimo na statistički značajno smanjenje (  $p=0,00005$  ) broja stanica s ekspresijom. Osim navedenih rezultata nalazimo i statističku značajnost u povećanju broja stanica s umjerenom i visokom ekspresijom u citoplazmi glioblastoma u odnosu na stanice iste kategorije kod astrocitoma II (  $p=0,013$  ) te statističku značajnost kod povećanog medijana stanica za visoku ekspresiju u citoplazmi kod astrocitoma III u odnosu na astrocitome II (  $p=0,04$  ) te većeg mediana stanica za visoku ekspresiju u citoplazmi kod glioblastoma u odnosu na astrocitome III (  $p=0,03$  ). Na ukupnom uzorku pokazali smo da je broj stanica s umjerenom i jakim izraženošću s lokalizacijom u jezgrama uvijek manji od broja stanica s lokalizacijom sFRP3 u citoplazmi. Vidljivo je da je umjerena i visoka ekspresija u jezgri kontinuirano pada kroz stupnjeve malignosti što pokazuje ulogu sFRP3 kao antagonista. Također je vidljivo da umjerena citoplazmatska ekspresija kontinuirano raste kroz stupnjeve malignosti , a također i visoka citoplazmatska ekspresija raste kroz stupnjeve malignosti. Glioblastom tako imaju najveću citoplazmatsku ekspresiju ovoga antagonista. Zaključiti možemo da je tu put Wnt inaktiviran. Što bi značilo da smo mi pokazali da nije samo antagonist nego da stimulira te pojačava prijenos signala.

Tablica 1. Prikaz broja stanica pojedinih preparata s različitim ekspresijama sFRP3 kod različitih gradusa astrocitoma. Značenje slova: 0(+/-)nc -slaba ili bez ekspresije u jezgri i citoplazmi ; 1(++)c - umjerena ekspresija u citoplazmi ; 1(++)n - umjerena ekspresija u jezgri; 2(+++)c - visoka ekspresija u citoplazmi ; 2(+++)n - visoka ekspresija u jezgri

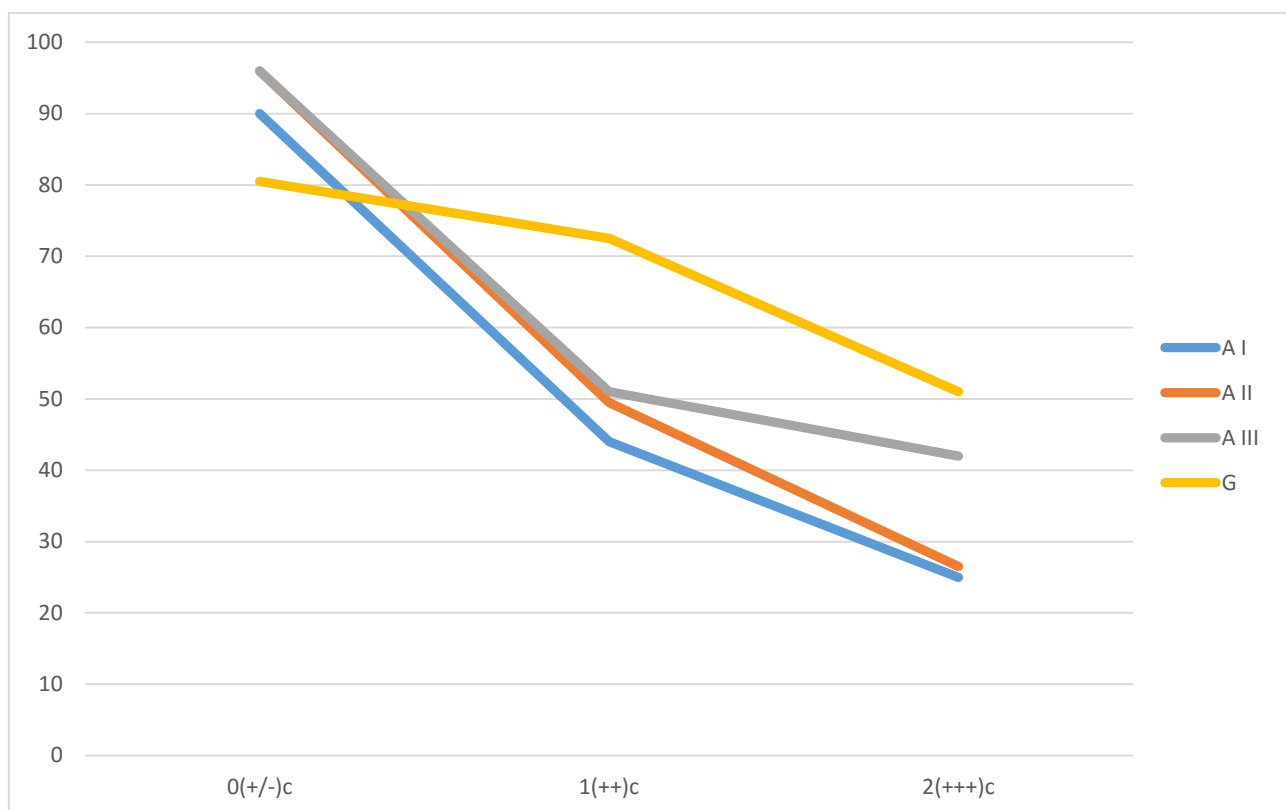
Astroцитomi I	0(+/-)nc	1(++)n	1(++)c	2(+++)n	2(+++)c	Astroцитomi III	0(+/-)nc	1(++)n	1(++)c	2(+++)n	2(+++)c
1616 08	82	40	23	30	25	1011 08	60	3	68	1	74
2096 08	20	85	40	30	42	10264 03	113	7	48	4	54
3581	200	0	0	0	0	11601 06	103	2	51	1	61
4434 02	200	0	0	0	0	11928 03	94	32	61	18	39
7770 01	145	18	34	0	0	12432 03	185	1	3	2	6
8422 02	28	36	74	53	52	14744 08	200	0	0	0	0
9535 06	90	10	56	8	19	17513 10	123	2	52	1	33
9858 01	85	8	53	0	61	19016 09	93	28	51	26	42
10614 01	50	30	41	48	48	1648 10	28	20	6	1	4
13000 09	110	10	58	8	32	5866 01	34	36	82	19	54
14417 03	110	35	44	3	4	18538 07	78	12	74	1	43
14791 10	60	59	62	47	67	<b>Glioblastomi</b>	0(+/-)nc	1(++)n	1(++)c	2(+++)n	2(+++)c
16604 08	130	4	40	22	2	55 05	81	19	74	22	68
17499 07	100	48	56	14	10	89 09	18	15	73	10	114
7286 04	62	23	51	18	46	651 04	11	41	81	32	96
<b>Astroцитomi II</b>	0(+/-)nc	1(++)n	1(++)c	2(+++)n	2(+++)c	2418 05	123	2	48	1	41
176 08	80	40	40	42	65	2695 05	110	1	72	0	38
741 01	101	22	52	14	43	2850 03	82	1	81	1	62
2430 08	135	12	48	3	10	5088 04	93	2	61	3	54
3991 07	64	38	55	65	53	7041 03	12	1	60	0	112
7390 01	98	19	64	13	20	9179 03	10	3	85	1	144
7510 01	106	29	51	23	38	9429 08	200	0	0	0	0
9639 09	94	42	68	13	10	9698 03	16	1	91	2	123
12129 03	152	16	14	3	10	10960 06	196	1	2	0	1
13343 10	93	39	73	13	33	12233 04	153	16	15	13	12
14506 04	71	22	38	39	69	14790 04	78	3	94	0	32
14874 04	30	101	16	128	13	15422 03	69	2	83	3	54
19707 08	160	8	15	4	10	16127 06	80	19	63	18	48
						16176 04	120	4	41	10	32
						2 05	22	6	120	2	74

Tablica 2. Median stanica s razinom ekspresije proteina sFRP3 kod različitih gradusa astrocitoma

	Slaba ili bez ekspresije u jezgri i citoplazmi	Umjerena ekspresija		Visoka ekspresija	
		u jezgri	u citoplazmi	u jezgri	u citoplazmi
<b>Astroцитomi I</b>	90	23	44	14	25
<b>Astroцитomi II</b>	96	25,5	49,5	13,5	26,5
<b>Astroцитomi III</b>	96	3	51	1	42
<b>Glioblastomi</b>	80,5	2,5	72,5	2	51

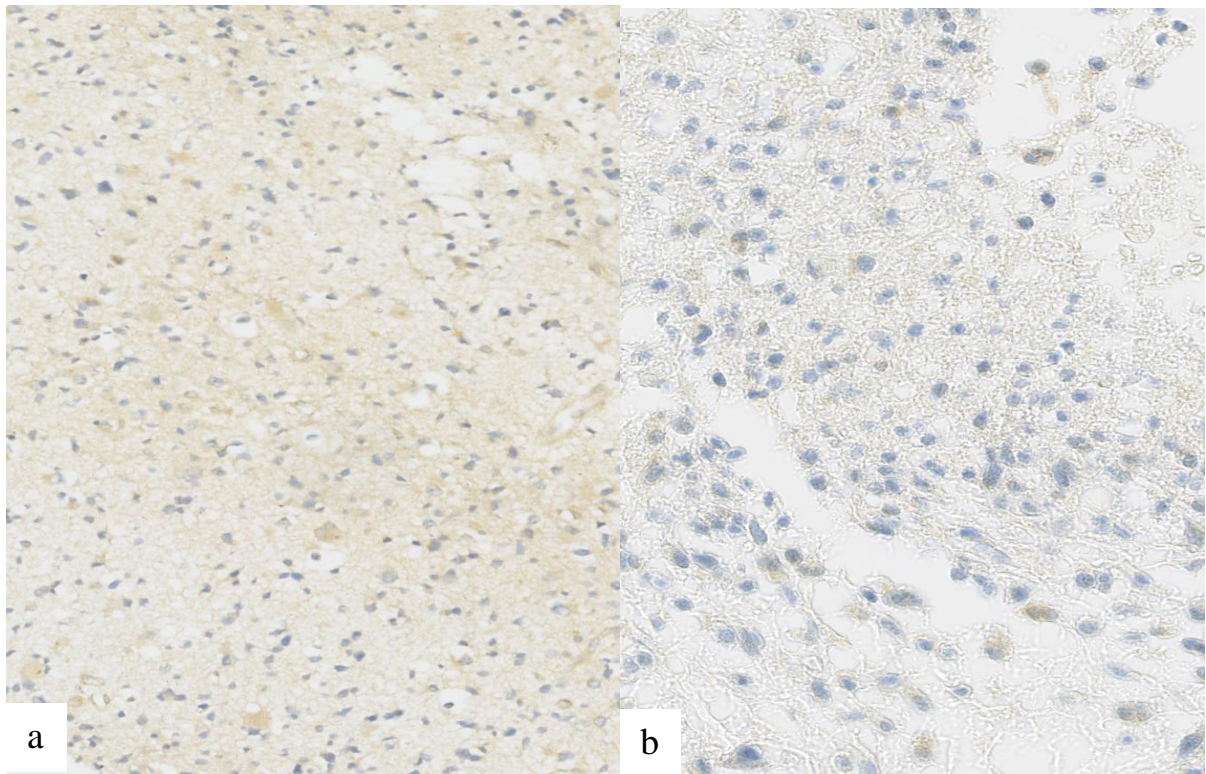


Slika 3. Median razine ekspresije proteina sFRP3 u jezgri kod različitih gradusa astrocitoma

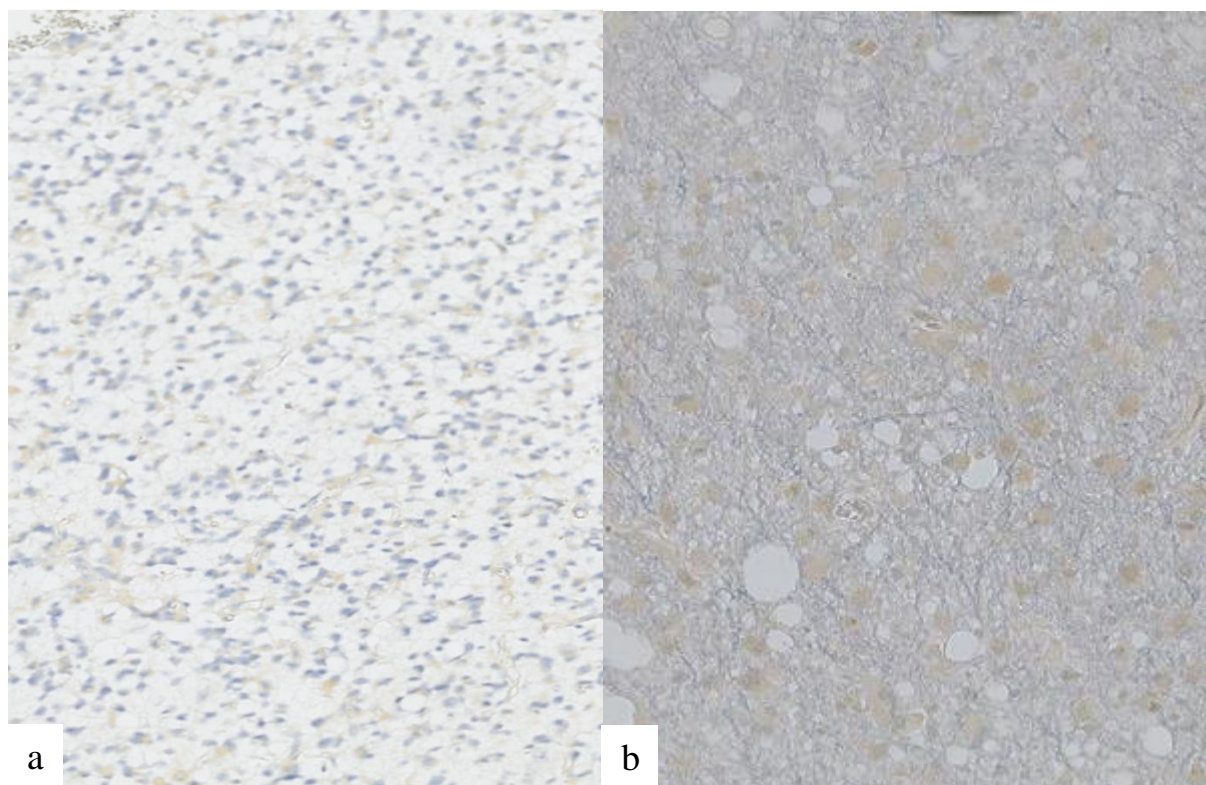


Slika 4. Median razine ekspresije proteina sFRP3 u citoplazmi kod različitih gradusa astrocitoma



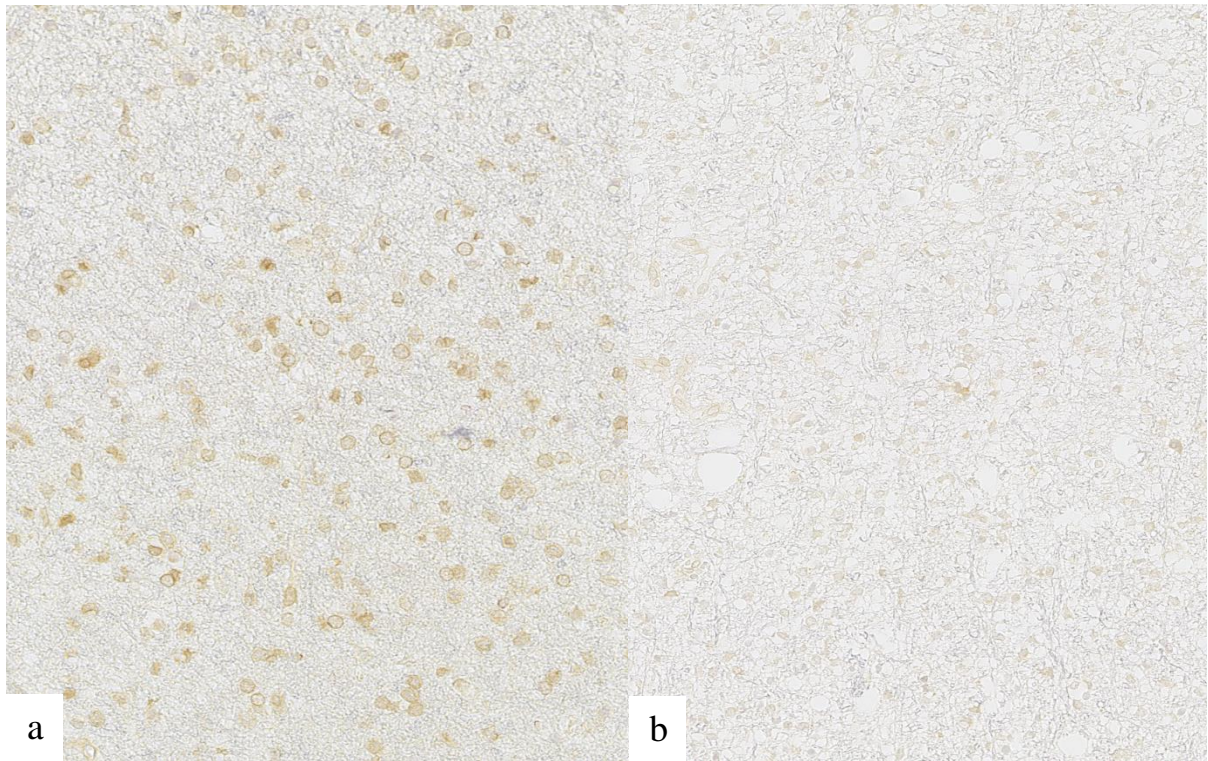


Slika 5. Prikaz ekspresije proteina sFRP3 kod glioblastoma. Vidljivo je: a) izrazita ekspresija u citoplazmi ; b) slaba ekspresija u jezgri

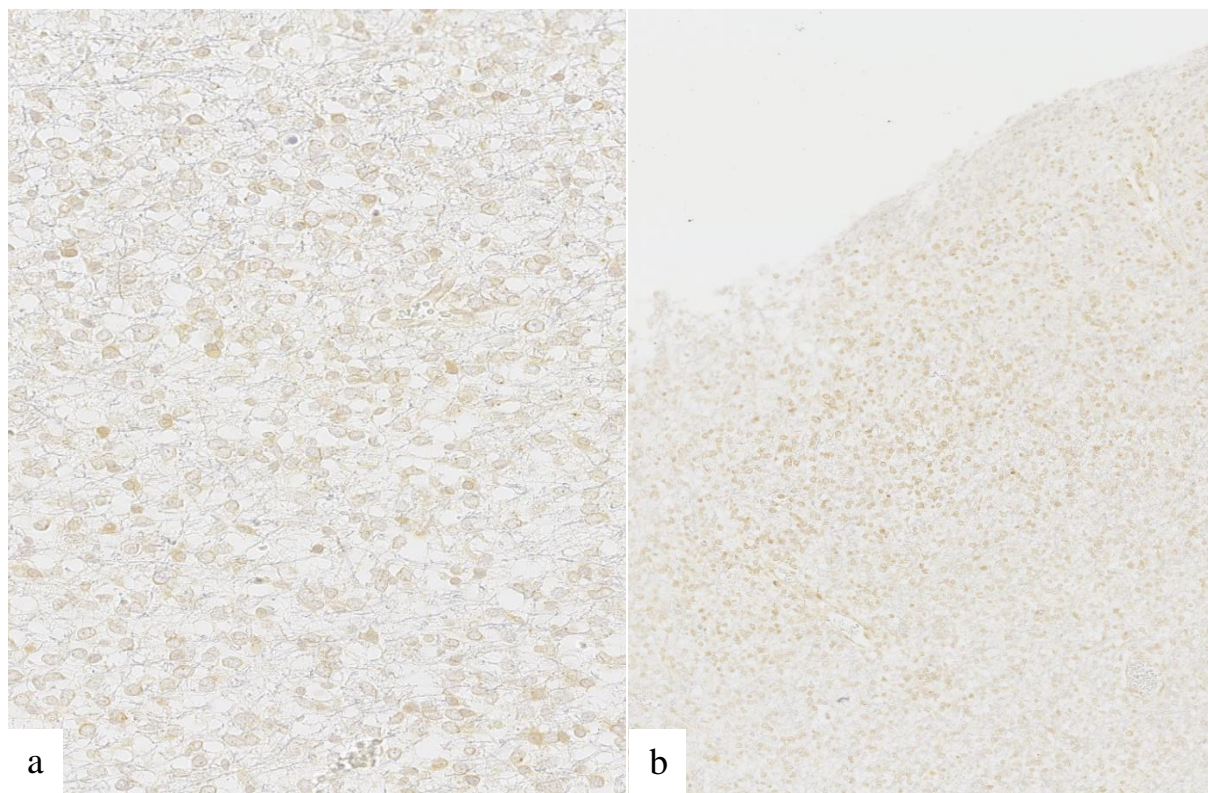


Slika 6. Prikaz ekspresije proteina sFRP3 kod astrocitoma III. Vidljivo je: a) slaba ekspresija u jezgri ; b) izrazita ekspresija u citoplazmi





Slika 7. Prikaz ekspresije proteina sFRP3 kod astrocitoma II .Vidljivo je: a) izrazita ekspresije u jezgri ; b) slaba ekspresija u citoplazmi



Slika 8. Prikaz ekspresije proteina sFRP3 kod astrocitoma I. Vidljivo je: a) slaba ekspresije u citoplazmi ; b) izrazita ekspresija u jezgri

## 8. RASPRAVA

Signalni put Wnt učestalo je promijenjen i neispravno reguliran (aktiviran) u brojnim tumorima. Naša prethodna istraživanja izraženosti i uloge molekularnih komponentni signalnog puta Wnt pokazale su povišenu aktivnosti signalnog puta Wnt u astrocitomima različitih gradusa (Pecina-Slaus et al., 2014.). Analizirajući ulogu sFRP3 proteina u astrocitinim tumorima mozga različitih gradusa na temelju zapažanja može utvrditi da je razina ekspresije sFRP3 globalno snižena u navedenim tumorima. Funkcija sFRP-a tijekom embrionalnog razvitka ukazuje na činjenicu da gradijent ekspresije sFRP proteina utječe na aktivnost signalnog puta Wnt (Lescher et al., 1998.) što pak pokazuje da protein sFRP svojom koncentracijom regulira i održava normalni stanični ustroj. Postoji nekoliko znanstvenih radova u kojima se reflektira uloga sFRP proteina u homeostazi signalnog puta Wnt te je tako dokazano da sFRP4 inhibira Wnt signalizaciju i staničnu proliferaciju u tumorima prostate ovisnim o androgenim hormonima (Horvath et al., 2004.). Studije također pokazuju da je uloga sFRP proteina neosporiva i u drugim malignim tumorima poput karcinoma dojke, jajnika, endometrija, debelog crijeva, bubrega, mokraćnog mjehura, želudca, pluća i jetre gdje je dokazano da u svim navedenim malignomima sFRP funkcionira kao antagonist signalnog puta (Surana et al., 2014.). Naše istraživanje pokazuje da u jezgri astrocitoma dolazi do pada ekspresije sFRP3 proteina, gdje najvišu razinu ekspresije imamo kod pilocitičkog astrocitoma kao benigne forme, medijan od 23 stanice s umjerenom ekspresijom i 14 stanica s visokom ekspresijom, te astrocitoma gradusa II, medijan od 25,5 stanica s umjerenom ekspresijom i 13,5 stanica s visokom ekspresijom, dok pak visoki gradusi pokazuju veoma malu razinu ekspresije sFRP3 proteina u jezgri, medijan ekspresije kod astrocitoma gradusa III za umjerenu ekspresiju iznosi 3 stanice, dok za visoku ekspresiju samo 1 stanica, a također i kod najmalignije forme astrocitoma, glioblastoma, nalazimo medijan u iznosu 2,5 stanica za umjerenu ekspresiju i medijan iznosa 2 stanice za visoku ekspresiju. Navedeni rezultati u jezgri su u skladu s pretpostavkama da sFRP djeluje kao inhibitor signalnog puta Wnt jer dokazanom povećanom aktivnošću navedenog puta logički se nameće zaključak da je razina inhibitora niska. Postoji samo jedan rad u literaturi koji se odnosi na međudjelovanje proteina sFRP i signalnog puta Wnt kod astrocitoma gdje rezultati tog rada pokazuju da djelovanjem na signalni put, pojačana ekspresija sFRP proteina inhibira migraciju djelujući preko inhibicije MMP-2 aktivnosti, no u isto vrijeme pojačava proliferaciju stanica nepoznatim mehanizmom (Roth et al., 2000.). Zapažanje o inhibiciji migracije pokazuje da sFRP različito utječe na procese rasta (

proliferacije ) i invazivnosti ( mobilnosti) tumora te se podudara s nalazima drugih radova o antagonističkog djelovanju sFRP proteina na signalni put Wnt kod različitih malignoma, no nalaz pojačane proliferacije otvara mogućnost postavljanja hipoteze da kod različitih gradusa i kod različitih tumora sFRP drugačije djeluje na ponašanje stanice. Osim analize ekspresije u jezgri, analizom ekspresije u citoplazmi dobili smo rezultat u potpunosti suprotan mišljenju da je sFRP isključivo antagonist signalnog puta Wnt. Naše istraživanje pokazalo je da u citoplazmi glioma dolazi do statistički značajnog porasta medijana stanica u iznosu od 72,5 stanica koje pokazuju umjerenu ekspresiju kod glioblastoma kao najmalignijih astrocitoma naspram mediana stanica s umjerenom ekspresijom kod astrocitoma III u iznosu od 51 stanice dok pak median stanica za visoku ekspresiju kod glioblastoma iznosi 51, kod astrocitoma III 42, a kod astrocitoma II kao najmanje malignih forme difuznih astrocitoma taj broj iznosi 25,5. Studija Surane et al. iz 2014. pak sugerira da povišene koncentracije sFRP-a djeluju nekim drugačijim mehanizmima na signalni put Wnt posljedica čega je „suprotno očekivanjima, poticanje proliferacije stanica. Neke pak studije pokazuju da sFRP kao antagonist djeluje prvenstveno u koncentracijama iznad fizioloških ( Willert et al., 2003. ). Studija Schiefera et al. iz 2014. pokazuje da upotrebom Western blot analize nalazimo povišenu ekspresiju sFRP4 proteina kod glioblastoma što se podudara s našim rezultatima povišene citoplazmatske ekspresije sFRP3 ekspresije kod glioblastoma. Naša istraživanja pokazuju da osim uobičajene uloge sFRP kao Wnt antagonista, analizom razina ekspresije navedenog proteina i u citoplazmi i u jezgri možemo zaključiti da prepoznavanje promjena u molekularnom kontekstu tumorskih stanica mozga znanstveno je vrlo vrijedno jer otkrivanjem uloge novih proteina možemo ponuditi potencijalne dijagnostičke biljege nastanka i progresije i otvoriti nove molekularne mete za terapijske intervencije. Komponente signalnog puta Wnt od kojih se iz našeg rada vidi da je i sFRP3 uključen pokazale su da imaju ulogu u astrocitnim tumorima mozga. Za bolje razumijevanje i bolju uspješnost u korištenju pametnih lijekova potrebne su dodatne studije u kojima korištenjem purificiranih Wnt proteina i studije gubitka funkcije sFRP3 pomoći će odrediti ulogu proteina Sfrp3 kao Wnt antagonista.

## 9. ZAKLJUČCI

1. Po prvi puta smo pokazali da je u ukupnom uzorku koji smo analizirali ekspresija proteina sFRP3 izražena i lokalizirana u citoplazmama i jezgrama stanica astrocitoma.
2. Razina ekspresije sFRP3 u jezgri i citoplazmi smanjena je u kategorijama umjerene i visoke ekspresije u svim gradusima astrocitoma. Pad je u skladu s našim očekivanjima i pretpostavkama.
3. Razine ekspresije u jezgri bilježe veći pad u kategorijama umjerene i visoke ekspresije malignijih gradusa( astrocitomi III i glioblastomi) u odnosu na manje maligne( astrocitomi II ) i benigne graduse( astrocitomi I) i ova razlika se pokazala statistički značajnom (  $p=0.00014$ )
4. Razina visoke ekspresije u citoplazmi je najviša za najmaligniji gradus IV ( glioblastomi) u odnosu na manje malignan gradus ( astrocitomi III i II) što se pokazalo statistički značajno ( $p=0.006$ )
5. Našli smo smanjenu razinu ekspresije u jezgri stanica astrocitoma dovodi do gubitka kontrole nad ograničavanjem aktivnosti signalnog puta Wnt, te posljedično pojačanoj malignosti s povišenjem gradusa.
6. Interpretacija rezultata ekspresije u citoplazmi nije tako jednostavna te su potrebna daljnja istraživanja za razjašnjavanje funkcije sFRP3 kod maligno promijenjenih stanica.

## **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. Bafico A, Gazit A, Pramila T, Finch PW, Yaniv A, Aaronson SA. Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* 1999;274:16180-16187
3. Banyai L, Pathy L. The NTR module: domains of netrins, secreted frizzled related proteins, and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of metalloproteases. *Protein Sci.* 1999;8:1636-1642.
4. Bejsovec A. Flying at the head of the pack: Wnt biology in Drosophilla. *Oncogene* 2006;25:7442-7449
5. Burger PC, Scheithauer BW. Tumors of the Central Nervous System. *AFIP Atlas of Tumor Pathology.* 2007.
6. Byun T, Karimi M, Marsh JL, Milovanovic T, Lin F, Holcombe RF. Expression of secreted Wnt antagonists in gastrointestinal tissues: potential role in stem cell homeostasis. *J Clin Pathol.* 2005;58;515-9
7. Cadigan KM. Wnt-beta-catenin signaling. *Curr Biol* 2008;18:943-7
8. Cheng YY, Yu J, Wong JP, Man EP, To KF, Jin VX, Li J, Tao Q, Sung JJ, Chan JK, Leung WK. Frequent epigenetic inactivation of secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2) by promoter methylation in human gastric cancer. *Br. J. Cancer* 2007;97:895-901
9. Clevers H. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006;3:469-480
10. Dann CE, Hsieh JC, Ratter A, Sharma D, Nathans J, Leahy DJ. Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature* 2001;412:86-90
11. D'Cruz CM1, Gunther EJ, Boxer RB, Hartman JL, Sintasath L, Moody SE, Cox JD, Ha SI, Belka GK, Golant A, Cardiff RD, Chodosh LA. c-MYC induces mammary tumorigenesis by means of a preferred pathway involving spontaneous Kras2 mutations. *Nat Med.* 2001;7:235-9



12. Gearhart J, Pashos EE, Prasad MK. Pluripotency redux--advances in stem-cell research. *N Engl J Med.* 2007;357:1469-72
13. Hoang B, Moos MJ, Vukicevic S, Luyten FP. Primary structure and tissue distribution of FRZB, a novel protein related to Drosophila frizzled, suggest a role in skeletal morphogenesis. *J. Biol. Chem.* 1997;271:26131-26137.
14. Horvath LG, Henshall SM, Kench JM, Saunders DN, Lee CS, Golovsky D, Brenner PC, O'Neill GF, Kooner R, Stricker PD, Grygiel JJ, Sutherland RL. Membranous expression of secreted frizzled-related protein 4 predicts for good prognosis in localized prostate cancer and inhibits PC3 cellular proliferation in vitro. *Clin. Cancer Res.* 2004;10:615-625
15. Kohler BA, Ward E, McCarthy BJ, Schymura MJ, Ries LA, Ehemann C, Jemal A, Anderson RN, Ajani UA, Edwards BK. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, featuring tumors of the brain and other nervous system. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103:714-36
16. Jones SE, Jomary C. Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays* 2002;24:811-820
17. Lescher, B., Haenig, B. and Kispert, A. sFRP-2 is a target of the Wnt-4 signaling pathway in the developing metanephric kidney. *Dev. Dyn.* 1998;213:440-451.
18. 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;314:341-50
19. Leyns L, Bouwmeester T, Kim SH, Piccolo S, de Robertis EM. Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* 1997;88:747-756.
20. Lin K, Wang S, Julius MA, Kitajewski J, Moos MJr, Luyten FP. The cysteine-rich frizzled domain of Frzb-1 is required and sufficient for modulation of Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997;94:11196-11200
21. Lopez-Rios J, Esteve P, Ruiz JM, Bovolenta P. The Netrin-related domain of Sfrp1 interacts with Wnt ligands and antagonizes their activity in the anterior neural plate. *Neural Dev* 2008;3:19

22. Malbon CC. Frizzleds: new members of the superfamily of G-protein-coupled receptors. *Front Biosci* 2004;9:1048-1058
23. Martin-Manso G1, Calzada MJ, Chuman Y, Sipes JM, Xavier CP, Wolf V, Kuznetsova SA, Rubin JS, Roberts DD. sFRP-1 binds via its netrin-related motif to the N-module of thrombospondin-1 and blocks thrombospondin-1 stimulation of MDA-MB-231 breast carcinoma cell adhesion and migration. *Arch Biochem Biophys*. 2011;509:147-56
24. Matsuyama M, Aizawa S, Shimono A. Sfrp controls apicobasal polarity and oriented cell division in developing gut epithelium. *PLoS Genet* 2009;5:
25. Melkonyan HS, Chang WC, Shapiro JP, Mahadevappa M, Fitzpatrick PA, Kiefer MC, Tomei LD, Umansky SR. SARPs: a family of secreted apoptosis-related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997;94:13636-13641
26. Minehan KJ, Shaw EG, Scheithauer BW, Davis DL, Onofrio BM. Spinal cord astrocytoma: pathological and treatment considerations. *J Neurosurg* 1995;83:590-95.
27. Niehrs C, Kazanskaya O, Wu W, Glinka A. Dickkopf1 and the Spemann-Mangold head organizer. *Int. J. Dev. Biol.* 2001;45:237-240.
28. Nusse R, van Ooyen A, Cox D., Funk YK, Varmus H. Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (int-1) on mouse chromosome 15. *Nature* 1984;307:131-6
29. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64:479-89.
30. Paw I, Carpenter RC, Watabe K, Debinski W, Lo HW. Mechanisms regulating glioma invasion. *Cancer Lett.* 2015;1:1-7
31. Pazanin L. Histopathology of glial tumors. *Medicina fluminensis* 2011;47:157-166
32. Pećina-Šlaus N, Kafka A, Tomas D, Marković L, Okštajner PK, Sukser V, Krušlin B. Wnt signaling transcription factors TCF-1 and LEF-1 are upregulated in malignant astrocytic brain tumors. *Histol Histopathol.* 2014;29:1557-64



33. Pollack IF, Hurtt M, Pang D, Albright AL. Dissemination of low grade intracranial astrocytomas in children. *Cancer* 1994;73:2869-78.
34. Rajasekaran AK1, Hojo M, Huima T, Rodriguez-Boulan E. Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions. *J Cell Biol.* 1996;132:451-63
35. 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
36. Reya T, Clevers H. Wnt signaling in stem cells and cancer. *Nature.* 2005;434:834-50
37. Rodriguez J, Esteve P, Weinl C, Ruiz JM, Fermin Y, Trousse F, Dwivedy A, Holt C, Bovolenta P. SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor. *Nat Neurosci.* 2005;8:1301-9
38. Roth, W, Wild-Bode C, Platten M, Grimm C, Melkonyan HS, Dichgans J, Weller M. Secreted Frizzled-related proteins inhibit motility and promote growth of human malignant glioma cells. *Oncogene* 2000;19:4210-4220
39. Saldanha J, Singh J, Mahadevan D. Identification of a frizzled-like cysteine rich domain in the extracellular region of developmental receptor tyrosine kinases. *Protein Sci.* 1998;7:1632-1635
40. Salic AN, Kroll KL, Evans LM, Kirschner MW. Sizzled: a secreted Xwnt8 antagonist expressed in the ventral marginal zone of *Xenopus* embryos. *Development* 1997;124:4739-4748.
41. Satoh W, Matsuyama M, Takemura H, Aizawa S, Shimono A. Sfrp1, Sfrp2, and Sfrp5 regulate the Wnt/beta-catenin and the planar cell polarity pathways during early trunk formation in mouse. *Genesis* 2008;46:92-103
42. Schiefer L, Visweswaran M, Perumal V, Arfuso F, Groth D, Newsholme P, Warriar S, Dharmarajan A. Epigenetic regulation of the secreted frizzled-related protein family in human glioblastoma multiforme. *Cancer Gene Ther.* 2014;21:297-303
43. Shitashige M, Hirohashi S, Yamada T. Wnt signaling inside the nucleus. *Cancer Sci.* 2008;99:631-637
44. Summerhurs K., Stark M., Sharpe J., Davidson D., Murphy P. 3D representation of Wnt and Frizzled gene expression patterns in the mouse embryo at embryonic day 11.5 (Ts19). *Gene Expr Patterns* 2008;8:331-348

45. Surana R, Sikka S, Cai W, Shin EM, Warriar SR, Tan HJ, Arfuso F, Fox SA, Dharmarajan AM, Kumar AP. Secreted frizzled related proteins: Implications in cancers. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1845:53-56
46. Uren A, Reichsman F, Anest V, Taylor WG, Muraiso K, Bottaro DP, Cumberland S, Rubin JS. Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. *J Biol Chem* 2000;275:4374–4382
47. Wawrzak D, Metioui M, Willems E, Hendrickx M, de Genst E, Leyns L. Wnt3a binds to several sFRPs in the nanomolar range. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;357:1119–1123
48. Welters HJ, Kulkarni RN Wnt signaling: relevance to beta-cell biology and diabetes. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2008;19: 349–355
49. Willert K1, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3rd, Nusse R. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 2003;423:448-52

## 12. ŽIVOTOPIS

Ana Maria Varošaneć

Rođena sam u Zagrebu 28. siječnja 1992. Pohađala sam VII. Križanićevu gimnaziju u Zagrebu koju sam završila 2010. Iste godine upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci. Godine 2011. prebacila sam se na Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2013. dobila sam Dekanovu nagradu za najboljeg studenta treće godine. 2015. godine sam nagrađena Dekanovom nagradom za znanstveni rad na temu „Uloga antagonista signalnog puta Wnt – proteina sFRP3 u astrocitnim tumorima mozga čovjeka“. Trenutno sam studentica 6. godine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U projektu „Signalni put Wnt“ sudjelujem od akademske godine 2013/2014.