

Promjene u strukturi gena i izraženosti proteina DVL-1, DVL-2, DVL-3 te transkripcijskih faktora TCF-1 i LEF-1 u astrocitnim tumorima mozga

Kafka, Anja

Doctoral thesis / Disertacija

2017

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:105:113632>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-28**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Anja Kafka

**Promjene u strukturi gena i izraženosti
proteina DVL-1, DVL-2, DVL-3 te
transkripcijskih faktora TCF-1 i LEF-1
u astrocitnim tumorima mozga**

DISERTACIJA



Zagreb, 2017.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Anja Kafka

**Promjene u strukturi gena i izraženosti
proteina DVL-1, DVL-2, DVL-3 te
transkripcijskih faktora TCF-1 i LEF-1
u astrocitnim tumorima mozga**

DISERTACIJA

Zagreb, 2017.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za neuroonkologiju na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Voditelj rada: prof. dr. sc. Nives Pećina-Šlaus

Ekperimentalni postupci, analiza preparata i troškovi izrade ove disertacije najvećim su dijelom financirani sredstvima Hrvatske zaklade za znanost, istraživački projekt HRZZ6625 „Uloga signalnog puta Wnt u epitelno-mezenhimsnoj tranziciji“ (WNT4EMT), voditeljica prof. dr. sc. Nives Pećina-Šlaus. Projekt se provodi na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.



Zahvala

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Nives Pećina-Šlaus na velikoj podršci i stručnom vodstvu tijekom izrade ovog rada. Hvala na savjetima, strpljenju i pruženom znanju koje me je osposobilo za daljnji znanstveni i nastavni rad.

Veliko hvala suradnicima s Klinike za neurokirurgiju i Zavoda za patologiju „Ljudevit Jurak“ Kliničkog bolničkog centra “Sestre milosrdnice” u Zagrebu te s Klinike za neurokirurgiju i Zavoda za patologiju Kliničkog bolničkog centra “Zagreb” u Zagrebu na suradljivosti prilikom prikupljanja uzoraka.

Svojim dragim kolegicama i kolegama sa Zavoda za biologiju i Hrvatskog instituta za istraživanje mozga želim se zahvaliti na pomoći, podršci, korisnim savjetima i razmjeni iskustava, a naročito na ugodnoj atmosferi bez koje rad ne bi predstavljao dovoljno zadovoljstvo.

Hvala i svim mojim prijateljima koji su uvijek uspješno ovo putovanje činili mnogo zabavnijim.

Posebnu i neizmjernu zahvalnost dugujem svojim roditeljima, bratu i supruzi bez čije ljubavi, razumijevanja, bodrenja i pomoći niti jedan moj uspjeh ne bi bio moguć.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Astrociti	1
1.2. Astrocitni tumori mozga	4
1.3. Molekularna neuropatologija astrocitnih tumora	6
1.3.1. Pilocitični astrocitom	7
1.3.2. Difuzni astrocitom	8
1.3.3. Anaplastični astrocitom	9
1.3.4. Glioblastoma multiforme	9
1.4. Signalni put Wnt.....	17
1.5. Dishevelled.....	20
1.5.1. Struktura proteina Dishevelled	21
1.5.2. Premještanje u jezgru.....	23
1.5.3. Regulacija aktivnosti DVL.....	23
1.6. Obitelj čimbenika transkripcije TCF/LEF	24
1.6.1. Domene čimbenika transkripcije TCF/LEF.....	24
1.6.2. Čimbenik transkripcije TCF1	25
1.6.3. Čimbenik transkripcije LEF1	26
1.6.4. Regulacija aktivnosti TCF/LEF	26
1.7. Nestabilnost genoma, mikrosatelitni biljezi i gubitak heterozigotnosti	28
2. HIPOTEZA.....	31
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	32
3.1. Opći cilj.....	32
3.2. Specifični ciljevi	32
4. MATERIJALI I METODE.....	33
4.1. Prikupljanje i obrada uzoraka	33
4.2. Izdvajanje DNA iz tkiva tumora metodom fenol/kloroform	37
4.3. Izdvajanje DNA iz pune krvi metodom izoljavanja.....	38
4.4. Provjera kvalitete izdvojene DNA u gelu agaroze.....	39
4.5. Određivanje koncentracije i čistoće DNA	39
4.6. Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimerazom (PCR)	40
4.6.1. Optimizacija višestruke („multiplex“) lančane reakcije polimerazom	42

4.7.	Elektroforeza DNA u gelu agaroze	43
4.8.	Elektroforeza DNA u gelovima Spreadex	44
4.9.	Genotipizacija mikrosatelita	44
4.10.	Imunohistokemija	45
4.10.1.	Protutijela	46
4.10.2.	Analiza imunohistokemijskih preparata	47
4.11.	Statistička analiza podataka	48
5.	REZULTATI	49
5.1.	Demografski podatci i anatomska lokalizacija ispitivanih astrocitoma	49
5.2.	Analiza gena Dishevelled u astrocitnim tumorima mozga	53
5.2.1.	Rezultati analize mikrosatelitne nestabilnosti i gubitka heterozigotnosti gena <i>DVL1</i> ..	53
5.2.2.	Rezultati analize mikrosatelitne nestabilnosti i gubitka heterozigotnosti gena <i>DVL2</i> ..	57
5.2.3.	Rezultati analize mikrosatelitne nestabilnosti i gubitka heterozigotnosti gena <i>DVL3</i> ..	59
5.3.	Rezultati genotipizacije mikrosatelita	62
5.4.	Izraženost proteina Dishevelled u astrocitnim tumorima mozga	65
5.4.1.	Izraženost i lokalizacija proteina <i>DVL1</i> u astrocitnim tumorima mozga	65
5.4.2.	Izraženost i lokalizacija proteina <i>DVL2</i> u astrocitnim tumorima mozga	72
5.4.3.	Izraženost i lokalizacija proteina <i>DVL3</i> u astrocitnim tumorima mozga	78
5.4.4.	Međusobna korelacija proteina <i>DVL1</i> , <i>DVL2</i> i <i>DVL3</i>	86
5.5.	Izraženost čimbenika transkripcije iz obitelji TCF/LEF u astrocitnim tumorima mozga	90
5.5.1.	Izraženost čimbenika transkripcije TCF1 u astrocitnim tumorima mozga	90
5.5.2.	Izraženost čimbenika transkripcije LEF1 u astrocitnim tumorima mozga	95
5.5.3.	Međusobna korelacija proteina TCF1 i LEF1	100
5.6.	Sveukupna analiza dobivenih podataka	102
6.	RASPRAVA	104
6.1.	Nestabilnost genoma <i>DVL1</i> , <i>DVL2</i> i <i>DVL3</i>	105
6.2.	Dishevelled i tumori	111
6.3.	Obitelj čimbenika transkripcije TCF/LEF i tumori	117
7.	ZAKLJUČCI	121
8.	SAŽETAK	123
9.	SUMMARY	124
10.	LITERATURA	125
11.	ŽIVOTOPIS	138

POPIS KRATICA

aCGH engl. *array Comparative Genomic Hybridization*, komparativna genomska hibridizacija

AKT - obitelj serin/treonin specifičnih protein kinaza

ALT engl. *Alternative Lengthening of Telomeres*, alternativno produljivanje telemera

ANXA7 engl. *Annexin A7*, aneksin A7

APC engl. *Adenomatous Polyposis Coli*, adenomatozna polipoza kolona

ATRX engl. *Alpha-Thalassemia/mental Retardation Syndrome X-linked*

CDK engl. *Cyclin-Dependent Kinase*, o ciklinu ovisna kinaza

CDKN2A engl. *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*, inhibitor o ciklinu ovisne kinaze 2A

CDKN2B engl. *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2B*, inhibitor o ciklinu ovisne kinaze 2B

CIN engl. *Chromosomal Instability*, nestabilnost kromosoma

CK1 engl. *Casein Kinase I*, kinaza kazeina I

DAAM engl. *Dishevelled Associated Activator of Morphogenesis 1*

DAB engl. *3,3'-Diaminobenzidine*, diaminobenzidin

EGFR engl. *Epidermal Growth Factor Receptor*, receptor za epidermalni čimbenik rasta

EMP3 engl. *Epithelial Membrane Protein 3*, epitelni membranski protein 3

FRAT engl. *Frequently Rearranged in Advanced T-Cell Lymphomas*

Fz engl. *Frizzled*

GBM engl. *Glioblastoma Multiforme*, glioblastom

GFAP engl. *Glial Fibrillary Acidic Protein*, kiseli vlaknasti protein glije

GSK3 β engl. *Glycogen Synthase Kinase 3 β* , kinaza sintaze glikogena 3 β

HIPK2 engl. *Homeodomain Interacting Protein Kinase 2*

HMG box engl. *High Mobility Group box*

IDH1/2 engl. *Isocitrate Dehydrogenase 1/2*, izocitrat dehidrogenaza 1/2

KLHL12 engl. *Kelch Like Family Member 12*

LEF1 engl. *Lymphoid-Enhancing Factor 1*

LOH engl. *Loss of Heterozygosity*, gubitak heterozigotnosti

LRP engl. *LDL Receptor-related Protein*, protein sličan receptoru LDL-a

MAPK engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*, mitogenom-aktivirane kinaze proteina

MDM2 engl. *Mouse Double Minute 2 homolog*

MDM4 engl. *Mouse Double Minute 4 homolog*

MGMT engl. *O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase*

MMR engl. *Mismatch Repair*, sustav za popravak pogrešno sparenih parova baza molekule DNA

mOS engl. *median Overall Survival*, medijan ukupnog preživljenja

MSI engl. *Microsatellite Instability*, mikrosatelitna nestabilnost

mTOR engl. *Mammalian Target of Rapamycin*, ciljna molekula rapamicina u sisavaca

NADPH engl. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NEDL1 engl. *Novel E3 Ubiquitin Ligase for Dishevelled1*

NES engl. *Nuclear Export Signal*, izlazni signal jezgre

NF1 engl. *Neurofibromatosis Type 1*, neurofibromatoza tipa 1

NFKBIA engl. *Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B-Cells Inhibitor Alpha*

NIH engl. *National Institutes of Health*, Nacionalni instituti za zdravlje

NLK engl. *Nemo Like Kinase*

NLS engl. *Nuclear Localization Signal*, lokalizacijski signal jezgre

PAR1 engl. *Prader-Willi/Angelman Region-1*

PBS engl. *Phosphate Buffer Solution*, otopina fosfatnog pufera

PCDH-gamma-A 11, *Protocadherin Gamma Subfamily A, 11*

PDGFR engl. *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*, receptor za trombocitni čimbenik rasta

PI3K engl. *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase*, fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat

PTEN engl. *Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome Ten*

RB1 engl. *Retinoblastoma 1*, retinoblastom 1

TCF1 engl. *T-Cell-Specific Transcription Factor 1*, transkripcijski faktor T-limfocita

TCGA engl. *The Cancer Genome Atlas*, Atlas genoma zloćudnih tumora

TERT engl. *Telomerase Reverse Transcriptase*, telomerazna reverzna transkriptaza

TLE engl. *Transducine-Like Enhancer Protein*

TNIK engl. *TRAF2 and NCK Interacting Kinase*

WHO engl. *World Health Organization*, Svjetska zdravstvena organizacija

Wnt engl. *Wingless*

1. UVOD

Astrocitni tumori mozga najčešći su primarni tumori središnjeg živčanog sustava (1). Ova je heterogena skupina dobroćudnih i zloćudnih neoplazmi, prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*; WHO), razvrstana u 4 gradusa, odnosno stupnja malignosti (2). Temelj klasifikacije astrocitoma čine histološke karakteristike tkiva tumora (stanični pleomorfizam, anaplazija, mitotski indeks, prokrvljenost, stupanj nekroze i izgled jezgara) (3). Iako je klasifikacija temeljena na histologiji još uvijek najpouzdaniji i najznačajniji pokazatelj biološkog i kliničkog ponašanja tumora kao i njihovog odgovora na liječenje, novije klasifikacije uključuju i njihove molekularne karakteristike (2,4,5). Kako bi se olakšala i poboljšala klasifikacija, tijekom posljednjih 25 godina intenzivno se proučavaju citogenetičke i molekularnogenetičke promjene povezane s nastankom i napredovanjem astrocitnih tumora mozga. Identifikacija mutacija u stanicama tumora bolesnika očekivano će doprinijeti preciznijem određivanju stadija bolesti i poboljšanju liječenja (2,6).

Tumori središnjeg živčanog sustava ne dijagnosticiraju se često (oko 2% ukupnog broja tumora). Praćeni su visokom stopom smrtnosti (7% u ukupnoj smrtnosti od tumora), koja je posljedica njihovog agresivnog ponašanja (1,7). Najveći broj tumora mozga javlja se u sporadičnom obliku, dok manje od 10% čine nasljedni oblici bolesti (1). Pojavnost ovih tumora u stalnom je porastu, s nešto većom učestalošću u osoba muškog spola (1,8). Do danas su kao čimbenici rizika za razvoj tumora mozga istaknuti rijetki genetički sindromi i izlaganje ionizirajućem zračenju (8,9). Smatra se da bi neionizirajuće zračenje elektromagnetskog polja (radiofrekvencija) mobilnih telefona moglo imati potencijalan karcinogeni učinak, ali, da bi se to potvrdilo, potrebne su dodatne dugoročne studije (8).

1.1. Astrociti

Neuroglija, potporne stanice središnjeg živčanog sustava (SŽS), dijele se u dvije velike skupine: makroglia (astrociti, oligodendrociti, ependimociti, radijalne, Schwannove i satelitske stanice) i mikroglia (makrofagi) (10). Glija stanice su, uz neurone, druga glavna vrsta stanica u živčanom sustavu čovjeka. Procjenjuje se da u središnjem živčanom sustavu na svaku živčanu stanicu dolazi 10 glija stanica, koje zbog manjih dimenzija zauzimaju približno 50% ukupnog volumena moždanog tkiva. Najveći ih se broj razvija od matičnih stanica

(glioblasti, spongioblasti) u neuroepitelu. Astrociti, za razliku od neurona, ne stvaraju akcijske potencijale i ne prenose informacije od jedne stanice do druge, mogu se dijeliti cijelog života, imaju samo jednu vrstu nastavaka (nemaju aksona), nemaju naponskih natrijskih kanala već posjeduju samo naponske kanale za prolaz kalijevih iona (10).

Astrociti (od grč. *astron* = zvijezda) su najveće i najrazgranatije, zvjezdolike stanice neuroglije prisutne u živčanom tkivu. Njihovi nastavci zajedno s dendritima i aksonima živčanih stanica čine neuropil. Otkrio ih je patolog Rudolf Virchow 1846. godine.

Ove specijalizirane stanice glije, koje su čak pet puta brojnije od neurona, u SŽS imaju brojne važne i složene uloge. Stvarajući jednu vrstu trodimenzionalne mreže unutar koje su smješteni neuroni, astrociti na prvom mjestu pružaju potporu živčanim stanicama. Značaj prisustva astrocita naročito se ogleda tijekom procesa diferencijacije živčanog tkiva u središnjem živčanom sustavu, budući da se neuroni tada kreću oslanjajući se upravo na astrocite koji određuju pravac kretanja (10).

Astrociti imaju i značajnu ulogu u metabolizmu. O tome, na neki način, svjedoči njihov položaj – nastavci im se pružaju između živčanih stanica, prate prostiranje aksona i dendrita, oslanjaju se na Ranvijerove čvoriće i okružuju područje sinapsi. Ova prostorna bliskost se, u određenoj mjeri, odražava i na njihovu „funkcijsku suradnju“ (11). Pokazano je, naime, da se astrociti ponašaju kao odstranjivači viška iona kalija, što ukazuje na njihovu ulogu u održavanju homeostaze. Tijekom provođenja živčanog impulsa ioni kalija se oslobađaju u međustanični prostor čime se mijenja njegov ionski sastav. Ionski kanali kalija prisutni u staničnoj membrani astrocita omogućuju odstranjivanje iona kalija iz međustaničnog prostora. Zbog toga su astrociti važni regulatori u održavanju relativno stalnog ionskog sastava međustanične tekućine. Upravo su po ionskom sastavu međustanične tekućine astrociti slični živčanim stanicama – imaju malo iona natrija, a mnogo iona kalija (10). Budući da preko svojih nastavaka diferenciranih u pločasta proširenja stvaraju jednu vrstu brane na površini SŽS – *glia limitans*, kao i ispod zone ependimskog epitela, pretpostavlja se da reguliraju ulazak hranjivih tvari iz cerebrospinalne tekućine i, posredno, krvne plazme u živčane stanice. Treba napomenuti da astrociti imaju značajnu poticajnu ulogu u stvaranju čvrste veze između endotelnih stanica kapilara u krvno-moždanoj barijeri, a potiču i sintezu enzima karakterističnih za te stanice (12).

Razlikuju se dvije vrste astrocita, protoplazmatski i fibrozni. Protoplazmatski astrociti smješteni su u sivoj tvari i prepoznaju se po mnogobojnim nastavcima različitih oblika, debljine i dužine. Posebno se izdvajaju nastavci završeni pločastim proširenjima poput stopala, koji pokrivaju približno 80% vanjske površine krvnih kapilara (perivaskularne nožice). U perifernim dijelovima SŽS nožice, koje su poredane jedna do druge, na vanjskoj površini mozga i leđne moždine, formiraju graničnu liniju (*glia limitans*) na koju naliježe meka moždana ovojnica (10,13). Protoplazmatski astrociti ne uspostavljaju morfološki definirane veze s aksonima, no nalaze se u njihovoj neposrednoj blizini. Ova blizina odražava metaboličku povezanost ovih dviju vrsta stanica (11).

Za razliku od protoplazmatskih, fibrozni se astrociti pretežno nalaze u bijeloj tvari SŽS-a. Od protoplazmatskih astrocita se razlikuju i po citoplazmatskim nastavcima koji su tanji, duži i ne granaju se. Na krajevima nastavaka postoje pločasta proširenja koja također naliježu na površinu kapilara, ali ne sudjeluju u stvaranju granične linije. Slično protoplazmatskim, i fibrozni astrociti mogu obuhvatiti aksone ne uspostavljajući s njima morfološki definirane fizičke veze. Ovaj tip astrocita, posredstvom svojih nastavaka, znatno češće uspostavlja kontakt sa Ranvijerovim čvorovima (10,13).

U održavanju mehaničke čvrstoće i oblika astrocita, važanu ulogu ima protein GFAP – kiseli vlaknasti protein glije. Ovaj intermedijarni filament, stanično je specifičan biljeg kojim se tijekom razvoja središnjeg živčanog sustava astrociti mogu razlikovati od drugih vrsta stanica glije. Sudjeluje i u procesima međustanične komunikacije i pravilne uspostave funkcije krvno-moždane barijere (10,13).

Postoji nekoliko teorija o podrijetlu stanica astrocitnih tumora. Jedna od pretpostavki je da one potječu od nepromijenjenih stanica glije (astrocita) koje su prošle pretvorbu u stanice tumora i dediferencirale se, dok je druga mogućnost da u tkivu tumora postoje stanice tumora s osobinama matičnih stanica (14). Pokazalo se da u mozgu odraslih osoba postoje populacije neuralnih matičnih stanica i progenitora stanica glije, a u glioblastomima su prisutne i matične stanice tumora. Potonje predstavljaju samo mali dio populacije stanica tumora, ali baš kao i neuralne matične stanice, imaju svojstvo samoobnavljanja kroz simetrične i nesimetrične diobe. Stanice kćeri mogu diferencirati u neurone ili stanice glije (astrocite u ovom slučaju) (15). U neuralnim matičnim stanicama su aktivni oni signalni putevi koji su i inače uključeni u razvoj živčanog sustava. Među njima je i signalni put Wnt, koji je važan za održavanje niše

matičnih stanica u organizmu. Aktivacija puteva koji reguliraju samoobnavljanje, proliferaciju i preživljenje stanica tijekom razvoja, može u odraslom organizmu doprinijeti nastanku agresivnih tumora kao što su astrocitomi. U astrocitnim tumorima mozga, između ostalog, dolazi i do poremećaja izraženosti molekula koje sudjeluju u signalnom putu Wnt. Stoga je vrlo vjerojatno da njihova aktivacija doprinosi tumorigenezi (16,17).

1.2. Astrocitni tumori mozga

Astrocitomi čine većinu intrakranijskih tumora i vrlo su heterogena skupina tumora koja se razlikuje s obzirom na lokalizaciju, potencijal rasta, morfološka obilježja, sklonost progresiji i klinički tijek bolesti.

Pilocitični astrocitomi (WHO gradus I) najčešći su astrocitni tumori u djece te čine 5–6% svih glioma. Ovaj dobroćudan, spororastući tumor s malim proliferacijskim potencijalom i niskom mitotskom aktivnošću ima najbolju prognozu. U većini je slučajeva za potpuno uklanjanje tumora dovoljna kirurška resekcija (18). Makroskopski su pilocitični astrocitomi dobro ograničeni, nodularni, sivkasti, mekani i solidni tumori. Njihovu histološku građu čine izmjenična gusta i rijetko strukturirana područja, s bipolarnim „piloidnim“ astrocitima i karakterističnom mikrocističnom komponentom i Rosenthalovim vlaknima. Ne ispoljavaju kiseli vlaknasti protein glije (engl. *Glial Fibrillary Acidic Protein*; GFAP). Nastaju u raznim dijelovima središnjeg živčanog sustava, a najčešće zahvaćaju optičku hijazmu, hipotalamus, talamus, mali mozak i moždano deblo (19). Pilocitični astrocitomi, za razliku od astrocitoma višeg gradusa, nisu skloni zloćudnoj progresiji; opisani su tek rijetki slučajevi maligne transformacije (20).

Astrocitomi WHO gradusa II (difuzni astrocitomi) spororastući su tumori koji se javljaju u mlađih odraslih, najčešće u dobi između 30 i 40 godina. Čine 10-15% svih astrocitnih tumora (1,21). Pokazuju nisku razinu zloćudnosti i lokalne invazivnosti te također imaju dobar ishod za pacijenta. Važno obilježje ovih tumora je infiltrativan rast zbog kojeg makroskopska granica tumora prema okolnom mozgu nije jasno vidljiva, što otežava njihovo potpuno odstanjivanje (22). Glavni dijagnostički kriterij je nazočnost atipičnih jezgara koje su često prisutne, dok su mitoze vrlo rijetke ili potpuno izostaju. Sastoji se od GFAP-pozitivnih bipolarnih ili zvjezdastih stanica (23). Raste pretežno u frontalnom i temporalnom režnju velikog mozga, moždanom deblu i leđnoj moždini. Još jedna važna osobitost difuznih

astrocitoma jest sklonost prelasku u više stupnjeve malignosti zbog čega većina ovih tumora nakon nekog vremena (4-6 godina nakon postavljanja primarne dijagnoze) napreduje do astrocitoma višeg gradusa (18,22).

Gradusi III i IV definiraju izrazito maligne i invazivne oblike astrocitoma koji brzo napreduju. Ovi tumori mogu nastati i postupno iz astrocitoma nižeg gradusa. Anaplastični astrocitom (WHO gradus III) je vrlo agresivan tumor koji nastaje na istim lokacijama kao difuzni astrocitom, ali u prosjeku desetljeće kasnije (18). Karakteriziran je povišenom celularnošću, atipijom jezgara, značajnom mitotskom aktivnošću i infiltracijom okolnog tkiva. Anaplastični astrocitom ima veliku sklonost prijelaza u glioblastom, za što su prosječno potrebne dvije godine (22).

Glioblastoma multiforme (GBM) (WHO gradus IV) predstavlja najčešći (približno 50% svih glijalnih tumora), biološki najagresivniji i najzloćudniji tip tumora mozga (1,2,21). Izraz „multiforme“ označava da se radi o vrlo heterogenom tipu tumora što se ne očituje samo na staničnoj razini, već je izraženo na svim razinama; od genetičkog „potpisa“ pa sve do odgovora tumora na različite oblike liječenja (24). Glioblastomi su slabo ograničeni i ekstenzivno se šire u okolne strukture. Unatoč tome, zahvaćanje vaskularnih prostora i moždanih ovojnica uz posljedično metastaziranje je rijetko (4,18). Dojmljiva je pokretljivost i potencijal migriranja stanica glioblastoma u kulturi, što ukazuje na postojanje mezenhimskog fenotipa (24). Histološki su građeni od slabo diferenciranih stanica u kojima postoji atipija jezgre. Stanice su mitotski vrlo aktivne. Stoga brzo prerastaju opskrbu kisikom i nutrijentima iz novonastalih krvnih žila te dolazi do nekroze u središnjem dijelu tumora. Ovo je jedna od najvažnijih osobina glioblastoma i jedan od kriterija za njegovo dokazivanje. Najčešće se nalazi u čeonom i temporalnom režnju s infiltracijom okoline, bazalnih ganglija i suprotne hemisfere. Unatoč velikim napretcima u dijagnostici i liječenju (kirurško uklanjanje tumora, radioterapija i kemoterapija), vrijeme preživljenja oboljelih od ovog tipa tumora i dalje je prilično nisko; u prosjeku 12-14 mjeseci nakon postavljanja dijagnoze (18) (Tablica 1).

Tablica 1. Klasifikacija astrocitnih tumora mozga

Gradus	Vrsta tumora	Prognoza
I	Pilocitični astroцитom	mOS: do 50 godina
II	Difuzni astroцитom	Petogodišnje preživljenje: 20-65% mOS: 3-5 godina
III	Anaplastični astroцитom	Petogodišnje preživljenje: 10-50% mOS: 2-4 godine
IV	Glioblastom	Petogodišnje preživljenje: ~5% mOS: 12-14 mjeseci

mOS - median Overall Survival (medijan ukupnog preživljenja)

1.3. Molekularna neuropatologija astrocitnih tumora

Projektom američkih Nacionalnih instituta za zdravlje (engl. *National Institutes of Health*; NIH) - Atlas genoma zloćudnih tumora (engl. *The Cancer Genome Atlas*; TCGA) završena je molekularna karakterizacija glioma na razini DNA (25,26). Proučavanjem genetičke osnove nastanka i napredovanja astrocitoma dobiveni su brojni podatci o specifičnim genetičkim promjenama karakterističnim za ove tumore (4). Razvojem različitih metoda i upotrebom mikropostroja (engl. *microarray*) omogućeno je proučavanje ekspresije velikog broja gena te korištenje novootkrivenih transkripcijskih profila u integriranoj molekularnoj klasifikaciji tumora u predviđanju odgovora na liječenje (27). Do sada su, na razini DNA, utvrđene promjene u broju kopija gena i kromosoma (delecije i amplifikacije), kao i određene točkaste mutacije, na osnovu kojih su identificirani brojni onkogeni i tumor supresorski geni uključeni u inicijaciju i progresiju različitih histoloških podtipova astrocitoma. Ove promjene najviše negativno utječu na signalne putove uključene u diferencijaciju i rast stanice, regulaciju staničnog ciklusa i smrt stanice. Zbog toga dolazi do nekontrolirane proliferacije stanica, neučinkovitog popravka oštećene DNA i sprječavanja apoptoze. Sve nabrojano vodi gubitku kontrole prijenosa signala posredovanih čimbenicima rasta i sve većoj nestabilnosti genoma (25,26,28). Neke od najčešćih genetičkih promjena prisutnih u astrocitnim tumorima kao i kromosomi koji su njima zahvaćeni u ljudi prikazani su na slikama 1 i 2.

Iako još uvijek nije moguće definirati točan broj i redoslijed promjena tijekom gliomogeneze, projektom TCGA, koji se temelji na ideji molekularnog pristupa u dijagnostici i liječenju tumora, otkriveni su ključni geni odgovorni za nastanak i progresiju astrocitnih tumora mozga. Korištenjem molekularnogenetičkog pristupa mogu se identificirati potencijalni molekularni biljezi neophodni za precizniju dijagnostiku, liječenje i prognozu

ovih tumora (26). Ovakav pristup pokazao je da svaki analizirani tumor ima jedinstven profil izraženosti gena, zbog čega je nužno personalizirati pristup u liječenju oboljelih. Razvoj novih metoda molekularne biologije doprinijet će dodatnom rasvjetljavanju molekularnih događaja koji potiču nastanak astrocitoma (29).

1.3.1. Pilocitični astrocitom

Molekularne i citogenetičke analize pokazale su da pilocitični astrocitomi posjeduju znatno manje genskih i kromosomskih aberacija u usporedbi s ostalim vrstama astrocitoma. Taj podatak ne iznenađuje, budući da se pilocitični astrocitomi biološki, klinički i histološki razlikuju od astrocitoma gradusa II-IV (30). Povećana incidencija ovog tumora mozga postoji u osoba s određenim nasljednim poremećajima, najčešće u oboljelih od neurofibromatoze tipa 1 (NF1). U ovih se osoba (15%) pilocitični astrocitom najčešće nalazi na vidnom živcu i ima deletirana oba alela na lokusu *NF1* (17q11.2). Sukladno tome, nema ekspresije NF1 što rezultira aktivacijom onkogeno *RAS* i gubitkom heterozigotnosti na kromosomu 10, zbog čega se gubi gen *PTEN* i dolazi do homozigotne delecije *p16^{INK4a}*. S druge strane, u pacijenata sa sporadičnim pilocitičnim astrocitomom promjene vezane uz gen *NF1* nisu pronađene (31). Nadalje, česta aberacija u ovim tumorima je djelomična duplikacija onkogeno *BRAF* (7q34) što za posljedicu ima njegovu povišenu ekspresiju. Također je otkriveno i nekoliko fuzija ovog gena od kojih su najčešće *BRAF-KIAA1549* i *BRAF-FAM131B* (32). Najčešća mutacija u onkogeno *BRAF* je zamjena aminokiseline valin glutaminskom kiselinom na položaju 600 (V600E). Stoga je nazočnost ove mutacije jedan od važnih kriterija za dijagnosticiranje astrocitoma gradusa I. Činjenica da je ova aktivirajuća mutacija *BRAF* pronađena u vrlo malom broju različitih tumora, upućuje na važnu ulogu protoonkogeno *BRAF* u patogenezi pilocitičnih astrocitoma. Eksperimentalno je utvrđeno da dio tumora ima multipliciran lokus 9q34.1-qter, a također je zabilježena i prisutnost trisomije kromosoma 5 i 7 (31,33) (Slika 1).



Slika 1. Najčešće molekularnogenetičke promjene u pilocitičnim astrocitomima.

1.3.2. Difuzni astroцитom

Komparativnom genomskom hibridizacijom (aCGH) je otkriveno da je najčešća kromosomska aberacija u difuznim astrocitomima (WHO gradus II) trisomija kromosoma 7 ili barem amplifikacija njegovog duljeg kraka (7q). Ove su promjene prisutne u 50% tumora (31,33). Osim toga, utvrđen je „višak“ genetske informacije na kromosomima 5p, 9 i 19p kao i delecije 22q, 19q, 13q, 10p te spolnih kromosoma. Najčešća molekularna promjena je mutacija tumor supresorskog gena *TP53* (60% tumora) smještenog na 17p13.1, a može doći i do gubitka heterozigotnosti (LOH) polimorfnog lokusa 17p uzrokujući potpuni gubitak divljeg tipa p53 u tumorskim stanicama. Opaženo je da tumori u kojima *TP53* nije mutiran, u velikom broju slučajeva imaju metiliran promotor gena *CDKN2A*. Ovaj gen se nalazi na lokusu 9p21. Njegov proteinski produkt p14^{ARF}, posreduje u aktiviranju p53 zbog toga što inhibira MDM2 (30). Zanimljivo, otkriveno je da je hipermetilacija *MGMT* (O-6-metilgvanin-DNA-metiltransferaza) povezana s mutacijom *TP53*, ali je međusobno isključiva s hipermetilacijom *CDKN2A*. Osim navedenog, poznato je da su u difuznim astrocitomima često epigenetički utišani geni smješteni na lokusu 10q26, te *PCDH-gamma-A11* na 5q31 i *EMP3* na 19q13. Tumor se može javiti u bolesnika sa sindromom Li-Fraumeni koji imaju urođenu mutaciju *TP53* (27). Često se u genomu astrocitoma gradusa II javlja i amplifikacija gena *PDGFRα* i *PDGFRβ* (33% slučajeva). Povećana ekspresija mRNA u receptorima α čimbenika rasta podrijetlom iz trombocita zamijećena je u svim gradusima astrocitnih tumora. Utvrđeno je da je nedavno otkrivena mutacija kodona 132 gena *IDH1* (izocitrat dehidrogenaza 1) također vrlo često prisutna u ovoj vrsti tumora (70% slučajeva) (23,33).

1.3.3. Anaplastični astrocitom

Utvrđeno je da se u anaplastičnom astrocitomu nalazi „višak“ genetske informacije na kromosomu 7 te mutacije gena *TP53* i *IDH1*. Njihova je učestalost slična onoj pronađenoj u difuznim astrocitomima. Nadalje, u ovim su tumorima često prisutne delecije alela na kromosomima 6, 9p, 11p, 19q i 22q (34). Aktivnost tumor supresorskih gena *CDKN2A* i *CDKN2B* može biti smanjena zbog genetičkih i epigenetičkih promjena, budući da inaktivacija *p14^{ARF}* služi kao alternativni način utišavanja signalnog puta p53 u slučajevima kada *TP53* nije mutiran. Produkti gena *CDKN2A* (p16) i *CDKN2B* (p15) djeluju kao negativni regulatori staničnog ciklusa na prijelazu iz G1- u S-fazu sprječavajući stvaranje kompleksa između ciklina D i o ciklinu ovisnih kinaza CDK4 i CDK6 (35). Njihova inaktivacija otkrivena je u približno 50% anaplastičnih astrocitoma. Amplifikacija i povišena ekspresija gena *CDK4* (smještenog na 12q13-q14) dokazana je u približno 10% anaplastičnih astrocitoma. Dodatno, približno 25% tumora ima mutiran gen *RBI*, a do njegove inaktivacije može doći i uslijed delecije lokusa 13q13 na kojem je smješten. Amplifikacija gena *EGFR* otkrivena je u tek 10% anaplastičnih astrocitoma (27).

1.3.4. Glioblastoma multiforme

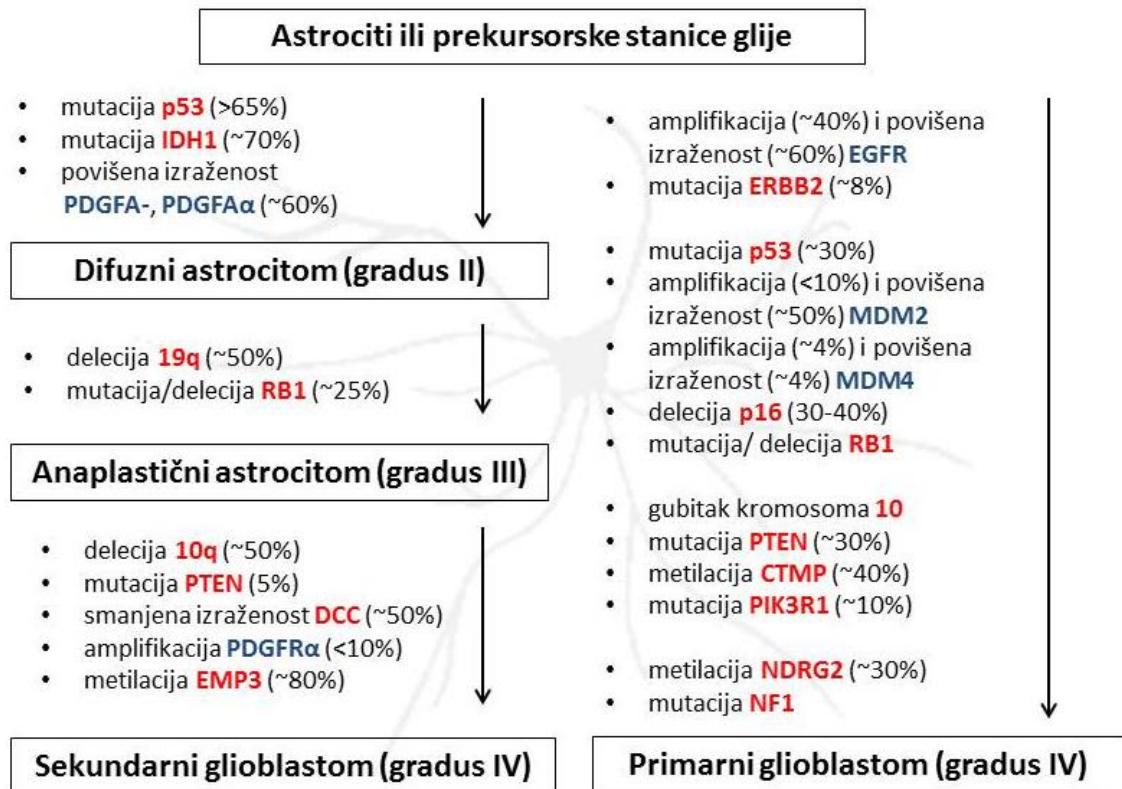
Molekularnogenetičkim analizama je tijekom proteklih godina nedvojbeno pokazano da postoje dva mehanizma nastanka glioblastoma. Zbog te je činjenice moguće razlikovati primarne i sekundarne glioblastome. Ustanovljeno je da se, unatoč njihovoj istovjetnoj morfologiji, razlikuju po brojnim drugim karakteristikama. One uključuju: dob bolesnika, signalne puteve uključene u nastanak tumora, uzorak ekspresije molekula RNA i proteina te odgovor na kemoterapiju i radioterapiju (35). Primarni glioblastomi su mnogo češći i nastaju *de novo* bez prethodnih kliničkih ili patohistoloških dokaza o postojanju manje maligne prekursorske lezije. Od njih oboljevaju pacijenti starije životne dobi, te usto imaju vrlo brz i kratak napredak bolesti. Nasuprot tome, sekundarni glioblastomi, koji čine svega 10% glioblastoma, razvijaju se kroz nekoliko godina i nastaju progresijom iz astrocitoma nižeg gradusa te se javljaju u pacijenata nešto mlađe životne dobi (18,26).

U glioblastomima su pronađene mnogostruke genske i kromosomske aberacije. Ova vrsta tumora pokazuje više promjena u usporedbi s astrocitomima nižeg gradusa. Uz spomenute promjene, koje su prisutne i u difuznim i anaplastičnim astrocitoma, glioblastomi najčešće pokazuju gubitak genetskog materijala na kromosomu 10 (31,35). Ova promjena prisutna je u

oba tipa glioblastoma i izuzetno je važna, budući da se na nekoliko lokusa pogođenih delecijom ovog kromosoma nalaze tumor supresorski geni. Najvažnijima se za nastanak glioblastoma smatraju *PTEN*, *MGMT* i *ANXA7* (inhibitor EGFR-a). Ova delecija, kao i ona gena *NFKBIA* na kromosomu 14 (također inhibitor EGFR-a) povezana je s lošijom prognozom bolesti (27). Delecija kratkog kraka kromosoma 9 dovodi do gubitka brojnih tumor supresorskih gena uključenih u signalne puteve posredovane proteinima RB1 i TP53. Isti putevi pogođeni su i amplifikacijom područja 12q13-15. Nadalje, učestalo se javlja duplikacija čitavog kromosoma 7, što posljedično dovodi do amplifikacije gena za receptor epidermalnog čimbenika rasta (EGFR) i povećane aktivnosti signalnog puta EGFR/PI3K/AKT. Ovaj signalni put ima ulogu u preživljavanju i proliferaciji stanice te su spomenute promjene povezane s lošijom prognozom bolesti (29,33).

Promjene zabilježene specifično za primarne glioblastome najčešće su amplifikacije *EGFR*, *CDK4*, *MDM2* i *MDM4*, delecije *CDKN2A* i *RBI*, monosomija kromosoma 10 i mutacija gena *PTEN*. Mutacija gena *TP53* dokazana je u manje od 30% primarnih glioblastoma. U dvije trećine sekundarnih glioblastoma nalaze se mutacije u genima *TP53* i *IDH1*. Osim navedenih promjena, u sekundarnim su glioblastomima često zabilježene i delecije alela na kromosomima 19q i 13q, hipermetilacija promotora gena *RBI*, te jaka ekspresija PDGFR α . Izolirani gubitak dugog kraka kromosoma 19 povezan je s duljim preživljenjem (33,36) (Slika 2).

Zahvaljujući ovim otkrićima je postalo jasno da astrocitomi različitog gradusa, odnosno difuzni astrocitomi, anaplastični astrocitomi i (sekundarni) glioblastomi predstavljaju različite stupnjeve napredovanja istog patološkog procesa.



Slika 2. Molekularna patogeneza nastanka primarnih i sekundarnih glioblastoma.

1.3.4.1. Izocitrat dehidrogenaza 1 i 2 (IDH1/2)

Posljednjih je godina puno pažnje usmjereno na mutacije gena *IDH1* i *IDH2*, koje su prisutne u većini sekundarnih glioblastoma i astroцитomima nižeg gradusa, ali rijetko u primarnim glioblastomima (2). Imajući u vidu složene genetičke promjene koje su, osim histoloških karakteristika, svojstvene za svaki tip tumora, Svjetska zdravstvena organizacija obnovila je klasifikaciju tumora SŽS na temelju integriranih parametara. Glioblastomi se prema novoj klasifikaciji dijele na:

1) glioblastom, IDH1/2-divlji tip (90% slučajeva), odgovara prethodno klasificiranom primarnom ili *de novo* tipu glioblastoma i javlja se u starijih bolesnika (stariji od 55 godina);

2) glioblastom, IDH1/2-mutirani (približno 10% slučajeva), prema staroj klasifikaciji odgovara sekundarnim glioblastomima koji nastaju progresijom iz astroцитoma nižeg gradusa i predominantno se javljaju u mlađih bolesnika (približno 45 godina starosti) (2).

IDH1 ili *IDH2* mutirani su u 60-80% sekundarnih glioblastoma (37). Izocitrat dehidrogenaze 1 i 2 (*IDH1/2*) enzimi su Krebsovog ciklusa koji oksidativno dekarboksiliraju izocitrat u CO₂ i α-ketoglutarat uz redukciju NAD(P)⁺ u NAD(P)H. *IDH1* kodira protein citoplazme, a *IDH2* protein mitohondrija. Analizom glioblastoma utvrđene su somatske mutacije na kodonima 132 (*IDH1*) i 172 (*IDH2*) (34). Stanice tumora s mutiranim genima *IDH1/2* ne mogu pretvoriti izocitrat u α-ketoglutarat, ali mogu reducirati α-ketoglutarat u 2-hidroksiglutarat koji ima ulogu u daljnjoj progresiji tumora. Mutacije ovih gena značajne su zbog razlikovanja primarnih i sekundarnih glioblastoma (38). Naime, smatra se da su primarni glioblastomi s mutacijom *IDH1* (<5%) zapravo sekundarni glioblastomi, za koje ne postoji histološki dokaz o prethodnom postojanju astrocitoma nižeg gradusa. Ovome u prilog ide i činjenica da su pacijenti s primarnim glioblastomom i *IDH1/2* mutacijom mlađe dobi i imaju dulje preživljenje (39).

Mutacije u genima *IDH1/2* mogu služiti kao prognostički biljezi budući da pacijenti s *IDH*-mutiranim astrocitomima žive značajno duže od onih s *IDH*-divljim tipom astrocitoma. Mutacije u navedenim genima mogu služiti i kao prediktivni biljeg budući da se povezuju s boljim odgovorom na liječenje temozolomidom (37).

1.3.4.2. Metilacija promotora O⁶-metilgvanin-DNA-metiltransferaze (MGMT)

U glioblastomima, kao i u drugim tumorima, dolazi do globalne hipometilacije, dok su tumor supresorski geni (posebice njihovi promotori) često hipermetilirani. Zbog toga je smanjena njihova izraženost. Jedan od klinički najznačajnijih biljega je svakako status metilacije promotora gena *MGMT* (O⁶-metilgvanin-DNA-metiltransferaze) (4). Hipermetilacija ovog promotora javlja se u primarnim (36%) i u sekundarnim (75%) GBM i predstavlja pozitivan prognostički čimbenik u liječenju citostaticima. Ovo je posebno značajno u odgovoru na liječenje temozolomidom, citostatikom koji alkilira molekulu DNA na bazi gvanin, zbog čega se onemogućuje replikacija molekule DNA i potiče programirana smrt stanice. Enzim O⁶-metilgvanin-DNA-metiltransferaza je uključen u popravak molekule DNA. Njegova je uloga odstranjivanje alkilne skupine s gvanina koju enzim premješta na svoj cisteinski nastavak, nakon čega se ireverzibilno inaktivira. S obzirom na to da *MGMT* odstranjuje alkilne skupine, a temozolomid je alkilirajući kemoterapeutik, očuvana funkcija enzima uzrokovat će neosjetljivost na liječenje. Ako je, međutim, promotor gena *MGMT* metiliran, doći će do smanjene aktivnosti ovog enzima (6,38). Tada će i liječenje biti

učinkovitije, zbog toga što će promjene na DNA izazvane temozolomidom dovesti do apoptoze. Zbog ovog se razloga status metilacije *MGMT* koristi i kao prognostički biljeg osjetljivosti na alkilirajuće agense, i kao prediktivni biljeg odgovora na zračenje, oboljelih od glioblastoma (4).

1.3.4.3. Mutacija promotora *hTERT* i mutacija gena *ATRX*

Značajka većine tumora je aktivacija mehanizma kojim se održava dužina telomera te se, sukladno tome, njegova inhibicija smatra vrlo važnom metom u liječenju. U većini tumora čovjeka aktiviran je enzim telomeraza koja reverznom transkripcijom nadodaje nova ponavljanja molekule DNA na telomerne dijelove kromosoma *de novo*. U stanicama netumora, telomeraza je aktivna samo u matičnim i spolnim stanicama. Telomerazna reverzna transkriptaza (*TERT*) katalitička je podjedinica kompleksa telomeraze koji regulira duljinu molekule DNA na krajevima kromosoma. Njena aktivnost ima ulogu u tumorigenezi. Pokazano je da je 70-80% slučajeva glioblastoma IDH-divljeg tipa združeno s mutacijama u promotoru gena *TERT* što je povezano s kraćim preživljenjem, dok su znatno rjeđe u IDH-mutiranih glioblastoma (27). Čini se da bi mutacije u promotoru gena *TERT* mogle biti neovisan prognostički čimbenik lošije prognoze u primarnim glioblastomima (27). Nasuprot tome, u glioblastomima s mutacijom u genima *IDH1/2*, prisutnost mutacija i u promotoru gena *TERT* mogla bi biti dovedena u vezu s duljim preživljenjem, budući da je združena s kodelecijom 1p/19q koja je povezana s boljom prognozom (4). Zanimljivo, pronađeno je da izraženost *TERT* može biti izravno povećana vezanjem β -katenina na promotorsko područje gena, što znači da, u ovim tumorima, signalni put Wnt potiče aktivnost telomeraze (40).

Prisutnost mutacija u genima *IDH1* i *TP53* je u astrocitnim tumorima usko povezana s inaktivacijom gena *ATRX* (engl. *Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-linked*). Ovaj gen kodira nastanak proteina koji je uključen u remodeliranje kromatina u području telomera. Istraživanja su pokazala da su mutacije gena *ATRX* puno učestalije u astrocitomima gradusa II (33%) i III (46%) te sekundarnim glioblastomima (80%) u odnosu na primarne glioblastome (7%) (27). Dodatno, gotovo svi astrocitni tumori u kojima je dokazana mutacija *ATRX* imali su mutaciju u genu *IDH1*. U većini tumora koji posjeduju ove dvije mutacije, pronađena je i mutacija u genu *TP53* (94%). Ustanovljena je jaka veza između prisutnosti mutacija u sva tri navedena gena i mehanizmima alternativnog produžavanja telomera (engl.

Alternative Lengthening of Telomeres; ALT), kojim se telomere produljuju u odsutstvu telomeraze, preko procesa vezanih uz popravak molekule DNA i rekombinacije (4).

Iako i aktivnost telomeraze i alternativno produžavanje telomera, omogućuju imortalizaciju stanica te maligni tumori mogu koristiti oba mehanizma, oni nisu ekvivalentni. Mehanizmi održavanja telomera pogodan su cilj antitumorske terapije jer postoje u svim tumorima, a zdrave ga stanice u pravilu ne koriste pa bi njegoa inhibicija imala minimalne nuspojave.

1.3.4.4. Signalni put p53/MDM2/p14^{ARF}

Inaktivacija gena *TP53* predstavlja rani događaj u nastanku sekundarnih glioblastoma (41). Značaj *TP53* u nastanku astrocitoma dodatno je potvrđen povećanom pojavnosću ovih tumora u oboljelih od sindroma Li-Fraumeni, uzrokovanog nasljednim mutacijama u genu *TP53* (33). Do inaktivacije *TP53* u astrocitnim tumorima dolazi zbog točkastih mutacija u domeni kojom se *TP53* veže na molekulu DNA i/ili zbog gubitka heterozigotnosti kromosoma 17p. *TP53* je inaktiviran u više od dvije trećine sekundarnih GBM, a više od polovice mutacija nalazi u kodonima 248 i 273. U primarnim se glioblastomima mutacije *TP53* javljaju s manjom učestalošću (<30%) i bez grupiranja u pojedinim točkama (mutacije su „raspršene“ u svim egzonima) (42). Povećana ekspresija negativnih regulatora *TP53*, MDM2 i MDM4, predstavlja alternativni mehanizam inaktivacije ovog tumor supresora u primarnim GBM s nemutiranim *TP53*. Do povišene razine MDM2 dovodi i smanjena izraženost gena *CDKN2A* (p14) izazvana homozigotnim delecijama ili pojačanom metilacijom promotora. Ova je promjena dokazana u 76% do danas analiziranih glioblastoma. Podjednako je zastupljena u primarnim i sekundarnim glioblastomima (41). Poremećaji u signalnim putevima posredovanim s *TP53* dovode do poremećaja u staničnom ciklusu i odgovoru stanice na oštećenja molekule DNA. Konačne posljedice su poremećaj diferencijacije i nastanak neovaskularizacije (29).

1.3.4.5. Signalni put p16^{INK4a}/RB1

Signalni put p16^{INK4a}/RB1 također ima vrlo važnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa. Ključan je za kontrolu prelaska iz G1- u S-fazu. Sukladno tome, njegoa inaktivacija dovodi do progresije i primarnih, i sekundarnih glioblastoma. U regulaciju ovog signalnog puta uključeni su inhibitori o ciklinu ovisnih kinaza, ciklin-ovisne kinaze CDK4 i CDK6, obitelj

čimbenika transkripcije E2F i članovi obitelji gena RB (RB1, RBL1 i NOLC1) (43). Promjene izraženosti svakog od navedenih proteina imaju značajan utjecaj na proces tumorigeneze. Najčešće su pogođeni geni *RB1*, *p16^{INK4a}* i *CDK4*. Smanjena izraženost RB, predstavlja kasni događaj tijekom progresije i karakteristična je za astrocitome viših gradusa. Osim mutacija gena *RB1*, koje su prisutne u približno 25% istraženih astrocitoma viših gradusa, do inaktivacije ovog gena također dovodi metilacija njegovog promotora kao i gubitak dijela dugačkog kraka kromosoma 13q (44). Osim navedenog, protein RB inaktivira se uslijed homozigotnih delecija i metilacije promotora *p16^{INK4a}*. Delecija lokusa *INK4a/ARF*, na kojem se nalazi gen za tumor supresor *p16^{INK4a}*, zajedno s delecijom lokusa za *p14^{ARF}*, prisutne su u više od 50% malignih astrocitoma. Ove promjene dovode do poremećaja u regulaciji signalnih puteva posredovanih s RB1 i TP53. Ova činjenica ukazuje na postojanje kompleksne mreže signalnih puteva koji sudjeluju u regulaciji gliomageneze (29).

1.3.4.6. Signalni putevi MAPK/ERK i PI3K/Akt/mTOR

U mnogim je solidnim tumorima dokazana pojačana ekspresija receptora za epidermalni čimbenik rasta (EGFR), a time i pojačana aktivnost signalnih puteva MAPK/ERK i PI3K/Akt/mTOR koji su ovisni o njegovoj aktivaciji. Ovi signalni putevi imaju ključnu ulogu u razvoju primarnih glioblastoma (45). Konstitutivnom aktivacijom mitogenih ograna signalnih puteva MAPK/ERK i PI3K/AKT/mTOR osigurava se dijeljenje stanica koje je neovisno o prisustvu čimbenika rasta. Ovaj fenomen predstavlja jednu od osnovnih karakteristika zloćudno promijenjene stanice (46). Povećana ekspresija EGFR otkrivena je u više od 60% primarnih, i nešto manje od 10% sekundarnih glioblastoma (47). Osim amplifikacija, i aktivirajuće mutacije dovode do konstitutivne izraženosti EGFR i aktivacije signalnog puta PI3K/AKT. Povišena izraženost mutirane inačice EGFR (EGFRvIII) dovodi do neosjetljivosti na signalne puteve apoptoze, nekontroliranog rasta i razvoja stanica. Zbog tog je razloga prisutnost ove mutacije u korelaciji s kraćim preživljenjem (4). EGFR značajno doprinosi patogenezi astrocitoma i predstavlja primarnu ciljnu molekulu za različite inhibitore aktivnosti o njemu ovisnih signalnih puteva. Uspješnost inhibicije EGFR ovisi o statusu gena *PTEN* (engl. *Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome Ten*). Mutacija *PTEN* druga je po učestalosti mutacija jednog tumor supresora pronađena u GBM (nakon mutacije TP53) koja za posljedicu ima stvaranje neosjetljivosti na inhibitore kinazne aktivnosti EGFR (47). Metilacija promotora, točkaste mutacije, gubitak heterozigotnosti na

kromosomu 10, male insercije i delecije osnovni su mehanizme inaktivacije gena *PTEN*, dok su homozigotne delecije rijetke (42). Pored svega navedenog, *PTEN* inhibira o interginu ovisnu aktivaciju *MAPK* i regulira aktivnost signalnog puta *Wnt* i signalne mreže posredovane s *TP53*(48).

Opisana je i amplifikacija čitavog kromosoma 7 na kojem su smješteni geni za *EGFR* i *MET*. Njihovi su proteinski produkti uključeni u kontrolu rasta, invazivnosti i sklonosti metastaziranju stanica tumora. I *PI3K* ima značajnu ulogu u navedenim staničnim procesima. Aktivira oba kompleksa serin/treonin kinaze *mTOR* (*mTORC1* i *mTORC2*) te na taj način pozitivno regulira rast, proliferaciju i preživljavanje stanice. Ovim se djelovanjem potiče razvoj astrocitoma (49).

Potrebno je naglasiti da se molekularne promjene u glioblastomima pojavljuju određenim redosljedom. Poznato je da se mutacije *IDH1* pojavljuju u ranijoj fazi bolesti, dok su mutacije gena *PTEN* i gubitak dugog kraka kromosoma 10 javljaju kasnije. Ove dvije promjene važne su za progresiju bolesti (4).

Iako su u oba tipa glioblastoma promijenjeni isti signalni putevi, primarni i sekundarni glioblastomi razlikuju se s obzirom na genetičke promjene i učestalost mutacija pojedinih gena. Rezultati dosadašnjih istraživanja nedvojbeno upućuju da primarni i sekundarni glioblastomi predstavljaju genetički različite entitete. Usprkos tome, oba tipa glioblastoma imaju slična histološka svojstva i podjednako lošu prognozu. Ovaj fenomen može se objasniti činjenicom da različiti proteini mogu biti uključeni kao „signalne točke“, u kaskade prijenosa signala u istim signalnim putevima. Ovo se osobito odnosi na signalne puteve čija je aktivnost posredovana s *TP53*, *pRB1*, *PTEN/P13K/AKT*. Stoga su i posljedice različitih genetičkih promjena slične, na razini funkcije stanice (36). Zbog povezanosti i složene mreže signala u stanici, nemoguće je da se bilo koja promjena ili poremećaj u jednom signalnom putu ne manifestira kroz poremećaj prijenosa signala i u drugim signalnim putevima. Pomnija analiza navedenih promjena i uspostavljanje obrasca poremećaja prijenosa signala (engl. *signature*) može, uz patohistološku dijagnozu, doprinijeti uspješnijem razlikovanju ova dva oblika glioblastoma, boljem razumijevanju njihova nastanka i biološkog ponašanja te pronalasku uspješnih načina liječenja (50).

1.4. Signalni put Wnt

Značaj molekula signalnog puta Wnt (poznat kao „*Wingless*“ u vinske mušice) dokazan je u brojnim biološkim procesima, počevši od razvoja organizma, preko održavanja homeostaze u tkivima odraslih do ponašanja stanice u različitim bolestima, osobito tumorima (51). Istraživanje signalne kaskade ovog puta započelo je 1982. godine, kada su Nusse i Varmus u mišu otkrili gen za protein *int1* (Integration 1). Ovaj je protoonkogen uključen u nastanak tumora mliječnih žlijezda, a kasnije je identificiran kao homolog već prije otkrivenog gena vinske mušice nazvanog *Wingless* (Wg). Zbog tog je otkrića *int1* preimenovan u *Wnt1* (52).

Signalni put Wnt ima ključnu ulogu u velikom broju bioloških procesa, kao regulator stanične proliferacije, diferencijacije, adhezije, te staničnog preživljenja i apoptoze. Svi ovi procesi od izuzetne su važnosti u odraslom organizmu za održavanje homeostaze tkiva i niša matičnih stanica. No ipak, Wnt put ponajprije se spominje u okvirima embrionalnog razvoja organizma u kojem ima nezamjenjivu ulogu u razvoju središnjeg živčanog sustava: prvo neuralne ploče i neuralne cijevi, a potom i mozga, leđne moždine te senzornih i motornih neurona. Uključen je i u razvoj astrocita (53,54). Osim u razvoju živčanog sustava, sudjeluje i u razvoju krvožilnog sustava, a ima ulogu i u procesu održavanja koštane mase u odraslom organizmu putem regulacije apoptoze osteoblasta (55,56).

Signalizaciju započinju glikoproteini Wnt koji mogu aktivirati tri različita signalna puta – kanonski, ne-kanonski i put ovisan o ionima kalcija. Između tri nabrojene Wnt kaskade, najistraženija je ona pod nazivom kanonski put u čijem se središtu nalazi β -katenin (wnt/ β -katenin signalni put). Kanonski signalni put Wnt jedan je od osnovnih mehanizama prijenosa signala i vrlo je konzerviran u životinjskom svijetu (55). Od ukupno 19 Wnt liganda poznatih u čovjeka, pretpostavlja se da Wnt10b i Wnt13 usmjeravaju regulaciju rasta stanice tijekom embrionalnog razvoja (57). U tumorima mozga otkrivena je povišena izraženost Wnt5a, Wnt10b i Wnt13 (58).

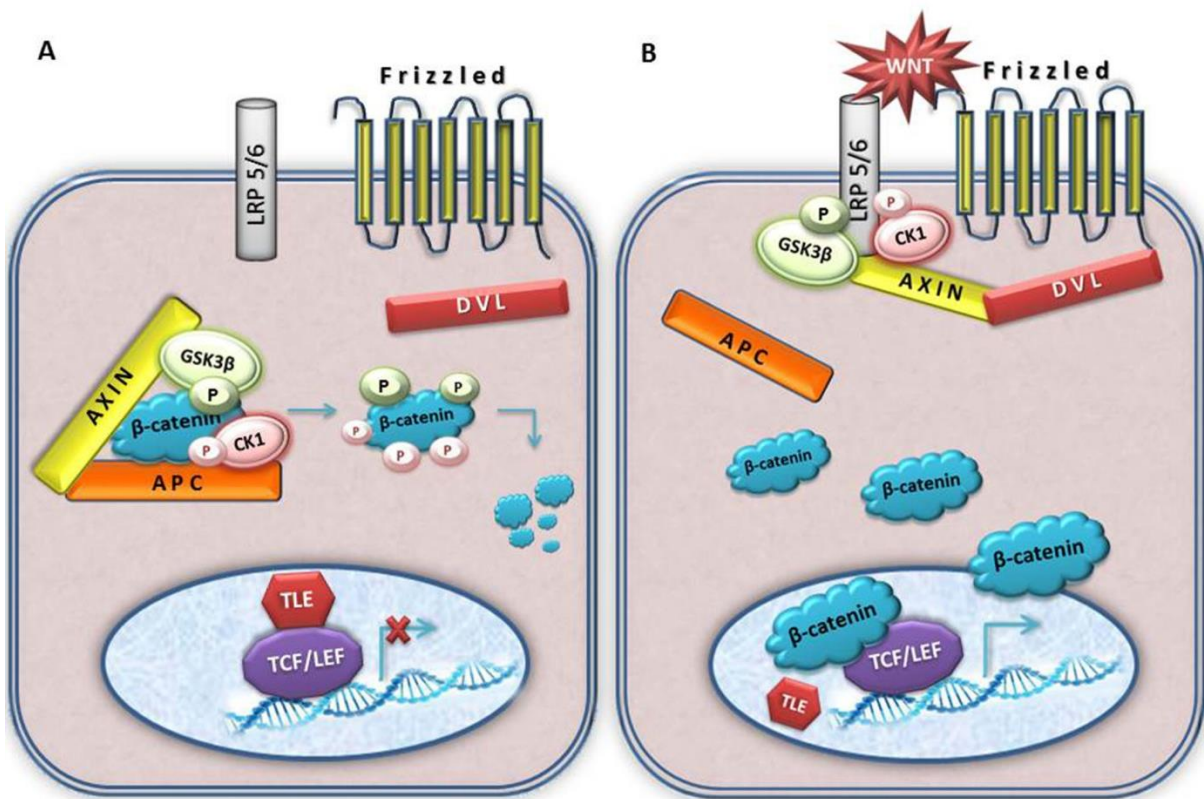
Ako ligandi Wnt nisu vezani na kompleks membranskih receptora, razina β -katenina u stanici je niska i signalni put Wnt je neaktivan. Multiproteinski razgradbeni kompleks kojeg čine četiri proteina AXIN1 (aksin), APC (adenomatozna polipoza kolona), CK1 (kazein kinaza 1) i GSK3 β (glikogen sintaza kinaza 3 beta) sudjeluje u razgradnji β -katenina. APC, zajedno s aksinom, stvara potporanj za vezanje β -katenina kako bi ga doveli u položaj u kojem je omogućena učinkovita fosforilacija kinazama, u točno određenom redosljedu

(55,59). Kinaze ovog multiproteinskog kompleksa pripadaju skupini serin/treonin kinaza. CK1 fosforilira treonin 41 i serin 45, dok GSK3 β posreduje u dodavanju fosfatnih skupina na serine 33 i 37. Sve ove mete fosforilacije nalaze se na amino terminalnom dijelu proteina. Na ovaj način uspostavljena fosforilacija β -katenina predstavlja obrazac koji prepoznaje podjedinica E3 ubikvitin ligaze β -TrCP (engl. *β -Transducin Repeat Containing Protein*), koja fosforilirani protein ubikvitinilira. Konačna posljedica uspostave ovih modifikacija je razgradnja β -katenina u proteasomu 26S (55,60). Zanimljivo je da su upravo ove aminokiseline (Thr41, Ser45, Ser 33, Ser37) često mutirane u raznim tumorima. Komponente kompleksa za razgradnju β -katenina negativni su modulatori Wnt signalizacije. Ovim se mehanizmom β -katenin neprestano eliminira iz stanice te ne može doći do jezgre i potaknuti aktivaciju gena koji su mete ovog signalnog puta (61).

Kada signalni put Wnt nije aktivan, represor Groucho/TLE (engl. *Transducin-Like Enhancer*) blokira aktivnost čimbenika transkripcije obitelji TCF/LEF (engl. *T-Cell-Specific Transcription Factor/Lymphoid Enhancer Binding Factor 1*) i na taj način sprječava njihovo vezanje za područja promotora ciljnih gena (62,63).

Signalna kaskada kanonskog puta aktivira se vezanjem Wnt-liganda na kompleks membranskih receptora koji čine Frizzled (Fz) i njegov koreceptor LRP 5/6 (engl. *Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 5 and 6*). Na ovaj način potaknut prijenos signala dovodi do fosforilacije i aktiviranja proteina citoplazme Dishevelled (DVL), koji migrira do membrane, i stupa u kontakt s receptorom Fz (55). Njihova interakcija ključna je za fosforilaciju koreceptora LRP 5/6 ranije spomenutim enzimima GSK3 β i CK1. Fosforilacijom aktiviran koreceptor LRP 5/6, preko svog citoplazmatskog repa veže fosfokinaze i aksin. Osim što se veže za koreceptor na membrani, aksin također stupa u interakciju s DVL. Ovom interakcijom aksin postaje član novostvorenog membranskog kompleksa i ujedno je isključen iz kompleksa za razgradnju β -katenina. Drugim riječima, DVL onemogućuje aktivnost aksina u kompleksu za razgradnju β -katenina (64). Sukladno tome, DVL se smatra ključnim negativnim regulatorom razgradnje β -katenin. S obzirom na to da se komponente kompleksa za razgradnju β -katenina nalaze na membrani, β -katenin se ne može razgraditi. Zbog toga njegova razina u citoplazmi posljedično raste, a kad dosegne određenu koncentraciju prelazi u jezgru, u kojoj se veže na čimbenike transkripcije iz obitelji TCF/LEF. Na taj način, s obzirom na to da nema veznu domenu za molekulu DNA, posredno

sudjeluje u aktivaciji transkripcije poznatih onkogenih *MYC*, *MYCN*, *JUN* i *CCND1*. Na ovaj je način objašnjeno zbog čega aktiviranje signalnog puta Wnt može dovesti do razvoja tumora (59,65) (Slika 3).



Slika 3. Signalni put Wnt. A) Utišan zbog izostanka vezanja signalne molekule Wnt: β -katenin podliježe modifikacijama kompleksa za razgradnju (kojeg čine aksin, APC, GSK3 β i CK1) što za posljedicu ima njegovu razgradnju u proteasomu. Zbog toga se ciljni geni ne prepisuju. B) Aktivan zbog stabiliziranja β -katenina u citoplazmi iz koje prelazi u jezgru u kojoj se veže za čimbenike transkripcije iz obitelji TCF/LEF. Zbog toga se ciljni geni počinju prepisivati. Preuzeto iz (66).

Prijenos signala putem signalnog puta Wnt ovisi o prisutnosti oba membranska receptora, i Fz i LRP5/6. Frizzled je transmembranski receptor koji sedam puta prelazi membranu. U genomu sisavaca nalazi se 10 gena koji kodiraju za receptore Fz. U obitelji gena LRP, član obitelji LRP6 ima značajnu ulogu u embriogenezi. Član obitelji LRP5 je uključen u održavanje homeostaze koštanog tkiva, u odraslom organizmu (55). Oba proteina iz obitelji LRP imaju pet ponavljajućih motiva PPPSPxS (P-prolin; S-serin ili treonin; x-promjenjiv

aminokiselinski ostatak). Fosforilacija ovih motiva fosfokinazama CK1 i GSK3 β ključan je događaj u aktiviranju receptora zbog toga što fosforilacija predstavlja preduvjet za vezanje aksina na LRP5/6, uslijed aktivacije Wnt. Do aktivacije signalnog puta Wnt dolazi i u slučajevima kada su APC, aksin i ostale komponente kompleksa za razgradnju β -katenina mutirani i/ili nefunkcionalni što je čest slučaj u stanicama tumora (64).

Kada se u jezgri nakupi dovoljno β -katenina, počinje njegova kompeticija s represorom TLE, dotad vezanom na čimbenike transkripcije iz obitelji TCF/LEF. Novostvoreni kompleks β -katenina i TCF/LEF vezanjem na DNA potiče transkripciju ciljnih gena puta Wnt koji nose uputu za ostale signalne molekule i različite čimbenike transkripcije koji nadziru sudbinu stanice (63,67). Mnogi od ovih gena uključeni su u procese razvoja, proliferacije stanice, međustanične interakcije, migraciju, morfogenezu, stanični ciklus i apoptozu. Neki od njih su jako dobro pručeni; na primjer, protoonkogeni *JUN* i *FOS-L1*, gen za osteopontin (*SPP1*) važan za adheziju i migraciju stanica, u procesu metastaziranja (62). Važnu ulogu imaju i geni za cikline D1 i D2, koji, zajedno s kinazama ovisnim o ciklinu sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa. Ističe se i *MYC*, gen za čimbenik transkripcije koji regulira ekspresiju mnogih gena uključenih u replikaciju molekule DNA, stanični ciklus, rast stanice i apoptozu (62,65).

1.5. Dishevelled

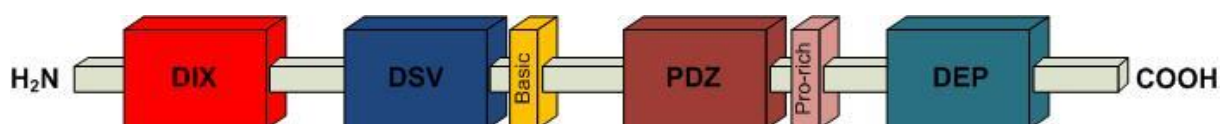
Dugogodišnje istraživanje mehanizma prijenosa signala signalnim putem Wnt dovelo je do otkrića velikog broja gena i proteina koji su uključeni u proces tumorigeneze. U složenoj signalnoj kaskadi Wnt, protein Dishevelled (DVL) smatra se ključnom komponentom, s obzirom na to da se nalazi na početku signalnog puta Wnt. Upravo članovi ove proteinske obitelji predstavljaju točku za grananje Wnt puta u tri različita pravca (68,69).

Dishevelled (*dsh*) je multifunkcionalni fosfoprotein, prvobitno otkriven u vinskoj mušici *Drosophila melanogaster*. *Drosophila* posjeduje samo jedan gen *dsh* čija je izraženost nužna za pravilan razvoj insekta. U čovjeka su pronađena tri homologna gena (*DVL1*, *DVL2* i *DVL3*) koja pokazuju visok stupanj sličnosti (70). Gen *DVL1* nalazi se na kromosomu 1p36 kromosomu i kodira nastanak proteina koji čine 695 aminokiselina. Gen *DVL2* nalazi se na položaju 17p13.1 i kodira nastanak proteina sastavljenog od 736 aminokiselina. Gen *DVL3* nalazi se na dugačkom kraku trećeg kromosoma (3q27) i kodira nastanak proteina u čijem se sastavu nalazi 716 aminokiselina. Na modelu *knock-out* miša je pokazano da svaki od

proteina DVL može djelovati pojedinačno i u kombinaciji s ostalim članovima obitelji. Alternativnim prekrajanjem primarnog transkripta glasničke RNA u čovjeka nastaju dvije izoforme proteina DVL1 i DVL3, dok se DVL2 javlja samo u jednom obliku (71).

1.5.1. Struktura proteina Dishevelled

Svi proteini DVL posjeduju 3 konzervirane domene: aminoterminalnu DIX (engl. *Dishevelled*, *Axin*), središnju PDZ (engl. *Postsynaptic Density 95*, *Discs Large*, *Zonula Occludens-1*) i karboksiterminalnu DEP (engl. *Dishevelled*, *Egl-10*, *Pleckstrin*) domenu. Također, posjeduju još dva područja u kojima se nalaze pozitivno nabijeni aminokiselinski ostatci. Prvo se zove „Osnovna regija“, koja se nalazi između domena DIX i PDZ domene, a sastoji se od konzerviranih serinskih i treoninskih ostataka. Drugo područje bogato je prolinom. Nazvano je SH3 (engl. *Src Homology 3*)-vezajuća domena. Smještena je nizvodno od domene PDZ (71). Predložena struktura peptida s istaknutim konzerviranim domenama i područjima, posreduje u interakcijama između proteina. Stoga se smatra da DVL vjerojatno služi kao adapterska molekula. U novijim se radovima spominje da protein DVL posjeduje četvrto konzervirano područje pod nazivom Dishevelled (DSV), no njegova uloga još nije razjašnjena (70) (Slika 4).



Slika 4. Struktura proteina Dishevelled s konzerviranim domenama i područjima. Preuzeto iz: (72).

Aminoterminalna domena DIX u čovjeka sadrži 85 aminokiselina u proteinu DVL1, 83 aminokiseline u DVL2 te 82 aminokiseline u DVL3. Ova je domena također prisutna u aksinu, vrlo važnom čimbeniku u prijenosu signala putem Wnt. Pokazano je da su za interakciju DVL-AXIN, uz domenu DIX, potrebni i neki drugi blizu smješteni sljedovi. DVL može vezati AXIN i inhibirati njegovu aktivnost, onemogućujući stvaranje kompleksa za razgradnju β -katenina ili regrutiranjem proteina FRAT (engl. *Frequently Rearranged in Advanced T-cell Lymphomas*). Fosforilirani DVL ima velik afinitet prema proteinu FRAT.

Vežanje ova dva proteina dovodi do konformacijskih promjena proteina koji tvore razgradbeni kompleks. Posljedično dolazi do aktivacije signalnog puta Wnt (73).

Središnja domena PDZ posjeduje 73 aminokiseline i sadrži vezna mjesta za brojne kinaze i fosfataze. Proteini koji se vežu na domenu PDZ imaju ulogu u submembranskom vezanju na receptore. U ovom se području signalne molekule integriraju u veće komplekse tzv. signalosome. Izravna interakcija DVL-Fz preko konzerviranog karboksiterminalnog slijeda u citoplazmi neizostavna je u prijenosu signala signalnim putem Wnt, od receptora Fz do drugih molekula ovog signalnog puta. Poznato je da je snaga interakcije DVL-AXIN i DVL-Fz relativno slaba i vrlo dinamična (74).

Sva tri proteina DVL u ljudi sadrže karboksiterminalnu domenu DEP koju čini 75 aminokiselina. Isti polipeptidni uzorak imaju i signalni čimbenici iz proteinske obitelji RGS (engl. *Regulator of G-protein Signaling*), koji posjeduju konzervirane, katalitičke domene RGS, prisutne i u domeni DEP na aminoterminalnom kraju. Pokazano je da domena DEP omogućuje interakcije između DVL i proteina DAAM (engl. *Dishevelled Associated Activator of Morphogenesis 1*), koji je uključen u polimerizaciju aktina. Posredovanjem aminokiselinskih ostataka u domeni DEP, DVL se veže na lipide membrane tijekom planarne polimerizacije epitela (75).

Imajući u vidu središnju ulogu proteina DVL u signalnom putu Wnt, ne iznenađuje činjenica da domene proteina DVL sadrže vezna mjesta za velik broj različitih proteina, uključujući i nekoliko kinaza. Poznato je da DVL stupa u interakciju s više od 50 proteina, u citoplazmi i jezgri stanice. Pojednostavljeno, proteini DVL koriste različite domene kojima posreduju u složenom procesu prijenosa signala. Domene DIX i PDZ nužne su za prijenos signala posredovan β -kateninom, dok domene PDZ i DEP imaju nezamjenjivu ulogu u signaliziranju PCP (76). Zalihe proteina DVL u stanici su ograničene. Stoga se može zaključiti da aktivacija jednog signalnog puta odvaja DVL u različite odjeljke stanice, zbog čega dolazi do njegovog relativnog „manjka“ na drugim mjestima. Zbog ovog fenomena sprečava se njegovo posredovanje u drugim signalnim putevima. Drugim riječima, aktivacija kanonskog oblika signalnog puta može potisnuti nekanonski oblik signalizacije i obrnuto (77).

1.5.2. Premještanje u jezgru

Poznato je da u stanici postoje dva „bazena“ proteina DVL. Prvi se premješta u jezgru kako bi posredovao u kanonskom signaliziranju, dok drugi ostaje u citoplazmi, u blizini stanične membrane te ima ulogu u kanonskom i nekanonskom signalnom putu. Premještaj DVL u jezgru pokazuje da je njegova uloga u prijenosu signala u putu Wnt složenija no što se isprva mislilo. Prelazak iz citoplazme u jezgru određuju lokalizacijski i izlazni signal jezgre, NLS i NES (engl. *Nuclear Localization Signal* i *Nuclear Export Signal*) (78).

Stabiliziranje β -katenina u citoplazmi ovisi o domenama DIX i PDZ proteina DVL (79). DVL u jezgri stupa u interakciju s fosforiliranim JUN i β -kateninom te na taj način posreduje u stvaranju još jednog funkcionalnog kompleksa DVL - JUN - β -katenin – TCF (80). Preko homeobox domene (HMG box) čimbenika transkripcije TCF, novostvoreni se kompleks veže na promotorsko područje ciljnih gena signalnog puta Wnt i na taj način regulira njihovu transkripcijsku aktivnost. Nasuprot tome, u citoplazmi smješten DVL premješta se do stanične membrane, gdje sudjeluje u stvaranju velikih molekularnih superkompleksa, koji se sastoje od Wnt-Fz-LRP5/6-DVL-AXIN. Signalosomi su potrebni za prijenos signala od receptora do nizvodno smještenih molekula (80).

1.5.3. Regulacija aktivnosti DVL

Zasad nije poznata niti jedna enzimatska aktivnost proteina DVL. Pozitivna se regulacija aktivnosti DVL postiže fosforilacijom proteina. Vrlo se malo zna o utjecaju drugih posttranslacijskih modifikacija na aktivnost, stabilnost i regulatorne mehanizme ovog proteina (81). Vežanjem liganda Wnt na receptor, potiče se opsežna fosforilacija glavnih područja proteina DVL. Fosforilaciji posreduju kazein kinaza 1 (CK1), kazein kinaza 2 (CK2) PAR1 i β -arestin. Mehanizam negativne regulacije aktivnosti DVL je poliubikvitinilacija do koje dolazi zbog toga što DVL stupa u interakciju s KLHL12, NEDL1, Dapper1 i Prickle. Fosfataza proteina 2A (PP2A) također je uključena u regulaciju aktivnosti proteina DVL. Ovisno o tome na koju regulatornu podjedinicu proteina se veže ima pozitivan ili negativan utjecaj na njegovu aktivnost. Čak je i deubikvitinilacija posredovana deubikvitinilirajućim enzimom (DUB) Usp14 potrebna za signalizaciju Wnt (82). Opisanim događajima se DVL, zbog promjena koje nastaju u njegovoj strukturi, može premještati između kanonskog i nekanonskog puta Wnt. Precizna regulacija ovog procesa omogućuje proteinima DVL dinamičnu organizaciju kompleksa i preusmjeravanje prijenosa signala (83).

1.6. Obitelj čimbenika transkripcije TCF/LEF

Na samom kraju signalne kaskade puta Wnt nalazi se β -katenin koji se u jezgri veže na čimbenike transkripcije iz obitelji TCF/LEF. U ljudi, ovu obitelj proteina čine četiri člana: TCF1, LEF1, TCF3 i TCF4 (poznati su i kao TCF7, LEF1, TCF7L1 i TCF7L2). TCF1 i LEF1 su prvi otkriveni tijekom istraživanja čimbenika transkripcije koji su specifični za T-limfocite. Za razliku od TCF1, LEF1 je, osim u T-limfocitima također eksprimiran i u ranim stadijima razvoja B-limfocita. Iako se članovi obitelji TCF/LEF razlikuju strukturom i funkcijom, imaju i neka zajednička svojstva. Sadrže četiri konzervirane domene: 1. domena za vezanje β -katenina; 2. domena za vezanje na molekulu DNA; 3. regulatorna domena te 4. tzv. aminokiselinski „rep“ (59).

1.6.1. Domene čimbenika transkripcije TCF/LEF

Na amino-terminalnom kraju čimbenika transkripcije iz obitelji TCF/LEF nalazi se približno 55 aminokiselina koje čine domenu koja posjeduje vezno mjesto za β -katenin. Upravo je β -katenin bio prvi protein za kojeg je utvrđeno da stupa u interakciju s proteinima iz obitelji TCF/LEF (59). U nastalom dvodjelnom kompleksu β -katenin djeluje kao koaktivator transkripcije dok se čimbenici transkripcije iz obitelji TCF/LEF preko svoje domene HMG (engl. *High Mobility Group*) box vežu na molekulu DNA. Domena HMG prepoznaje jako konzerviran i specifičan slijed nukleotida WRE (engl. *Wnt Response Element*), 5'-ACATCAAAGGG-3', kojim je omogućeno vezanje čimbenika transkripcije u mali utor na molekuli DNA. Domenu HMG čini 80 aminokiselina koje su smještene u središnjem dijelu proteina. Uz posredovanje u prepoznavanju slijeda WRE, ova domena uzrokuje i savijanje DNA te na taj način omogućava lakše vezanje drugih kofaktora uključenih u transkripciju ciljnih gena (59,84).

Između domene HMG i vezujuće domene za β -katenin smještena je domena CDR (engl. *Context-Dependent Regulatory*). Ova regulatorna podjedinica, kojom se ostvaruje interakcija s represorom Groucho (odnosno, TLE u čovjeka), najmanje je očuvana između članova obitelji TCF/LEF. Kad nema vezanja liganda Wnt, ovi čimbenici preuzimaju ulogu represora transkripcije. Nedavno je u domeni CDR otkriveno sekundarno mjesto za vezanje β -katenina što govori o kompeticiji između ova dva vezna mjesta. Naravno, spomenuti model kompeticije vrijedi samo u slučaju prisustva TCF/LEF pune dužine, uz koje u stanici mogu postojati kraće, dominantno-negativne izoforme (dnTCF/LEF) koje nastaju alternativnim

prekrajanjem, i kojima nedostaje domena za vezanje β -katenina. Ciljni geni na koje se veže kompleks dnTCF/LEF i Groucho/TLE imat će manji afinitet za vezanje β -katenina dok se cijeli kompleks ne zamijeni proteinom TCF/LEF pune duljine (85).

Posljednju konzerviranu domenu čini tzv. karboksi-terminalni „rep“ koji može imati različite oblike, ovisno o alternativnom prekrajanju. Neke inačice proteina sadrže motive koje prepoznaje CtBP (engl. *C-terminal Binding Protein*). Nije još sasvim jasno koji je funkcionalni učinak vezanja CtBP na karboksilni (C-) kraj, budući da su rezultati proizašli iz različitih pokusa kontradiktorni. Neki autori ove proteine opisuju kao korepresore transkripcije, dok drugi navode kako proteini CtBP mogu imati dvojni ulogu (kao aktivatori i kao represori) ovisno o kontekstu događanja u stanici (59) (Slika 5).



Slika 5. Konzervirane domene u čimbenika transkripcije iz obitelji TCF/LEF.

1.6.2. Čimbenik transkripcije TCF1

Gen *TCF7* (engl. *T-Cell Specific Transcription Factor*) koji kodira za protein TCF1 smješten je na lokusu 5q31.1. Ovaj je protein tijekom embriogeneze snažno izražen u mnogim organima, dok su u odraslom tkivu visoke razine ekspresije zabilježene uglavnom u stanicama limfoidne loze. Iako su miševi kojima su inaktivirana oba alela gena *TCF7* (engl. *knockout*) reproduktivno sposobni, imaju zastoj u diferencijaciji T-limfocita. Relativno slabo izražen fenotip upućuje na nadomještanje aktivnosti *TCF7* drugim članovima obitelji TCF/LEF. Ovo je potvrđeno pokusom na miševima kojima su inaktivirana oba alela *TCF7* i *LEF1*, zbog čega imaju ozbiljnije poteškoće u razvoju (86,87).

Gen *TCF7* u čovjeka sadrži dvije promotorske regije, a alternativnim prekrajanjem može nastati pet različitih inačica mRNA/proteina (prema NCBI RefSeq). Zanimljivo je da se sve nastale inačice razlikuju u egzonima koji kodiraju C-terminalni dio proteina. Neovisno o

prekrajanju, inačice posjeduju istovjetnu domenu za vezanje β -katenina koja je smještena na N-kraju proteina. Zbog toga imaju jednaku sposobnost aktivacije transkripcije.

Zahvaljujući relativno velikom udjelu cisteinskih ostataka, slijed nazvan C-clamp predstavlja još jednu domenu putem koje TCF1 ostvaruje interakciju s molekulom DNA. Stvaranje interakcije je omogućeno prepoznavanjem slijeda DNA koji je bogat nukleotidima GC, koji se nalaze u blizini slijeda WRE u promotorskoj regiji nekih Wnt ciljnih gena. Smatra se da se na ovaj način dodatno stabilizira veza ostvarena između TCF1 i molekule DNA (84). Nadalje, regulacija promotora za dominantno-negativni TCF/LEF jednako je važna i razlikuje se tijekom razvoja ili progresije zloćudne bolesti. Na primjer, dominantno-negativan oblik TCF1 (dnTCF1) dokazan je u zdravim stanicama epitela debelog crijeva, ali ne i u stanicama tumora kolona (87).

1.6.3. Čimbenik transkripcije LEF1

Slično kao *TCF7* i gen *LEF1* (engl. *Lymphoid Enhancer Binding Factor 1*) snažno je izražen tijekom embrionalnog razvoja miša. U odrasloj je jedinki njegova izraženost ograničena uglavnom na timus, odnosno T-limfocite. Rekombinantni miševi, u kojih je ciljano utišana ekspresija ovog gena, ugibaju nedugo nakon rođenja zbog slabog razvoja dlake, zubi i mliječnih žlijezda. Gen *LEF1* koji kodira protein LEF1 nalazi se na lokusu 4q25 (87). Posjeduje dva promotorska područja. Aktivnost prvog promotora rezultira nastankom proteina pune duljine, dok aktivnost drugog promotora rezultira nastankom kraćeg oblika LEF1, kojemu nedostaje domena za vezanje β -katenina. Iako ne može vezati β -katenin, kraći oblik i dalje zadržava sposobnost vezanja na molekulu DNA kao i LEF1 normalne duljine, zbog čega djeluje kao inhibitor transkripcije ciljnih gena. Kraći se oblik naziva i dominantno negativan LEF1 (dnLEF1), zbog toga što se s proteinom LEF1 pune duljine „natječe“ za vezna mjesta promotora gena koji su pod kontrolom signalnog puta Wnt. Zanimljivo je da je u tumorima debelog crijeva prekomjerno izražen protein LEF1 pune duljine, što je posljedica poremećenog signaliziranja puta Wnt. U isto je vrijeme ekspresija kraćeg, inhibitorynog oblika LEF1 smanjena ili posve utišana (86).

1.6.4. Regulacija aktivnosti TCF/LEF

U organizmima koji posjeduju nekoliko inačica proteina iz obitelji TCF/LEF, neke su inačice razvile vrlo specijalizirane funkcije. Zbog toga se signal Wnt može „interpretirati“ na

različite načine. Ova činjenica objašnjava i zašto neki od čimbenika transkripcije iz obitelji TCF/LEF imaju ulogu supresora tumora, dok drugi utječu na pojačanu transkripcijsku aktivnost ciljnih gena (onkogeni). Brojne inačice nastaju aktiviranjem alternativnih promotora i/ili alternativnim izrezivanjem primarnog transkripta (87). Dokazano je da izostavljanje dijelova kodirajućeg područja alternativnim izrezivanjem može utjecati na razinu aktivirajućeg potencijala proteina. Ova heterogenost također podrazumijeva da se čimbenici transkripcije iz obitelji TCF/LEF mogu specijalizirati za „ciljanje“ promotora određenog gena ili da mogu stupiti u interakciju s različitim aktivatorima ili represorima (59). Na primjer, TCF3 i TCF4 najčešće imaju ulogu represora signalnog puta Wnt dok su inačice TCF1 i LEF1 pune dužine u najvećem broju slučajeva vezane uz aktivaciju ciljnih gena u ovom signalnom putu. Razumijevanje mehanizma uspostave regulatorne mreže koja kontrolira pojavljivanje pojedine inačice važno je i za razumijevanje funkcioniranja gena u zametnim stanicama i utjecaja pojedine inačice na pojavu različitih patoloških procesa kao što je, između ostalih, i rak (84).

Aktivnost čimbenika transkripcije iz obitelji TCF/LEF regulirana je s nekoliko post-translacijskih modifikacija (fosforilacija, acetilacija, ubikvitinacija i sumoilacija). U pravilu, ove promjene dovode do nastanka slabijih veza između čimbenika transkripcije i njihovih partnera (DNA i proteini), zbog čega se, na ovaj način modificirani čimbenici transkripcije, razgrađuju (84). Na primjer, kinaza HIPK2 (engl. *Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2*) nakon aktivacije signalnog puta, fosforilira LEF1, TCF3 i TCF4 u području domene HMG box. Zbog toga dolazi do prekida fizičke veze između ovih proteina i molekule DNA. Vežanje LEF1 i TCF4 na molekulu DNA spriječeno je i fosforilacijom njihove središnje domene kinazom MAP. Poznato je i da kinaze NLK (engl. *Nemo-Like Kinase*) antagoniziraju djelovanje LEF1 i TCF4 na način da fosforiliraju neke aminokiseline u njihovim domenama CRD. S obzirom na to da TCF1 i TCF3 ne posjeduju motive za vežanje NLK, pretpostavlja se da bi njihova prisutnost mogla biti neophodna za negativnu regulaciju ovih čimbenika transkripcije. Osim navedenih kinaza, u fosforilaciji čimbenika transkripcije sudjeluje i kinaza TNIK (engl. *Traf2 and Nck-Interacting Kinase*), koja pomoću β -katenina bude privučena do proteina TCF3 i TCF4 na koje se veže u području CDR. Raznolikost svojstvena obitelji čimbenika transkripcije TCF/LEF pokazuje da povezivanje molekularnog učinka o β -kateninu ovisnih kinaza (HIPK2, NLK i TNIK) na ukupno funkcioniranje signalnog puta nije istoznačno zbog postojanja istovremeno ispoljenih brojnih inačica koje imaju različite

funkcije (87). Poznato je da acetilacija ovih čimbenika transkripcije utječe na ekspresiju ciljnih gena Wnt. Dodavanje acetilnih grupa na amino-kraj podjedinica histona H3 i H4 ima pozitivan utjecaj na transkripcijsku aktivnost. Ova je reakcija katalizirana acetiltransferazama histona (engl. *Histone Acetyl Transferase*; HAT) dok deacetilaze histona (engl. *Histone Deacetylases*; HDAC), uz vezanje korepresora Gro/TLE, imaju ulogu u represiji transkripcije (85).

1.7. Nestabilnost genoma, mikrosatelitni biljezi i gubitak heterozigotnosti

Tijekom tumorigeneze dolazi do nakupljanja različitih genetičkih promjena u zloćudno promijenjenim stanicama. U stanicama eukariota postoje brojni biološki i biokemijski mehanizmi koji održavaju strukturni integritet molekule DNA kroz mehanizme popravka novonastalih mutacija. Iako su stanice stalno izložene štetnim utjecajima egzogenih i endogenih čimbenika, enzimi uključeni u popravak oštećenja molekule DNA (engl. *DNA repair*) osiguravaju održavanje integriteta genoma. Dodatno, DNA polimeraza „ispravlja“ greške nastale tijekom replikacije molekule DNA. Apoptoza, programirana stanična smrt, predstavlja dodatan mehanizam zaštite. Mehanizmi apoptoze aktiviraju se u slučajevima kada stupanj oštećenja molekule DNA nadilazi mogućnost popravka (88). U specifičan tip postreplikacijskog popravka u ljudi tzv. MMR (eng. *Mismatch Repair*) uključeni su geni *hMLH1*, *hPMS1* (*hMLH2*), *hMLH3*, *hPMS2* (*hMLH4*), *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH5* i *hMSH6*. Povećana ukupna frekvencija mutacija, kao i mutacijom izazvana inaktivacija gena zaduženih za postreplikacijski popravak oštećenja molekule DNA, uzrokuje nestabilnost genoma u stanicama tumora. Genomska nestabilnost dodatno povećava stope mutacija. Mehanizam MMR je odgovoran za „prepoznavanje“ i hidrolizu pogrešno sparenih baza, kao i nastanak insercija/delecija tijekom replikacije monotonih ponavljajućih sljedova (mikrosatelita) kojima genom čovjeka obiluje (89).

Nestabilnost genoma jedno je od osnovnih obilježja genoma stanica tumora, a može se očitovati kao kromosomska (engl. *Chromosomal Instability*; CIN) i mikrosatelitna nestabilnost (engl. *Microsatellite Instability*; MSI ili MIN). Uzroci ova dva oblika nestabilnosti su različiti. Kromosomsku nestabilnost karakteriziraju velike kromosomske abnormalnosti poput dobotka ili gubitka čitavog kromosoma (aneuploidija), jednog od krakova ili dijelova kromosoma. Do ovog tipa nestabilnosti genoma dolazi zbog nepravilnog odvajanja i poravnanja kromosoma tijekom mitoze. Mikrosatelitna nestabilnost očituje se

promjenom broja ponavljanja nukleotida u mikrosatelitima. Posljedica je smanjenog ili potpuno nefunkcionalnog mehanizma za popravak molekule DNA, do kojeg dolazi zbog mutacija u genima koji kodiraju proteine uključene u popravak molekule DNA. Do mutacija u mikrosatelitima najčešće dolazi zbog nesavršene replikacije enzimom DNA polimeraza, prilikom sinteze kratkih ponavljajućih sljedova nukleotida. Zbog toga se broj ponavljanja u stanici-kćeri razlikuje u odnosu na stanicu-roditelja. Promjene u genima koji kodiraju proteine uključene u popravak molekule DNA uključuju gubitak heterozigotnosti, hipermetilaciju promotora i prisustvo mutacijama čija se funkcija odražava na funkciju proteina uključenih u popravak molekule DNA (90).

Mikrosateliti su jednostavni ponavljajući sljedovi nukleotida u molekuli DNA koji zauzimaju približno 4% genoma u sisavaca (91). Za mikrosatelite se, uz naziv „jednostavni ponavljajući sljedovi“ (engl. *Simple Sequence Repeats*; SSR), upotrebljava i izraz kratka ponavljanja tandema (engl. *Short Tandem Repeats*; STR). Ponavljajući slijed mikrosatelitne DNA ima 1-6 parova baza, za razliku od minisatelita koji broje više od 10, a manje od 100 ponavljajućih parova baza (92). Mikrosateliti se nalaze razmješteni po cijelom genomu. U genomu čovjeka je, korištenjem prilagođenih programa, dokazano postojanje približno 20 milijuna mikrosatelita. Najčešći mikrosatelit u genomu nepromijenjenih stanica čovjeka je ponavljajući dinukleotid CA, koji se ponavlja nekoliko desetaka tisuća puta. Mikrosatelitni sljedovi su vrlo nestabilni i skloni mutacijama. Razina polimorfnosti im je, zbog širokog raspona ponavljanja u čovjeka, vrlo visoka (93). Zbog svojih su svojstava primijenjeni u mapiranju genoma u populacijskoj genetici, selekciji te identifikaciji genotipova i dokazivanju srodnosti i očinstva. Budući da su smješteni u blizini mnogih važnih genskih lokusa, mikrosateliti se mogu koristiti kao biljezi za razne bolesti. Status mikrosatelitnog područja neizravno ukazuje na status pojedinog gena, što je naročito korisno u istraživanju tumora. Ukratko, preko mikrosatelitnih sljedova molekule DNA može se, neizravno, dobiti uvid u replikaciju, popravak i mutacijski status molekule DNA u eukariota (94).

Genomska nestabilnost se, u oboljelih od raka, određuje uspoređivanjem broja ponavljanja u molekuli DNA izdvojenoj iz tkiva tumora i tkiva netumora (krvi) i kvantifikacijom uočenih razlika. Prvo se odredi broj ponavljanja u profilima genomske DNA izdvojene iz tkiva netumora (krvi), a zatim se isti tip analize primjenjuje na DNA izdvojenoj iz tkiva tumora. Stupanj genomske nestabilnosti predstavljen je odnosom broja vrpci između

tkiva tumora i tkiva netumora. Osim otkrivanja MSI u genomu stanica tumora, mikrosatelitni biljezi također omogućuju utvrđivanje kvantitativnih promjena poput gubitka heterozigotnosti (engl. *Loss Of Heterozygosity*; LOH). Gubitak heterozigotnosti ili gubitak alela genetička je nestabilnost karakteristična za tkiva tumora. Ovakav gubitak vidljiv je jedino u heterozigotnih ili tzv. „informativnih osoba“ za ispitivani genski biljeg. U gelu elektroforeze se LOH prikazuje manjim brojem vrpca DNA izdvojenih iz tkiva tumora u odnosu na DNA netumora.

2. HIPOTEZA

DVL1, DVL2, DVL3, TCF1 i LEF1 uključeni su u nastanak i zloćudnu progresiju astrocitnih tumora mozga te promjene u ovim genima i povećana izraženost istoimenih proteina upućuju na viši stupanj malignosti.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3.1. Opći cilj

Istražiti promjene gena i proteina obitelji Dishevelled i čimbenika transkripcije TCF1 i LEF1 u astrocitnim tumorima mozga i dobivene podatke povezati s kliničkim parametrima.

3.2. Specifični ciljevi

1. Odrediti mikrosatelitnu nestabilnost i analizirati gubitak heterozigotnosti obitelji gena *DVL*.
2. Odrediti razinu izraženosti proteina DVL1, DVL2 i DVL3.
3. Odrediti razinu izraženosti čimbenika transkripcije TCF1 i LEF1.
4. Odrediti međusoban odnos ključnih molekula signalnog puta Wnt.
5. Korelirati podatke dobivene na razini gena i proteina s kliničkim parametrima (dob, spol, lokalizacija tumora).

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Prikupljanje i obrada uzoraka

Uzorci astrocitnih tumora mozga i periferne krvi oboljelih prikupljeni su s Klinike za neurokirurgiju i Zavoda za patologiju „Ljudevit Jurak“ Kliničkog bolničkog centra “Sestre milosrdnice” u Zagrebu te s Klinike za neurokirurgiju i Zavoda za patologiju Kliničkog bolničkog centra “Zagreb” u Zagrebu. Svi tumori klasificirani su od strane patologa u četiri gradusa astrocitoma prema kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije (2,5). Prije uzimanja uzoraka tkiva primarnih tumora za ovo istraživanje, oboljeli nisu bili podvrgnuti onkološkim metodama liječenja (radijacija, kemoterapija) koje bi mogle utjecati na rezultate genetičkih analiza.

Prikupljanje, pohrana te analiza uzoraka odobreni su dozvolom Etičkog povjerenstva navedenih centara i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Uzorci tkiva tumora prikupljeni za vrijeme kirurškog zahvata obrađeni su na dva načina. Dio uzorka, namijenjen za molekularnogenetičke analize, smrznut je u tekućem dušiku i potom pohranjen na -80°C , do izdvajanja molekule DNA. Uzorci tumora namijenjeni patohistološkoj analizi, standardno su fiksirani u 4%-tnom formalinu i uklopljeni u parafin. Uzorci krvi uzeti su prije operacije ili za vrijeme kontrolnih pregleda, a zatim pohranjeni u staklene epruvete koje sadrže antikoagulans EDTA, na -80°C do korištenja.

Prikupljena su 83 uzorka astrocitnih tumora mozga. Prema patohistološkoj analizi u 17 bolesnika postavljena je dijagnoza pilocitičnog astrocitoma gradusa I, 14 bolesnika je imalo difuzni astrocitom gradusa II, u 17 bolesnika dijagnosticiran je anaplastični astrocitom gradusa III, dok je kod preostalih 35 oboljelih dijagnosticiran glioblastom gradusa IV. Skupina oboljelih obuhvaćala je 36 osoba ženskog i 47 osoba muškog spola. Prosječna starost bolesnika u trenutku operacije bila je 45 godina (medijan 44 godine), pri čemu je najmlađi pacijent imao 2, a najstariji 77 godina.

Genomska DNA gena *DVL1*, *DVL2* i *DVL3* analizirana je na 146 uzoraka, 73 uzorka tkiva tumora i 73 uzorka konstitutivne DNA izdvojene iz stanica pune krvi svakog pacijenta. Razina izraženosti gena *DVL1*, *DVL2* i *DVL3* te čimbenika transkripcije *TCF1* i *LEF1* analizirana je na 73 parafinska reza tkiva tumora, metodom imunohistokemije.

Podatci dobiveni molekularnogenetičkim analizama i metodom imunohistokemije analizirani su u odnosu na dijagnozu, dob i spol oboljelih. Kontrolna skupina sastojala se od 10 uzoraka komercijalno dostupnog, u potpunosti zdravog tkiva mozga (Amsbio, Oxfordshire, UK).

Uzorci DNA izdvojeni iz tkiva tumora i krvi pohranjeni su u Banci tumora u Laboratoriju za neuroonkologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga (Tablica 2).

Tablica 2. Pregled patohistoloških parametara pacijenata oboljelih od astrocitnih tumora (N=83)

Redni broj	Broj Banke*	Histološki tip / Gradus	Dob	Spol	Lokalizacija
1	T17	PA/I	42	M	frontoparijetalno D
2	T51	PA/I	55	Ž	temporalno L
3	T500	PA/I	19	Ž	okcipitalno D
4	T501	PA/I	41	M	mezencefalno
5	T523	PA/I	29	M	mezencefalno
6	T542	PA/I	5	M	cerebelum
7	T548	PA/I	71	Ž	3. komora
8	T549	PA/I	16	M	cerebelum
9	T303	PA/I	20	M	temporalno L
10	T310	PA/I	2	M	cerebelum
11	T311	PA/I	15	M	cerebelum
12	T312	PA/I	65	F	cerebelum
13	T313	PA/I	2	M	cerebelum
14	T314	PA/I	12	Ž	cerebelum
15	ND	PA/I	29	Ž	supraselarno
16	ND	PA/I	49	M	stražnja lubanjska jama
17	ND	PA/I	36	Ž	frontalno L
18	T13	DA/II	36	Ž	frontotemporoparijetalno L
19	T104	DA/II	17	M	frontalno L
20	T132	DA/II	72	Ž	temporalno D
21	T526	DA/II	32	M	temporalno L
22	T535	DA/II	36	Ž	frontotemporalno L
23	T545	DA/II	44	M	inzularno L
24	T279	DA/II	49	M	frontalno D
25	T62	DA/II	37	M	temporalno L
26	T301	DA/II	39	M	frontalno D
27	T298	DA/II	31	Ž	frontotemporoparijetalno D
28	T315	DA/II	56	M	temporalno D
29	T316	DA/II	48	M	frontalno D
30	T317	DA/II	38	Ž	okcipitalno D
31	ND	DA/II	39	M	temporalno L

Redni broj	Broj Banke*	Histološki tip / Gradus	Dob	Spol	Lokalizacija
32	T20	AA/III	17	Ž	talamus D
33	T46	AA/III	25	Ž	frontalno D
34	T536	AA/III	51	M	frontalno parasagitalno L
35	T543	AA/III	24	M	frontalno L
36	T278	AA/III	34	Ž	frontoparijetalno parasagitalno D
37	T26	AA/III	35	M	frontalno D
38	T519	AA/III	34	M	frontalno L
39	T299	AA/III	66	Ž	frontotemporoparijetalno D
40	T318	AA/III	55	Ž	frontalno L
41	T319	AA/III	58	M	frontalno D
42	T320	AA/III	46	M	frontalno L
43	ND	AA/III	65	M	parijetalno L
44	ND	AA/III	25	M	cerebelum
45	ND	AA/III	30	M	temporalno L
46	ND	AA/III	41	M	frontotemporalno L
47	ND	AA/III	32	M	frontalno L
48	ND	AA/III	57	Ž	frontalno D
49	T10	GBM/IV	56	M	frontalno D
50	T4	GBM/IV	68	M	parijetalno D
51	T14	GBM/IV	54	Ž	temporooccipitalno D
52	T23	GBM/IV	77	Ž	temporalno L
53	T27	GBM/IV	60	M	temporalno L
54	T42	GBM/IV	71	Ž	frontalno L
55	T44	GBM/IV	55	M	parijetalno D
56	T40	GBM/IV	31	M	temporalno L
57	T39	GBM/IV	56	Ž	parijetalno L
58	T50	GBM/IV	56	Ž	temporalno D
59	T76	GBM/IV	38	M	temporooccipitalno D
60	T102	GBM/IV	59	Ž	temporalno L
61	T160	GBM/IV	35	M	okcipitalno L
62	T139	GBM/IV	54	M	frontalno D
63	T131	GBM/IV	42	Ž	frontotemporoparijetalno L
64	T22	GBM/IV	58	Ž	temporoparijetalno L
65	T16	GBM/IV	62	Ž	parijetalno D
66	T28	GBM/IV	72	M	frontotemporoparijetalno L
67	T43	GBM/IV	70	M	okcipitalno D
68	T48	GBM/IV	74	Ž	frontalno D
69	T90	GBM/IV	67	M	temporalno L
70	T138	GBM/IV	62	Ž	temporooccipitalno L
71	T129	GBM/IV	72	M	temporalno D
72	T130	GBM/IV	70	M	parijetalno D
73	T502	GBM/IV	38	Ž	temporooccipitalno D
74	T513	GBM/IV	31	M	temporoparijetalno L
75	T511	GBM/IV	59	Ž	hemisfera D

Redni broj	Broj Banke*	Histološki tip / Gradus	Dob	Spol	Lokalizacija
76	T508	GBM/IV	70	Ž	parijetalno L
77	T509	GBM/IV	37	Ž	parijetalno L
78	T503	GBM/IV	53	Ž	temporalno D
79	T516	GBM/IV	61	M	parijetalno L
80	T510	GBM/IV	34	Ž	parijetalno D
81	T507	GBM/IV	36	M	okcipitalno L
82	T505	GBM/IV	55	M	temporoparijetalno D
83	T515	GBM/IV	65	Ž	temporoparijetalno L

PA – pilocitični astrocitom; DA – difuzni astrocitom; AA – anaplastični astrocitom; GBM – glioblastoma multiforme; ND – not determined (nije određeno zbog nedostatka uzorka); M – muško; Ž – žensko; D – desno; L – lijevo

4.2. Izdvajanje DNA iz tkiva tumora metodom fenol/kloroform

Genomska DNA izolirana je iz uzoraka tkiva tumora prethodno pohranjenih na -80°C klasičnom metodom fenol/kloroform (95). Nakon otapanja na sobnoj temperaturi tkivo mase 500 mg mehanički je usitnjeno u što kraćem vremenu kako bi se izbjeglo djelovanje DNaza. Uzorci su prebačeni u sterilne epruvete (Eppendorf) od 1.5 mL na njih je dodan 1 mL pufera za lizu stanica (10 mM Tris Cl; pH 8; 0.5% Tween) i 20 μL proteinaze K (20 mg/mL) (Sigma, Njemačka). Pripremljeni uzorci stavljeni su na inkubaciju preko noći u vodenoj kupelji uz miješanje na 37°C .

Sadržaj svake epruvete Eppendorf je nakon inkubacije razdijeljen u dvije nove epruvete od 1.5 mL i u njih je dodan jednak volumen fenola. Epruvete su stavljene 10 min na rotacijsku mješalicu (Stuart SB2), nakon čega je uslijedilo centrifugiranje 10 min na 1200 g na sobnoj temperaturi (Centrifuge 5415D, Eppendorf, rotor 100 mm), na sobnoj temperaturi. Pipetom je pažljivo, u novu sterilnu epruvetu, prebačena gornja (vodena) faza izbjegavajući povlačenje srednje (proteinske) i donje (fenolne) faze. U novu epruvetu dodano je pola volumena fenola i pola volumena kloroforma, u odnosu na prenesen volumen. Uslijedilo je lagano okretanje uzoraka na mješalici te centrifugiranje pri istim uvjetima kao i u prvom koraku izdvajanja. Potom je pažljivo, bez povlačenja proteinskog i organskog sloja, odvojena gornja vodena faza u novu sterilnu epruvetu. Na odvojeni volumen vodenog sloja dodan je jednak volumen kloroforma te je smjesa promiješana sporom rotacijom 10 min i centrifugirana 10 min na 10 000 okretaja na sobnoj temperaturi. Gornja vodena faza odvojena je u novu sterilnu epruvetu. Na volumen vodenog sloja dodano je 2.5 volumena hladnog apsolutnog etanola (-20°C) (Kemika), a zatim je sadržaj epruvete promiješan snažnim izvrtanjem epruvete, nakon čega je genomska DNA postala vidljiva u obliku malog bijelog klupka. Izdvojena genomska DNA je preko noći pohranjena na -20°C .

Sljedećeg dana su uzorci centrifugirani 20 min na 1600 g na 4°C (Hettich 32R, Universal). Na dnu epruvete vidljiv je bijeli talog, koji je nakon odstranjivanja etanola otopljen dodavanjem 100 μL pufera TE (Tris-EDTA: 10 mM Tris; 1mM EDTA; pH 7.6). Uzorci otopljene DNA pohranjeni su na 4°C (95,96).

4.3. Izdvajanje DNA iz pune krvi metodom isoljavanja

Genomska DNA izdvojena je iz leukocita perifirne krvi metodom isoljavanja (97). Nakon odležavanja uzoraka, puna krv volumena 5-10 mL prelivena je u polipropilensku epruvetu (Falcon) volumena 50 mL. Volumenu uzorka perifirne krvi dodana su tri volumena pufera za lizu eritocita, RCLB (engl. *Red Blood Cell Lysis Buffer*) (0.16 M NH₄Cl; 10 mM KHCO₃; 10 mM EDTA; pH 7.6). Tako pripremljen uzorak stavljen je 15 minuta na led uz povremeno snažno protresanje. Uslijedilo je centrifugiranje (Hettich 32R, Universal) 10 min na 1 600 g na 4 °C. Nakon centrifugiranja odliven je supernatant i uz dodatak pufera RCLB otopljen je talog u epruveti. Uzorak je ponovo centrifugiran pri istim uvjetima, a supernatant je dekantiran. Ukoliko je nakon drugog centrifugiranja talog bez eritrocita, na što ukazuje boja taloga koja se promijenila iz crvene u bijelu, nastavlja se s protokolom. Ako u talogu još uvijek ima eritrocita, postupak se ponavlja sve dok talog ne postane bijele boje.

Nakon kratkog sušenja, u Falcon epruvetu je dodano 2 mL pufera SE (engl. *Sodium-EDTA*; 75 mM NaCl; 25 mM Na₂EDTA; pH 8), 200 µL 10% SDS (engl. *Sodium-dodecylsulphate*) i 15 µL proteinaze K (Sigma, Njemačka) koncentracije 20 mg/mL. Resuspendirani talog inkubiran je preko noći u termostatoranoj vodenoj kupelji na 37 °C. Nakon inkubacije, sadržaj je iz Falcon epruveta prebačen u manje epruvete od 25 mL u koje je na jedan volumen prenesenog sadržaja dodana jedna trećina volumena 5 M NaCl (približno 720 µL). Uzorci su snažno vorteksirani te potom centrifugirani 15 min na 1 600 g i na sobnoj temperaturi. Supernatant je pažljivo izdvojen i prebačen u novu epruvetu. Postupak centrifugiranja ponovljen je 2-3 puta sve do gubitka taloga. Na pročišćeni supernatant dodan je jedan volumen 2-propanola (Kemika). DNA je istaložena laganim okretanjem epruvete.

Pomoću prethodno sterilizirane staklene kukice, uhvaćeno je klupko DNA i zatim je nekoliko puta uronjeno u ledeni 70%-tni etanol (-20 °C) (Kemika) i potom otopljeno u TE puferu. Uzorci su nakon toga ostavljeni preko noći na sobnoj temperaturi, a sljedeći dan su pohranjeni na 4 °C (96,97).

4.4. Provjera kvalitete izdvojene DNA u gelu agaroze

Za provjeru kvalitete DNA potrebno je pripremiti 0.8% gel agaroze otapanjem 0.8 g agaroze (Sigma, Njemačka) u 100 mL 1X pufera TBE, pH=8.2 (89 mM Tris-borat; 2 mM EDTA) uz zagrijavanje. Otopinu agaroze potrebno je ohladiti do 50 °C pa dodati 0.2 µg/mL boje SYBR Safe (TermoFisher Scientific, USA), a zatim izliti u kadicu za elektroforezu i ostaviti da agarozu polimerizira. Uzorak za nanošenje se priprema miješanjem 5 µL otopljene DNA s 1 µL boje za nanošenje u gel (engl. *loading buffer*: 30% glicerol, 0.25% bromofenolno plavilo, 0.25% ksilen cijanol) i zatim se unosi u jažice gela. Elektroforeza se odvija u 1X TBE na 80-100 V u trajanju od 35 do 45 minuta. Nakon elektroforeze DNA se vizualizira na transiluminatoru (ElcromScientific) podešenom na valnu duljinu 254 nm (UV-svjetlo). Neoštećena genomska DNA vidljiva je kao oštra traka u gelu, dok raspadnuta i/ili apoptotična molekula stvara razmaz duž gela.

4.5. Određivanje koncentracije i čistoće DNA

Za mjerenje koncentracije i čistoće uzorka korišten je mikrovolumni spektrofotometar (ND 1000, NanoDrop, Wilmington, DE, USA) kojim se apsorbancija uzorka mjeri na četiri valne duljine (230 nm, 260 nm, 280 nm i 320 nm). Valna duljina od 230 nm apsorpcijski je minimum nukleinskih kiselina, a ujedno i apsorpcijski maksimum fenola, EDTA i peptidnih veza u proteinima. Valna duljina od 260 nm je apsorpcijski maksimum nukleinskih kiselina. Na valnoj duljini od 280 nm odvija se apsorbancija aromatskih aminokiselina proteina i spojeva s aromatskim prstenom, dok na valnoj duljini od 320 nm nukleinske kiseline i proteini ne apsorbiraju zračenje. Apsorbancija (A) na 260 nm koristila se za izračunavanje koncentracije DNA jer je pri $A_{260}=1$ koncentracija genomske DNA 50 µg/mL.

Čistoća DNA provjerena je mjerenjem apsorbancije pri valnim duljinama od 230 nm, 260 nm i 280 nm te izračunavanjem omjera A_{260}/A_{230} i A_{260}/A_{280} . Omjer apsorbancija A_{260}/A_{280} služi za određivanje kontaminacije uzorka proteinima. Čista DNA daje omjer A_{260}/A_{280} između 1.8 i 2.0. Vrijednost omjera A_{260}/A_{280} manja od 1.8 pokazatelj je prisutnosti proteina, dok su vrijednosti veće od 2.0 pokazatelj prisutnosti RNA u uzorku. Omjer apsorbancija A_{260}/A_{230} koristi se za provjeru onečišćenosti fenolom i solima. Ako je njegova vrijednost iznad 1.8, uzorak je dovoljno čist za daljnju analizu. Proteini i soli predstavljaju inhibitore većine reakcija u kojima se analizira DNA, pa je stoga njihovo prisustvo u većim koncentracijama nepoželjno.

Uzorci s koncentracijom DNA većom od 500 ng/ μ L razrijeđeni su dodavanjem TE pufera, dok su uzorci s niskom koncentracijom DNA ukoncentrirani isparavanjem pufera (Concentrator Plus, Eppendorf, Njemačka).

4.6. Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*; PCR) je metoda umnažanja određenog odsječka DNA u uvjetima *in vitro*. Ciljni dio molekule DNA koji se želi umnožiti određuje se kratkim oligonukleotidnim sljedovima - početnicama, koje su komplementarne krajevima ulomka DNA od interesa. Početnice su pokretači serije reakcija u kojima se koristi enzim Taq polimeraza, koja na kalupu jednog lanca DNA sintetizira novi, komplementarni lanac, pri čemu veličina novonastalog dijela DNA odgovara dužini koju omeđuju 5'-krajevi izabranih početnica (98).

Reakcijska smjesa sadržavala je:

- par oligonukleotidnih početnica (10 μ M) za analizirani biljeg
- 5 x pufer PCR (50 mM Tris HCl pH 8.3, 250 mM KCl) (Promega, SAD)
- 10 x otopina MgCl₂ (15 mM) (Promega, SAD)
- smjesa nukleotida dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 10 mM – svaki 2.5 mM) (Promega, SAD)
- enzim *Taq* DNA polimeraza (5 U/ μ L) (Promega, SAD)
- genomska DNA
- voda

Reakcija umnažanja izvođena je u ukupnom reakcijskom volumenu od 25 μ L kojeg je sačinjavalo 5 μ L komercijalno dostupnog 5X PCR-pufera, 1.5 μ L MgCl₂, smjese nukleotida, početni oligonukleotidi (10 μ M svaki), 100 ng DNA, 1 jedinica Taq polimeraze te H₂O do volumena 25 μ L (Tablica 3).

Tablica 3. Volumeni sastojaka smjese u jednoj lančanoj reakciji polimerazom

Sastojak smjese	Konačna koncentracija	Konačni volumen
5X PCR pufer	1X	5 µL
25 mM MgCl ₂	1.5 mM	1.5 µL
10 mM dNTP	200 µM	0.5 µL
10 µM početnica 5'	0.4 µM	1 µL
10 µM početnica 3'	0.4 µM	1 µL
Taq DNA polimeraza	1 U	0.2 µL
Genomska DNA	100 ng	1 µL
H ₂ O	-	14.8

Za analizu LOH, za svaki je od analiziranih gena izabran fizički blizak mikrosatelitni biljeg, koji se umnožava lančanom reakcijom polimeraze i razdvoja elektroforezom. Pravilnim izborom mikrosatelitskih biljega, smještenih u blizini ili u okviru samog gena omogućava se precizna i visoko specifična analiza LOH. Gubitak alela na lokusima gena *DVLI*, *DVL2* i *DVL3* procijenjen je pomoću četiri mikrosatelitna biljega: D1S468 (1p36.3), D1S243 (1p36.3), D17S960 (17p13.1) i D3S1262 (3q27). Ovi mikrosateliti imaju različit broj dinukleotidnih ponavljanja CA, a pokazuju visoku razinu polimorfnosti među pojedincima (Tablica 4).

Tablica 4. Početnice za mikrosatelitne biljege

Početnice	Slijed nukleotida	Produkt
D1S468 (DVL1)	5' TTAACCGTTTTGGTCCTACC 3'	173 - 191 pb
	5' CTCTGACCAGCATTAAGATTC 3'	
D1S243 (DVL1)	5' CAC ACA GGC TCA CAT GCC 3'	142 -170 pb
	5' GCT CCA GCG TCA TGG ACT 3'	
D17S960 (DVL2)	5' CAA TGG AAC CAA ATG TGG TC 3'	144 - 174 pb
	5' AGT CCG ATA ATG CCA GGA TG 3'	
D3S1262 (DVL3)	5' CGG CCC TAG GAT ATT TTC AA 3'	112 - 126 pb
	5' CCA GTT TTT ATG GAC GGG GT 3'	

Sve reakcije PCR u ovom istraživanju izvedene su instrumentom GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, SAD), tijekom 40 ciklusa umnažanja. Uvjeti umnažanja optimizirani su za svaki odsječak, na način prikazan u Tablici 5.

Tablica 5. Optimizirani uvjeti lančane reakcije polimerazom za umnažanje mikrosatelitnih biljega D1S468 (*DVLI*), D1S243 (*DVLI*), D17S960 (*DVL2*) i D3S1262 (*DVL3*)

		Početna denaturacija lanaca DNA	Uvjeti umnažanja u ciklusima			Završno produljenje lanca
<i>DVLI</i>	D1S468	94 °C 5 min	94 °C 30 sec	60 °C 30 sec	72 °C 30 sec	72 °C 10 min
	D1S243	95 °C 5 min	95 °C 30 sec	56 °C 30 sec	72 °C 30 sec	72 °C 10 min
<i>DVL2</i>	D17S960	95 °C 5 min	95 °C 30 sec	58 °C 30 sec	72 °C 30 sec	72 °C 30 sec
<i>DVL3</i>	D3S1262	94 °C 5 min	94 °C 30 sec	56 °C 35 sec	72 °C 30 sec	72 °C 10 min

4.6.1. Optimizacija višestruke („multipleks“) lančane reakcije polimerazom

Multipleks PCR (mPCR) modifikacija je metode PCR i predstavlja mogućnost da se istovremeno analizira nekoliko odsječaka istog uzorka DNA u jednoj reakcijskoj smjesi. mPCR, osim kvalitativne omogućuje i kvantitativnu analizu uzorka. Jedan od osnovnih uvjeta je da početnice imaju slične optimalne temperature za vezanje (podjednaka dužina i sastav GC nukleotida).

Umožen je mikrosatelitni biljeg D3S1262 za gen *DVL3* čiji produkt ima veličinu od 112-126 pb. Uz njega su umnaženi i kontrolni biljezi SHGC-68373 (222 pb) (99) i Apex1 (321 pb) (100) za koje smo potvrdili da nemaju genetičke promjene u glioblastomima te su korišteni kao referentne količine DNA koja je korištena u reakcijama umnažanja (Tablica 6).

Tablica 6. Parovi početnica za mPCR

Početnice	Slijed nukleotida	Produkt
D3S1262	5' CGG CCC TAG GAT ATT TTC AA 3'	112 - 126 pb
	5' CCA GTT TTT ATG GAC GGG GT 3'	
SHGC-68373	5' CTC AAC TTT GCT TTC CTT CTC CA 3'	222 pb
	5' AAC AGC CCA ACT AAG CAA AAT GT 3'	
Apex 1	5' TCC CTT GAT GTA CGG TAA G 3'	321 pb
	5' TCT TCT TAA TCC AGG CTC G 3'	

Tablica 7. Prikaz udaljenosti analiziranih lokusa od ciljnog gena

Gen	Biljeg	Lokacija
<i>DVL1</i>		1 335 278 – 1 349 142
	D1S243	2 207 835 – 2 207 996
	D1S468	3 357 232 – 3 668 575
<i>DVL2</i>		7 225 341 – 7 234 548
	D17S960	7 354 454 – 7 354 582
<i>DVL3</i>		184 155 311 – 184 173 610
	D3S1262	186 505 690 – 186 505 805

4.7. Elektroforeza DNA u gelu agaroze

Uspješnost reakcije PCR provjerena je horizontalnom elektroforezom u 2%-tnom gelu agaroze (Sigma, Njemačka). Veličina umnoženog odsječka određena je prema standardu DNA (100 bp DNA Ladder) (Amresco, USA).

Elektroforeza se odvijala u puferu TAE 40 mM Tris-acetat; 1 mM EDTA; pH 8) pri naponu od 100 V, a trajanje je ovisilo o duljini odsječka veličinu kojeg smo željeli provjeriti. Za vizualizaciju produkata reakcije PCR u gelove je dodana boja Sybr Safe (0.5 µg/mL). Za detekciju vrpce DNA korišten je UV-transiluminator dok je za fotografiranje gelova, pri emisiji valova duljine 254 nm, korišten sustav Kodak (Kodak, SAD).

4.8. Elektroforeza DNA u gelovima Spreadex

Za analizu gubitka heterozigotnosti (LOH), određivanje mikrosatelitne nestabilnosti (MSI) i amplifikacije gena korišten je sustav za elektroforezu SEA 2000 (Elchrom Scientific, Švicarska). Umnoženi odsječci DNA nanešeni su na komercijalne Spreadex EL400 Mini gelove (Elchrom Scientific, Švicarska). Ovi gelovi posjeduju veliku razlučivost, u njima se mogu razdvajati vrpce koje se razlikuju samo 2 para baza. Odsječci veći od 400 pb fizički ne mogu ući u gel, stoga su ovi gelovi idealni za analizu naših uzoraka (veličina odsječka 100-200 pb). Elektroforeza se odvijala u puferu TAE pri temperaturi od 55 °C, pod stalnim naponom od 120 V, 70 min. Za određivanje veličine razdvojenih DNA vrpce, na gel se uvijek nanosio i standard DNA - 100 pb ljestve (Amresco, USA).

Nakon završetka elektroforeze, gelovi su 20 minuta bojani bojom Sybr Gold (Molecular Probes, SAD), na način da se 5 µL boje doda u 50 mL pufera TAE. Nakon toga je slijedilo odbojavanje gelova tijekom 30 minuta (0.5 mL otopine za odbojavanje (ABC Biopply, Švicarska), 20 mL pufera TAE, 29.5 mL dH₂O). Gelovi su vizualizirani UV-transiluminatorom i fotografirani digitalnom kamerom, pri emisiji $\lambda=254$ nm (Kodak, SAD).

Ukoliko su u DNA izdvojenoj iz pune krvi prisutna dva različita alela („informativan uzorak“), a u tumoru dolazi do gubitka signala, zaključuje se da postoji delecija jednog od alela. U tom slučaju, govorimo o gubitku heterozigotnosti analiziranog lokusa (LOH).

Za razliku od gubitka heterozigotnosti, mikrosatelitna nestabilnost se očituje kao pojava dodatno umnoženih vrpce (tkivo tumora), koje se veličinom razlikuju za najmanje dva para baza u odnosu na konstitutivnu DNA. Ako u uzorku DNA izdvojenom iz tkiva tumora postoje vrpce koje nisu vidljive u DNA izdvojenoj iz periferne krvi u istog bolesnika i/ili se razlikuju po broju ponavljanja „CA“, postoji MSI. Interpretacija podataka moguća je u samo tzv. informativnim uzorcima, a to su oni u kojima aleli imaju različit broj ponavljanja. Stoga je bilo bitno odrabrati biljege s visokim postotkom informativnosti u populaciji. Uzorci su uvijek bili nanešeni u parovima; prvo se nanosio amplifikat dobiven na DNA izdvojenoj iz tkiva tumora (T_{broj}), a potom i pripadajućeg netumorskog tkiva (OT_{broj}).

4.9. Genotipizacija mikrosatelita

Po završenoj analizi rezultata dobivenih elektroforezom na gelovima Spreadex, uzorci u kojima je otkriven gubitak heterozigotnosti pripremljeni su za potvrđivanje metodom

genotipizacije mikrosatelita. Priprema uzoraka za određivanje prisustva LOH podrazumijeva njihovu amplifikaciju pod uvjetima navedenim u Tablici 5. Uzorci su potom poslani na analizu u Source Bioscience (Nottingham, UK) gdje su obrađeni prema standardnom protokolu laboratorija.

4.10. Imunohistokemija

Analiza metodom imunohistokemije temelji se na lokalizaciji specifičnih antigena u tkivu, vezanjem ciljano usmjerenih protutijela. Upotreba imunohistokemije za procjenu izraženosti staničnih biljega koji definiraju specifičan fenotip, omogućila je dobivanje važnih dijagnostičkih, prognostičkih i prediktivnih informacija neophodnih za klasificiranje, diferenciranje i praćenje liječenja pojedinih bolesti (96).

Izraženost proteina određena je neizravnom metodom imunohistokemije na parafinskim rezovima, korištenjem specifičnih protutijela na DVL1, DVL2, DVL3, TCF1 i LEF1, u odvojenim reakcijama. Rezovi parafinskih kocki debljine 4 µm fiksiraju se na predmetna stakalca, deparafiniziraju u ksilenu (Kemika), rehidriraju u padajućim koncentracijama etanola (96%, 90%, 70%) (Kemika), ispiru u destiliranoj vodi.

Za uspješnu je reakciju potrebno razotkriti („demaskirati“) antigen. Demaskiranje antigena provedeno je kuhanjem preparata u svježe pripremljenom 6 M citratnom puferu pH 6.0. Preparati su dva puta po sedam minuta izloženi snazi mikrovalova od 400 W, a potom tri puta po 5 minuta snazi od 700 W s hlađenjem između svakog ciklusa zagrijavanja.

Slijede tri ispiranja u puferu PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4). Važno je da preparati niti u jednom trenutku ne ostanu suhi. Stoga ih treba položiti na stalak s natopljenim papirom i pokriti za vrijeme produljenih inkubacija. Nakon ispiranja, rezovi tkiva se tretiraju s 3%-tnim vodikovim peroksidom kako bi se blokiralo nespecifično vezanje. Tretman vodikovim peroksidom odvija se u vlažnoj komori kroz 10 min, pri sobnoj temperaturi. Uloga vodikovog peroksida je blokiranje endogenih staničnih peroksidaza koje nespecifično oksidiraju kromogen DAB i time dovode do nastanka lažno pozitivnog signala. Slijedi ispiranje u puferu PBS tri puta po 5 min.

Na preparatima je potrebno blokirati potencijalno nespecifično vezanje primarnog protutijela (engl. *blocking background*) kako bi se poboljšao omjer signala u odnosu na šum

(lažno pozitivan signal, buka pozadine). Za blokiranje je korišten serum (Protein Block Serum Free, Dako, Glostrup, Denmark), a inkubacija se odvijala u hladnjaku tijekom 30 min. Serum se ne ispiri već se otopina samo pažljivo ukloni sa stakalca. Primarna protutijela nakapana su na preparate i na pozitivnu kontrolu u zadanim koncentracijama (Tablica 8) te su ostavljena u hladnjaku na 4°C preko noći. Nakon ispiranja u puferu PBS 3 puta po 5 min, na preparate je nakapano sekundarno protutijelo (EnVision™, Dako REAL™) koje se specifično veže na primarno. Ispiranjem se također umanjuje omjer šuma u odnosu na signal. Sustav EnVision baziran je na polimeru dekstrana na kojeg je vezano 70 molekula enzima (peroksidaza) i približno 10 sekundarnih protutijela. Prednost metoda koje se temelje na korištenju polimera je veća osjetljivost, a nespecifično pozadinsko bojanje svedeno je na minimum. Otopina sekundarnih protutijela na dekstranu nakapa se na preparate i inkubira 30 min.

Preparati se zatim tretiraju kromogenom DAB (3,3'-diaminobenzidine) (EnVision™, Dako REAL™) koji daje smeđe obojenje. Otopina kromogena priprema se otapanjem supstrata za DAB u supstratnom puferu (EnVision™, Dako REAL™) u omjeru 50:1. Inkubacija bi trebala trajati 30 sekundi po preparatu. Međutim dobro je prekinuti reakciju i ranije, čim obojenje postane jasno vidljivo, kako se ne bi došlo do nespecifičnog bojanja. Kako bi se olakšala detekcija detalja u tkivu, koristi se boja koja je kontrast signalu i koja „pokriva“ ostale strukture stanice.

Jezgre su 3 min bojane hematoksilinom (Dako, Carpinteria, CA, USA), a višak boje ispran u hladnoj vodovodnoj vodi kroz 10 min. Preparati su potom dehidrirani u rastućim koncentracijama etanola (70%, 90%, 96%) i ksilenu te trajno uklopljeni u sredstvo za prekrivanje (Biomountu DPX Low, BioGnost). Za otkrivanje eventualnog nespecifičnog bojanja, u svakoj je reakciji korištena negativna kontrola. To je bio parafinski rez obrađen na isti način kao i ispitivani rezovi, samo bez dodavanja primarnog protutijela.

4.10.1. Protutijela

U ovom je istraživanju korišteno pet različitih protutijela, osobitosti kojih su prikazane u Tablici 8.

Tablica 8. Popis primarnih protutijela

Antigen	Podrijetlo (izotip) protutijela	Razrijeđenje	Epitop	Proizvođač
DVL1	miš (monoklonsko)	1:50	AK 441-470	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
DVL2	kunić (poliklonsko)	1:500	AK 223-550	Abcam, Cambridge, UK
DVL3	kunić (poliklonsko)	1:50	AK 606-665	Abcam, Cambridge, UK
TCF1	miš (monoklonsko)	1:50	rekombinantni TCF1	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
LEF1	miš (monoklonsko)	1:50	LEF1 pune dužine	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

4.10.2. Analiza imunohistokemijskih preparata

Rezultati reakcije imunohistokemije očitani su kao pozitivni ukoliko je primijećeno smeđe obojenje u citoplazmi i/ili jezgri stanice ili negativni ukoliko je bilo prisutno samo plavo obojenje jezgara.

Procjena jačine obojenja za DVL1, DVL2, DVL3, TCF1 i LEF1 utvrđena je korištenjem svjetlosnog mikroskopa (BH-2 Olympus), tehnikom semikvantitativne analize, pri povećanju 200x. Rezovi su skenirani i pomoću digitalnog skenera (NanoZoomer 2.0 RS; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) u Laboratoriju za neurogenomiku i *in situ* hibridizaciju. Za određivanje broja stanica (200 na svakom preparatu) i intenziteta izražaja proteina korišten je računalni program ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, SAD). Procjena imunopozitiviteta u citoplazmama i/ili jezgrama stanica temeljila se na određivanju indeksa obojenja (engl. *Immunoreactivity Score*; IRS), koji predstavlja vrijednost dobivenu množenjem postotka stanica u kojima je signal prisutan (engl. *Positive Cells Proportion Score*; PP) s intenzitetom signala (engl. *Staining Intensity Score*; SI). Pet različitih kategorija snage obojenja (PP) označavaju se brojevima: (0) nema pozitiviteta u tumorskim stanicama, (1) imunopozitivitet u citoplazmi od 1-25 % stanica tumora pregledanih rezova tumorskog tkiva po vidnom polju pri velikom povećanju mikroskopa, (2) u > 25-50 % tumorskih stanica, (3) u > 50-85 % tumorskih stanica, (4) u > 85 % tumorskih stanica. Jačina intenziteta bojenja preparata (SI) podijeljena je u tri kategorije: (1) nema/slab imunopozitivitet – žućkasto obojenje, (2) umjereno – smeđkasto i (3) jako – tamno smeđe. Za analizu se je uzimalo

obojenje prisutno u najvećem broju stanica tumora na preparatu. IRS se stoga kreće u rasponu vrijednosti od 0-12. Zbog potreba statističke analize IRS vrijednosti su pretvorene u brojeve: 1 (IRS=0-4), 2 (IRS=6, 8) i 3 (IRS=9, 12). Preparate su neovisno pregledala dva patologa i jedan eksperimentalni biolog.

4.11. Statistička analiza podataka

Svi dobiveni podatci analizirani su u odnosu na lokalizaciju tumora i patohistološku dijagnozu (PHD), dob i spol bolesnika, podatke dobivene molekularnogenetičkim analizama (*DVL1* LOH/MSI, *DVL2* LOH/MSI, *DVL3* LOH/MSI) i podatke dobivene metodom imunohistokemije (izraženost proteina *DVL1*, *DVL2*, *DVL3*, *TCF1* i *LEF1*). Statistička analiza dobivenih podataka napravljena je programskim paketom SPSS v.19.0.1 (SPSS, Chicago, IL, SAD), uz razinu značajnosti od $\alpha \leq 0.05$.

Dobiveni rezultati prikazani su tablično i grafički. Normalnost raspodjele pojedinih parametara unutar skupina testirana je upotrebom testa raspodjele normalnosti Kolmogorov-Smirnovljeva. Ovisno o rezultatima ove analize, ali i broju ispitanika po skupinama, korišteni su parametrijski i neparametrijski statistički testovi.

Razlike u učestalosti analiziranih obilježja analizirane su Pearsonovim χ^2 -testom koristeći Yatesovu korelaciju kada je to bilo primjereno. Razlike u vrijednostima bioloških biljega između četiri gradusa u slučaju normalne raspodjele, testirane su pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA), a u slučaju odstupanja od normalnosti testom Kruskal-Wallis. Nakon jednosmjerne analize varijance za usporedbu pojedinih skupina proveden je post-hoc test Scheffé, dok je nakon testa Kruskal-Wallis proveden test Mann-Whitney. Razlike u vrijednostima između dvije skupine su, u slučaju normalne raspodjele, testirane pomoću Studentovog t-testa, a u slučaju odstupanja od normalnosti testom Mann-Whitney. Korelacije između pojedinih parametara su, u slučaju normalne raspodjele, rađene Pearsonovom korelacijom, a ukoliko su odstupale od normalnosti u obzir su se uzimale vrijednosti dobivene Spearmanovom korelacijom. Prije toga je test Kolmogorov-Smirnov bio upotrebljen kako bi se ispitalo imaju li dobiveni podaci normalnu distribuciju – niska vrijednost značajnosti ($p < 0.05$) upućuje da se distribucija značajno razlikuje od normalne. Iz istog razloga korišten je test Shapiro-Wilk u slučajevima kada je u analizu uključeno manje od 50 bolesnika.

5. REZULTATI

Kako bi se realizirali opći i specifični ciljevi, eksperimentalni dio disertacije obuhvaća dva segmenta istraživanja. Prvi dio rada posvećen je analizi genske strukture i nestabilnosti genoma stanica tumora, s naglaskom na detekciju mikrosatelitne nestabilnosti (MSI) i gubitka heterozigotnosti (LOH). Nakon dobivanja rezultata na razini DNA, u drugom dijelu istraživanja, metodom imunohistokemije analizirana je izraženost proteinskih produkata ispitivanih gena kako bi se pokušalo utvrditi da li, i na koji način promjene na razini gena utječu na izraženost proteina. Analiza međusobne povezanosti dobivenih podataka, kao i njihova korelacija s kliničkim i patohistološkim parametrima za cilj je imala otkrivanje potencijalnih dijagnostičkih i prognostičkih biljega u tumorima podrijetlom od astrocita čovjeka.

5.1. Demografski podatci i anatomska lokalizacija ispitivanih astrocitoma

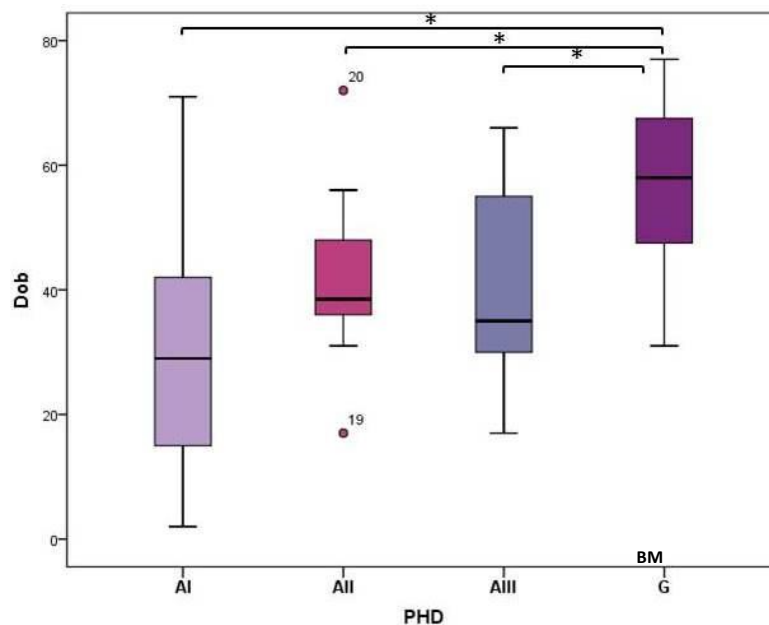
U istraživanju su analizirana 83 uzorka astrocitnih tumora mozga (47 osoba muškog i 36 osoba ženskog spola). Raspon životne dobi bio je od 2 do 77 godina, prosječno 45 godina. Srednja vrijednost životne dobi u trenutku postavljanja dijagnoze za muškarce bila je 42, dok je za žene iznosila 49 godina. U Tablici 9 nalazi se sistematizirani prikaz ovih podataka.

Tablica 9. Raspodjela dobi i spola u odnosu na gradus astrocitoma

Gradus astrocitoma	Broj oboljelih			Dob	
				Srednja vrijednost ± SD	Medijan (25.-75. percentila)
	M	Ž	Ukupno		
AI	11	6	17	29.88±21.44	29 (13.5 – 45.5)
AII	8	6	14	41±12.85	38.5 (35 – 48.25)
AIII	11	6	17	40.88±15.37	35 (27.5 – 56)
GBM	17	18	35	55.94±13.69	58 (42 – 68)
Ukupno	47	36	83	45±18.56	44 (32 – 59)

AI – pilocitični astrocitom; AII – difuzni astrocitom; AIII – anaplastični astrocitom; GBM – glioblastoma multiforme; SD – standardna devijacija; M – muškarci; Ž – žene

Rezultati testa Kruskal-Wallis pokazali su da se pojavnost pojedinih tipova astrocitnih tumora statistički značajno razlikuje u odnosu na dob obolijevanja ($p < 0.001$). Upotrebom testa Mann-Whitney otkrili smo da se glioblastomi javljaju u kasnijoj životnoj dobi u odnosu na pilocitične ($p < 0.001$), difuzne ($p = 0.004$) i anaplastične astrocitome ($p = 0.001$) (Slika 6).



Slika 6. Povezanost dobi i pojavnosti astrocitoma različitih gradusa. AI – pilocitični astrocitom; AII – difuzni astrocitom; AIII – anaplastični astrocitom; GBM – glioblastom; PHD – patohistološka dijagnoza.

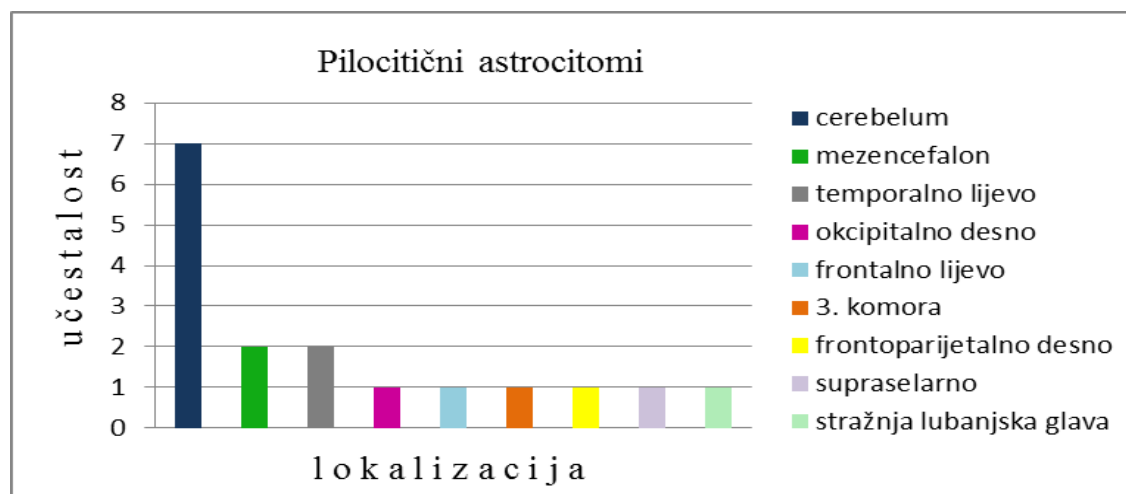
Iako je u skupini pilocitičnih i anaplastičnih astrocitoma bilo gotovo dvostruko više muškaraca nego žena, upotrebom χ^2 -testa nisu utvrđene statistički značajne razlike između spolova, u odnosu na pojavnost tumora, u odnosu na njegov gradus ($p = 0.608$) (Tablica 10). Značajnost nije utvrđena niti u pojavnosti tumora specifičnog gradusa u odnosu na spol, u određenoj dobi ($p = 0.631$).

Tablica 10. Razdioba histoloških podtipova u odnosu na dob i spol bolesnika

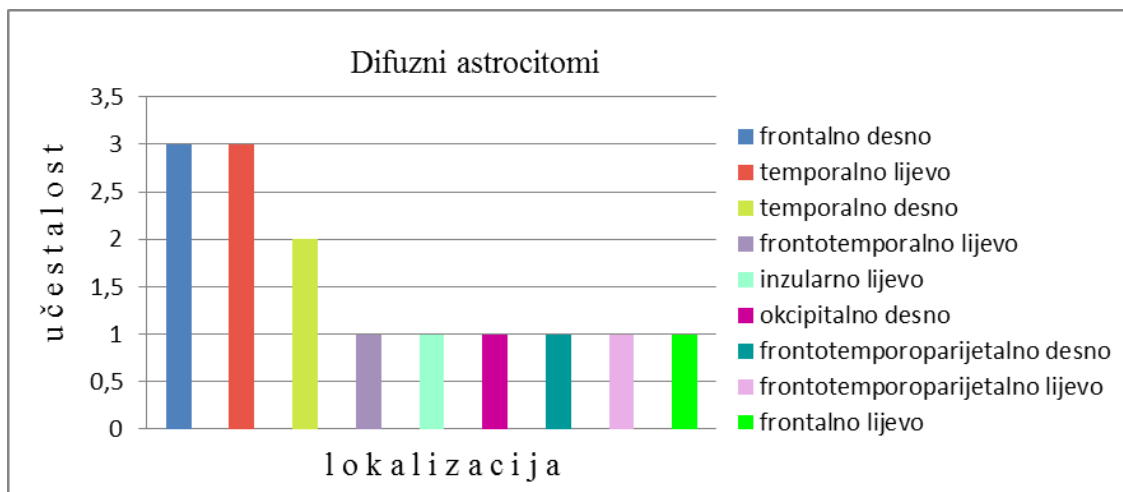
Gradus astrocitoma	Broj oboljelih			DOB					
				Srednja vrijednost ± SD			Medijan (25.-75. percentila)		
	M	Ž	SVI	M	Ž	SVI	M	Ž	SVI
AI	11	6	17	26±20.95	37±22.33	29.88±21.43	20 (5 – 42)	32.5 (17.25 – 59)	29 (13.5 – 45.5)
AII	8	6	14	39.13±11.65	43.5±15.04	41±12.85	39 (33.25–47.45)	37 (34.75 – 54)	38.5 (35 – 48.25)
AIII	11	6	17	40.09±13.46	42.33±19.73	40.88±15.37	35 (30 – 51)	44.5 (23 – 59.25)	35 (27.5 – 56)
GBM	17	18	35	54.76±15.01	57.06±12.64	55.94±13.68	56 (37 – 69)	58.5 (50.25 – 66.25)	58 (42 – 68)
Ukupno	47	36	83	41.94±18.91	49±17.54	45±18.55	41 (31 – 56)	54.5 (36 - 62)	44 (32 – 59)

AI – pilocitični astrocitom; AII – difuzni astrocitom; AIII – anaplastični astrocitom; GBM – glioblastoma multiforme; SD – standardna devijacija; M – muškarci; Ž – žene

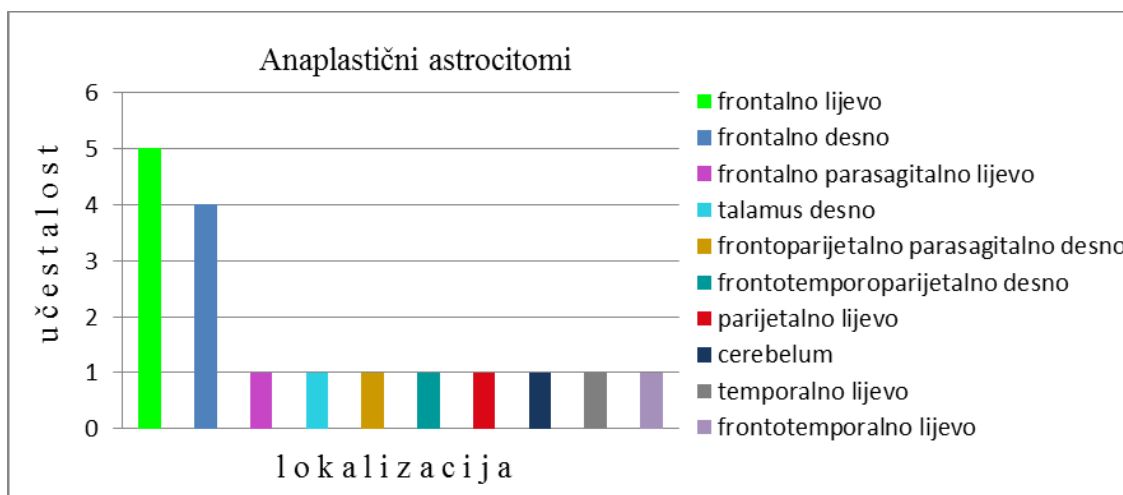
Sijela analiziranih tumora prikazana su u Tablici 2. Pilocitični astrocitomi su najčešće bili smješteni u cerebelumu (Slika 7), difuzni astrocitomi su se u najvećem broju javljali u frontalnoj i temporalnoj regiji (Slika 8), dok je pojavnost anaplastičnih astrocitoma, u ovom uzorku, bila najčešća u frontalnom dijelu mozga (Slika 9). Glioblastomi su se najčešće razvili u parijetalnom i temporalnom području (Slika 10).



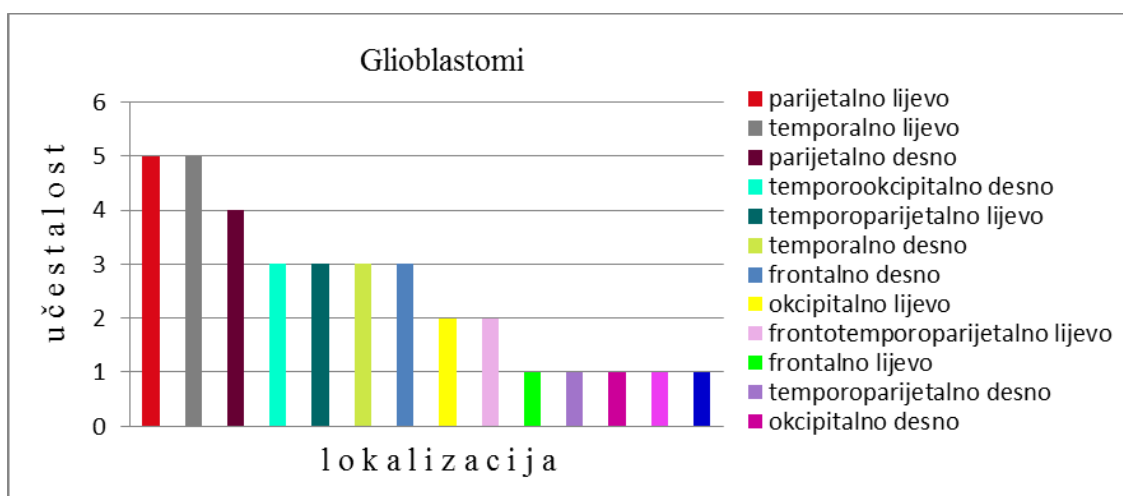
Slika 7. Lokalizacija i učestalost pilocitičnih astrocitoma.



Slika 8. Lokalizacija i učestalost difuznih astrocitoma.



Slika 9. Lokalizacija i učestalost anaplastičnih astrocitoma.



Slika 10. Lokalizacija i učestalost glioblastoma.

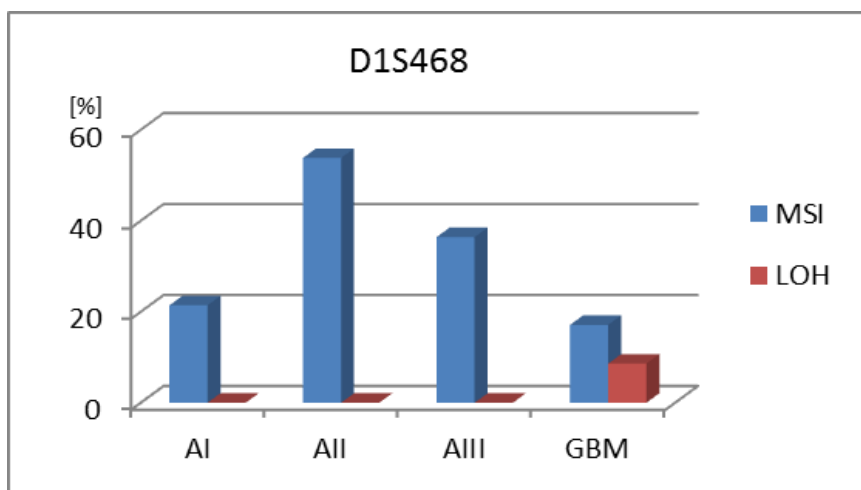
5.2. Analiza gena Dishevelled u astrocitnim tumorima mozga

Od ukupno 83 bolesnika uključena u istraživanje, molekularnogenetičke analize napravljene su korištenjem DNA izdvojene iz 73 astrocitna tumora. U 10 je uzoraka genomska DNA bila raspadnuta ili nedostupna za analizu.

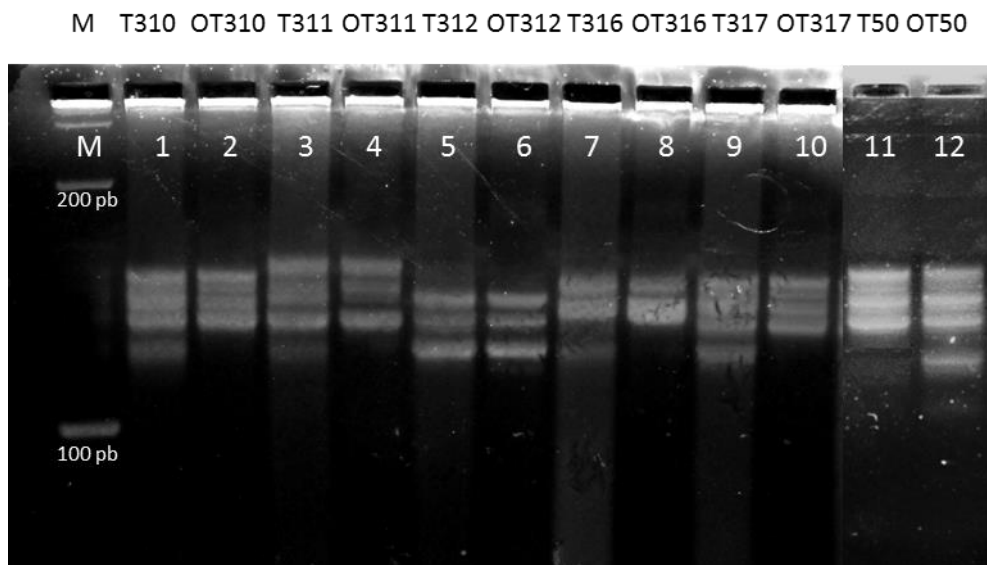
5.2.1. Rezultati analize mikrosatelitne nestabilnosti i gubitka heterozigotnosti gena *DVLI*

Mikrosatelitni biljezi vezani uz gen *DVLI*, D1S468 i D1S243, bili su visoko informativni, obzirom na to da je udio heterozigota bio 91.8% (67/73) i 94.5% (69/73).

Analizom mikrosatelitnog biljega D1S468 pronađen je znatan postotak mikrosatelitne nestabilnosti (MSI) u astrocitnim tumorima svih gradusa (AI = 21.4%; AII = 53.8%; AIII = 36.4%; GBM = 17.1%), dok je gubitak heterozigotnosti (LOH) ovog lokusa otkriven samo u glioblastomima (GBM = 8.6%). χ^2 -testom je pokazano da postoji statistički značajna razlika u raspodjeli genskih promjena u odnosu na gradus tumora ($p=0.020$). Dodatnom je analizom utvrđeno da se u difuznim astrocitomima mikrosatelitna nestabilnost u području ovog gena javlja statistički značajno češće u odnosu na ostale graduse astrocitoma ($p=0.008$) (Tablica 11, Slika 11 i 12).



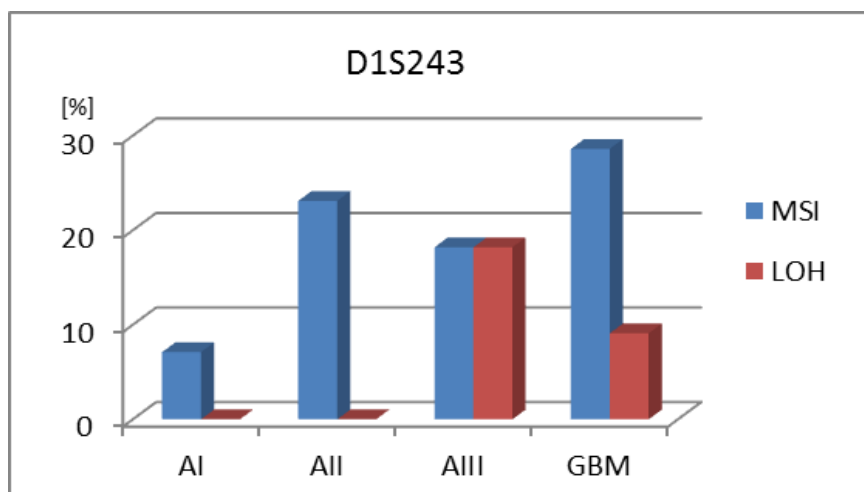
Slika 11. Postotak informativnih uzoraka koji pokazuju MSI i LOH na mikrosatelitni biljeg D1S468 u pojedinom gradusu astrocitnih tumora.



Slika 12. Analiza gena *DVL1* (biljeg D1S468) u gelovima Spreadex (Elchrom Scientific).. Pruga M – 100 pb DNA standard; pruga 1 –MSI u tumoru T310; pruga 2 – pripadajući uzorak krvi; pruga 3 –MSI u tumoru T311; pruga 4 – pripadajući uzorak krvi; pruge 5, 6 – heterozigot; pruga 7 –MSI u tumoru T316; pruga 8 – pripadajući uzorak krvi; pruga 9 – MSI u tumoru T317; pruga 10 – pripadajući uzorak krvi; pruga 11 –LOH u tumoru T50; pruga 12 – pripadajući uzorak krvi.

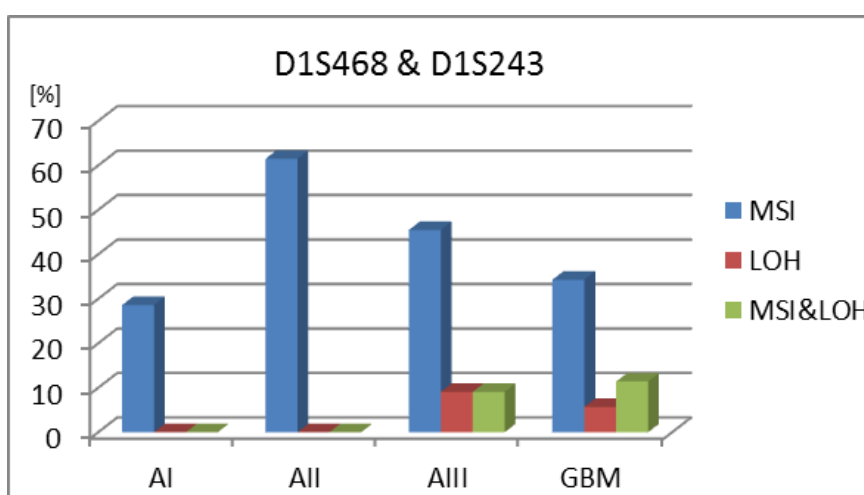
Analiza MSI je napravljena za sve tumore, a analiza LOH samo za one u kojima su se markeri u konstitucionalnoj DNA pojavljivali u heterozigotnoj konstelaciji. Sukladno ovome, postotak MSI izražen je za sve, a postotak LOH izražen je samo za heterozigotne uzorke.

Drugi mikrosatelitni biljeg za gen *DVL1*, D1S243, također je otkrio znatan broj genskih promjena. Mikrosatelitna nestabilnost utvrđena je u 7.1% uzoraka pilocitičnih, 23.1% difuznih, 18.2% anaplastičnih astrocitoma i 28.6% glioblastoma. Prisutnost LOH povećala se je u odnosu na prethodni biljeg te je pronađen u 18.2% informativnih uzoraka anaplastičnih astrocitoma i 9.1% uzoraka glioblastoma. U ovom slučaju nisu utvrđene statistički značajne razlike u raspodjeli ovih genskih promjena u odnosu na gradus ($p=0.418$) (Tablica 11, Slika 13).



Slika 13. Postotak uzoraka u kojima su dokazani MSI i LOH mikrosatelitnog biljega D1S243 u odnosu na gradusu astrocitoma.

Analiza podataka temeljena na 2 mikrosatelitna biljega za gen *DVLI*, pokazala je MSI u 28.6% pilocitičnih, 61.5% difuznih i 45.5% anaplastičnih astrocitoma te 34.3% glioblastoma. LOH gena *DVLI* pronađen je u 9.1% uzoraka anaplastičnih astrocitoma i 5.7% uzoraka glioblastoma. U 9.1% anaplastičnih astrocitoma i 11.4% glioblastoma bile su prisutne obje promjene. Međutim, nije dokazana statistički značajna razlika u distribuciji promatranih genskih promjena u odnosu na gradus tumora ($p=0.400$) (Tablica 11, Slika 14).



Slika 14. Postotak informativnih uzoraka koji pokazuju MSI i LOH na mikrosatelitne biljega D1S468 i D1S243 u pojedinom gradusu astrocitnih tumora.

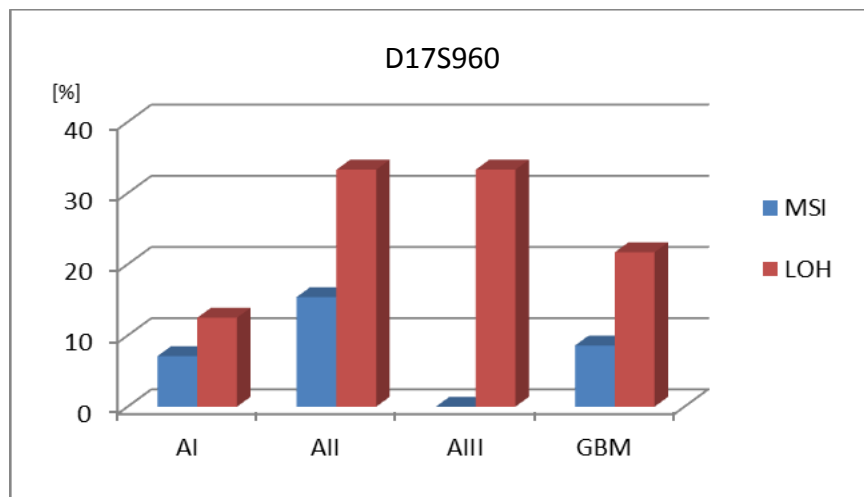
Tablica 11. Rezultati analize gena *DVLI* dobiveni korištenjem polimorfnih mikrosatelitnih biljega D1S468 i D1S243

	Pilocitični astroцитomi	Difuzni astroцитomi	Anaplastični astroцитomi	Glioblastomi
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
	14	13	11	35
D1S468				
HETERO	12 (85.7)	10 (76.9)	10 (90.1)	35 (100)
HOMO	2 (14.3)	3 (23.1)	1 (9.9)	0 (0.0)
MSI	3 (21.4)	7 (53.8)	4 (36.4)	6 (17.1)
LOH	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (8.6)
D1S468	$\chi^2=19.652$; df=9; p=0.020*			
D1S243				
HETERO	13 (92.9)	12 (92.3)	11 (100)	33 (94.3)
HOMO	1 (7.1)	1 (7.7)	0 (0.0)	2 (5.7)
MSI	1 (7.1)	3 (23.1)	2 (18.2)	10 (28.6)
LOH	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (18.2)	3 (9.1)
D1S243	$\chi^2=9.208$; df=9; p=0.418			
D1S468 i D1S243				
HETERO	14 (100)	13 (100)	11 (100)	35 (100)
HOMO	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
MSI	4 (28.6)	8 (61.5)	5 (45.5)	12 (34.3)
LOH	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (9.1)	2 (5.7)
MSI&LOH	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (9.1)	4 (11.4)
D1S468 i D1S243	$\chi^2=9.419$; df=9; p=0.400			

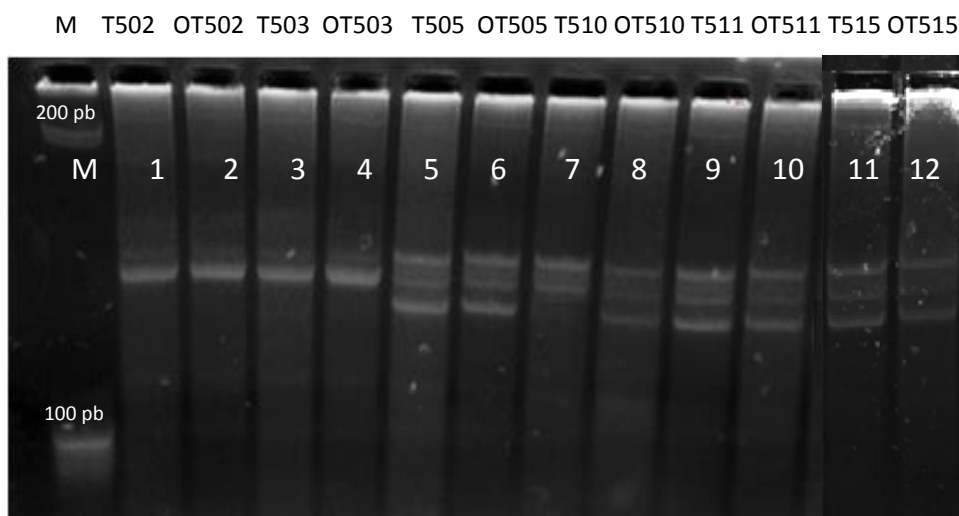
HETERO – heterozigot; HOMO – homozigot; MSI – mikrosatelitna nestabilnost; LOH – gubitak heterozigotnosti; χ^2 – chi kvadrat; df – stupnjevi slobode.

5.2.2. Rezultati analize mikrosatelitne nestabilnosti i gubitka heterozigotnosti gena *DVL2*

Za analizu gena *DVL2* odabran je genski biljeg D17S960 koji je na našem uzorku pokazao 63% heterozigotnosti (46/73). Dobiveni rezultati također govore o prisutnosti mikrosatelitne nestabilnosti u analiziranim uzorcima, budući da je MSI detektiran u 7.1% pilocitičnih, 15.4% difuznih astrocitoma i 8.6% glioblastoma. Područje 17. kromosoma na kojem se ovaj biljeg nalazi često je deletirano u našem uzorku o čemu svjedoči gubitak heterozigotnosti pronađen u 12.5% pilocitičnih astrocitoma, 33.3% difuznih astrocitoma, 33.3% anaplastičnih astrocitoma i 21.7% glioblastoma (Tablica 12, Slika 15 i 16).



Slika 15. Postotak uzoraka u kojima su dokazani MSI i LOH mikrosatelitnog biljega D17S960 u odnosu na gradus astrocitoma.



Slika 16. Analiza gena *DVL2* (biljeg D17S960) u uzorcima glioblastoma u gelovima Spreadex (Elchrom Scientific). Pruga M – 100 pb DNA standard; pruge 1, 2 – neinformativni homozigot; pruge 3, 4 – neinformativni homozigot; pruge 5, 6 – heterozigot; 7 – LOH u tumoru T510; 8 - pripadajući uzorak krvi; pruga 9, 10 – heterozigot; 11 – MSI u tumoru T515; 12 – pripadajući uzorak krvi.

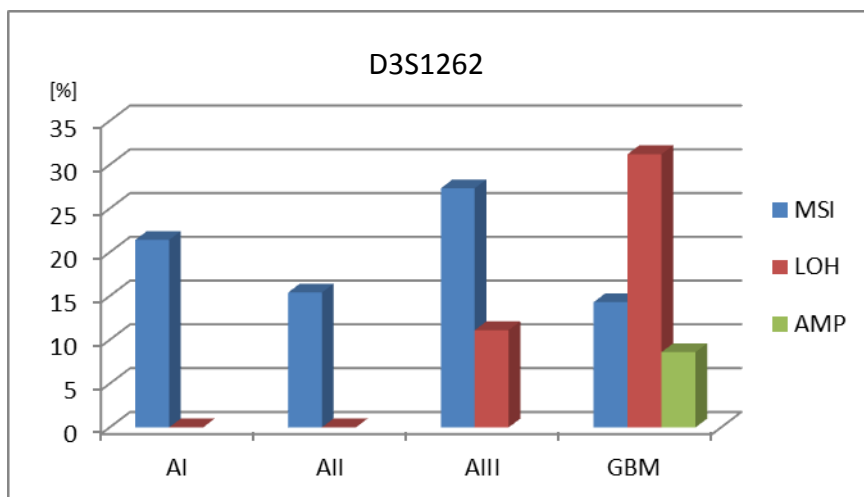
Tablica 12. Rezultati analize gena *DVL2* dobiveni korištenjem polimorfnog mikrosatelitnog biljega D17S960

	Pilocitični astrocitomi	Difuzni astrocitomi	Anaplastični astrocitomi	Glioblastomi
	(N=14)	(N=13)	(N=11)	(N=35)
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
D17S960				
HETERO	8 (57.1)	9 (69.2)	6 (54.5)	23 (65.7)
HOMO	6 (42.9)	4 (30.8)	5 (45.5)	12 (34.3)
MSI	1 (7.1)	2 (15.4)	0 (0)	3 (8.6)
LOH	1 (12.5)	3 (33.3)	2 (33.3)	5 (21.7)
	$\chi^2=4.902$; df=9; p=0.843			

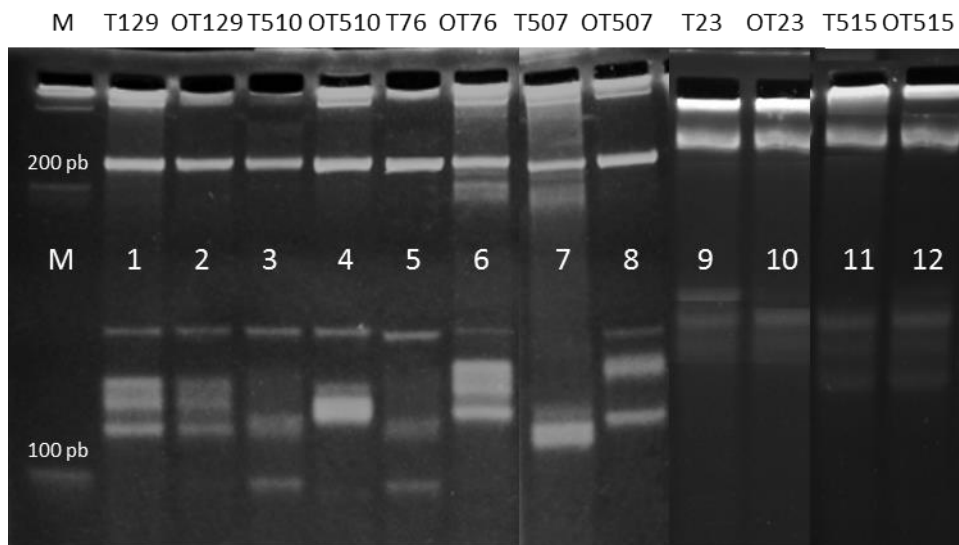
HETERO – heterozigot; HOMO – homozigot; MSI – mikrosatelitna nestabilnost; LOH – gubitak heterozigotnosti; χ^2 – chi kvadrat; df – stupnjevi slobode

5.2.3. Rezultati analize mikrosatelitne nestabilnosti i gubitka heterozigotnosti gena *DVL3*

Korištenjem polimorfnog mikrosatelitnog biljega D3S1262, koji je bio visoko informativan (89% heterozigota; 65/73), analizirane su promjene gena *DVL3*. MSI je bio otkriven u 21.4% pilocitičnih astrocitoma i 15.4% difuznih astrocitoma. U anaplastičnim astrocitomima otkrivene su obje promatrane promjene; MSI u 27.3%, a LOH u 11.1% tumora. Genskim promjenama najčešće su bili pogođeni glioblastomi u kojima je MSI otkriven u 14.3%, LOH u 31.2% dok se amplifikacija pojavila u 8.6% tumora. Post-hoc analizom χ^2 -testa utvrđeno je da se u glioblastomima LOH gena *DVL3* javlja statistički značajno češće u odnosu na astrocitate nižih gradusa ($p=0.007$) (Tablica 13, Slika 17, 18 i 19).



Slika 17. Postotak uzoraka u kojima su dokazani MSI, LOH i amplifikacija mikrosatelitnog biljega D3S1262 u odnosu na gradus astrocitnih tumora.

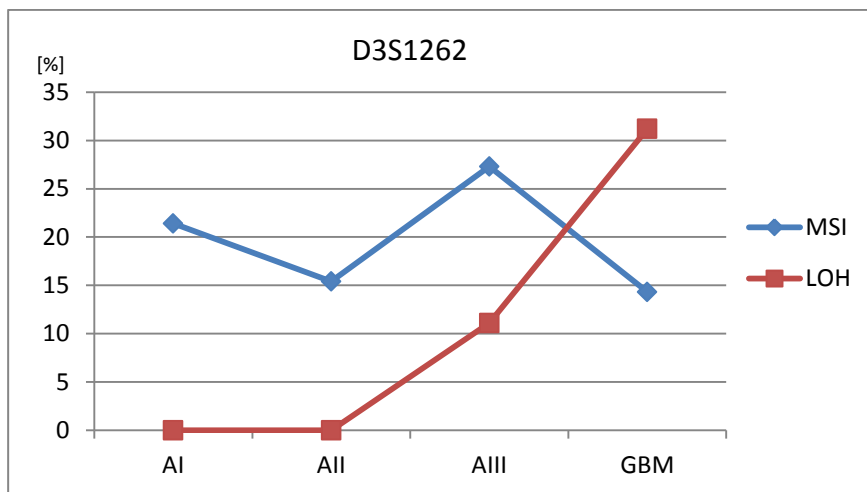


Slika 18. Analiza gena *DVL3* (biljeg D3S1262) u uzorcima glioblastoma u gelovima Spreadex (Elchrom Scientific) analiziranih metodom multipleks PCR. Uz D3S1262 je korišten i kontrolni biljeg SHGC-68373 (222 pb). Pruga M – 100 pb DNA standard; pruge 1, 2 – heterozigot s amplifikacijom; pruga 3 - LOH u tumoru T510; 4 - pripadajući uzorak krvi; 5 - LOH u tumoru T76; 6 - pripadajući uzorak krvi; 7 - LOH u tumoru T507; 8 - pripadajući uzorak krvi; 9 –MSI u tumoru T23; 10 – pripadajući uzorak krvi; 11, 12 – heterozigot.

Tablica 13. Rezultati analize gena *DVL3* dobiveni korištenjem polimorfnog mikrosatelitnog biljega D3S1262

	Pilocitični astrocitomi	Difuzni astrocitomi	Anaplastični astrocitomi	Glioblastomi
	(N=14)	(N=13)	(N=11)	(N=35)
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
D17S960				
HETERO	13 (92.8)	11 (84.6)	9 (81.8)	32 (91.4)
HOMO	1 (7.2)	2 (15.4)	2 (18.2)	3 (8.6)
MSI	3 (21.4)	2 (15.4)	3 (27.3)	5 (14.3)
LOH	0 (0)	0 (0)	1 (11.1)	10 (31.2)
AMP	-	-	-	3 (8.6)
	$\chi^2=12.533$; df=9; p=0.185			

HETERO – heterozigot; HOMO – homozigot; MSI – mikrosatelitna nestabilnost; LOH – gubitak heterozigotnosti; AMP – amplifikacija; χ^2 – chi kvadrat; df – stupnjevi slobode

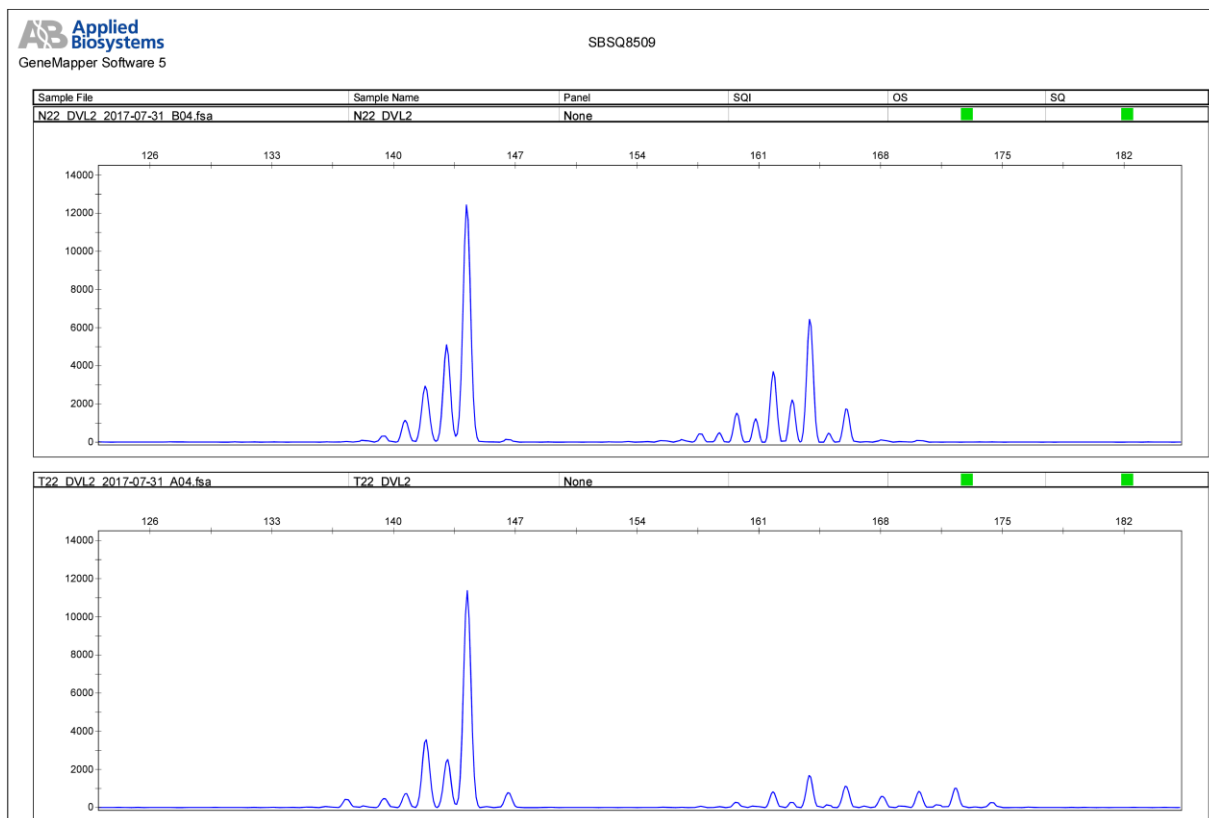


Slika 19. Odnos postotaka MSI i LOH u astrocitomima različitih gradusa.

Ako se sve genske promjene, dokazane za sva četiri polimorfna biljega, prikažu kao jedan entitet, uočava se statistički značajna razlika u razdiobi MSI i LOH u odnosu na gradus astrocitoma ($p=0.050$) (Tablica 14).

5.3. Rezultati genotipizacije mikrosatelita

Genotipizacijom mikrosatelita potvrđen je gubitak heterozigotnosti u sljedećim uzorcima: za gen *DVL1* T50 i T129; za gen *DVL2* T22, T39, T48, T129, T316, T319 i T536; za gen *DVL3* T39, T42, T46, T76, T507, T510 i T536 (Slika 20).



Slika 20. Potvrda LOH gena *DVL2* metodom genotipizacije mikrosatelita. Gornja slika prikazuje uzorak DNA izdvojen iz krvi (T22), dok se na donjoj slici nalazi uzorak DNA izdvojen iz tkiva tumora istog bolesnika (OT22).

Tablica 14. Polimorfni status korištenih mikrosatelitnih biljega i uočene genetske promjene gena *DVL1*, *DVL2* i *DVL3*

Redni broj uzorka	Broj u banci	Gradus	DVL1				DVL2		DVL3	
			D1S468		D1S243		D17S960		D3S1262	
			KRV	TUMOR	KRV	TUMOR	KRV	TUMOR	KRV	TUMOR
1	T17	I	HOMO	HOMO	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO	HETERO	HETERO
2	T51	I	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO	HETERO	HETERO
3	T500	I	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
4	T501	I	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
5	T523	I	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO
6	T542	I	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	HETERO	LOH	HETERO	MSI
7	T548	I	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO	HOMO	HOMO	HETERO	MSI
8	T549	I	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	HETERO	MSI
9	T303	I	HOMO	HOMO	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO	HETERO	HETERO
10	T310	I	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO	HETERO	HETERO
11	T311	I	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
12	T312	I	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO	HETERO	HETERO
13	T313	I	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
14	T314	I	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
15	T13	II	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
16	T104	II	HOMO	HOMO	HETERO	HETERO	HETERO	LOH	HETERO	HETERO
17	T132	II	HETERO	MSI	HETERO	MSI	HETERO	LOH	HETERO	MSI
18	T526	II	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
19	T535	II	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HOMO	MSI	HETERO	HETERO
20	T545	II	HETERO	MSI	HOMO	MSI	HOMO	HOMO	HETERO	HETERO
21	T279	II	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO	HETERO	HETERO
22	T62	II	HOMO	HOMO	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO	HETERO	HETERO
23	T301	II	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
24	T298	II	HOMO	HOMO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO
25	T315	II	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	HETERO	MSI
26	T316	II	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HETERO	LOH	HOMO	HOMO
27	T317	II	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
28	T20	III	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO	HETERO	HETERO
29	T46	III	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HETERO	LOH
30	T536	III	HETERO	HETERO	HETERO	LOH	HETERO	LOH	HOMO	MSI
31	T543	III	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO	HETERO	HETERO
32	T278	III	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HOMO	MSI
33	T26	III	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO	HETERO	HETERO
34	T519	III	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	HOMO	HOMO	HETERO	MSI
35	T299	III	HETERO	MSI	HETERO	LOH	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
36	T318	III	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
37	T319	III	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HETERO	LOH	HETERO	HETERO
38	T320	III	HOMO	HOMO	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO	HETERO	HETERO
39	T502	IV	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO	HETERO	LOH

Redni broj uzorka	Broj u banci	Gradus	DVL1				DVL2		DVL3	
			D1S468		D1S243		D17S960		D3S1262	
			KRV	TUMOR	KRV	TUMOR	KRV	TUMOR	KRV	TUMOR
40	T513	IV	HETERO	MSI	HETERO	LOH	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
41	T511	IV	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	MSI
42	T508	IV	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	HOMO	HOMO	HETERO	HETERO
43	T509	IV	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO	HETERO	HETERO
44	T503	IV	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO	HOMO	HOMO
45	T516	IV	HETERO	HETERO	HETERO	LOH	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
46	T510	IV	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	LOH
47	T507	IV	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO	HETERO	LOH
48	T505	IV	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
49	T515	IV	HETERO	HETERO	HETERO	LOH	HETERO	LOH	HETERO	HETERO
50	T10	IV	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
51	T4	IV	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HETERO	LOH
52	T14	IV	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	LOH
53	T23	IV	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO	HETERO	MSI
54	T27	IV	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
55	T42	IV	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	HETERO	MSI	HETERO	LOH
56	T44	IV	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	HOMO	HOMO	HETERO	LOH
57	T40	IV	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO	HETERO	HETERO
58	T39	IV	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HETERO	LOH
59	T50	IV	HETERO	LOH	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
60	T76	IV	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HOMO	MSI	HETERO	LOH
61	T102	IV	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO
62	T139	IV	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	MSI
63	T131	IV	HETERO	LOH	HETERO	MSI	HETERO	LOH	HETERO	HETERO
64	T22	IV	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO	HETERO	LOH	HETERO	HETERO
65	T16	IV	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
66	T28	IV	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	MSI
67	T43	IV	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO	HETERO	LOH
68	T48	IV	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO	HETERO	LOH	HETERO	HETERO
69	T90	IV	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HOMO	MSI	HETERO	MSI
70	T138	IV	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO	HETERO	HETERO
71	T129	IV	HETERO	LOH	HETERO	MSI	HETERO	LOH	HETERO	HETERO
72	T130	IV	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
73	T160	IV	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO

HETERO – heterozigot; HOMO – homozigot; MSI – mikrosatelitna nestabilnost; LOH – gubitak heterozigotnosti

5.4. Izraženost proteina Dishevelled u astrocitnim tumorima mozga

U svrhu određivanja povezanosti promjena na razini gena s izraženošću proteina koje ovi geni kodiraju, analizirana je ekspresija proteina Dishevelled u parafinskim rezovima tkiva astrocitoma istih bolesnika. Razina izraženosti proteina DVL1, DVL2 i DVL3 u zdravom mozgu, određena je korištenjem kore velikog mozga čovjeka. Ustanovljeno je da je razina imunoreaktivnosti proteina Dishevelled u tkivu zdravog mozga vrlo niska, a obojenje je prisutno samo u citoplazmi. U tkivu tumora postoji signal smeđeg obojenja, koji može biti prisutan u citoplazmi, jezgri i membrani stanica tumora. Na pojedinom preparatu brojano je po 200 stanica u tzv. vrućem području tumora (engl. *hot spot*). Potom su uslijedile analize IRS, određivanje jačine signala u tri razine (0/+, ++, +++), što redom odgovara izostanku ili slabom signalu, umjerenoj jačini signala i jakom signalu u odnosu na pozitivnu kontrolu koja služi kao referenca maksimalne jačine kao što je i objašnjeno u poglavlju Materijali i Metode (4.10.2). Kao pozitivna kontrola korišteni su rezovi jetre (DVL1), karcinoma pločastih stanica pluća (DVL2) i maternice (DVL3), prema uputama proizvođača.

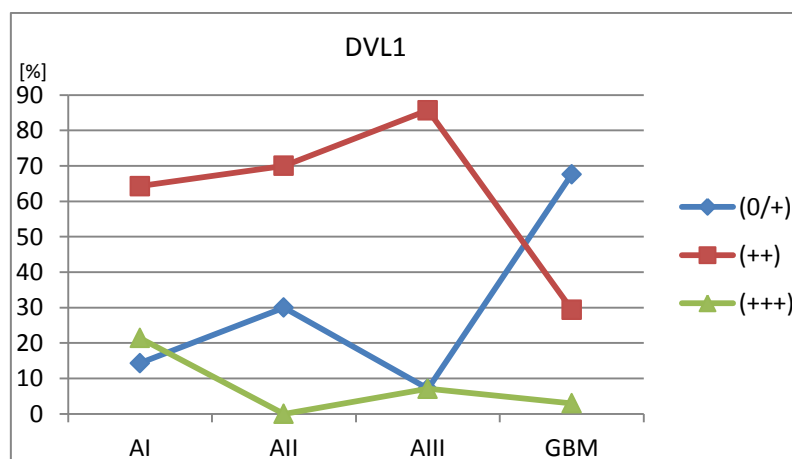
5.4.1. Izraženost i lokalizacija proteina DVL1 u astrocitnim tumorima mozga

Razina izraženosti proteina DVL1 znatno se razlikovala između nižih i viših gradusa astrocitoma. Najveća izraženost DVL1 otkrivena je u pilocitičnim i anaplastičnim astrocitomima, u kojima je 85.7% odnosno 92.9% uzoraka imalo umjerenu i jaku ekspresiju. S druge strane protein nije bilo moguće detektirati u samo 14.3% (AI) i 7.1% (AIII) ovih tumora. Glioblastomi su u najvećem postotku (67.6%) imali nisku izraženost DVL1, dok je umjeren i jak signal proteina DVL1 otkriven u 32.4% tumora. Najveći broj difuznih astrocitoma (70%) pokazao je umjerenu jačinu signala DVL1 (Tablica 15, Slika 21).

Tablica 15. Izraženosti proteina DVL1 u astrocitomima različitog gradusa

		DVL1			
		AI	AII	AIII	GBM
IRS 0-4 (0/+)	N	2	3	1	23
	%	14.3	30	7.1	67.6
IRS 6, 8 (++)	N	9	7	12	10
	%	64.3	70	85.7	29.4
IRS 9, 12 (+++)	N	3	0	1	1
	%	21.4	0	7.1	3.0
Ukupno	N	14	10	14	34
	%	100	100	100	100

IRS – immunoreactivity score; (0/+) - niska; (++) - umjerena; (+++) - jaka izraženost; AI – pilocitični astrocitom; AII – difuzni astrocitom; AIII – anaplastični astrocitom; GBM – glioblastoma multiforme



Slika 21. Postotak uzoraka koji pokazuju određenu razinu izraženosti proteina DVL1 u odnosu na gradus astrocitoma.

Dobiveni podatci su već prvi pogled dali naslutiti da postoji poveznica između udjela stanica s određenom izraženošću signala i njegovom pojavom na specifičnoj substaničnoj lokalizaciji što je potvrđeno i statističkom analizom. Pokazalo se da se u tumorima s niskom razinom ekspresije DVL1, signal najčešće pojavljivao u citoplazmi ili u citoplazmi i membrani. Preparati s umjerenom i jakom izraženošću proteina DVL1, statistički su značajno češće imali signal lokaliziran u citoplazmi i jezgri ili u citoplazmi, jezgri i membrani stanice ($p < 0.001$) (Tablica 16).

Tablica 16. Substancična razdioba signala za DVL1 u astrocitomima različitog gradusa

		DVL1			
		AI	AII	AIII	GBM
C	N	2	3	1	9
	%	14.3	30	7.2	26.5
C+M	N	0	0	0	8
	%	0	0	0	23.5
C+N	N	8	4	7	12
	%	57.2	40	50	35.3
C+M+N	N	4	3	6	5
	%	28.5	30	42.8	14.7
Ukupno	N	14	10	14	34
	%	100	100	100	100

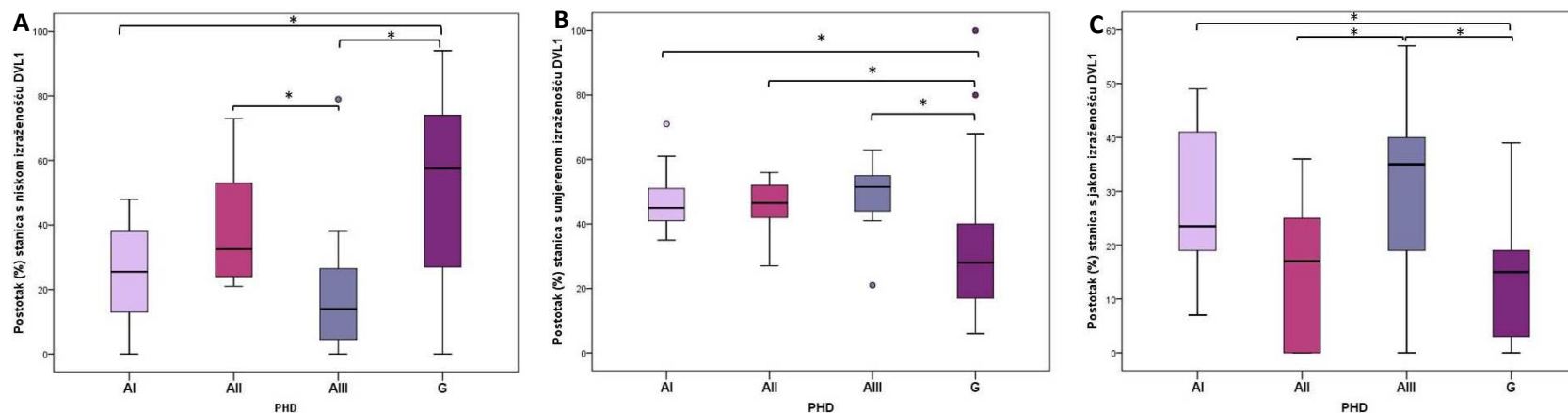
C – citoplazma; N – jezgra; M – membrana; AI – pilocitični astrocitom; AII – difuzni astrocitom; AIII – anaplastični astrocitom; GBM – glioblastoma multiforme

Između tumora različitih gradusa postojale su i značajne razlike u broju stanica s niskom, umjerenom i jakom izraženošću DVL1 ($p < 0.001$). Glioblastomi imaju statistički značajno veći broj stanica s niskom ekspresijom DVL1 u odnosu na pilocitične ($p = 0.001$) i anaplastične astrocitome ($p < 0.001$). Anaplastični astrocitomi imaju statistički značajno manje stanica s niskom ekspresijom DVL1 u odnosu na difuzne astrocitome ($p = 0.008$). U glioblastomima je statistički značajno smanjen udio stanica s umjerenom ekspresijom DVL1, u odnosu na astrocitome gradusa I ($p = 0.001$), gradusa II ($p = 0.018$) i gradusa III ($p = 0.001$). Sukladno tome, glioblastomi su imali statistički značajno manji broj stanica s jakom izraženošću DVL1 u odnosu na pilocitične ($p = 0.001$) i anaplastične astrocitome ($p = 0.001$). Anaplastični astrocitomi su, u istoj kategoriji jake izraženosti, pokazali veći broj stanica od difuznih ($p = 0.022$) (Tablica 17, Slika 22). Slike 23-27 prikazuju imunohistokemijsko bojanje različitih gradusa astrocitoma na DVL1.

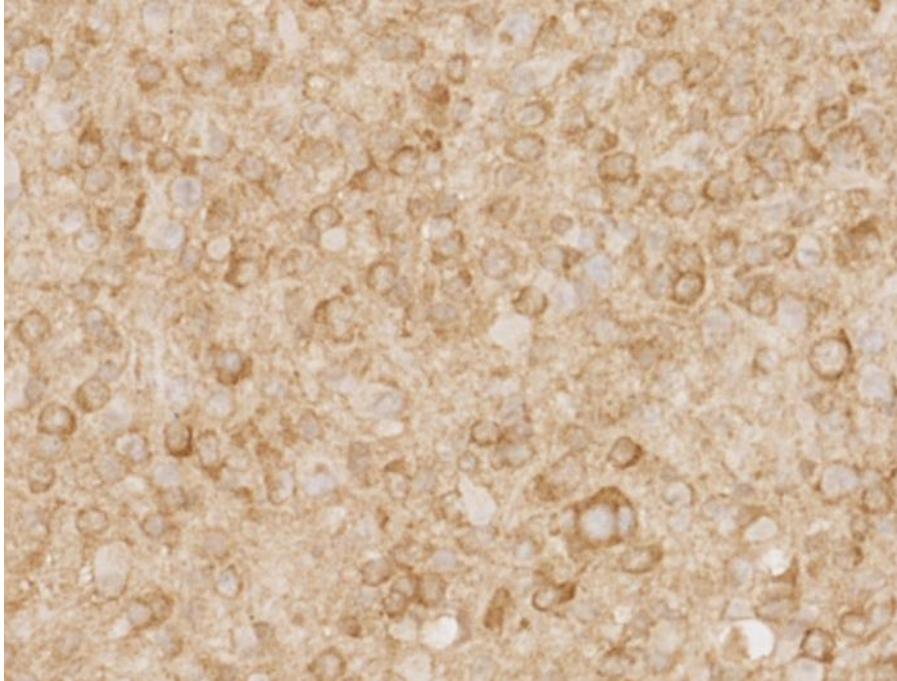
Tablica 17. Prikaz statističkih analiza broja stanica s različitim razinom izraženosti DVL1 u odnosu na gradus astrocitnih tumora

DVL1		AI vs AII	AI vs AIII	AI vs G	AII vs AIII	AII vs G	AIII vs G
(0/+)	ANOVA	F=10.601, df=3, 69, p<0.001* (p=0.142 [#])					
	KW	$\chi^2=22.393$, df=3, p<0.001*					
	TT	t=-2.080, df=22, p=0.049* (p=0.681 [#])	t=-0.826, df=27, p=0.416	t=-3.830, df=42, p<0.001* (p=0.077 [#])	t=-2.576, df=23, p=0.017* (p=0.772 [#])	t=-1.553, df=42, p=0.128	t=-4.555, df=47, p<0.001* (p=0.101 [#])
	MW	U=42.5, Z=-1.612, p=0.108	U=73.5, Z=-1.382, p=0.172	U=86, Z=-3.449, p=0.001*	U=28, Z=-2.614, p=0.008*	U=112, Z=-1.625, p=0.108	U=83, Z=-3.734, p<0.001*
(++)	ANOVA	F=5.003, df=3, 68, p=0.003* (p=0.016 [#])					
	KW	$\chi^2=17.821$, df=3, p<0.001*					
	TT	t=0.654, df=22, p=0.520	t=-0.418, df=26, p=0.679	t=2.506, df=46, p=0.016* (p=0.033 [#])	t=-0.996, df=22, p=0.330	t=1.777, df=42, p=0.083	t=2.746, df=46, p=0.009* (p=0.048 [#])
	MW	U=68, Z=-0.117, p=0.931	U=73.5, Z=-1.128, p=0.265	U=94, Z=-3.268, p=0.001*	U=51.5, Z=-1.084, p=0.285	U=86.5, Z=-2.339, p=0.018*	U=98, Z=-3.177, p=0.001*
(+++)	ANOVA	F=7.960, df=3, 68, p<0.001* (p=0.382 [#])					
	KW	$\chi^2=17.577$, df=3, p=0.001*					
	TT	t=2.396, df=22, p=0.026* (p=0.935 [#])	t=-0.462, df=26, p=0.648	t=3.742, df=46, p=0.001* (p=0.448 [#])	t=-2.521, df=22, p=0.019* (p=0.438 [#])	t=0.303, df=42, p=0.763	t=4.085, df=46, p<0.001* (p=0.095 [#])
	MW	U=37, Z=-1.935, p=0.560	U=89, Z=-0.414, p=0.701	U=90.5, Z=-3.354, p=0.001*	U=31.5, Z=-2.261, p=0.022*	U=155.5, Z=-0.409, p=0.689	U=97, Z=-3.207, p<0.001*

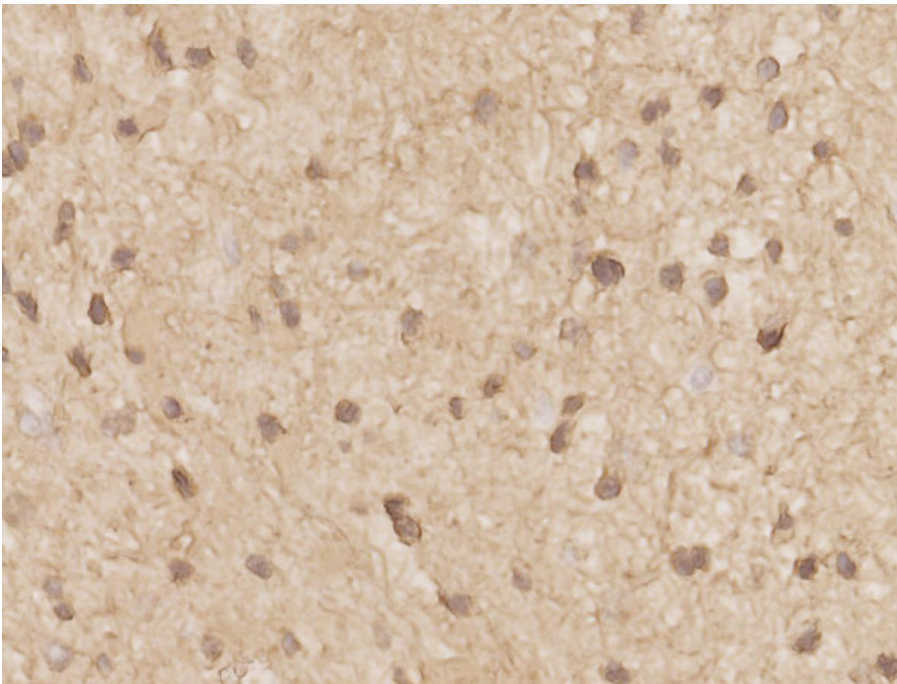
(0/+) – niska; (++) – umjerenja; (+++) – jaka izraženost; KW – Kruskal-Wallis test; MW – Mann-Whitney test; TT – T test; *p < 0.05; [#]Levenov test jednakosti varijanci; AI – pilocitični astroцитom; AII – difuzni astroцитom; AIII – anaplastični astroцитom; GBM – glioblastoma multiforme.



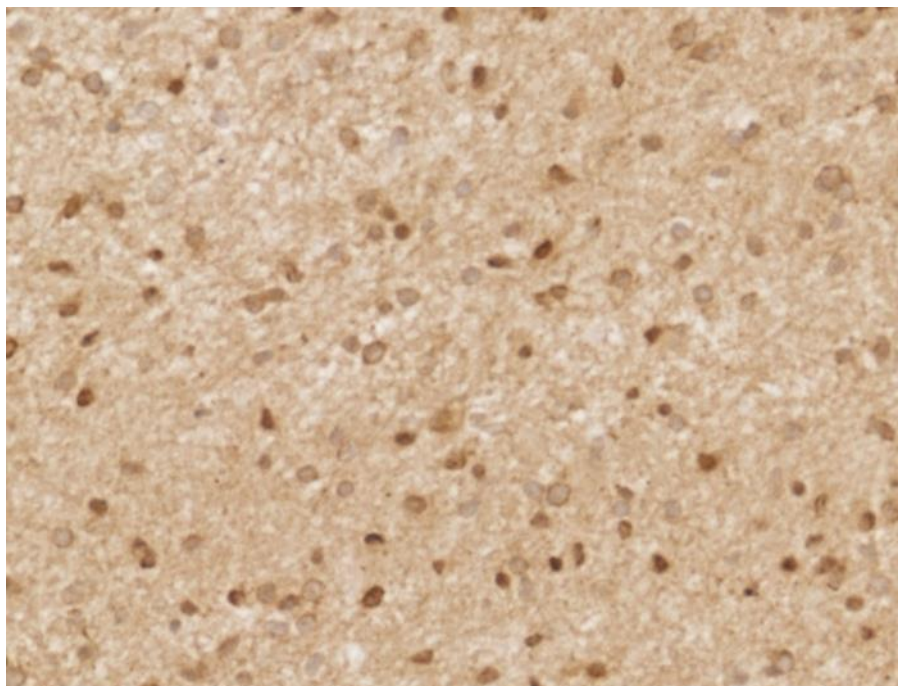
Slika 22. Analiza broja stanica sa A) slabom, B) umjerenom i C) jakom izraženošću proteina DVL1 u odnosu na gradus astrocitoma; *p < 0.05.



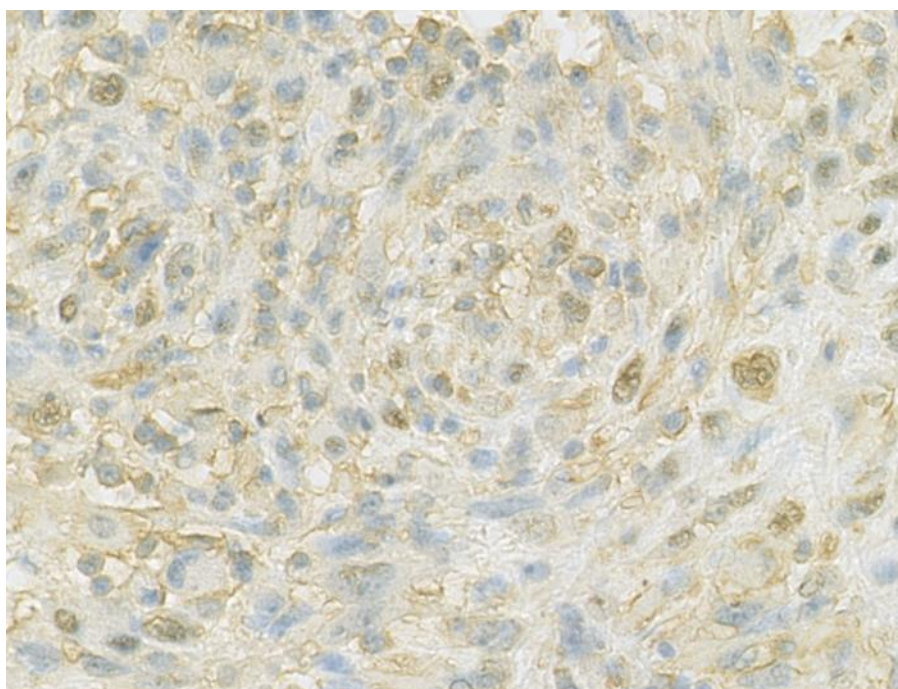
Slika 23. DVL1 u pilocitičnom astrocitomu dokazan metodom imunohistokemije. Slika prikazuje umjeren i jak intenzitet bojanja citoplazmi stanica tumora (objektiv x40).



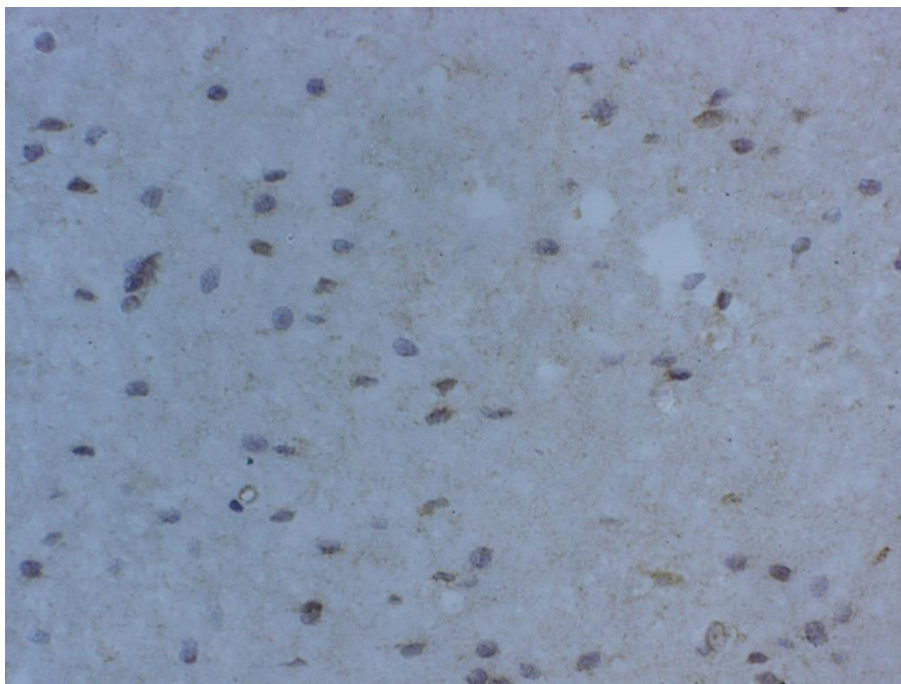
Slika 24. DVL1 u difuznom astrocitomu dokazan metodom imunohistokemije. Slika prikazuje umjeren i jak intenzitet bojanja membrana, citoplazmi i jezgara stanica tumora (objektiv x40).



Slika 25. DVL1 u anaplastičnom astrocitomu dokazan metodom imunohistokemije. Slika prikazuje jak intenzitet bojanja citoplazmi i jezgara stanica tumora (objektiv x40).



Slika 26. DVL1 u glioblastomu dokazan metodom imunohistokemije. Slika prikazuje slab i umjeren intenzitet bojanja membrana i citoplazmi stanica tumora (objektiv x40).



Slika 27. IH bojanje kore velikog mozga na DVL1 (pozitivna kontrola). Intenzitet bojanja astrocita je vrlo slab (objektiv x40).

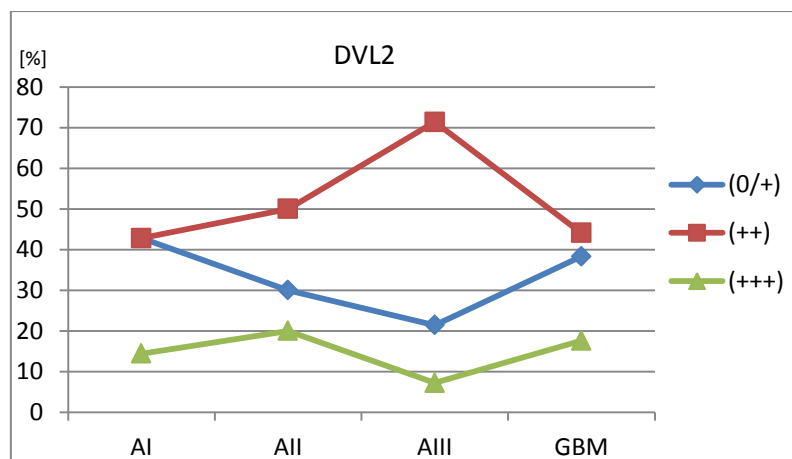
5.4.2. Izraženost i lokalizacija proteina DVL2 u astrocitnim tumorima mozga

Izraženost proteina DVL2 nije bila značajno različita u odnosu na gradus tumora. Astroцитomi gradusa I u najmanjem su postotku imali umjerenu i jaku ekspresiju (57.2%). Udio tumora s pozitivnim signalom gotovo je pratio gradus; u difuznim astrocitomima je DVL2 bio izražen u 70% uzoraka, u anaplastičnim astrocitomima u 77.6%, a u glioblastomima u 61.7% uzoraka (Tablica 18, Slika 28).

Tablica 18. Izraženosti proteina DVL2 u astrocitomima različitog gradusa

		DVL2			
		AI	AII	AIII	GBM
IRS 0-4 (0/+)	N	6	3	3	13
	%	42.8	30.0	21.4	38.3
IRS 6, 8 (++)	N	6	5	10	15
	%	42.8	50	71.4	44.1
IRS 9, 12 (+++)	N	2	2	1	6
	%	14.4	20.0	7.2	17.6
Ukupno	N	14	10	14	34
	%	100	100	100	100

IRS – immunoreactivity score; (0/+) - niska; (++) - umjerena; (+++) - jaka izraženost; AI – pilocitični astrocitom; AII – difuzni astrocitom; AIII – anaplastični astrocitom; GBM – glioblastoma multiforme



Slika 28. Postotak uzoraka koji pokazuju određenu razinu izraženosti proteina DVL2 u odnosu na gradus astrocitoma.

U tumorima koji su imali najveći udio stanica s umjerenim (++) i jakim (+++) signalom, protein je bio smješten u citoplazmi i jezgri, odnosno – citoplazmi, jezgri i membrani (glioblastom) ($p < 0.001$) (Tablica 19).

Tablica 19. Substancična razdioba signala za DVL2 u astrocitomima različitog gradusa

		DVL2			
		AI	AII	AIII	GBM
C	N	3	1	3	4
	%	21.4	10	21.4	11.8
C+M	N	0	1	0	4
	%	0	10	0	11,8
C+N	N	11	8	11	10
	%	78.6	80	78.6	29.4
C+M+N	N	0	0	0	16
	%	0	0	0	47.0
Ukupno	N	14	10	14	34
	%	100	100	100	100

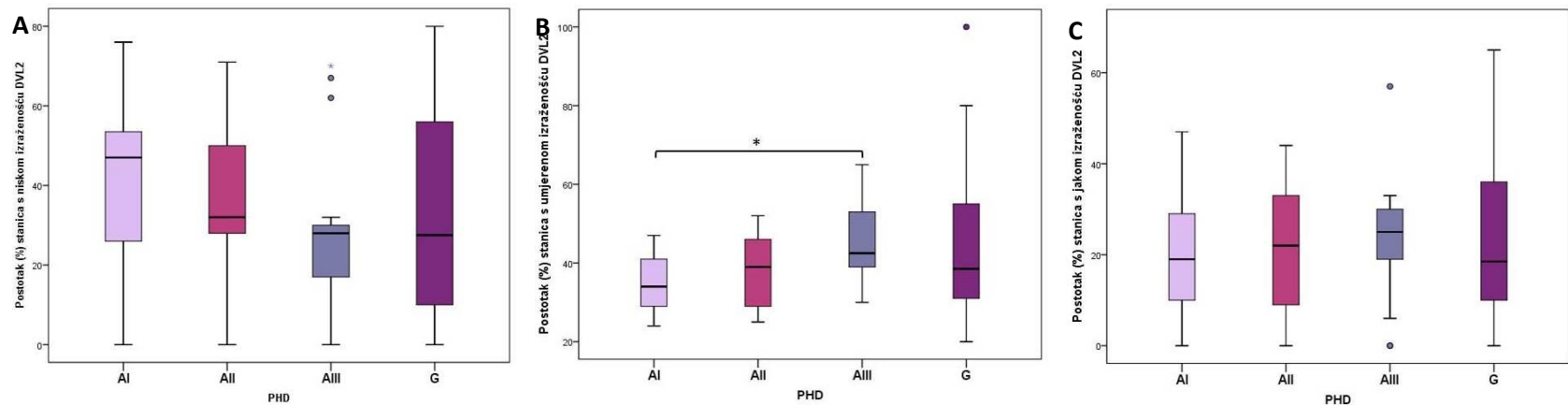
C – citoplazma; N – jezgra; M - membrana; AI – pilocitični astrocitom; AII – difuzni astrocitom; AIII – anaplastični astrocitom; GBM – glioblastoma multiforme

Analiza broja stanica proteina DVL2 u tri kategorije prema jačini signala u većini slučajeva također nije pokazala značajne razlike u odnosu na gradus astrocitoma. Jedina statistički značajna razlika u našem uzorku dobivena je u kategoriji umjerene izraženosti DVL2, u kojoj je zabilježeno da anaplastični astrocitomi imaju statistički značajno više pozitivnih stanica od pilocitičnih astrocitoma ($p=0.009$) (Tablica 20, Slika 29). Slike 30-34 prikazuju imunohistokemijsko bojanje različitih gradusa astrocitoma na DVL2.

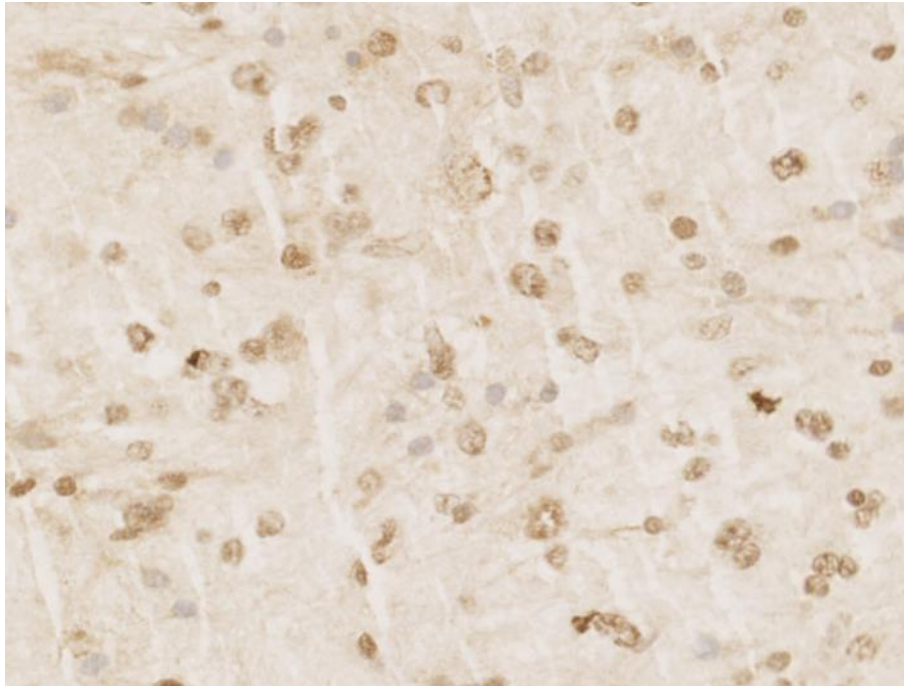
Tablica 20. Prikaz statističkih analiza broja stanica s različitim razinom izraženosti DVL2 u odnosu na gradus astrocitnih tumora

DVL2		AI vs AII	AI vs AIII	AI vs G	AII vs AIII	AII vs G	AIII vs G
(0/+)	ANOVA	F=0.636, df=3, 71, p=0.594* (p=0.227 [#])					
	KW	$\chi^2=2.381$, df=3, p=0.497*					
	TT	t=-0.436, df=24, p=0.667	t=1.479, df=28, p=0.150	t=0.916, df=47, p=0.364	t=0.899, df=24, p=0.378	t=0.378, df=43, p=0.708	t=-0.571, df=47, p=0.571
	MW	U=77.5, Z=-0.260, p=0.799	U=76.5, Z=-1.498, p=0.137	U=209.5, Z=-0.988, p=0.323	U=55.5, Z=-1.404, p=0.164	U=167, Z=-0.529, p=0.611	U=241.5, Z=-0.293, p=0.769
(++)	ANOVA	F=1.778, df=3, 68, p=0.160* (p=0.014 [#])					
	KW	$\chi^2=6.003$, df=3, p=0.111					
	TT	t=-0.766, df=22, p=0.452	t=-2.907, df=26, p=0.007* (p=0.169 [#])	t=-1.724, df=46, p=0.091	t=-1.762, df=22, p=0.092	t=-1.0, df=42, p=0.323	t=0.293, df=46, p=0.771
	MW	U=59, Z=-0.646, p=0.546	U=42.5, Z=-2.555, p=0.009*	U=171.5, Z=-1.510, p=0.131	U=41.5, Z=-1.670, p=0.096	U=138.5, Z=-0.883, p=0.384	U=203.5, Z=-0.783, p=0.433
(+++)	ANOVA	F=0.055, df=3, 68, p=0.983 (p=0.218 [#])					
	KW	$\chi^2=0.829$, df=3, p=0.842					
	TT	t=-0.160, df=22, p=0.874	t=-0.465, df=26, p=0.645	t=-0.289, df=46, p=0.774	t=-0.259, df=22, p=0.798	t=-0.112, df=42, p=0.911	t=-0.136, df=46, p=0.892
	MW	U=68, Z=-0.117, p=0.931	U=81, Z=-0.782, p=0.454	U=231, Z=-0.159, p=0.874	U=64.5, Z=-0.323, p=0.752	U=157, Z=-0.365, p=0.730	U=201.5, Z=-0.830, p=0.406

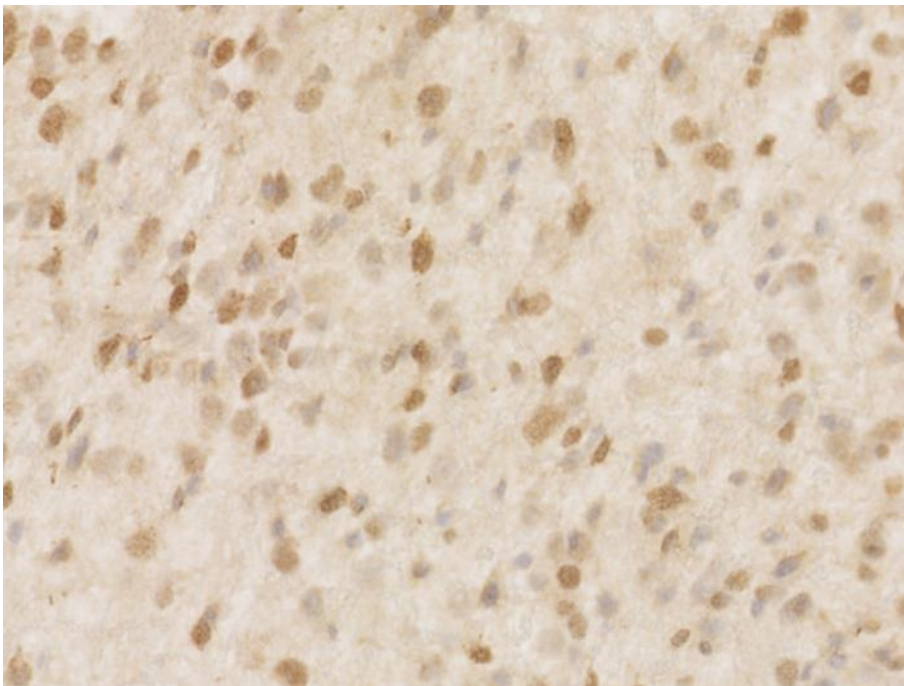
(0/+) – niska; (++) – umjerena; (+++) – jaka izraženost; KW – Kruskal-Wallis test; MW – Mann-Whitney test; TT – T test; *p < 0.05; [#]Levenov test jednakosti varijanci; AI – pilocitični astrocitom; AII – difuzni astrocitom; AIII – anaplastični astrocitom; GBM – glioblastoma multiforme.



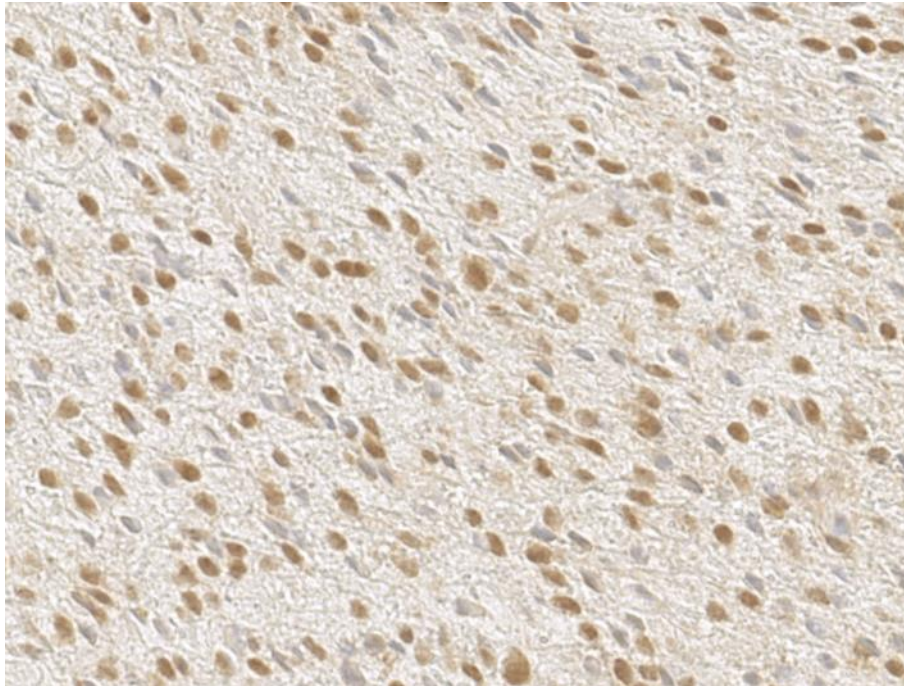
Slika 29. Analiza broja stanica sa A) slabom, B) umjerenom i C) jakom izraženošću proteina DVL2 u odnosu na gradus astrocitoma; *p < 0.05.



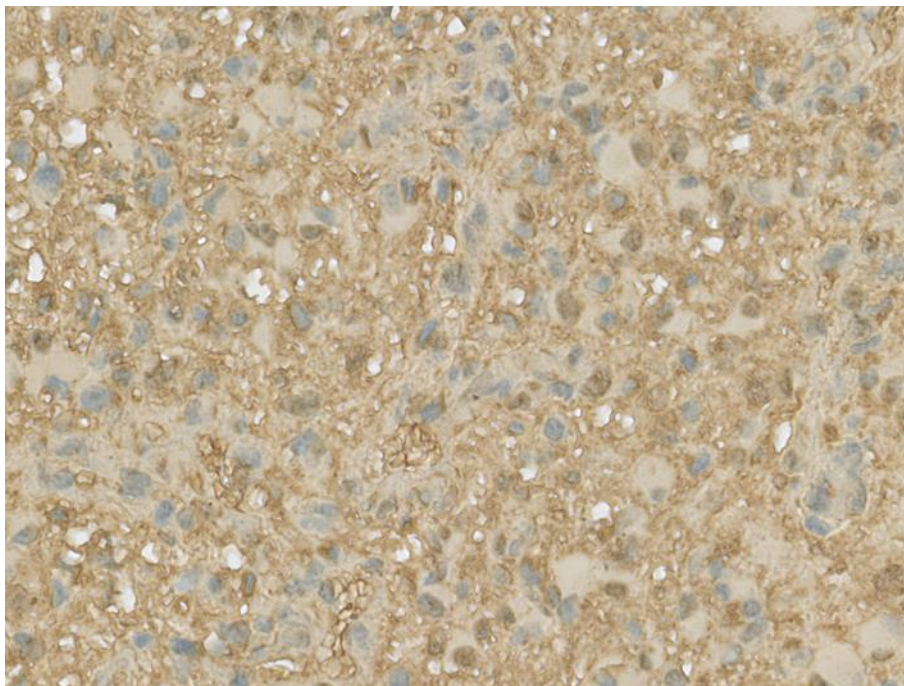
Slika 30. DVL2 u pilocitičnom astrocitomu dokazan metodom imunohistokemije. Slika prikazuje umjeren i jak intenzitet bojanja citoplazmi i jezgara stanica tumora (objektiv x40).



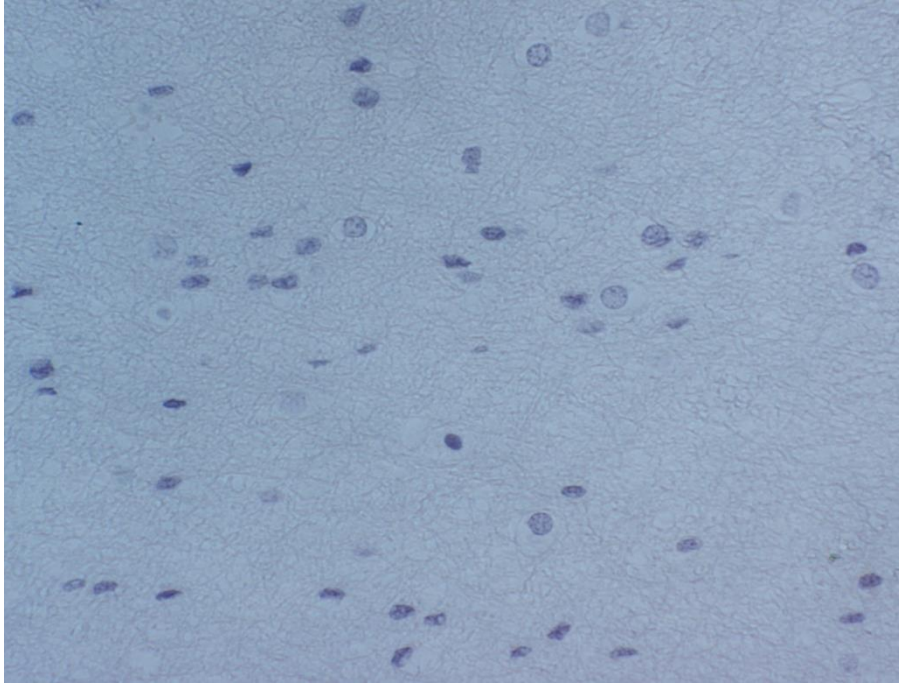
Slika 31. DVL2 u difuznom astrocitomu dokazan metodom imunohistokemije. Slika prikazuje umjeren i jak intenzitet bojanja citoplazmi i jezgara stanica tumora (objektiv x40).



Slika 32. DVL2 u anaplastičnom astrocitomu dokazan metodom imunohistokemije. Slika prikazuje umjeren i jak intenzitet bojanja jezgara stanica tumora (objektiv x40).



Slika 33. DVL2 u glioblastomu dokazan metodom imunohistokemije. Slika prikazuje umjeren i jak intenzitet bojanja citoplazmi i jezgara stanica tumora (objektiv x40).



Slika 34. IH bojanje kore velikog mozga na DVL2 (pozitivna kontrola). Intenzitet bojanja astrocita je vrlo slab (objektiv x40).

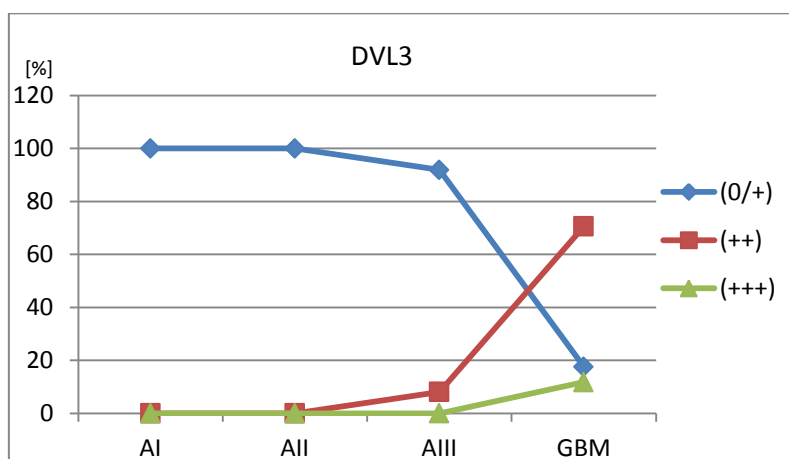
5.4.3. Izraženost i lokalizacija proteina DVL3 u astrocitnim tumorima mozga

Već su preliminarne analize pokazale da se razina izraženosti proteina DVL3 povećava s porastom gradusa. Glioblastomi imaju najveći postotak stanica s umjerenom i jakom ekspresijom DVL3, čak 82.4%. U astrocitomima gradusa I i II niti jedan analizirani uzorak nije imao više od 50% pozitivnih stanica u *hot spotu* tumora. Stoga je u ovim slučajevima ekspresija okarakterizirana kao slaba (Tablica 21, Slika 35).

Tablica 21. Izraženosti proteina DVL2 u astrocitomima različitog gradusa

		DVL3			
		AI	AII	AIII	GBM
IRS 1-4 (0/+)	N	14	10	13	6
	%	100	100	92.8	17.6
IRS 6, 8 (++)	N	0	0	1	24
	%	0	0	7.2	70.6
IRS 9, 12 (+++)	N	0	0	0	4
	%	0	0	0	11.8
Ukupno	N	14	10	14	34
	%	100	100	100	100

IRS – immunoreactivity score; (0/+) - niska; (++) - umjerenom; (+++) - jaka izraženost; AI – pilocitični astrocitom; AII – difuzni astrocitom; AIII – anaplastični astrocitom; GBM – glioblastoma multiforme



Slika 35. Postotak uzoraka koji pokazuju određenu razinu izraženosti proteina DVL3 u odnosu na gradus astrocitoma.

Rezultati korelacije vrijednosti IRS i smještaja DVL3 pokazuju da će preparati s visokim udjelom stanica jakog signala gotovo sigurno imati signal u citoplazmi i jezgri, dok će u tumorima sa slabijim signalom smještaj biti ograničen pretežno na citoplazmu ($p=0.004$). Pojačana ekspresija proteina DVL3 u glioblastomu dovodi do češćeg prelaska ovog proteina u jezgru (Tablica 22).

Tablica 22. Substancična razdioba signala za DVL3 u astrocitomima različitog gradusa

		DVL3			
		AI	AII	AIII	GBM
C	N	14	5	8	19
	%	100	50	57.2	55.9
C+M	N	0	4	1	0
	%	0	40	7.1	0
C+N	N	0	0	4	15
	%	0	0	28.6	44.1
C+M+N	N	0	1	1	0
	%	0	10	7.1	0
Ukupno	N	14	10	14	34
	%	100	100	100	100

C – citoplazma; N – jezgra; M - membrana; AI – pilocitični astroцитom; AII – difuzni astroцитom; AIII – anaplastični astroцитom; GBM – glioblastoma multiforme

Postoji statistički značajna razlika u ekspresiji DVL3 u odnosu na gradus tumora, koja je prisutna u sve tri promatrane kategorije jačine signala ($p<0.001$).

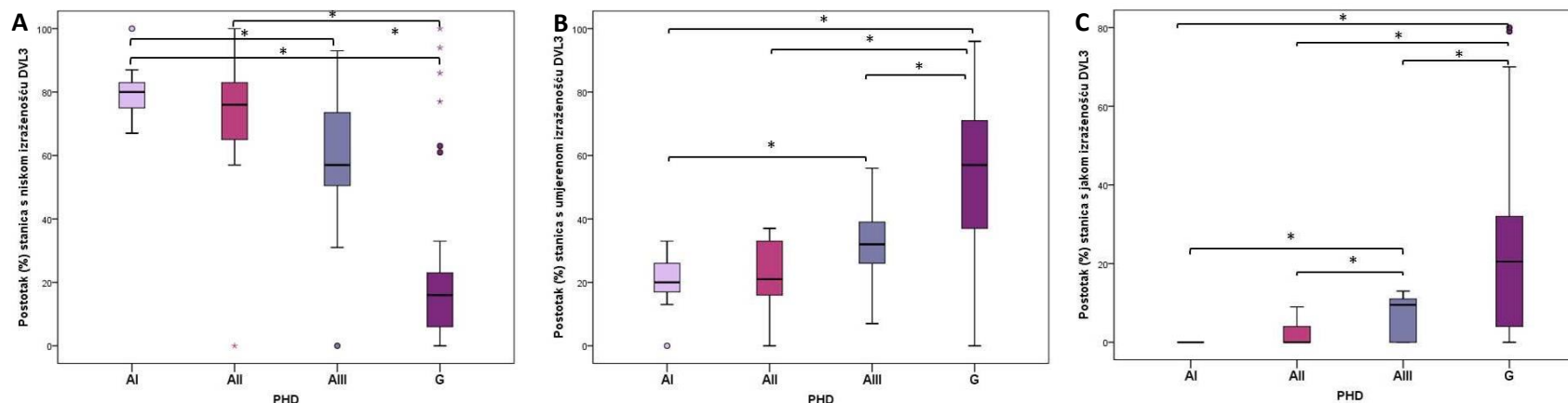
Pilocitični astroцитomi imaju statistički značajno više stanica s niskom izraženošću DVL3, u odnosu na anaplastične astroцитome ($p=0.001$) i glioblastome ($p<0.001$). Postoji i značajna razlika u broju stanica s niskom izraženošću DVL3 između difuznih astroцитoma i glioblastoma ($p=0.001$), te anaplastičnih astroцитoma i glioblastoma ($p=0.001$). Nadalje, u analiziranom uzorku pilocitični astroцитomi su imali statistički značajno manje stanica s umjerenom izraženošću DVL3 u odnosu na anaplastične astroцитome ($p=0.016$) i glioblastome ($p<0.001$). U glioblastomima postoji i statistički veći broj stanica s umjerenom ekspresijom DVL3 u usporedbi a astroцитomima gradusa II ($p<0.001$) i gradusa III ($p=0.003$). Značajne razlike između gradusa uočene su i u odnosu na broj stanica s jakom ekspresijom proteina DVL3. U pilocitičnim astroцитomima niti jedna stanica nije imala jaku izraženost ovog proteina, za razliku od anaplastičnih astroцитoma ($p=0.003$) i glioblastoma ($p<0.001$).

Dodatno, glioblastomi su, u odnosu na astrocitome gradusa II ($p=0.001$) i gradusa III ($p=0.013$), također imali statistički značajno veći broj stanica sa jakom izraženošću DVL3. Razlika je bila prisutna i između difuznih i anaplastičnih astrocitoma; tumori višeg gradusa imali su značajno više stanica s jakom ekspresijom DVL3 ($p=0.036$) (Tablica 23, Slika 36). Slike 37-41 prikazuju imunohistokemijsko bojanje različitih gradusa astrocitoma na DVL3.

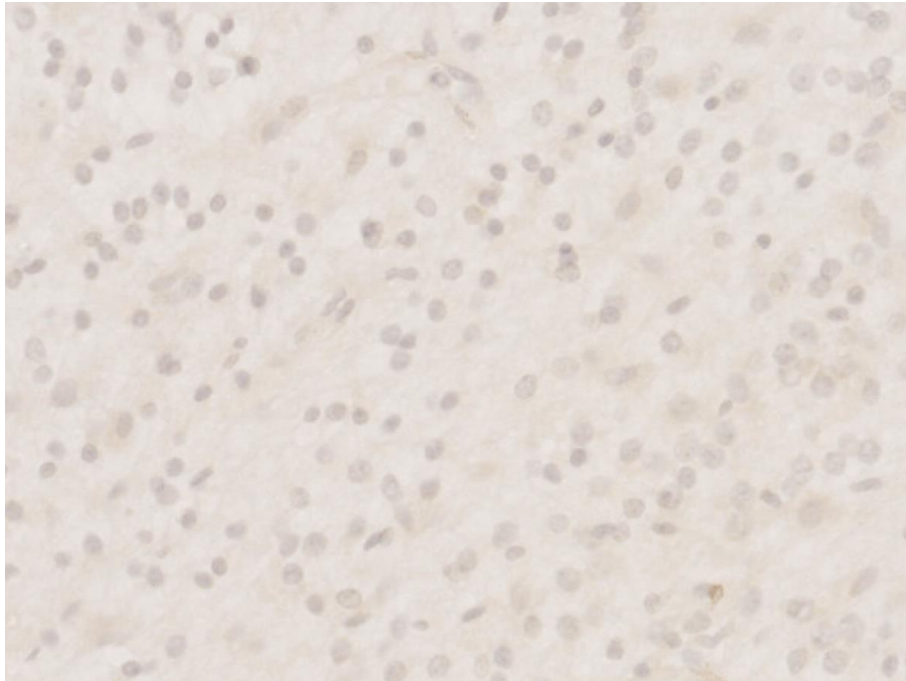
Tablica 23. Prikaz statističkih analiza broja stanica s različitim razinom izraženosti DVL3 u odnosu na gradus astrocitnih tumora

DVL3		AI vs AII	AI vs AIII	AI vs G	AII vs AIII	AII vs G	AIII vs G
(0/+)	ANOVA	F=22.597, df=3, 70, p<0.001* (p=0.056 [#])					
	KW	$\chi^2=30.538$, df=3, p<0.001*					
	TT	t=1.464, df=23, p=0.157,	t=3.553, df=27, p=0.001* (p=0.34 [#])	t=7.228, df=46, p<0.001* (p=0.06 [#])	t=1.258, df=24, p=0.221	t=4.682, df=43, p<0.001* (p=0.541 [#])	t=3.898, df=47, p<0.001* (p=0.385 [#])
	MW	U=57, Z=-1.097, p=0.291	U=31, Z=-3.233, p=0.001*	U=42.5, Z=-4.437, p<0.001*	U=45, Z=-1.947, p=0.054	U=68.5, Z=-3.132, p=0.001*	U=104.5, Z=-3.266, p=0.001*
(++)	ANOVA	F=13.589, df=3, 68, p<0.001* (p<0.001 [#])					
	KW	$\chi^2=25.411$, df=3, p<0.001*					
	TT	t=-0.331, df=22, p=0.744	t=-2.606, df=26, p=0.015* (p=0.167 [#])	t=-4.691, df=46, p<0.001* (p<0.001 [#])	t=-1.844, df=22, p=0.079	t=-3.771, df=42, p=0.001* (p=0.013 [#])	t=-3.041, df=46, p=0.004* (p=0.009 [#])
	MW	U=65, Z=-0.293, p=0.796	U=46.5, Z=-2.369, p=0.016*	U=69.5, Z=-3.823, p<0.001*	U=39.5, Z=-1.787, p=0.074	U=49.5, Z=-3.376, p<0.001*	U=106.5, Z=-2.984, p=0.003*
(+++)	ANOVA	F=9.790, df=3, 68, p<0.001* (p<0.001 [#])					
	KW	$\chi^2=28.947$, df=3, p<0.001*					
	TT	t=-2.200, df=22, p=0.039* (p<0.001 [#])	t=4.692, df=26, p<0.001* (p<0.001 [#])	t=-3.795, df=46, p<0.001* (p<0.001 [#])	t=-2.413, df=22, p=0.025* (p=0.021 [#])	t=-2.900, df=42, p=0.006* (p=0.005 [#])	t=-2.625, df=46, p=0.012* (p=0.004 [#])
	MW	U=49, Z=-2.139, p=0.235	U=35, Z=-3.492, p=0.003*	U=56, Z=-4.343, p<0.001*	U=34.5, Z=-2.224, p=0.036*	U=59.5, Z=-3.159, p=0.001*	U=130, Z=-2.475, p=0.013*

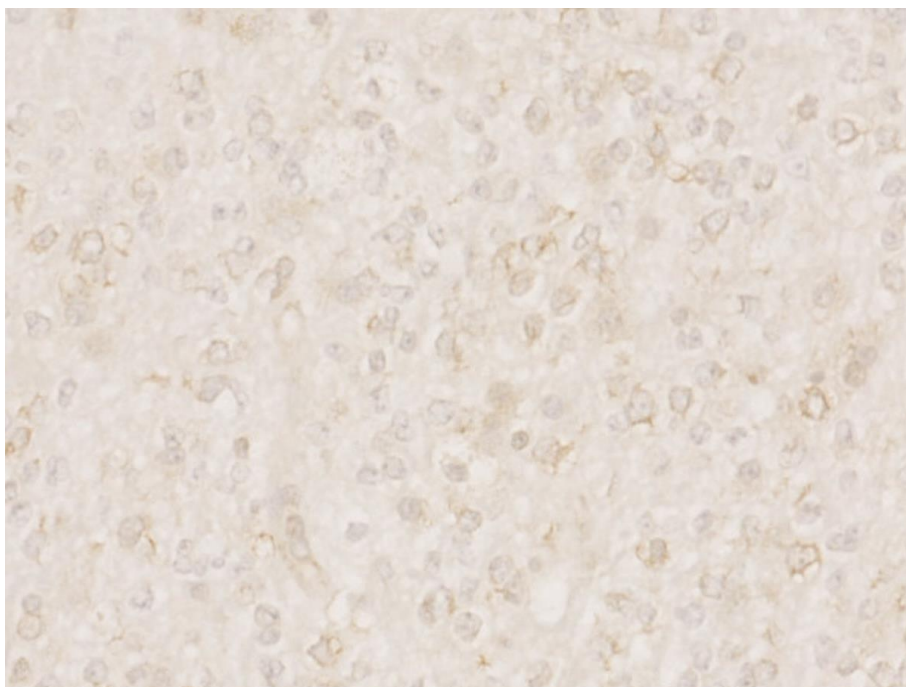
(0/+) – niska; (++) – umjerena; (+++) – jaka izraženost; KW – Kruskal-Wallis test; MW – Mann-Whitney test; TT – T test; *p < 0.05; [#]Levenov test jednakosti varijanci; AI – pilocitični astroцитom; AII – difuzni astroцитom; AIII – anaplastični astroцитom; GBM – glioblastoma multiforme.



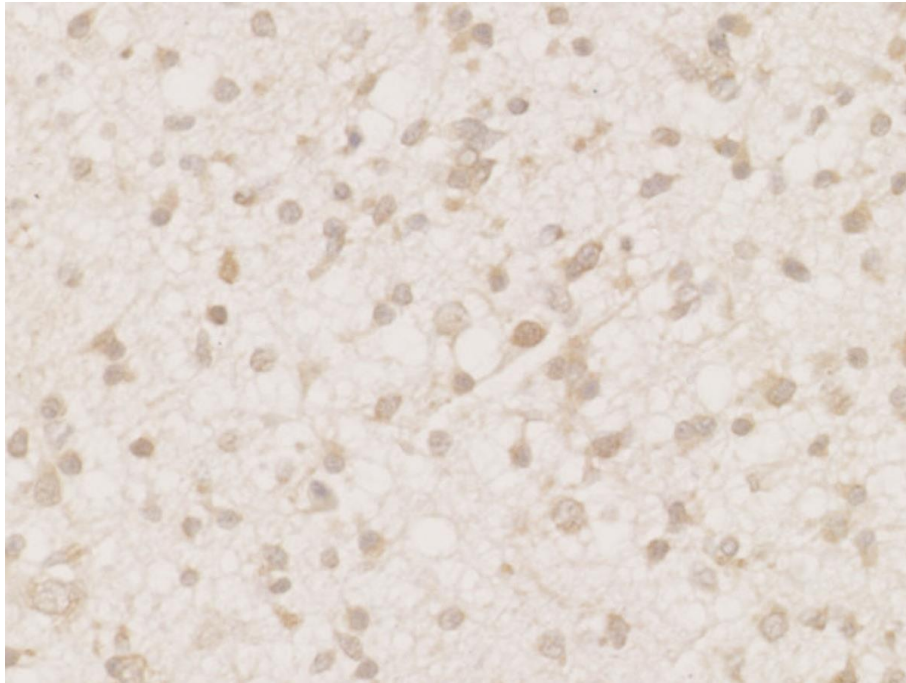
Slika 36. Analiza broja stanica sa (A) slabom, (B) umjerenom i (C) jakom izraženošću proteina DVL3 u odnosu na gradus astrocitoma; *p < 0.05.



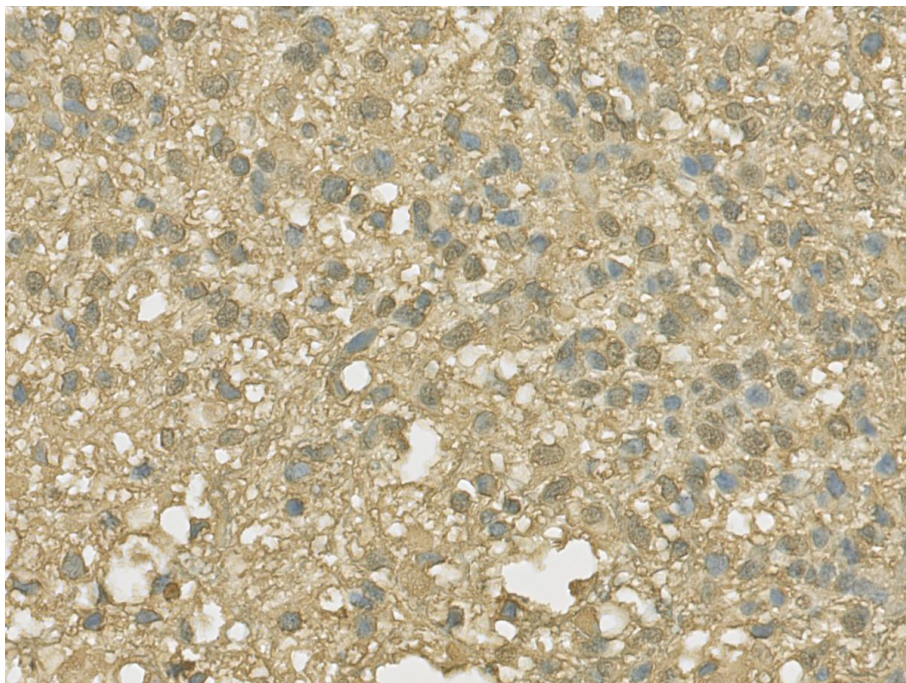
Slika 37. DVL3 u pilocitičnom astrocitomu dokazan metodom imunohistokemije. Slika prikazuje pokoju slabo pozitivnu stanicu tumora (objektiv x40).



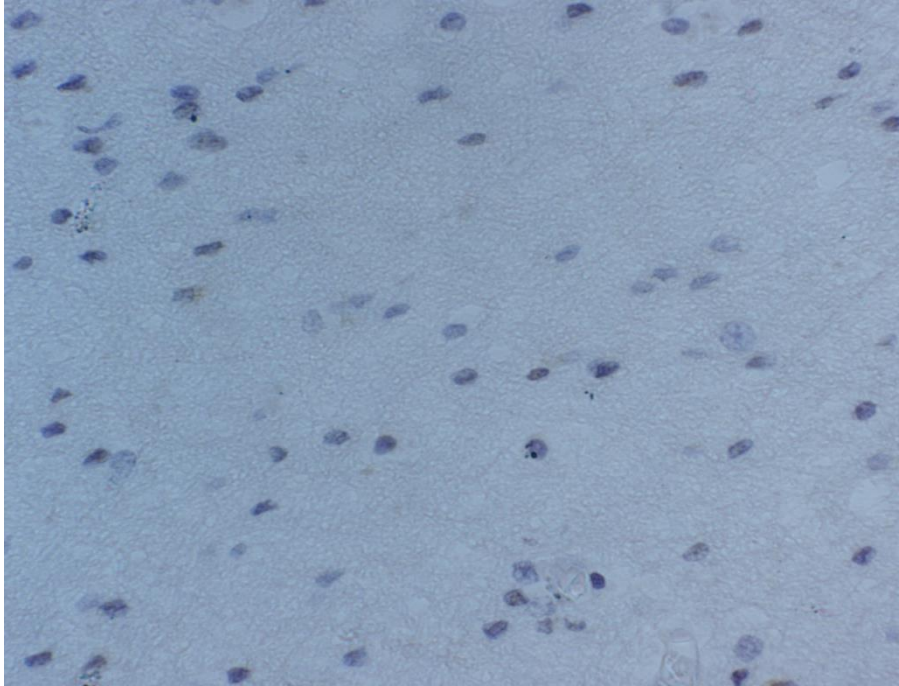
Slika 38. DVL3 u difuznom astrocitomu dokazan metodom imunohistokemije. Slika prikazuje slab intenzitet bojanja membrana i citoplazmi stanica tumora (objektiv x40).



Slika 39. DVL3 u anaplastičnom astrocitomu dokazan metodom imunohistokemije. Slika prikazuje slab i umjeren intenzitet bojanja membrana, citoplazmi i jezgara stanica tumora (objektiv x40).



Slika 40. DVL3 u glioblastomu dokazan metodom imunohistokemije. Slika prikazuje jak intenzitet bojanja membrana, citoplazmi i jezgara stanica tumora (objektiv x40).



Slika 41. IH bojanje kore velikog mozga na DVL3 (pozitivna kontrola). Intenzitet bojanja astrocita je vrlo slab (objektiv x40).

Tablica 24. Vrijednosti IRS - DVL1 u astrocitomima različitog gradusa

		AI vs AII	AI vs AIII	AI vs GBM	AII vs AIII	AII vs GBM	AIII vs GBM
IRS_DVL1	ANOVA	F=10,817, df=3, 68, p<0.001* (p=0.398 [#])					
	KW	$\chi^2=23,031$, df=3, p<0.001*					
	TT	t=-2.102 df=22, p=0.047* (p=0.855 [#])	t=-0.332, df=26, p=0.743	t=-4.175, df=46, p<0.001* (p=0.330 [#])	t=-2.549, df=22, p=0.018* (p=0.832 [#])	t=-1.559, df=42, p=0.127	t=-4.635, df=46, p=0.001* (p=0.137 [#])
	MW	U=38.5 Z=-2.063, p=0.064	U=89.5, Z=-0.417, p=0.701	U=82.5, Z=-3.647, p=0.001*	U=29.5, Z=-2.615, p=0.016*	U=11.5, Z=-1.622, p=0.128	U=81, Z=-3.696, p<0.001*

KW, Kruskal-Wallis test; MW, Mann-Whitney test; TT, T test; *p < 0.05; [#]Levenov test jednakosti varijanci; AI – pilocitični astrocitom; AII – difuzni astrocitom; AIII – anaplastični astrocitom; GBM – glioblastoma multiforme.

Tablica 25. Vrijednosti IRS – DVL2 u astrocitomima različitog gradusa

		AI vs AII	AI vs AIII	AI vs GBM	AII vs AIII	AII vs GBM	AIII vs GBM
IRS_DVL2	ANOVA	F=0.268, df=3, 68, p<0.848 (p=0.344 [#])					
	KW	$\chi^2=0.968$, df=3, p<0.809					
	TT	t=-0.794, df=22, p=0.592	t=-0.795, df=26, p=0.434	t=-0.827, df=46, p=0.413	t=0.897, df=22, p=0.520	t=-0.148, df=42, p=0.883	t=-0.024, df=46, p=0.981
	MW	U=61.5, Z=-0.535, p=0.625	U=79, Z=-0.946, p=0.401	U=201.5, Z=-0.856, p=0.392	U=66, Z=-0.258, p=0.841	U=162.5, Z=-0.217, p=0.836	U=236.5, Z=-0.035, p=0.972

KW, Kruskal-Wallis test; MW, Mann-Whitney test; TT, T test; *p < 0.05; [#]Levenov test jednakosti varijanci; AI – pilocitični astrocitom; AII – difuzni astrocitom; AIII – anaplastični astrocitom; GBM – glioblastoma multiforme.

Tablica 26. Vrijednosti IRS – DVL3 u astrocitomima različitog gradusa

		AI vs AII	AI vs AIII	AI vs GBM	AII vs AIII	AII vs GBM	AIII vs GBM
IRS_DVL3	ANOVA	F=36.435, df=3, 68, p<0.001* (p<0.001 [#])					
	KW	$\chi^2=43.568$, df=3, p<0.001*					
	TT	t=-0.466, df=22, p=0.646	t=2.747, df=26, p=0.011*	t=-6.253, df=46, p<0.001* (p=0.002 [#])	t=3.282, df=22, p=0.003* (p=<0.001 [#])	t=-5.181, df=42, p<0.001* (p=0.008 [#])	t=-6.806, df=46, p<0.001* (p<0.001 [#])
	MW	U=63 Z=-0.475, p=0.709	U=56, Z=-2.465, p=0.056	U=42, Z=-4.560, p=0.001*	U=33, Z=-2.750, p=0.031*	U=33, Z=-3.944, p<0.001*	U=24, Z=-5.031, p<0.001*

KW, Kruskal-Wallis test; MW, Mann-Whitney test; TT, T test; *p < 0.05; [#]Levenov test jednakosti varijanci; AI – pilocitični astrocitom; AII – difuzni astrocitom; AIII – anaplastični astrocitom; GBM – glioblastoma multiforme.

5.4.4. Međusobna korelacija proteina DVL1, DVL2 i DVL3

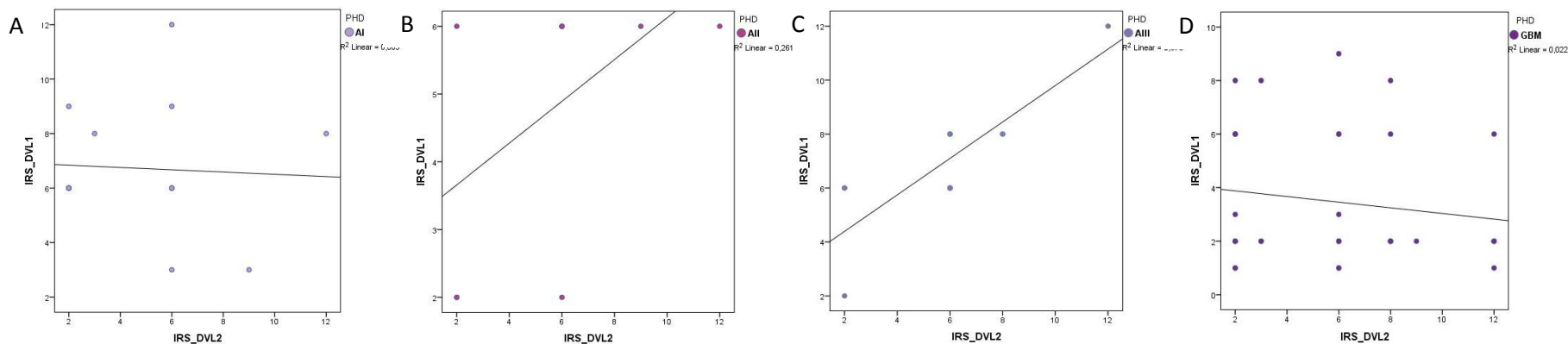
Kako bi se utvrdila eventualna korelacija između izraženosti proteina DVL1, DVL2 i DVL3, za svaki su uzorak korelirane vrijednosti IRS koje su naknadno analizirane korelacijskim testovima Pearson i Spearman.

Iako prvobitna analiza nije pokazala povezanost između proteina DVL1 i DVL2 ($p=0.799$), preciznijom analizom korištenjem vrijednosti IRS pokazana je pozitivna korelacija u anaplastičnim astrocitoma ($r_s=0.751$, $t=3.943$, $p=0.002$) (Tablica 27, Slika 42). Proteini DVL1 i DVL3 su u ukupnom uzorku bili negativno korelirani ($p=0.002$). Iako detaljna analiza nije pokazala statistički značajnu korelaciju niti u jednoj skupini astrocitoma, u anaplastičnim astrocitomima je zabilježen pozitivan trend ($p=0.057$) koji bi povećanjem broja uzoraka mogao postati značajan (Tablica 28, Slika 43). Na temelju rezultata dobivenih usporedbom vrijednosti IRS izračunatih za DVL2 i DVL3, dobivena je statistički značajna negativna korelacija ispitivanih proteina u pilocitičnim astrocitomima ($r=-0.699$, $t=-3.388$, $p=0.005$). Trend negativne korelacije otkriven je i u anaplastičnim astrocitomima ($r=-0.488$, $t=0.236$, $p=0.077$) (Tablica 29, Slika 44).

Tablica 27. Korelacija vrijednosti IRS - DVL1 i DVL2 u astroцитомима различитог gradusa

IRS_DVL1 vs IRS_DVL2	AI	AII	AIII	GBM
	PK	r=0.034, df=70, p=0.775		
SK	$r_s=0.030$, df=70, p=0.799			
PK	r=-0.053, df=12, p=0.856	r=-0.511, df=8, p=0.132	r=0.822, df=12, p<0.001*	r=-0.148, df=32, p=0.403
SK	$r_s=-0.058$, df=12, p=0.844	$r_s=-0.534$, df=8, p=0.112	$r_s=0.751$, df=12, p=0.002*	$r_s=-0.116$, df=32, p=0.512

AI – pilocitični astroцитом; AII – difuzni astroцитом; AIII – anaplastični astroцитом; GBM – glioblastoma multiforme; PK – Pearsonova korelacija; SK – Spearmanova korelacija; r – koeficijent korelacije; df – stupnjevi slobode; *p < 0.05.

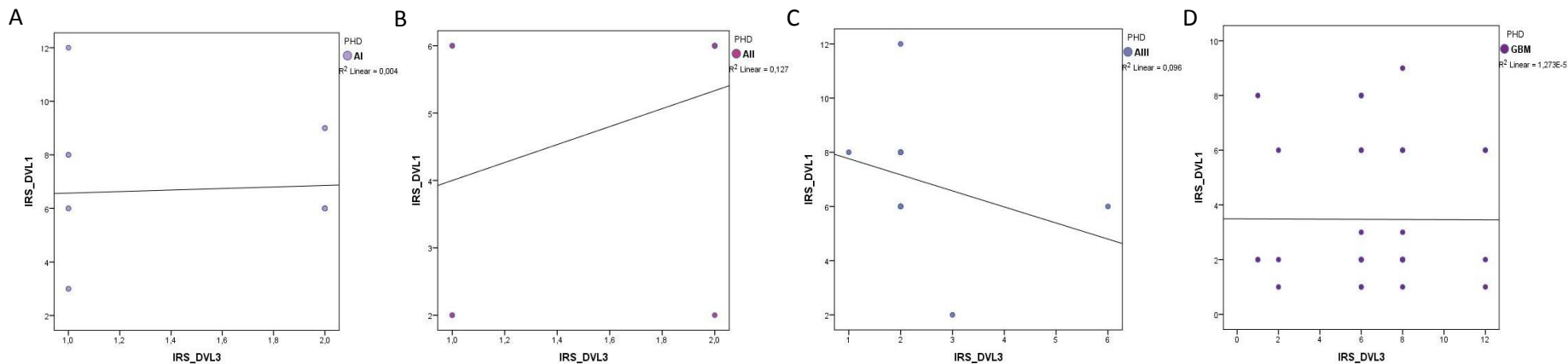


Slika 42. Korelacija proteina DVL1 i DVL2 u (A) pilocitičnim, (B) difuznim, (C) anaplastičnim astroцитомима i (D) glioblastomima.

Tablica 28. Korelacija vrijednosti IRS - DVL1 i DVL3 u astroцитomima različitog gradusa

IRS_DVL1 vs IRS_DVL3		AI	AII	AIII	GBM
	PK	r=-0.385, df=70, p=0.001*			
	SK	r _s =-0.363, df=70, p=0.002*			
	PK	r=0.063, df=12, p=0.832	r=0.356, df=8, p=0.312	r=-0.309, df=12, p=0.282	r=-0.004, df=32, p=0.984
SK	r _s =0.095, df=12, p=0.747	r _s =0.356, df=8, p=0.312	r _s =-0.519, df=12, p=0.057	r _s =-0.005, df=32, p=0.977	

AI – pilocitični astroцитom; AII – difuzni astroцитom; AIII – anaplastični astroцитom; GBM – glioblastoma multiforme; PK – Pearsonova korelacija; SK – Spearmanova korelacija; r – koeficijent korelacije; df – stupnjevi slobode; *p < 0.05.

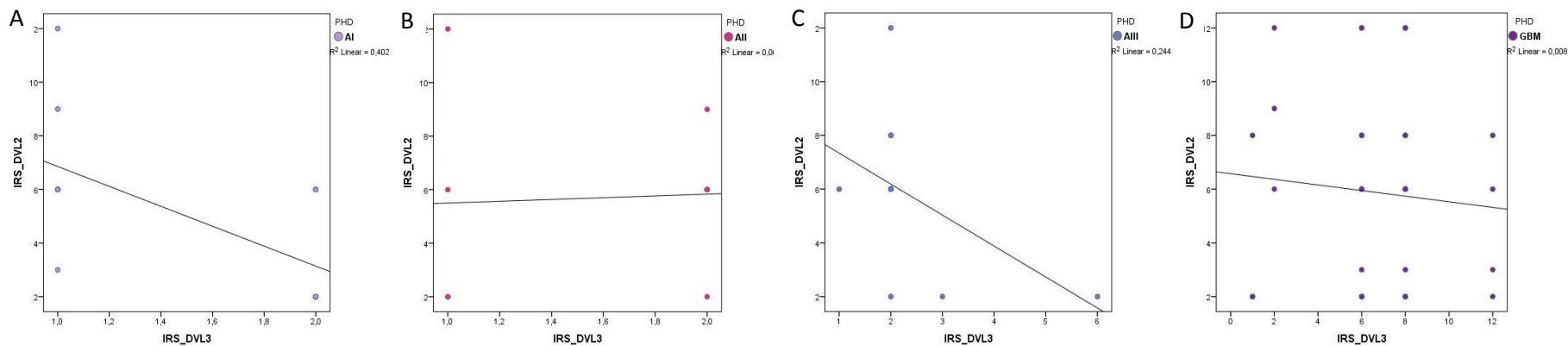


Slika 43. Korelacija proteina DVL1 i DVL3 u (A) pilocitičnim, (B) difuznim, (C) anaplastičnim astroцитomima i (D) glioblastomima.

Tablica 29. Korelacija vrijednosti IRS – DVL2 i DVL3 u astrocitomima različitog gradusa

IRS_DVL2 vs IRS_DVL3	AI	AII	AIII	GBM
	PK	r=-0.036, df=70, p=0.765		
SK	r_s =-0.029, df=70, p=0.806			
PK	r=-0.634, df=12, p=0.015*	r=0.054, df=8, p=0.883	r=-0.494, df=12, p=0.073	r=-0.091, df=32, p=0.610
SK	r_s =-0.699, df=12, p=0.005*	r_s =0.154, df=8, p=0.671	r_s =-0.488, df=12, p=0.077	r_s =-0.048, df=32, p=0.789

AI – pilocitični astrocitom; AII – difuzni astrocitom; AIII – anaplastični astrocitom; GBM – glioblastoma multiforme; PK – Pearsonova korelacija; SK – Spearmanova korelacija; r – koeficijent korelacije; df – stupnjevi slobode; *p < 0.05.



Slika 44. Korelacija proteina DVL2 i DVL3 u (A) pilocitičnim, (B) difuznim, (C) anaplastičnim astrocitomima i (D) glioblastomima.

5.5. Izraženost čimbenika transkripcije iz obitelji TCF/LEF u astrocitnim tumorima mozga

Analizirali smo izraženost dva čimbenika transkripcije smještena na kraju signalne kaskade puta Wnt, TCF1 i LEF1, čija povišena ekspresija upućuje na aktivnost spomenutog puta.

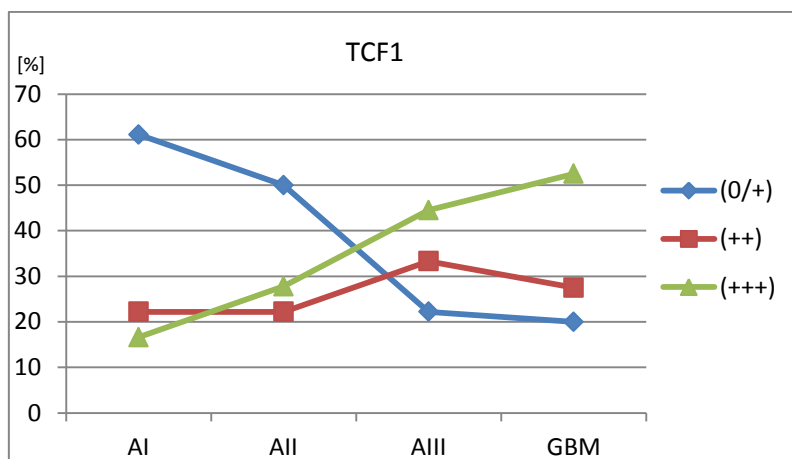
5.5.1. Izraženost čimbenika transkripcije TCF1 u astrocitnim tumorima mozga

Razina izraženosti čimbenika transkripcije TCF1 povećavala se s porastom gradusa astrocitoma. Sukladno tome, najveći postotak uzoraka pilocitičnih astrocitoma pokazao je nisku razinu izraženosti TCF1 (61.1%). U difuznim astrocitomima je 50% uzoraka slabo ekspimiralo ispitivani protein, a u drugoj polovici uzoraka zabilježena je umjerena i jaka izraženost. Najveća izraženost TCF1 zabilježena je u anaplastičnim astrocitomima i glioblastomima u kojima je čak 77.8%, odnosno 80% tumora imalo umjerenu (++) ili jaku (+++) izraženost TCF1 (Tablica 30, Slika 45). Signal je bio prisutan isključivo u jezgrama stanica tumora.

Tablica 30. Izraženosti proteina TCF1 u astrocitomima različitog gradusa

		TCF1			
		AI	AII	AIII	GBM
(0/+)	N	11	9	4	8
	%	61.1	50	22.2	20
(++)	N	4	4	6	11
	%	22.2	22.2	33.3	27.5
(+++)	N	3	5	8	21
	%	16.6	27.8	44.5	52.5
Ukupno	N	18	18	18	40
	%	100	100	100	100

(0/+) - niska; (++) - umjerena; (+++) - jaka izraženost; AI – pilocitični astrocitom; AII – difuzni astrocitom; AIII – anaplastični astrocitom; GBM – glioblastoma multiforme



Slika 45. Postotak uzoraka koji pokazuju određenu razinu izraženosti proteina TCF1 u odnosu na gradus astrocitoma.

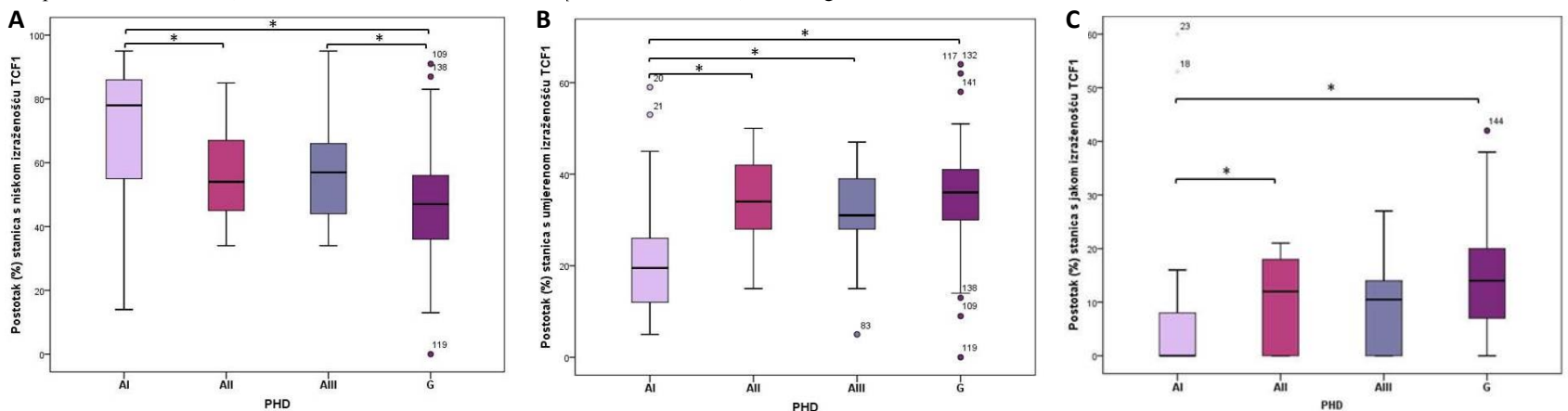
Statističkom je analizom pokazano nekoliko statistički značajnih razlika vezanih uz raspodjelu jačine signala TCF1 u odnosu na gradus tumora ($p=0.006$). Pilocitični astroцитomi su imali statistički značajno više stanica s niskom izraženošću u odnosu na difuzne astroцитome ($p=0.040$) i glioblastome ($p=0.003$), dok su glioblastomi u istoj kategoriji jačine signala imali statistički značajno manje stanica u odnosu na anaplastične astroцитome (0.032). Pilocitični astroцитomi imali su najmanji broj stanica u sa srednje izraženim signala, a razlika je bila statistički značajna u odnosu na tumore drugih gradusa: difuzni astroцитom ($p=0.007$), anaplastični astroцитom (0.022) i glioblastom ($p=0.004$). Difuzni astroцитomi ($p=0.047$) i glioblastomi ($p=0.001$) imali su statistički značajno veći broj stanica s jakom izraženošću TCF1, u odnosu na pilocitične astroцитome ($p=0.001$) (Tablica 31, Slika 46). Slike 47-50 prikazuju imunohistokemijsko bojanje različitih gradusa astrocitoma na TCF1.

Tablica 31. Prikaz statističkih analiza broja stanica s različitim razinom izraženosti TCF1 u odnosu na gradus astrocitnih tumora

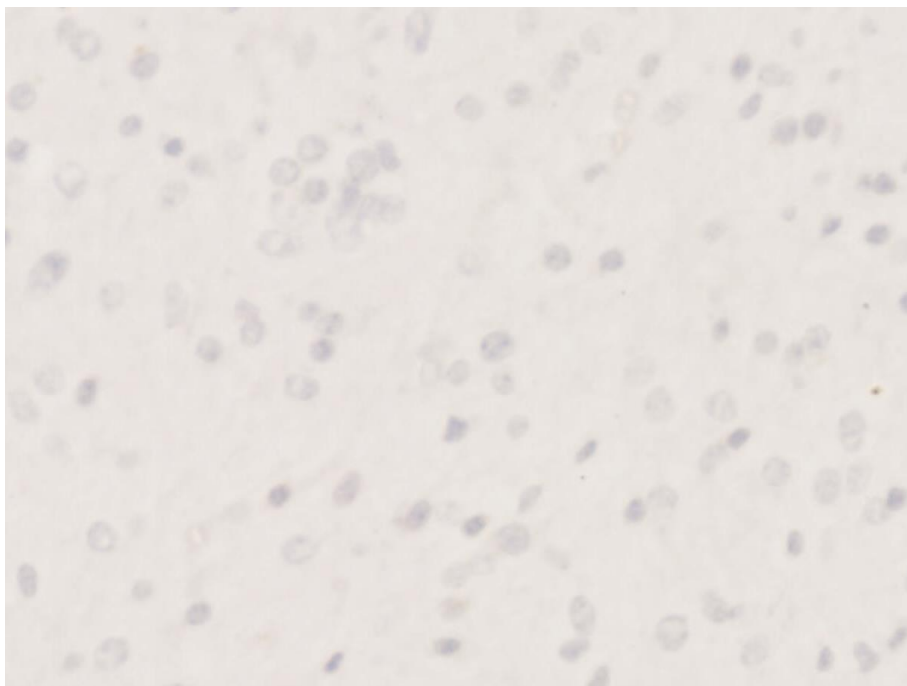
TCF1		AI vs AII	AI vs AIII	AI vs G	AII vs AIII	AII vs G	AIII vs G
(0/+)	ANOVA	F=4.972, df=3, 91, p=0.003* (p=0.200 [#])					
	KW	$\chi^2=12.569$, df=3, p=0.006*					
	TT	t=1.910, df=34, p=0.065	t=1.327, df=34, p=0.193	t=3.378, df=57, p=0.01* (p=0.285 [#])	t=-0.700, df=34, p=0.489	t=1.478, df=57, p=0.145	t=2.109, df=57, p=0.039* (p=0.465 [#])
	MW	U=97.5, Z=-2.042, p=0.040*	U=110, Z=-1.647, p=0.104	U=185.5, Z=-3.021, p=0.003*	U=140, Z=-0.697, p=0.501	U=278, Z=-1.498, p=0.134	U=239, Z=-2.141, p=0.032*
(++)	ANOVA	F=3.699, df=3, 91, p=0.015* (p=0.496 [#])					
	KW	$\chi^2=11.112$, df=3, p=0.011*					
	TT	t=-2.540, df=34, p=0.16 (p=0.224 [#])	t=-1.820, df=34, p=0.78	t=-2.910, df=57, p=0.005* (p=0.575 [#])	t=0.881, df=34, p=0.385	t=-0.171, df=57, p=0.865	t=-1.004, df=57, p=0.320
	MW	U=78, Z=-2.660, p=0.007*	U=90, Z=-2.280, p=0.022*	U=192.5, Z=-2.907, p=0.004*	U=134.5, Z=-0.871, p=0.398	U=350, Z=-0.313, p=0.754	U=295, Z=-1.219, p=0.223
(+++)	ANOVA	F=1.782, df=3, 91, p=0.156					
	KW	$\chi^2=12.628$, df=3, p=0.006*					
	TT	t=-0.433, df=34, p=0.668	t=-0.260, df=34, p=0.797	t=-1.719, df=57, p=0.91	t=-0.286, df=34, p=0.776	t=-1.585, df=57, p=0.118	t=-1.815, df=57, p=0.075
	MW	U=99, Z=-2.088, p=0.047*	U=108, Z=-1.789, p=0.091	U=168.5, Z=-3.330, p=0.001*	U=147, Z=-0.480, p=0.650	U=292.5, Z=-1.263, p=0.207	U=263.5, Z=-1.741, p=0.082

(0/+) – niska; (++) – umjerenja; (+++) – jaka izraženost; KW – Kruskal-Wallis test; MW – Mann-Whitney test; TT – T test; *p < 0.05; [#]Levenov test jednakosti varijanci;

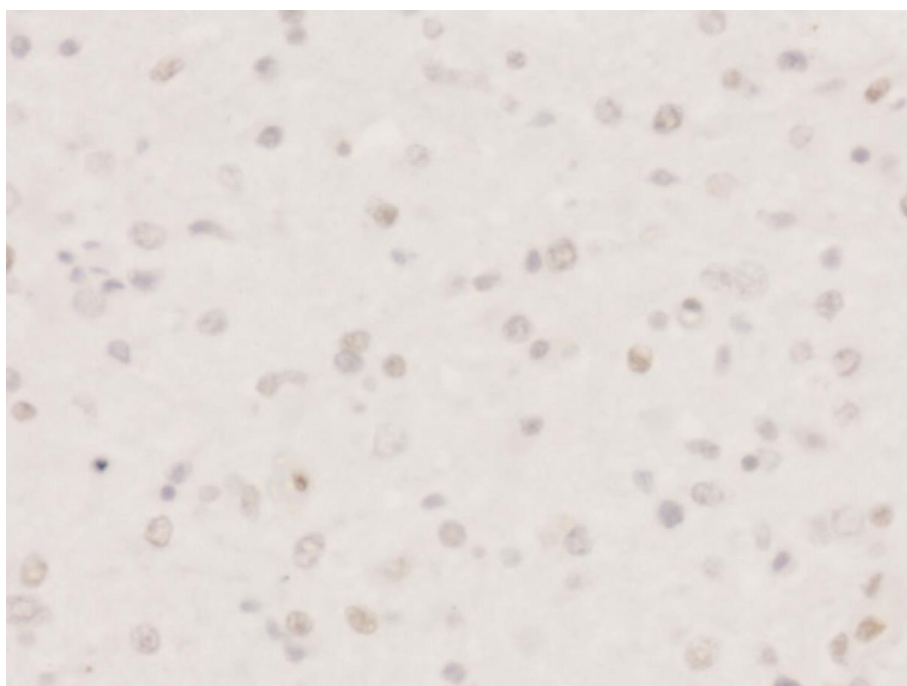
AI – pilocitični astroцитom; AII – difuzni astroцитom; AIII – anaplastični astroцитom; GBM – glioblastoma multiforme



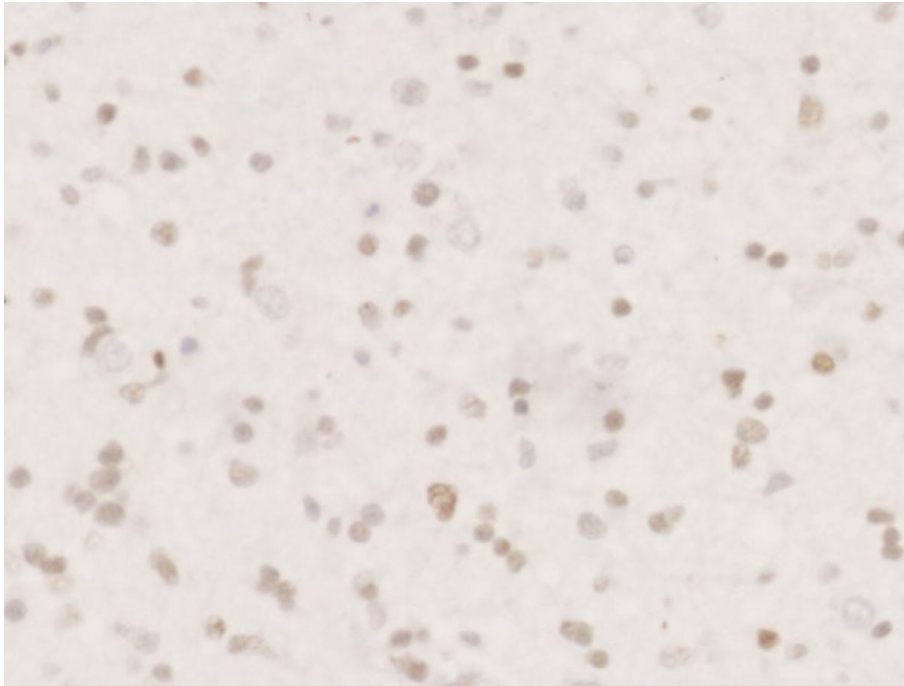
Slika 46. Analiza broja stanica sa (A) slabom, (B) umjerenom i (C) jakom izraženošću proteina TCF1 u odnosu na gradus astrocitoma; *p < 0.05.



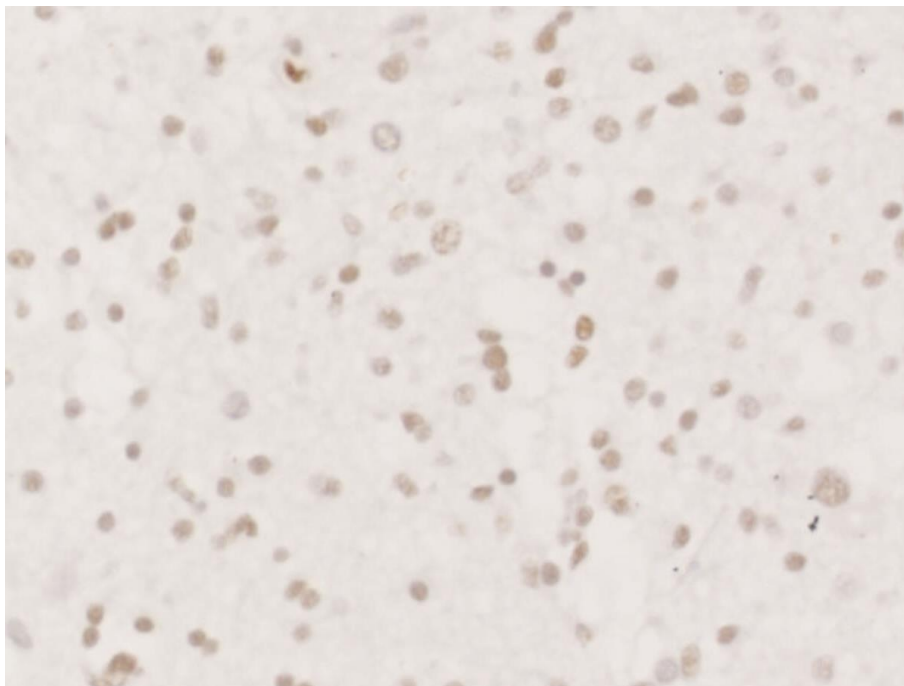
Slika 47. TCF1 u pilocitičnom astrocitomu dokazan metodom imunohistokemije. Slika prikazuje slab intenzitet bojanja jezgara stanica tumora (objektiv x40).



Slika 48. TCF1 u difuznom astrocitomu dokazan metodom imunohistokemije. Slika prikazuje slab i umjeren intenzitet bojanja jezgara stanica tumora (objektiv x40).



Slika 49. TCF1 u anaplastičnom astrocitomu dokazan metodom imunohistokemije. Slika prikazuje umjeren i jak intenzitet bojanja jezgara stanica tumora (objektiv x40).



Slika 50. TCF1 u glioblastomu dokazan metodom imunohistokemije. Slika prikazuje umjeren i jak intenzitet bojanja jezgara stanica tumora (objektiv x40).

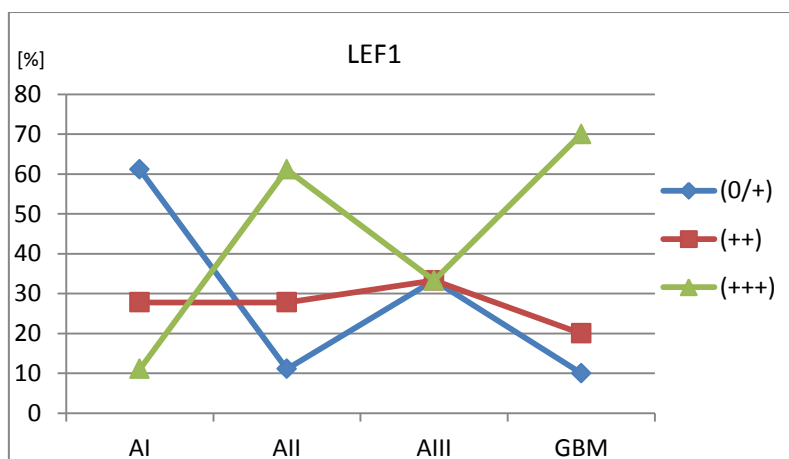
5.5.2. Izraženost čimbenika transkripcije LEF1 u astrocitnim tumorima mozga

Statističkom analizom izraženosti čimbenika transkripcije LEF1 pokazano je da se stanice s niskom izraženošću LEF1 najčešće nalaze u pilocitičnim astroцитomima (61.1%) u usporedbi s ostalim gradusima astroцитoma. Gotovo podjednak udio uzoraka s umjerenom i jakom izraženošću bio je zastupljen u skupinama difuznog astroцитoma (88.9%) i glioblastoma (90%) Taj je udio bio manji u skupini anaplastičnih astroцитoma (66.6%) (Tablica 32, Slika 51).

Tablica 32. Izraženosti proteina LEF1 u astroцитomima različitog gradusa

		LEF1			
		AI	AII	AIII	GBM
(0/+)	N	11	2	6	4
	%	61.1	11.1	33.3	10
(++)	N	5	5	6	8
	%	27.8	27.8	33.3	20
(+++)	N	2	11	6	28
	%	11.1	61.1	33.3	70
Ukupno	N	18	18	18	40
	%	100	100	100	100

(0/+) - niska; (++) - umjerena; (+++) - jaka izraženost; AI – pilocitični astroцитom; AII – difuzni astroцитom; AIII – anaplastični astroцитom; GBM – glioblastoma multiforme



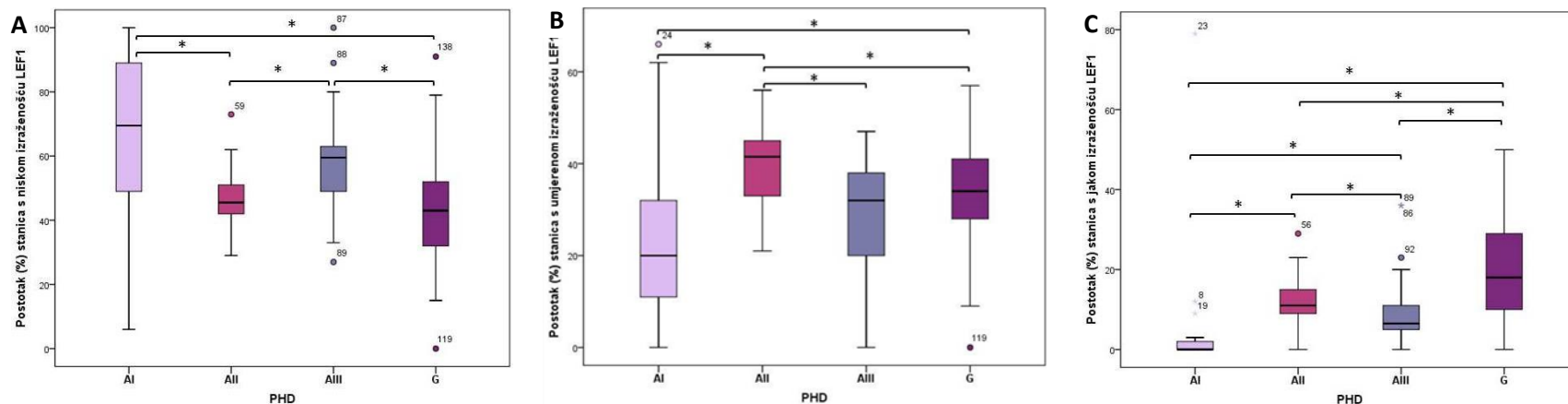
Slika 51. Postotak uzoraka koji pokazuju određenu razinu izraženosti proteina LEF1 u odnosu na gradus astroцитoma.

Analiza broja stanica čimbenika transkripcije LEF1, u sve tri kategorije jačine signala, također je pokazala velik broj statistički značajnih razlika, u odnosu na gradus tumora ($p < 0.001$). I u ovom su slučaju pilocitični astroцитomi imali statistički značajno više stanica s niskom izraženošću LEF1, u odnosu na difuzne astroцитome ($p = 0.006$) i glioblastome ($p = 0.001$). Statistički značajno manji broj stanica s umjerenom izraženošću LEF1 postoji u pilocitičnim astroцитomima, u odnosu na difuzne astroцитome ($p = 0.012$) i glioblastome ($p = 0.028$). S druge strane, difuzni astroцитomi imaju statistički značajno više stanica s umjerenom izraženošću LEF1 u odnosu na anaplastične astroцитome ($p = 0.016$) i glioblastome ($p = 0.022$). Najveći broj stanica s jakim izraženošću LEF1 imali su glioblastomi i to statistički značajno više u odnosu na pilocitične ($p < 0.001$), difuzne ($p = 0.032$) i anaplastične astroцитome ($p = 0.003$). Difuzni su astroцитomi imali statistički značajno više stanica s jakim izraženošću LEF1 u odnosu na pilocitične ($p < 0.001$) i anaplastične astroцитome ($p = 0.008$). Anaplastični astroцитomi su imali statistički značajno više stanica s jakim izraženošću LEF1 u odnosu na pilocitične astroцитome ($p = 0.008$) (Tablica 33, Slika 52). Slike 53-56 prikazuju imunohistokemijsko bojanje različitih gradusa astroцитoma na LEF1.

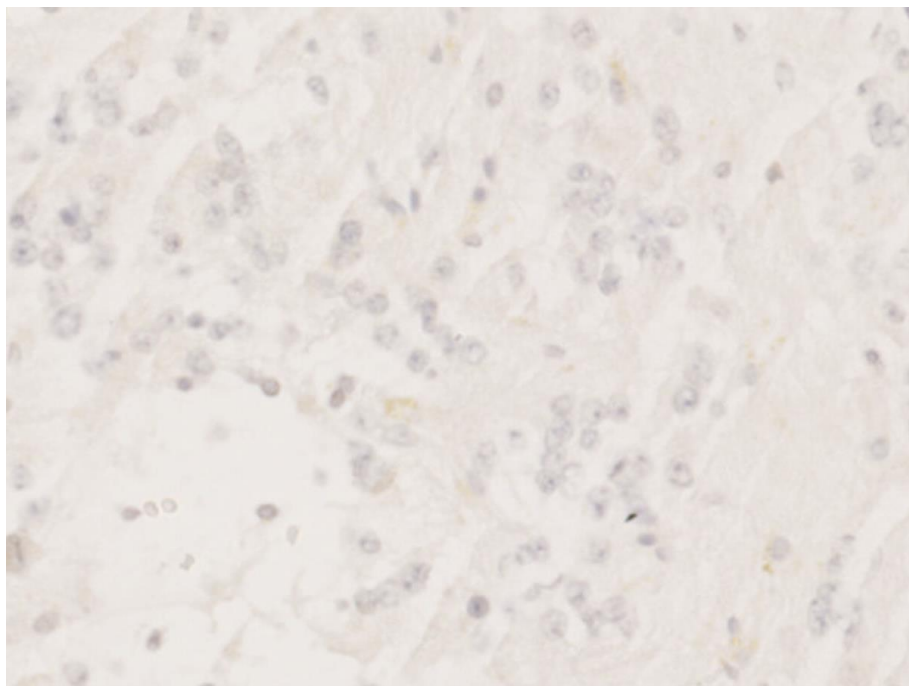
Tablica 33. Prikaz statističkih analiza broja stanica s različitim razinom izraženosti LEF1 u odnosu na gradus astrocitnih tumora

LEF1		AI vs AII	AI vs AIII	AI vs G	AII vs AIII	AII vs G	AIII vs G
(0/+)	ANOVA	F=, df=3, 91, p=0.003* (p=0.200 [#])					
	KW	$\chi^2=17.936$, df=3, p<0.001*					
	TT	t=3.078, df=34, p=0.004* (p=0.004 [#])	t=1.134, df=34, p=0.265	t=3.975, df=57, p<0.001* (p=0.081 [#])	t=-2.413, df=34, p=0.021* (p=0.102 [#])	t=0.638, df=57, p=0.526	t=2.904, df=57, p=0.005* (p=0.815 [#])
	MW	U=77.5, Z=-2.675, p=0.006*	U=113, Z=-1.552, p=0.126	U=165.5, Z=-3.351, p=0.001*	U=84, Z=-2.471, p=0.013*	U=312.5, Z=-0.931, p=0.352	U=199.5, Z=-2.792, p=0.005*
(++)	ANOVA	F=3.523, df=3, 91, p=0.018* (p=0.001 [#])					
	KW	$\chi^2=11.586$, df=3, p=0.009*					
	TT	t=-2.563, df=34, p=0.015* (p=0.003 [#])	t=-0.715, df=34, p=0.479	t=-1.767, df=57, p=0.083	t=2.682, df=34, p=0.011* (p=0.311 [#])	t=2.305, df=57, p=0.025 (p=0.729 [#])	t=-0.993, df=57, p=0.325
	MW	U=83.5, Z=-2.484, p=0.012*	U=119, Z=-1.364, p=0.181	U=235.5, Z=-2.199, p=0.028*	U=86, Z=-2.408, p=0.016*	U=230, Z=-2.290, p=0.022*	U=322, Z=-0.774, p=0.439
(+++)	ANOVA	F=5.852, df=3, 91, p=0.001* (p=0.278 [#])					
	KW	$\chi^2=31.670$, df=3, p<0.001*					
	TT	t=-1.435, df=34, p=0.160	t=-0.846, df=34, p=0.403	t=-3.427, df=57, p=0.001* (p=0.910 [#])	t=0.579, df=34, p=0.453	t=2.373, df=57, p=0.021* (p=0.007 [#])	t=-2.854, df=57, p=0.006* (p=0.556 [#])
	MW	U=41.5, Z=-3.933, p<0.001*	U=79, Z=-2.777, p=0.008*	U=80, Z=-4.798, p<0.001*	U=96.5, Z=-2.081, p=0.037*	U=239, Z=-2.142, p=0.032*	U=190, Z=-2.950, p=0.003*

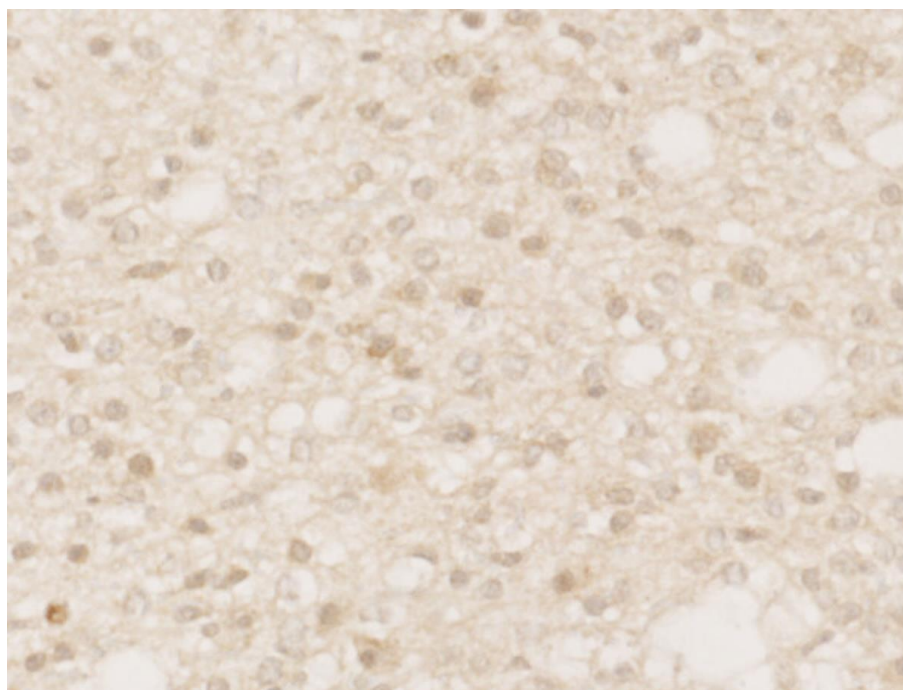
(0/+) – niska; (++) – umjerenja; (+++) – jaka izraženost; KW – Kruskal-Wallis test; MW – Mann-Whitney test; TT – T test; *p < 0.05; [#]Levenov test jednakosti varijanci; AI – pilocitični astrocitom; AII – difuzni astrocitom; AIII – anaplastični astrocitom; GBM – glioblastoma multiforme.



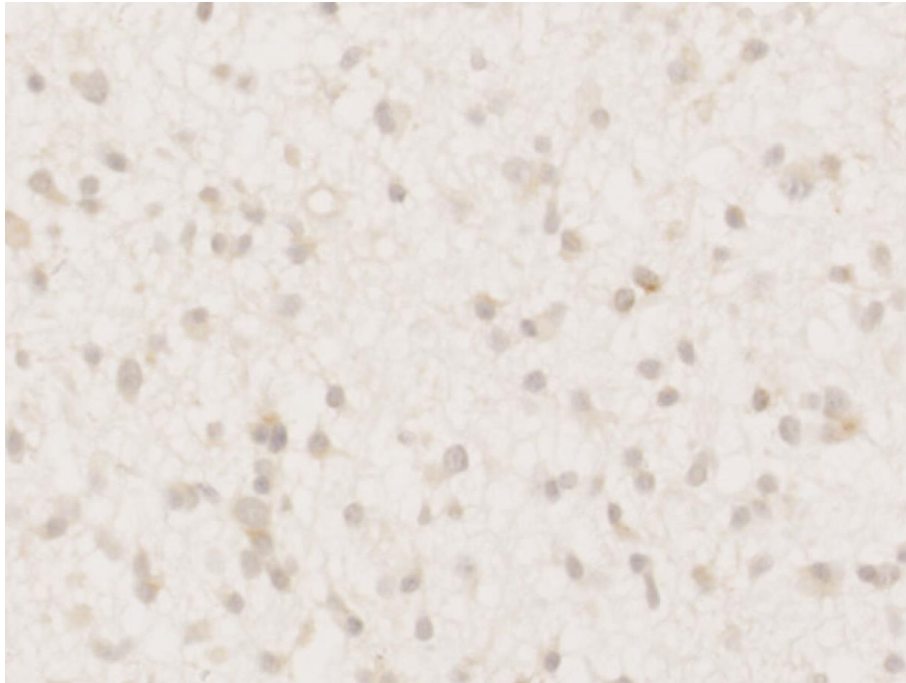
Slika 52. Analiza broja stanica sa (A) slabom, (B) umjerenom i (C) jakom izraženošću proteina LEF1 u odnosu na gradus astrocitoma; *p < 0.05.



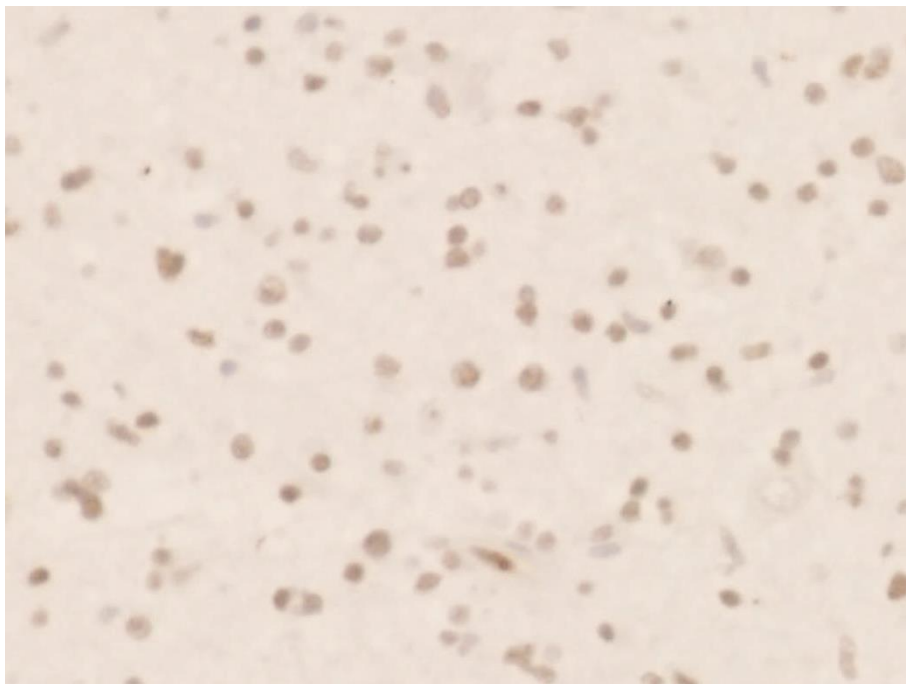
Slika 53. LEF1 u pilocitičnom astrocitomu dokazan metodom imunohistokemije. Slika prikazuje slab intenzitet bojanja jezgara stanica tumora (objektiv x40).



Slika 54. LEF1 u difuznom astrocitomu dokazan metodom imunohistokemije. Slika prikazuje umjeren i jak intenzitet bojanja jezgara stanica tumora (objektiv x40).



Slika 55. LEF1 u anaplastičnom astrocitomu dokazan metodom imunohistokemije. Slika prikazuje slab i umjeren intenzitet bojanja jezgara stanica tumora (objektiv x40).



Slika 56. LEF1 u glioblastomu dokazan metodom imunohistokemije. Slika prikazuje umjeren i jak intenzitet bojanja jezgara stanica tumora (objektiv x40).

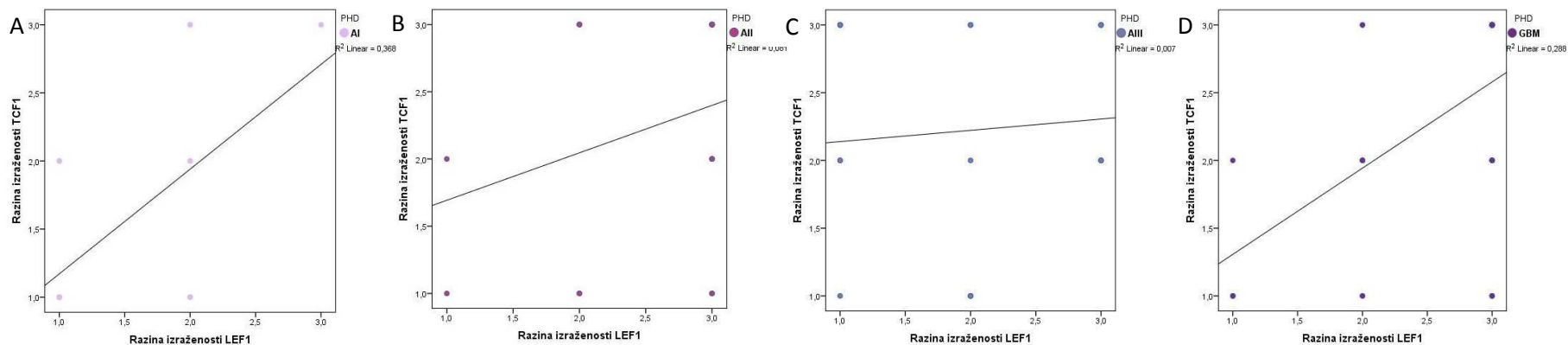
5.5.3. Međusobna korelacija proteina TCF1 i LEF1

Usporedba različitih razina izraženosti ovih proteina, omogućila je otkrivanje korelacije između čimbenika transkripcije TCF1 i LEF1, koji su bili smješteni u jezgri, u svim analiziranim tumorima ($r_s=0.474$, $df=92$, $p<0.001$). Podjelom uzoraka prema gradusima, pozitivna korelacija otkrivena je u pilocitičnim astroцитomima ($r_s=0.539$, $df=16$, $p=0.021$), a pokazano je da je statistički značajna povezanost dvaju proteina također prisutna i u uzorcima glioblastoma ($r_s=0.515$, $df=38$, $p=0.001$) (Tablica 34, Slika 57).

Tablica 34. Korelacija TCF1 i LEF1 u astrocitomima različitih gradusa

TCF1 vs LEF1		AI	AII	AIII	GBM
	PK	r=0.476, df=92, p<0.001*			
SK	r _s =0.474, df=92, p<0.001*				
PK	r=0.607, df=16, p=0.008*	r=0.284, df=16, p=0.253	r=0.087, df=16, p=0.733	r=0.536, df=38, p<0.001*	
SK	r _s =0.539, df=16, p=0.021*	r _s =0.243, df=16, p=0.332	r _s =0.070, df=16, p=0.781	r _s =0.515, df=38, p=0.001*	

AI – pilocitični astroцитom; AII – difuzni astroцитom; AIII – anaplastični astroцитom; GBM – glioblastoma multiforme; PK – Pearsonova korelacija; SK – Spearmanova korelacija; r – koeficijent korelacije; df – stupnjevi slobode; *p < 0.05.



Slika 57. Korelacija čimbenika transkripcije TCF1 i LEF1 u (A) pilocitičnim, (B) difuznim, (C) anaplastičnim astrocitomima i (D) glioblastomima.

5.6. Sveukupna analiza dobivenih podataka

Usporedbom podataka dobivenih molekularnogenetičkim analizama i analizama izraženosti proteina DVL1, DVL2, DVL3, TCF1 i LEF1 s podacima vezanim uz kliničke značajke tumora, pokazano je da su neke molekularne promjene značajno povezane sa starošću. Bolesnici mlađe životne dobi imaju jaču izraženost DVL1 u odnosu na starije ($r_s = -0.226$, $df=70$, $p=0.057$). S druge strane, stariji bolesnici imaju statistički značajno jaču izraženost DVL3 u odnosu na skupinu mlađih bolesnika ($r_s = 0.395$, $df=70$, $p=0.001$). Nije utvrđena statistička značajnost u odnosu na spol bolesnika.

Razina izraženosti proteina DVL1, DVL2 i DVL3 i njihov smještaj u stanici nisu pokazali statistički značajnu korelaciju s genetskim promjenama u odnosu na polimorfne mikrosatelitne biljege D1S468, D1S243, D17S960 i D3S1262.

Niti jedan od dva mikrosatelitna biljega korištena za utvrđivanje nestabilnosti gena *DVLI*, D1S468 i D1S243, nije pokazao statistički značajnu povezanost genetičkih promjena s razinom izraženosti proteina ($p_1=0.369$, $p_2=0.992$). Ukupno gledano, slabu izraženost proteina DVL1 imalo je 51.9% uzoraka bez promjene gena *DVLI*, 33.3% uzoraka s MSI i 7.4% uzoraka s LOH te 7.4% uzoraka s obje promjene. Umjerenu i jaku izraženost proteina DVL1 imalo je 42.8% uzoraka bez genetičkih promjena, 48.7% uzoraka s MSI, 2.8% uzoraka s LOH. Obje genetičke promjene, MSI i LOH, bile su združene sa slabom i umjerenom izraženošću proteina DVL1 u 5.7% uzoraka.

Rezultati χ^2 -testa pokazali su da ne postoji statistički značajna povezanost između genskih promjena utvrđenih korištenjem biljega D17S960 i izraženosti proteina DVL2 ($p=0.266$). Slaba izraženost proteina DVL2 opažena je u 78.3% uzoraka bez promjene ovog gena, 4.3% uzoraka s mikrosatelitnom nestabilnošću i 17.4% uzoraka s gubitkom heterozigotnosti. Umjerena ili jaka ekspresija DVL2 bila je prisutna u 74.3% uzoraka bez promjene gena, 12.8% uzoraka s MSI i 12.8% uzoraka s LOH.

Niti u slučaju DVL3 nije pokazana povezanost između nestabilnosti genoma i izraženosti proteina ($p=0.254$). U kategoriji slabog signala bilo je 69.7% uzoraka bez promjena gena *DVL3*, 24.3% uzoraka s mikrosatelitnom nestabilnošću i 6% uzoraka s gubitkom heterozigotnosti. Umjerenu ili jaku ekspresiju proteina DVL3 pokazalo je 13.8% uzoraka s MSI, 27.6% uzoraka s LOH i 58.6% koji nisu imali niti jednu od promatranih promjena.

Međusobnom bivarijantnom korelacijom svih analiziranih proteina, u svim vrstama astrocitoma, dobivena je statistički značajna pozitivna korelacija između proteina DVL3 i TCF1 ($r_s=0.410$, $df=30$, $p=0.020$) i DVL3 i LEF1 ($r_s=0.475$, $df=30$, $p=0.006$). Analize korelacije DVL1 i TCF1 ($r_s=-0.197$, $df=30$, $p=0.279$), DVL1 i LEF1 ($r_s=-0.074$, $df=30$, $p=0.688$), DVL2 i TCF1 ($r_s=0.073$, $df=30$, $p=0.690$) te DVL2 i LEF1 ($r_s=0.071$, $df=30$, $p=0.701$) nisu pokazale statistički značajne povezanosti u odnosu na prisustvo analiziranih proteina.

Usporedbom svih analiziranih proteina s histološkim gradusom astrocitoma dobivena je statistički značajna pozitivna korelacija gradusa tumora s DVL3 ($r_s=0.756$, $df=70$, $p<0.001$), TCF1 ($r_s=0.272$, $df=92$, $p=0.008$) i LEF1 ($r_s=0.417$, $df=92$, $p<0.001$) te statistički značajna negativna korelacija gradusa s DVL1 ($r_s=-0.479$, $df=70$, $p<0.001$). Jačina izraženosti DVL2 nije bila povezana s gradusom tumora ($r_s=0.021$, $df=70$, $p=0.860$).

6. RASPRAVA

Gliomi, među koje se ubrajaju i astrocitni tumori, predstavljaju skupinu neuroepitelnih tumora i čine preko 70% svih primarnih tumora mozga. U astrocitnim tumorima postoje četiri gradusa/stupnja malignosti. Najzloćudniji, a ujedno i najbrojniji su glioblastomi (1,2). Istraživanje mehanizama nastanka i invazivnosti stanica tumora dovelo je do novih smjernica u području neuroonkologije na molekularnoj razini. Iako većina procesa koji dovode do zloćudne preobrazbe još uvijek nije detaljno objašnjena, jasno je da se radi o izrazito složenim odnosima, koji stanicama tumora omogućuju brzo prilagođavanje i dinamičan odgovor na specifične uvjete mikrookoline (101,102). Neophodan uvjet za povećanje stope preživljenja oboljelih od astrocitnih tumora mozga je identifikacija i povezivanje svih molekularnih događaja koji dovode do nastanka i progresije ove bolesti (28). Rezultati projekta TCGA (engl. *The Cancer Genome Atlas*) i sličnih manjih studija, čiji je cilj definiranje genetskih poremećaja povezanih s preko 100 poznatih vrsta tumora, ukazali su na specifične molekularne biljege i signalne putove odgovorne za nastanak i progresiju glioma. Ovim se projektima želi stvoriti svojevrsni sveobuhvatni katalog tisuća genskih promjena koje pretvaraju zdrave stanice u tumorske (25). Unatoč napretku u kliničkoj i molekularnoj onkologiji, u slučaju astrocitoma, a naročito glioblastoma, nije postignut značajan pomak u povećanju stope preživljenja u posljednjih nekoliko desetljeća (103). Budući da ne postoje metode i biomarkeri za ranu detekciju astrocitoma, pregled pacijenata vrši se nakon pojave kliničkih simptoma kada je bolest već u podmaklom stadiju. Postoji sve više dokaza o izraženoj heterogenosti tumora, kao i velikom broju faza tijekom progresije astrocitnih tumora. Stoga je identifikacija potencijalnih biomarkera za predviđanje ishoda bolesti i odgovora na liječenje izuzetno složena.

Heterogenost se ne očituje samo u vanjskim morfološkim karakteristikama tumora, već i kao niz različitih genskih promjena u stanicama tumora. Prvi ispitivani tumor projekta TCGA bio je glioblastom, a studija iz 2008. godine govori o specifičnim mutacijama u signalnim putovima od kojih svakako treba navesti tri najistaknutija: RTK/RAS/PI3K, TP53 i RB (25). U svrhu razvoja što uspješnijih lijekova, TCGA je na temelju uočenih molekularnih abnormalnosti definirao podrazrede glioblastoma: proneurološki, neurološki, klasični i mezenhimski. Svaki podrazred ima specifične genetske, epigenetske i transkripcijske osobitosti (104). Budući da se klasifikacija i dalje razvija, u novije vrijeme uključuje i širu

skupinu sastavljenu od šest podrazreda u koje je uvršten i pedijatrijski glioblastom (105). Različite molekularnogenetičke osobitosti definiraju i snagu odgovora na liječenje (106). Osim promjena izraženosti pojedinih gena, za proces nastanka i progresije astrocitnih tumora karakterističan je visok stupanj nestabilnosti genoma, koji podrazumijeva mikrosatelitnu nestabilnost i gubitak heterozigotnosti.

Put prijenosa signala Wnt jedan je od osnovnih mehanizama signalizacije stanice. Na važnost ovog signalnog puta upućuje i njegova aktivnost u brojnim procesima u stanici. Velik broj istraživanja potvrdio je ulogu proteina - molekularnih sudionika puta Wnt u embrionalnom razvoju mozga, a poznate su i promjene u signalizaciji u procesu tumorigeneze u brojnim tumorima čovjeka uključujući i astrocitne tumore (64,107-109). Novije studije tzv. analize large-scale i cjelogenomske studije povezanosti (engl. *Genome-Wide Association Study*; GWAS) pokazuju da je promijenjen prienos signala u signalnom putu Wnt, uključen i u molekularnu patogenezu glijalnih tumora (17,28,110-112). Nakon što smo u prethodnim istraživanjima pokazali uloge gena E-kadherina, β -katenina i aksina (108-113), uvidjeli smo da postoje i drugi važni molekularni „kandidati“ čija je uloga u genetičkom profilu tumora mozga do danas još uvijek nedovoljno istražena i nepoznata. Zbog toga smo odlučili istražiti gene i proteine iz obitelji Dishevelled (DVL) i TCF/LEF. Postoje rijetke studije o izraženosti navedenih molekularnih sudionika signalnog puta Wnt u astrocitnim tumorima mozga u ljudi. Vrlo se malo zna o eventualnoj povezanosti ekspresije proteina uključenih u prienos signala signalnim putem Wnt u odnosu na stupanj malignosti tumora.

6.1. Nestabilnost genoma *DVL1*, *DVL2* i *DVL3*

Analiza nestabilnosti genoma stanica tumora izvrsna je podloga za istraživanje dinamike mutacija. Rezultati ovog rada pokazali su znatan udio genskih promjena u analiziranom uzorku. Dokazano postojanje nestabilnosti genoma upućuje na povećanu ukupnu stopu mutacija koje dovode do akumulacije promjena u onkogenima i tumor-supresorskim genima. Velika učestalost genskih promjena u genima *DVL1*, *DVL2* i *DVL3* pronađena u našim uzorcima ukazuje na njihovu važnost u procesu nastanka i napredovanja astrocitnih tumora mozga. Navedeni geni, do sada, nisu bili povezani s patogeneзом ove bolesti.

Četiri odabrana mikrosatelitna biljega za gene *DVL1* (D1S468 i D1S243), *DVL2* (D17S960) i *DVL3* (D3S1262) bili su visoko informativni u ispitivanom uzorku. Naši

rezultati pokazuju da su molekularne promjene gena Dishevelled česta pojava u astrocitnim tumorima mozga. Gen *DVLI* analiziran je s dva biljega, D1S468 i D1S243. Navedeni mikrosatelitni biljezi smješteni su na maloj udaljenosti uzvodno i nizvodno od gena *DVLI* u kromosomskoj regiji 1p36 te se njihovom analizom dobiva vrlo dobar i pouzdan uvid u promjene ovog gena. Zbirna analiza rezultata oba mikrosatelitna biljega gena *DVLI*, pokazala je da je MSI bio detektiran u 28.6% pilocitičnih, 61.5% difuznih i 45.5% anaplastičnih astrocitoma te 34.3% glioblastoma. Utvrđeno je da difuzni astrocitomi (gradus II) imaju statistički značajno veću stopu mikrosatelitne nestabilnosti od ostalih gradusa astrocitoma ($p=0.008$). Ako izuzmemo pilocitične astrocitome koji su dobroćudni, nisu skloni zloćudnoj progresiji i smatraju se zasebnim entitetom, vidljivo je da se ukupna stopa MSI blago smanjuje porastom gradusa.

Navedeni rezultati u skladu su s teorijom koja objašnjava mehanizam nastanka tumora i ističe se da je povećana nestabilnost genoma svojstvena ranim fazama nastanka tumora, zbog toga što povećanje međustanične genetičke varijabilnosti za posljedicu ima ubrzavanje procesa evolucije stanica tumora (114). Osim pozitivnog učinka na proliferaciju stanice, povećana stopa mutacija, uslijed postojanja nestabilnog genoma, dovodi do akumulacije štetnih promjena. Zbog toga predstavlja genetičko opterećenje za stanicu koje može dovesti do njezine smrti. Stoga samo one stanice u kojima broj mutacija ne prelazi određeni prag imaju mogućnost proliferacije. Drugim riječima, stanice s opsežnim oštećenjima genoma, zbog evolucijske neprilagođenosti, umiru. Iz tog se razloga izraženost "mutator" fenotipa smanjuje u uznapredovalim fazama progresije tumora. Osim toga, pod utjecajem selektivnih pritisaka dolazi do preživljavanja klonova koji su se najbolje prilagodili, što dodatno utječe na smanjenje broja stanica s visoko nestabilnim genomom tijekom progresije tumora (115). Postoji, međutim, i teorija koja je u potpunosti drukčija i kojom se nastanak nestabilnosti genoma veže uz progresiju bolesti.

Gubitak heterozigotnosti gena *DVLI* u ovoj studiji imalo je 9.1% anaplastičnih astrocitoma i 5.7% glioblastoma, dok su u 9.1% anaplastičnih astrocitoma i 11.4% glioblastoma bile prisutne obje promjene. Iz literature je poznato da se kromosomsko područje 1p gubi u brojnim tumorima, uključujući sporadične i nasljedne feokromocitome, karcinome dojke, pluća, probavnog trakta i gliome (116-119). Također se zna da je kodelecija 1p/19q karakteristična za anaplastične oligodendrogliome i povezana je s boljom prognozom

za oboljelog. Zanimljivo, kod astrocitnih tumora, osobito kod anaplastičnih astrocitoma (46%) i glioblastoma (54%) često dolazi do gubitka genetskog materijala na 19q13.3, a također je zabilježen i djelomičan gubitak 1p (uključujući 1p36) (120). U studiji koju su objavili Castro i sur. (121) gubitak područja 1p bio je prisutan u 65% oligodendroglioma i samo 7% uzoraka astrocitoma gradusa II-IV. Relativno mala učestalost uzoraka s LOH među našim pacijentima dovodi nas do zaključka da velike delecije gena *DVLI* nisu ključan događaj u mehanizmu nastajanja astrocitoma već su povezani s progresijom, budući da se javljaju u višim gradusima.

Rezultati analize gena *DVL2* dobiveni korištenjem biljega D17S960 potvrđuju vrlo nisku razinu mikrosatelitne nestabilnosti u analiziranim tumorima; MSI je detektiran u samo 7.1% pilocitičnih astrocitoma, 15.4% difuznih astrocitoma i 8.6% glioblastoma. Obzirom na to da u anaplastičnim astrocitomima niti u jednom uzorku nije otkrivena mikrosatelitna nestabilnost, teško je procijeniti njezinu ulogu u odnosu na incijaciju/progresiju bolesti. Najveći postotak tumora s LOH bio je upravo u skupini anaplastičnih astrocitoma. Područje 17. kromosoma na kojem je smješten ovaj biljeg bilo je često deletirano u našim uzorcima; gubitak heterozigotnosti pronađen je u 12.5% pilocitičnih astrocitoma, 33.3% difuznih astrocitoma, 33.3% anaplastičnih astrocitoma i 21.7% glioblastoma. Naši su rezultati u skladu s nekoliko ranijih studija kojima su proučavane aberacije kromosoma 17 u različitim vrstama tumora, uključujući karcinome pluća, dojke, jajnika te tumore mozga (122-125). U istraživanju koje su proveli Lee i sur. (126) gubitak heterozigotnosti na lokusu 17p pronađen je u 50% uzoraka anaplastičnih astrocitoma i glioblastoma, dok u tumorima nižih gradusa nije detektiran. LOH nije bio povezan s mutacijama gena *TP53*, smještenom na kratkom kraku kromosoma 17, što upućuje da bi neki drugi, još nepoznat, tumor-supresorski gen u tom dijelu kromosoma mogao biti izgubljen. Hu i sur. (127) su, korištenjem 15 mikrosatelitnih biljega detaljno analizirali područje 17p13 i 17p11.2-p12 u 20 primarnih glioblastoma. Najveći postotak LOH (>50%) pokazali su biljezi koji se nalaze u području 17p12-p13 u kojem je smješten *DVL2*. Niti s jednim od korištenih biljega Hu i sur. (127) nisu dokazali MSI.

Promjene gena *DVL3* analizirane su korištenjem polimorfnog mikrosatelitnog biljega D3S1262. Za ovaj gen se, porastom gradusa, povećavao i postotak LOH, dok je pojavnost MSI bila u laganom padu. U pilocitičnim astrocitomima je MSI dokazan u 21.4% informativnih uzoraka, dok je u slučaju difuznih astrocitoma taj udio bio 15.4%. U

anaplastičnim su astroцитomima otkrivene obje genske promjene; MSI u 14.3% i LOH u 18.2% tumora. Najveći broj genskih promjena otkriven je u glioblastomima, u kojima je MSI pronađen u 14.3%, LOH u 31.2%, a amplifikacija se pojavila u 8.6% tumora. Statističkom analizom (χ^2 -test) smo utvrdili da se u glioblastomima LOH pojavljuje statistički značajno češće u odnosu na astroцитne tumore nižih gradusa ($p=0.007$).

Dobiveni rezultati upućuju na mikrosatelitnu nestabilnost kao konstantnu pojavu kroz sva četiri gradusa, s nešto češćom pojavnošću u astroцитomima nižih gradusa te bi MSI mogla biti povezana s nastankom astroцитoma. Delecije gena *DVLI*, *DVL2* i *DVL3* bile su značajnije pridružene najvišem gradusu i mogle bi imati ulogu u progresiji tumora.

Druge istraživačke grupe također su došle do sličnih zaključaka. Hu i sur. (128) su u kromosomskom području 3q, u kojem je smješten *DVL3*, detektirali zamjetan broj primarnih glioblastoma s LOH (~30%). S druge strane, Hui i sur. (129) su, koristeći aCGH analizu, istražili amplifikacije u genomu glioblastoma, i utvrdili da je područje 3q bilo amplificirano u 14.3% tumora. Ovaj je postotak nešto viši u odnosu na postotak dobiven na glioblastomima u našem istraživanju (8.4 % glioblastoma s amplifikacijom 3q27.3).

Postoje podatci koji upućuju na akumuliranje mikrosatelitne nestabilnosti u genima uključenim u tumorigenezu i posljedično pokretanje razvoja tumora. Činjenica da se nestabilni mikrosateliti u malignim bolestima pretežno nalaze u genima u području trusnih regija odgovornim za nastanak raka, podržava ovu teoriju i sugerira da bi MSI mogla imati velik utjecaj u povećanju stope mutacija koje dovode do razvoja tumora. Korištenjem računalnih programa je u genomu čovjeka pronađeno približno 20 milijuna mikrosatelita, a kao najnestabilnija su se pokazala CA i GA ponavljanja dinukleotida (93).

Posebno je dobro opisan utjecaj MSI na nastanak nasljednog nepolipznog karcinoma debelog crijeva (engl. *Hereditary NonPolyposis Colorectal Cancer*; HNPCC) poznatog i pod nazivom Lynchov sindrom. Dodatno je prisutnost mikrosatelitne nestabilnosti otkrivena i u mnogim sporadičnim tumorima. Ponašanje mikrosatelitnih lokusa može se značajno razlikovati između različitih tumora, a lokusi koji su nasljedno stabilni u jednom tumoru mogu često biti pogođeni mutacijama u drugom tipu tumora.

Nekoliko je istraživanja provedeno na gliomima, ali se dobiveni rezultati nisu pokazali konzistentnima. Jednu od prvih studija koja se bavi ovom problematikom objavili su Dams i

sur. (130) istražujući promjene u genima sustava MMR. U skupini glioblastoma i anaplastičnih astrocitoma opazili su MSI u 6 od 16 uzoraka (37.5%), dok je LOH bio prisutan u 30% glioblastoma. Naši su rezultati slični rezultatima ove studije. U istraživanju koje su objavili Zhu i sur. (131) analizirana je mikrosatelitna nestabilnost u 144 primarna tumora mozga ljudi. MSI je pronađen u 17.4% oligodendroglioma, 3% astrocitoma i 2.4% meningeoma. Izumoto i sur. (132) su dokazali MSI u 21% glioblastoma i u 18% anaplastičnih astrocitoma dok u astrocitomima nižeg gradusa nije bila prisutna (N=40). Leung i sur. (133) su proučavali mutacije pet mikrosatelitnih lokusa gena sustava MMR u 22 glioma. Dokazali su da 18% analiziranih uzoraka ima visok stupanj MSI. Sve navedene studije, uključujući i rezultate našeg istraživanja, upućuju na važnost MSI u astrocitnim tumorima mozga.

Sveobuhvatne analize molekularnih promjena povezanih s MSI, utjecaj sustava MMR i njegova povezanost s kromosomskom nestabilnošću počele su se provoditi na astrocitnim tumorima prije približno 10 godina. U opsežnoj studiji koju su Martinez i sur. (134) proveli na 109 novodijagnosticiranih i 20 recidivirajućih glioblastoma, koristeći 15 mikrosatelitnih markera, pronađena je niska stopa MSI u novodijagnosticiranim glioblastomima (5.5%) u odnosu na recidivirajuće tumore (25%). Učestalost MSI bila je veća kod bolesnika kojima su prethodno dijagnosticirani astrocitomi nižeg gradusa, u odnosu na glioblastome koji su nastali *de novo* što ukazuje na vezu između stjecanja MSI i razvoja glioblastoma iz tumora nižeg stupnja malignosti. Promjene u genima za MMR istraživali su i Eckert i sur. (135). U njihovom je istraživanju, koje je napravljeno na 624 glioma, samo u jednom uzorku (0.16%) pokazan MSI. Ovaj je broj značajno manji u odnosu na sve, do sada citirane, studije. Vladimirova i sur. (136) analizirali su mikrosatelitnu nestabilnost u malignim astrocitomima djece (144 tumora) korištenjem panela od pet mononukleotidnih ponavljanja. Otkrili su da 13.2% uzoraka posjeduje MSI. Rodriguez-Hernandes i sur. (137) napravili su molekularnu karakterizaciju tri gena iz MMR sustava na 96 zloćudnih astrocitoma i procijenili utjecaj pronađenih promjena na ishod liječenja oboljelih. MSI je dokazan u 5% analiziranih uzoraka, od kojih su svi bili glioblastomi.

Karunasena i sur. (138) su u svom radu željeli otkriti na kojim se lokusima nalaze mikrosateliti za koje je poznato da su povezani s nastankom glioma, (CAMLs, od eng. *Cancer-Associated Microsatellite Loci*). Rezultatima istraživanja identificirano je 48 mikrosatelitnih lokusa specifičnih za glioblastome (GBM CAMLs). Dodatno su otkrivena 42

lokusa karakteristična za gliome nižeg gradusa (LGG CAMLs) te 29 lokusa prema kojima se razlikuju glioblastomi od glioma nižeg stupnja. Rezultati analize upućuju da se na nekim od analiziranih lokusa CAMLs nalaze geni koji utječu na procesiranje RNA i sustav proteasomske razgradnje. U uzorcima glioblastoma pronađeno je šest modificiranih gena za helikaze koji sadrže CAMLs. Važno je reći kako je u genima MMR opažen znatno manji broj mutacija u odnosu na gene koji kodiraju helikaze, odgovorne za razdvajanje lanaca nukleinskih kiselina u procesima replikacije, transkripcije, translacije i popravka DNA. Izneseni podatci upućuju na to da bi helikaze mogle imati značajniji utjecaj na održavanje stabilnosti molekule DNA u odnosu na gene sustava MMR. Sukladno tome, mutacije u helikazama mogle bi znatno doprinosti gliomagenezi.

Iz svega navedenog, jasno je da se LOH i MSI pojavljuju u astrocitnim tumorima mozga i doprinose stanju nestabilnosti genoma. Međutim, MSI se u nekim analizama pojavljuje u manjoj zastupljenosti nego što je to očekivano. Stoga se njegova točna uloga, i njezin opseg, u nastanku astrocitoma teško mogu odrediti. Dodatno, ne može se niti definirati točan uzrok nastanka MSI u astrocitnim tumorima mozga, s obzirom na to da citirani radovi ukazuju kako MSI nije povezana s nestabilnošću gena sustava MMR, iako su upravo mutacije u ovim genima odgovorne za nastanak ovog molekularnog fenomena. S druge strane, specifični varijabilni mikrosatelitni lokusi predstavljaju koristan biljeg za određivanje predispozicije razvoja astrocitoma. LOH je često prisutan u glioblastomima i uključen je u proces tumorigeneze kao pozadinski mehanizam inaktivacije tumor supresorskih gena.

Mikrosateliti se u pravilu nalaze u nekodirajućim područjima genoma i očekuje se da će u budućnosti veća dostupnost sekvencioniranja cijelog genoma dovesti do boljeg razumijevanja uloge MSI u različitim malignim bolestima. Ti bi podatci mogli dovesti raznolikost mikrosatelita u vezu s regulacijom aktivnosti gena i pridonijeti otkrivanju novih nekodirajućih pro-onkogenih elemenata koji utječu na regulaciju gena te dodatno ponuditi uvid u potencijalno važne elemente genoma uključene u karcinogenezu. Mutacije u mikrosatelitima koje nastaju unutar kodirajućih područja molekule DNA, introna ili netranslatiranih područja gena mogu pozitivno ili negativno utjecati na ekspresiju gena i/ili funkciju proteina što za posljedicu ima promjene u transkripciji gena ili izrezivanju primarnog transkripta molekule glasničke RNA (93). Postojanje specifičnog uzorka MSI u tumorima i prediktivni potencijal MSI može imati važnu ulogu u molekularnoj dijagnostici MSI. Trenutno postoje optimizirani

komercijalno dostupni kompleti kemikalija za otkrivanje MSI u karcinomima debelog crijeva i rektuma, no oni nisu prilagođeni otkrivanju nestabilnosti genoma u drugim vrstama tumora (93).

6.2. Dishevelled i tumori

U humanoj je medicini dugo poznata važnost signalnog puta Wnt, primarno za neurodegenerativne bolesti i za tumore. Budući da se proteini iz obitelji Dishevelled smatraju središnjim čvorištem ovog signalnog puta, njihova uloga u procesu tumorigeneze se intenzivno istražuje. Brojne studije pokazale su da proteini iz obitelji Dishevelled imaju povišenu ekspresiju u velikom broju različitih tumora uključujući karcinome pluća, prostate, dojke, grlića maternice i gliome (139-144). Smatra se da bi ciljano smanjenje izraženosti proteina DVL moglo biti dobra baza za supresiju aktivnosti signalnog puta Wnt te bi, sukladno tome, DVL mogao poslužiti kao potencijalna meta za liječenje tumora (145,146). S obzirom na to da važnost i uloga pojedinog člana obitelji DVL u nastanku karcinoma i dalje nije dovoljno istražena potrebno je prikupiti još puno podataka.

Istraživanja na miševima pokazala su da različiti homolozi Dvl u kanonskom signalnom putu tek manjim dijelom imaju jedinstvene, a u većini slučajeva redundantne uloge. Redundantnost uloga ne iznenađuje, s obzirom na to da su sva tri gena *Dvl* visoko konzervirana i izražena tijekom embrionalnog razvoja. U odraslom je organizmu razina njihove izraženosti tkivno specifična. Aktivnost kanonskog signalnog puta Wnt u embrionalnom razvoju beskralješnjaka i kralješnjaka je dobro proučena. Posebno je značajna uravnoteženost izraženosti svih homologa Dishevelled, budući da premala i prevelika ekspresija mogu biti letalne i/ili za posljedicu mogu imati malformaciju jedinke. Pokusima na *knockout* miševima uvidjelo se da dvostruki mutanti *Dvl1* i *Dvl2* kao i *Dvl2* i *Dvl3* imaju teške poremećaje u razvoju neuralne cijevi (craniorachischisis). Smatra se da proteini iz obitelji Dsh/Dvl mogu izravno utjecati na rast stanica i preživljenje što potkrepljuje činjenica da prekomjerna izraženost Dsh kod *Drosophila* dovodi do stanične smrti. Dodatno, trostruki *knockout* kojim se inaktiviraju sva tri gena *Dvl* u miša također ima smrtonosan učinak na jedinku (147).

Prema podacima dostupnim na mrežnim stranicama Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (engl. *National Center for Biotechnology Information*; NCBI)

(www.ncbi.nlm.nih.gov), DVL1 je u odraslog čovjeka najviše izražen u testisima i masnom tkivu, dok je najviša razina DVL2 i DVL3 opažena u endometriju i jajniku. U tkivu odraslog mozga također je bilo moguće detektirati izraženost svih homologa DVL, ali u znatno nižim količinama u odnosu na ranije navedena tkiva.

U našem istraživanju je, kako bi se utvrdila razina izraženosti proteina DVL1, DVL2 i DVL3 u zdravom mozgu, korištena kora velikog mozga čovjeka. U njoj smo detektirali slabu razinu izraženosti sva tri DVL proteina. Međutim, iako je razina imunoreaktivnosti proteina Dishevelled u astrocitima bila vrlo niska i prisutna samo u citoplazmi, opazili smo da je povišena izraženost DVL1 prisutna u područjima velike gustoće neurona (148).

U ovoj je studiji istražena razina izraženosti proteina DVL1, DVL2 i DVL3. Pokušali smo odrediti ulogu koju pojedini homolozi iz obitelji proteina Dishevelled imaju u progresiji astrocitnih tumora mozga. Izraženost DVL1 znatno se razlikovala s obzirom na gradus tumora. U skupini anaplastičnih astrocitoma je bila prisutna u najvećem udijelu (92.9%), a potom su slijedili pilocitični (85.7%) i difuzni astrocitomi (70%). Nasuprot tome, uzorci glioblastoma su u najvećem broju slučajeva pokazivali nisku izraženost DVL1 (67.6%). Analiza stanica s obzirom na jačinu signala DVL1, pokazala je statistički značajne razlike u broju stanica s niskom, umjerenom i jakom izraženošću u odnosu na gradus tumora ($p < 0.001$). Glioblastomi imaju statistički značajno više stanica s niskom izraženošću u odnosu na pilocitične ($p = 0.001$) i anaplastične astrocitome ($p < 0.001$). Sukladno tome, glioblastomi imaju i manji broj stanica s jakom izraženošću DVL1 u odnosu na pilocitične ($p = 0.001$) i anaplastične astrocitome ($p = 0.001$). U tumorima s niskom razinom ekspresije DVL1, signal se najčešće pojavljivao u citoplazmi ili u citoplazmi i staničnoj membrani. U tumorima s umjerenom i jakom izraženošću proteina DVL1, signal je statistički značajno češće bio lokaliziran u citoplazmi i jezgri, odnosno u citoplazmi, jezgri i membrani stanice ($p < 0.001$). Ovi rezultati ne upućuju na povezanost pojačane izraženosti DVL1 i progresije astrocitoma. Upravo suprotno, statističkom analizom je utvrđena negativna korelacija izraženosti proteina DVL1 sa stupnjem malignosti ($r_s = -0.479$, $df = 70$, $p < 0.001$). Rezultati dobiveni na razini proteina, u skladu su s velikim delecijama koje smo pronašli u 17.1% glioblastoma i koje mogu objasniti smanjenu razinu izraženosti u tumorima najvišeg gradusa.

U našem je istraživanju također utvrđena i povećana izraženost proteina DVL2 u odnosu na kontrolu, u tumorima svih gradusa. Umjerena i jaka ekspresija proteina zabilježena je u

57.2% uzoraka pilocitičnih, 70% difuznih, 77.6% anaplastičnih astrocitoma te u 61.7% uzoraka glioblastoma. Ove razlike nisu bile statistički značajne. Iako prvobitnom analizom (Spearmanova korelacija) nije pokazana korelacija u izraženosti između proteina DVL1 i DVL2 ($p=0.799$), preciznijom analizom vrijednosti IRS, dobivena je pozitivna korelacija u anaplastičnim astrocitomima ($r=0.751$, $t=3.943$, $p=0.002$). U tumorima s najsnažnijim izražajem DVL2 signal se nalazi u citoplazmi i jezgri, odnosno u sva tri odjeljka stanice (C+N+M) ($p<0.001$).

U skladu s rezultatima našeg istraživanja je i ono koje su proveli Pulvirenti i sur. (149), kojim je pokazana vrlo visoka razina ekspresije DVL2 u glioblastomima i to u čak 70% analiziranih tumora. Ovo otkriće ukazuje na uključenost signalnog puta Wnt u razvoj ovih tumora. Želeći dodatno potvrditi ulogu DVL2 u gliomima čovjeka *in vitro* i *in vivo*, ista istraživačka skupina je pokazala da utišavanje gena *DVL2*, korištenjem RNAi, rezultira zaustavljanjem proliferacije i poticanjem diferencijacije staničnih linija stanica glioma i primarne kulture stanica uzgojene iz nativnog glioma. Nadalje, unošenje stanica glioblastoma sa smanjenom aktivnošću DVL2 u imunodeficientnog miša, zaustavlja razvoj tumora. Zanimljivo, smanjenjem izraženosti β -katenina metodom RNAi (ili izraženošću dominantno negativne forme TCF1) suprimirana je aktivnost signalnog puta Wnt i zaustavljena je proliferacija, no nije bilo utjecaja na diferencijaciju (149). Poznato je da se u kanonskom signalnom putu Wnt linije astrocita i glioma ponašaju poput matičnih stanica, dok smanjena aktivnost Wnt signalizacije izaziva apoptozu u linijama stanica glioma. Stoga inhibiranje prijenosa signala putem Wnt predstavlja dobar pristup za liječenje zloćudnih glioma (150,151).

Razina izraženosti proteina DVL3 u našim se uzorcima povećavala s porastom stupnja malignosti. Izraženost u astrocitomima gradusa I i II okarakterizirana je kao slaba budući da niti jedan analizirani uzorak nije pokazao više od 50% pozitivnih stanica u *hot spotu* tumora. Glioblastomi su imali uvjerljivo najveći postotak stanica s umjerenom i jakom ekspresijom; čak 82.4%. U skladu s tim, statistička analiza je pokazala da se, u odnosu na izraženost DVL3, različito diferencirani astrocitni tumori značajno razlikuju ($p<0.001$). Glioblastomi su imali statistički značajno najmanji broj stanica s niskom i najveći broj stanica s umjerenom i jakom izraženošću u usporedbi s astrocitomima gradusa I-III. Tumori sa slabijim intenzitetom signala imali su lokalizaciju pretežno ograničenu na citoplazmu dok se u preparatima s

visokim udjelom stanica jakog signala, obojenje osim u citoplazmi pojavljivalo i u jezgri ($p=0.004$). Pojačana ekspresija proteina DVL3 u glioblastomu dovodi do češćeg prelaska ovog proteina u jezgri. Naše istraživanje pokazuje da je DVL3 negativno koreliran s DVL1 i DVL2, što upućuje da se DVL1 i DVL2 u astrocitnim tumorima ponašaju na jedan način, dok DVL3 predstavlja drugačiji entitet čija izraženost raste s povećanjem gradusa tumora.

Ako uzmemo u obzir rezultate dobivene na razini gena, opažena povećana stopa gubitka heterozigotnosti pridružena glioblastomima, i samo 8.6% uzoraka glioblastoma koji posjeduju amplifikaciju, nije u skladu s rezultatima koji govore o povišenoj razini izraženosti proteina DVL3. Ovaj nalaz ne možemo objasniti pretpostavljenom ulogom DVL3 u stanici gdje je poznato njegovo posredovanje u sprječavanju stvaranja kompleksa za razgradnju β -katenina. Međutim, iako nismo utvrdili korelaciju između pacijenata s LOH i smanjenom izraženošću proteina, postoji mogućnost da je to odraz heterogenosti ovog tumora te da se LOH javlja samo u određenom podtipu glioblastoma.

Podatci iz literature pokazuju da u stanici postoje dva bazena proteina DVL: jedan koji se premješta u jezgri i drugi koji ostaje u citoplazmi. Poznato je da u jezgri DVL stupa u interakciju s β -kateninom koji se, nakon premještanja iz citoplazme u jezgri, veže na čimbenike transkripcije iz obitelji TCF/LEF. DVL u jezgri također dolazi u vezu s fosforiliranim proteinom JUN. Na ovaj se način stvara stabilni funkcionalni kompleks sastavljen od DVL-JUN- β -katenin-TCF što, nakon vezanja kompleksa na molekulu DNA, dovodi do transkripcijske aktivacije ciljnih gena (80). Međutim, još uvijek nije razjašnjeno na koji je način regulirana aktivnost DVL smještenog u jezgri (71,152). Nasuprot tome, DVL koji ostaje u citoplazmi odlazi do plazmatske membrane na kojoj sudjeluje u stvaranju velikih molekularnih kompleksa tzv. signalosoma (Wnt-Fz-LRP5/6-DVL-AXIN) koji su nužni za prijenos signala od receptora prema jezgri stanice (153). Ovakva raspodjela signala u stanici u skladu je s različitim ulogama koje DVL obavlja u citoplazmi i jezgri.

Čini se da DVL migrira iz citoplazme u jezgri nakon što njegova količina u citoplazmi dosegne određenu razinu, odnosno određeni prag, neophodan za prijenos signala. Povećana ekspresija DVL3 mogla bi rezultirati jačanjem transkripcijskog djelovanja TCF1 i LEF1 poticanjem aktivnosti prijenosa signala putem Wnt. U prilog tome idu i rezultati bivarijantne usporedbe izraženosti proteina DVL3 i TCF1 ($r_s=0.410$, $df=30$, $p=0.020$) te DVL3 i LEF1 ($r_s=0.475$, $df=30$, $p=0.006$). Ovi su proteini pokazali statistički značajnu pozitivnu korelaciju.

Smještaj DVL3 u jezgri mogao bi biti pokazatelj lošijeg ishoda za pacijenta. Gan i sur. (80) analizirali su nekoliko rezova tkiva karcinoma debelog crijeva i našli da je DVL3 bio akumuliran u jezgri u 36% uzoraka.

Istraživanje koje su proveli Sareddy i sur. (107) na skupini od 32 astrocitna tumora različitih gradusa pokazuje da je izraženost mRNA DVL3 povišena u svim gradusima (AII, AIII, GBM), u odnosu na kontrolu. Također je potvrđena i pozitivna korelacija ekspresije DVL3 sa histološkim gradusom odnosno stupnjem malignosti. Opažena je i snažna pozitivna korelacija između DVL3, β -katenina i LEF1 na razini mRNA što ukazuje na snažnu aktivnost signalnog puta Wnt. U uzorcima tkiva tumora koje su analizirali ovi znanstvenici, nije bilo mRNA DVL1 i DVL2.

Sareddy i sur. (154) su proveli i istraživanje kojim su željeli usporediti izraženost pojedinih signalnih proteina, sastavnica puta Wnt, između pilocitičnih i difuznih astrocitoma. Kvantitativna analiza denzitometrijom pokazala je da su β -katenin, LEF1, TCF4 i MYC u pilocitičnim astrocitomima imali statistički značajno veću izraženost u odnosu na kontrolne uzorke. Navedeni proteini bili su jače izraženi u pilocitičnim astrocitomima i glioblastomima, u odnosu na difuzne astrocitome. Jaka izraženost u glioblastomima ne iznenađuje budući da je u prethodnoj studiji (107) ustanovljeno da se izraženost navedenih proteina povećava s porastom stupnja malignosti. Rezultati dobiveni za pilocitične astrocitome jasno govore da se ovaj tip tumora biološki razlikuje od astrocitoma višeg gradusa te predstavlja drugi entitet.

Li i sur. (155) su analizirali izraženost sva tri proteina Dishevelled (korišteno je protutijelo koje detektira sva tri homologa proteina DVL u čovjeka) u 67 glioma. Otkrili su da se razina izraženosti povećavala s histopatološkim gradusom glioma, pa su tako u njihovoj studiji glioblastomi pokazali najjaču izraženost. Dishevelled je bio pozitivno koreliran s proliferacijskim indeksom (Ki-67), indeksom invazivnosti tumora (MMP-9) i β -kateninom. Ovo upućuje na njegovu uključenost u procese proliferacije i invadiranja, što je povezano s njegovim premještanju u jezgru. Njihovi su rezultati sukladni s našima, s obzirom na to da smo pokazali statistički značajnu pozitivnu korelaciju izraženosti DVL3 sa stupnjem malignosti ($r_s=0.756$, $df=70$, $p<0.001$). U tumorima starijih bolesnika je DVL3 bio statistički značajno jače izražen u odnosu na tumore koji su se razvili u mlađih bolesnika (medijan 44 godine) ($r_s=0.395$, $df=70$, $p=0.001$).

Funkcionalne posljedice ekspresije proteina DVL u nastanku tumora i dalje nisu u potpunosti razjašnjene, a literaturni podatci o ulogama proteina Dishevelled u raznim tumorima čovjeka su kontradiktorni. Većina studija pokazala je postojanje amplifikacije gena i visoke ekspresije proteina DVL (139,140,156), no u literaturi su opisane i velike delecije lokusa ovih gena (118,119). Pokazano je da je amplifikacija i povišena izraženost gena DVL1 uključena u nastanak i razvoj karcinoma dojke (142,157), a potvrđena je i korelacija između smještaja DVL1 i β -katenina u jezgri. Slične rezultate na uzorcima karcinoma prostate, dobili su Mizutani i sur. (143) gdje su u 65% analiziranih tumora otkrili povišenu ekspresiju DVL1. U stanicama karcinoma kolona bili su izraženi DVL2 i DVL3 (158), a postoje studije koje pokazuju da bi DVL, zajedno sa mTOR, mogao biti uključen i u progresiju karcinoma debelog crijeva (159).

Pojačana izraženost DVL ključna je za razvoj karcinoma nemalih stanica pluća i mezotelioma (139,140). U studiji koju su Uematsu i sur. (139) proveli na karcinomima nemalih stanica pluća otkrivena je povišena ekspresija proteina DVL3. Ovo upućuje na važnost događaja koji su „uzvodno“ od β -katenina, a ključni su za aktivaciju signalnog puta Wnt. U ovom modelu nije pokazana povišena ekspresija proteina DVL1 i DVL2. U suglasju s ovim rezultatima su i oni proizašli iz studije Wei i sur. (144) na temelju kojih se može zaključiti da bi visoka izraženost svih proteina Dishevelled, što je otkriveno spomenutim istraživanjem, mogla biti povezana s progresijom s obzirom na to da je opažena u karcinomima nemalih stanica pluća gradusa III i IV. Sva tri homologa iz obitelji proteina DVL bila su pojačano izražena u primarnim karcinomima pluća (160) i razina izraženosti proteina DVL bila je statistički značajno veća u adenokarcinomima nego u karcinomima pločastih stanica pluća. Iako je u metastazama zahvaćenim regionalnim limfnim čvorovima njihova izraženost bila jača u odnosu na primarne tumore, povezanost s prognozom bolesti nije pokazana. Ukratko, povišena izraženost gena iz obitelji DVL (ovisno i/ili neovisno o amplifikaciji lokusa) može imati važnu ulogu u nastanku dijela tumora s obzirom na to da dovodi do nepravilnosti u prijenosu signala signalnim putem Wnt.

Rezultati istraživanja u našem laboratoriju, koje smo dobili analizom metastaza tumora pluća u mozak, pokazala su povišenu izraženost DVL1 i DVL3 u 87.1% i 90.3% analiziranih metastaza, pri čemu je više od pola uzoraka imalo signal smješten i u citoplazmi, i u jezgri (161). U kontekstu iznesenih činjenica, vezanih uz izraženost proteina Dishevelled, važno je

prokomentirati i uključenost ovih proteina u proces zvan epitelno-mezenhimska tranzicija (EMT), koji je povezan s procesima invazije i metastaziranja tumora.

Signalni put Wnt i proces EMT usko su povezani. Pojava EMT tijekom napredovanja tumora, podsjeća na scenarij embrionalnog razvoja. Ujedno upućuje i na važne mehanizme koji reguliraju metastaziranje, kojem prethodi stjecanje pokretljivosti dotada neinvazivnih stanica. Postoji, međutim, važna razlika između kontrolirane embrionalne EMT i nekontrolirane EMT koja se odvija u tumorigenezi. Stvaranje pokretnih stanica s metastatskim potencijalom rezultat je brojnih promjena u stanici. Eksperimentalno je potvrđeno da stabilizacija i akumulacija β -katenina u jezgri može dovesti do EMT (109,162) aktiviranjem represora transkripcije Snail i Slug koji potiskuju ekspresiju gena za E-kadherin (163). Povrh toga, zna se i da prekomjerna izraženost LEF1 dovodi do pojačane invazivnosti tumora i izaziva EMT (163-165). Na temelju svih ovih činjenica, i nakon obrade vlastitih rezultata, pretpostavljamo da su proteini iz obitelji DVL također uključeni u metastaziranje stanica tumora.

6.3. Obitelj čimbenika transkripcije TCF/LEF i tumori

Aktivacija transkripcije signalnog puta Wnt, u prvom je redu posredovana čimbenicima transkripcije iz obitelji TCF/LEF. Uloga ovih čimbenika transkripcije intenzivno se proučava u okvirima biologije tumora još od njihovog otkrića. Poznato je da proteini TCF1 i LEF1 mogu imati doista raznoliko djelovanje i to u nekoliko signalnih puteva. Njihova funkcija (aktivacija ili represija ciljnih gena) ovisi o proteinu-partneru s kojim se u određenom trenutku nalaze u interakciji.

Provedena su brojna istraživanja u kojima je ispitana razina izraženosti čimbenika transkripcije TCF1 i LEF1 u raznim tipovima tumora uključujući karcinome kolona, bubrega, dojki, adenokarcinom pluća, nekoliko različitih tipova leukemija i limfoma te u melanomima (62,165-167). Istraživanja su pokazala da je temeljno ispoljavanje čimbenika LEF1 važno u održavanju fizioloških funkcija stanica, dok njegova pretjerana ekspresija uzrokuje pojačanu invazivnost stanica tumora (165) i potiče epitelno-mezenhimsku tranziciju (164).

Rezultati ovog istraživanja dodatno objašnjavaju reguliranje transkripcije posredovano čimbenicima transkripcije TCF1 i LEF1 u signalnom putu Wnt u astrocitnim tumorima mozga. Pokazano je da izraženost TCF1 i LEF1 varira ovisno o gradusu tumora. Tumori

najvišeg gradusa, glioblastomi, imali su umjerenu i jaku izraženost TCF1 u 80% slučajeva, dok je ekspresija čimbenika transkripcije LEF1 okarakterizirana kao umjerena i jaka u 90% analiziranih uzoraka. Nasuprot tome, astrocitni tumori najnižeg gradusa, pilocitični astrocitomi, imali su nisku razinu ekspresije u 61.1% uzoraka za oba čimbenika transkripcije, TCF1 i LEF1. Umjerena izraženost proteina TCF1 i LEF1 nije se mogla povezati s malignom progresijom.

Postoji mali broj studija kojima je istražena uloga signalnog puta Wnt u astrocitomima čovjeka (107,154). Sareddy i sur. (107) dokazali su jaku izraženost TCF4 i LEF1 u stanicama difuznih i anaplastičnih astrocitoma te glioblastoma, a koimunoprecipitacijom su pokazali da do aktivacije navedenih čimbenika transkripcije dovodi β -katenin premješten u jezgru. Jačina signala za TCF4 i LEF1 je u stanicama tumora bila statistički značajno veća u odnosu na kontrolne uzorke tkiva zdravog mozga. Opažena je i pozitivna korelacija jačine izraženosti TCF4 i LEF1 u odnosu na gradus astrocitoma. Ovo je u suglasju s našim rezultatima, iako smo mi u svom istraživanju analizirali druge članove obitelji TCF/LEF. Velika podudarnost u razini izraženosti TCF1 i LEF1 u našim uzorcima dala je naslutiti da bi ta dva proteina mogla biti povezana, što je i dokazano izračunom koji je pokazao statistički značajnu korelaciju ($r_s=0.515$, $df=38$, $p=0.001$). Jako zanimljivom i statistički značajnom, pokazala se i pozitivna korelacija oba ispitana čimbenika transkripcije s gradusom tumora. Analiza varijanci izvedena na ukupnom uzorku upućuje na značajne razlike u vrijednostima slabe izraženosti TCF1 ($F=2.804$; $p=0.045$), slabe izraženosti LEF1 ($F=4.255$; $p=0.008$) i jake izraženosti LEF1 ($F=5.498$; $p=0.002$) u odnosu na stupanj malignosti. Pokazalo se da glioblastomi imaju najmanji broj stanica sa slabom ekspresijom TCF1 i LEF1 i najveći broj stanica s jakom ekspresijom LEF1. F-vrijednosti dvije varijable (LEF1 jako izražen i LEF1 slabo izražen) pokazuju statistički značajne razlike između astrocitoma (II, III) i glioblastoma ($p<0.02$). Nakon analize svih dostupnih varijabli, diskriminantna funkcija je izdvojila jednu varijablu – jaku izraženost LEF1, u odnosu na koju se astrocitom gradusa II, III značajno razlikuju od glioblastoma.

Postoji nekoliko razloga za pojačanu izraženost TCF1 i LEF1: konstitutivna aktivacija puta Wnt, prisustvo mutacija u genima/proteinima koji u njemu sudjeluju, poremećaj u regulaciji samih čimbenika transkripcije, a posebice u proteinima koji sudjeluju u negativnoj regulaciji TCF1 i LEF1, bilo kao represori ili enzimi za kovalentnu modifikaciju.

Iako naši rezultati dobiveni analizom TCF1 i LEF1 mogu navesti na zaključak da svi članovi iz obitelji TCF/LEF imaju funkcije koje su dijelom istovjetne, što bi jednom članu ove obitelji proteina omogućilo da preuzme ulogu drugog, poznato je da se uloga ovih proteina ne može generalizirati. Brojna su istraživanja pokazala da utjecaj proteina iz obitelji TCF/LEF ovisi o staničnom kontekstu. Zanimljivo je, na primjer, da je u tumorima debelog crijeva pojačano izražen oblik proteina LEF1 normalne duljine. Njegova je prisutnost u stanici posljedica poremećenog prijenosa signala u signalnom putu Wnt, dok je ekspresija kraćeg, inhibitorynog oblika LEF1, u tom slučaju, smanjena ili posve utišana (168,169). U zdravim stanicama debelog crijeva opažena je izraženost samo TCF1 i TCF4, dok ekspresija TCF3 i LEF1 nije mjerljiva (166).

Imajući u vidu činjenicu da β -katenin stupa u interakciju s čimbenicima transkripcije iz obitelji TCF/LEF, zanimljivo bi bilo ispitati njegovu izraženost na istim uzorcima. U prijašnjim istraživanjima našeg laboratorija analizirana je izraženost β -katenina u neuroepitelnim tumorima koji uključuju i astrocitne tumore (108). Rezultati te studije pokazali su povišenu izraženost β -katenina u 53.1% uzoraka te njegov smještaj u jezgri u 59.4% slučajeva. Nekoliko je istraživačkih skupina, uključujući i našu, pokazalo da je β -katenin u glijalnim tumorima, osim u citoplazmi, smješten i u jezgri (108,170,171).

Narušavanje fiziološke funkcije proteina Dishevelled zbog genskih promjena, baš kao i promjene u izraženosti proteina koji sudjeluju u prijenosu signala signalnim putem Wnt nizvodno od čimbenika transkripcije TCF1 i LEF1, može dovesti do neželjenih posljedica. Zbog ovog se poremećaja u stanici remete brojni biološki procesi, što se odražava i na susjedne stanice, te naposljetku na čitavo tkivo u kojem se promjena dogodila.

Rezultati ovog rada jasno pokazuju da su važne regulatorne komponente signalnog puta Wnt promijenjene u astrocitnim tumorima mozga. Također je vidljiva razlika u njihovoj izraženosti u različitim histopatološkim tipovima i gradusima tumora. Prvenstveno treba naglasiti da obrazac izraženosti DVL3 prati obrazac ispoljavanja onkoproteina. Sve navedeno pokazuje da pojedine molekule (DVL3, TCF1 i LEF1) ispitane u ovom istraživanju mogu poslužiti kao molekularni biljezi progresije, a kao statistički najznačajniji se pokazao LEF1. Također bi bilo zanimljivo istražiti njihovu potencijalnu ulogu kao prognostičkih biljega. Otkrivanje promjena molekula uključenih u prijenos signala signalnim putem Wnt postavlja temelje za razumijevanje procesa nastanka i invazivnosti tumora te otvara mogućnost

terapeutskih djelovanja nudeći molekularne mete. Osim ove izravne primjene postoji i dalekosežnija upotreba, na primjer, razvoj specifičnih lijekova koji bi mogli inhibirati prijenos signala u signalnom putu Wnt, za koje rezultati naših istraživanja mogu poslužiti kao znanstvena podloga te u konačnici pomoći u povećanju preživljenja i boljoj perspektivi oboljelih od tumora mozga čovjeka.

7. ZAKLJUČCI

1. Mikrosatelitna nestabilnost (MSI) je konstantno prisutna kroz graduse astrocitnih tumora s češćom pojavnošću u nižim gradusima (AII) iz čega možemo zaključiti da ovaj tip genske promjene prisutan rano u nastanku astrocitoma. Velike delecije značajnije su bile pridružene najvišem gradusu iz čega zaključujemo da imaju ulogu u progresiji. Najveći postotak MSI imali su difuzni astrocitomi (53.8%) analizirani s biljgom D1S468 ($p=0.008$), dok je LOH bio najzastupljeniji kod glioblastoma (31.2%) ispitanih biljgom D3S1262 ($p=0.007$).
2. Razina izraženosti proteina DVL1, DVL2 i DVL3 niti njihov smještaj u stanici nisu pokazali statistički značajnu korelaciju s genskim promjenama pripadajućih polimorfnih mikrosatelitnih biljega što upućuje da otkrivene genetičke promjene nisu jedini način regulacije izraženosti.
3. Izraženost proteina DVL1 karakteristična je za ranije stadije nastanka astrocitnih tumora (pilocitični astrocitomi), dok njegova izraženost u glioblastomu pada. Protein DVL2 pokazivao je relativno konstantnu razinu izraženosti kroz graduse bez statistički značajnih razlika između različitih stupnjeva malignosti. Izraženost proteina DVL3 povećavala se s gradusom astrocitoma.
4. Proteini DVL1 i DVL3 u ukupnom su uzorku bili negativno korelirani ($r_s=-0.363$, $p=0.002$), gdje je izraženost DVL1 bila jače pridružena pilocitičnim astrocitomima, a DVL3 glioblastomima. Ovaj nalaz sugerira da DVL1 ima značajniju ulogu u ranijim fazama razvoja astrocitoma dok je DVL3 vezan uz progresiju tumora.
5. Analiza raspodjele substanične lokalizacije signala pokazala je da su preparati sa slabijim intenzitetom signala DVL1 ($p<0.001$), DVL2 ($p<0.001$) i DVL3 ($p=0.004$) imali lokalizaciju pretežno ograničenu na citoplazmu (i membranu) dok se kod preparata s visokim udjelom stanica jakog signala, obojenje osim u citoplazmi pojavljivalo i u jezgri.
6. Rezultati analize aktivatora transkripcije signalnog puta Wnt jasno pokazuju da glioblastomi imaju najmanji broj stanica sa slabom ekspresijom TCF1 i LEF1 te najveći broj stanica s jakom ekspresijom LEF1 što navodi na zaključak da je signalni

put Wnt znatno jače aktiviran u najvišem gradusu astrocitoma. U ovom istraživanju jasno je uspostavljena pozitivna korelacija između čimbenika transkripcije TCF1 i LEF1 smještenih u jezgri stanica astrocitnih tumora mozga ($r_s=0.474$, $p<0.001$), što navodi na zaključak da su oba čimbenika transkripcije uključena u krajnji ishod aktivacije puta Wnt.

7. Međusobnom bivarijantnom korelacijom svih analiziranih proteina dobivena je statistički značajna pozitivna korelacija između proteina DVL3 i TCF1 ($r_s=0.410$, $p=0.020$) i DVL3 i LEF1 ($r_s=0.475$, $p=0.006$). Povećana ekspresija DVL3 (koja je povezana s njegovim prebacivanjem u jezgri) mogla bi rezultirati jačanjem transkripcijskog djelovanja TCF1 i LEF1 stimulirajući aktivnost Wnt signalizacije.
8. Dobivena je statistički značajna pozitivna korelacija razine izraženosti DVL3 ($r_s=0.756$, $df=70$, $p<0.001$), TCF1 ($r_s=0.272$, $p=0.008$) i LEF1 ($r_s=0.417$, $p<0.001$) te statistički značajna negativna korelacija razine izraženosti DVL1 ($r_s=-0.479$, $p<0.001$) u odnosu na gradus astrocitoma. Ovaj nalaz sugerira da se DVL3 u astrocitnim tumorima ponaša poput onkogeni i djeluje aktivirajuće na čimbenike transkripcije TCF1 i LEF1 te bismo ove 3 molekule mogli predložiti kao dobre biljege progresije astrocitnih tumora mozga.

8. SAŽETAK

Astroцитomi su najčešći primarni tumori središnjeg živčanog sustava. Prema klasifikaciji WHO u astroцитnim tumorima postoje 4 gradusa/stupnja malignosti, ovisno o njihovoj histologiji, molekularnim karakteristikama i prognozi, gdje je gradus IV (glioblastom) najsmrtonosniji i još uvijek bez učinkovite terapije. Cilj disertacije bio je istražiti promjene gena i proteina obitelji Dishevelled i čimbenika transkripcije TCF1 i LEF1, molekularnih komponenti signalnog puta Wnt, u astroцитnim tumorima mozga i usporediti rezultate s kliničkim parametrima. Četiri odabrana mikrosatelitna biljega za gene *DVL1* (D1S468 i D1S243), *DVL2* (D17S960) i *DVL3* (D3S1262) pokazala su određen broj uzoraka s MSI i LOH, genskim promjenama koje doprinose stanju nestabilnosti genoma tumorskih stanica. Najveći postotak MSI (53.8%) imali su difuzni astroцитomi analizirani biljekom D1S468 ($p=0.008$), dok je LOH bio najzastupljeniji kod glioblastoma (31.2%) ispitanih biljekom D3S1262 ($p=0.007$). Rezultati dobiveni na ukupnom uzorku upućuju da je pojavnost mikrosatelitne nestabilnosti konstantno prisutna kroz graduse s tim da je nešto češća u nižim gradusima te može biti uzrok nastanka astroцитoma, dok su velike delecije značajnije pridružene najvišem gradusu i imaju ulogu u progresiji. Razina izraženosti proteina *DVL1*, *DVL2* i *DVL3* nije pokazala statistički značajnu korelaciju s genskim promjenama, no opažene su statistički značajne razlike u broju stanica s određenom izraženošću pojedinog proteina između gradusa. Međusobnom bivarijantnom korelacijom svih analiziranih proteina dobivena je statistički značajna pozitivna korelacija između proteina *DVL3* i TCF1 ($p=0.020$), *DVL3* i LEF1 ($p=0.006$), TCF1 i LEF1 ($p=0.021$), dok su *DVL1* i *DVL3* bili negativno korelirani ($p=0.002$). *DVL1* je bio negativno koreliran ($p<0.001$) s gradusom astroцитoma za razliku od *DVL3* ($p<0.001$), TCF1 ($p=0.008$) i LEF1 ($p<0.001$) koji su pokazali pozitivnu korelaciju sa stupnjem malignosti sugerirajući uključenost ovih proteina u malignu progresiju. Dobiveni rezultati doprinose boljem razumijevanju molekularnog profila astroцитnih tumora mozga te bi mogli poslužiti kao molekularni biljezi progresije.

9. SUMMARY

Changes in gene structure and protein expression of DVL-1, DVL-2, DVL-3 and transcription factors TCF-1 and LEF-1 in astrocytic brain tumors

Anja Kafka, 2017

Astrocytomas are the most common primary tumors of the central nervous system. According to the WHO classification, there are four grades of astrocytoma, considering their histology, molecular characteristics and prognosis, where the grade IV (glioblastoma) is the deadliest form and still without effective therapy. The aim of this dissertation was to investigate changes in gene structure and protein expression of Dishevelled family and transcription factors TCF1 and LEF1, the molecular components of the Wnt signaling pathway, in astrocytic brain tumors and compare results with clinical parameters. Four selected microsatellite markers for *DVL1* (D1S468 and D1S243), *DVL2* (D17S960) and *DVL3* (D3S1262) genes have shown a significant number of samples demonstrating MSI and LOH, genetic changes that contribute to the genome instability in cancer. Diffuse astrocytomas (WHO grade II) analyzed with D1S468 ($p=0.008$) have shown the highest percentage of MSI (53.8%), while LOH was the most common in glioblastoma (31.2%) analysed with D3S1262 ($p=0.007$). The results obtained on the total sample indicate that the microsatellite instability is constantly present, with a more frequent appearance in lower grades and may be the cause of astrocytoma formation, whereas large deletions are significantly associated with the highest grade and have a role in progression. The levels of DVL1, DVL2 and DVL3 protein expression did not show statistically significant correlation with genetic changes. Nevertheless, statistically significant differences in the number of cells with certain level of expression of a single protein between the grades were observed. Bivariate correlation of all analyzed proteins showed a statistically significant positive correlation between DVL3 and TCF1 ($p=0.020$), DVL3 and LEF1 ($p=0.006$), TCF1 and LEF1 ($p=0.021$), while DVL1 and DVL3 were negatively correlated ($p=0.002$). DVL1 was also negatively correlated ($p<0.001$) with astrocytoma grade, while DVL3 ($p<0.001$), TCF1 ($p=0.008$) and LEF1 ($p<0.001$) showed positive correlation with malignancy grade suggesting involvement of these proteins in malignant progression. These results contribute to a better understanding of the molecular profile of astrocytic brain tumors and could serve as molecular markers of progression.

10. LITERATURA

1. Ostrom QT, Gittleman H, Stetson L, Virk SM, Barnholtz-Sloan JS. Epidemiology of gliomas. *Cancer Treat Res.* 2015;163:1-14.
2. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. WHO classification of tumours of the central nervous system. 4. izd. Lyon: IARC; 2016. str. 312.
3. Perry A, Wesseling P. Histologic classification of gliomas. *Handb Clin Neurol.* 2016;134:71–95.
4. Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, Reifenberger G, von Deimling A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 2015;129:829-48.
5. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, i sur. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114:97-109.
6. Otani R, Uzuka T, Keisuke U. Classification of adult diffuse gliomas by molecular markers - a short review with historical footnote. *Jpn J Clin Oncol.* 2016;47:2-6.
7. Ohgaki H. Epidemiology of brain tumors. *Methods Mol Biol.* 2009;472:323-42.
8. Wohner A. Epidemiology and brain tumors: Practical usefulness. *Eur Assoc Neurooncol Mag.* 2013;3;56-60.
9. Rice T, Lachance DH, Molinaro AM, Eckel-Passow JE, Walsh KM, Barnholtz-Sloan J, i sur. Understanding inherited genetic risk of adult glioma - a review. *Neurooncol Pract.* 2016;3:10-16.
10. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010;119:7–35.
11. Allen NJ. Astrocyte regulation of synaptic behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:1-722.
12. Nag S. Morphology and properties of astrocytes. *Methods Mol Biol.* 2011;686:69-100.
13. Molofsky AV, Deneen B. Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. *Glia.* 2015;63:1320-9.
14. Walker C, Baborie A, Crooks D, Wilkins S, Jenkinson MD. Biology, genetics and imaging of glial cells tumours. *Br J Radiol.* 2011;84:90-106.
15. Kanu OO, Hughes B, Di C, Lin N, Fu J, Bigner DD, i sur. Glioblastoma multiforme oncogenomics and signaling pathways. *Clin Med Oncol.* 2009;3:39–52.

16. Alcantara Llaguno SR, Chen J, Parada LF. Signaling in malignant astrocytomas: role of neural stem cells and its therapeutic implications. *Clin Cancer Res.* 2009;15:7124-9.
17. Matias D, Predes D, Niemeyer Filho P, Abreu JG, Lima FRS, Moura Neto V. Microglia-glioblastoma interactions: New role for Wnt signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2017;pii: S0304-419X(17)30102-6.
18. Pazanin L. Histopathology of glial tumors. *Medicina fluminensis* 2011;47:157-66.
19. Matyja E, Grajkowska W, Stępień K, Naganska E. Heterogeneity of histopathological presentation of pilocytic astrocytoma - diagnostic pitfalls. A review. *Folia Neuropathol.* 2016;54:197-211.
20. Coelho J, Nunes S, Salgado D. Spontaneous malignant transformation of a pilocytic astrocytoma of cerebellum: Case Report. *Child Neurol Open.* 2015;2:1-5.
21. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol.* 2015;17Suppl 4:iv1-iv62.
22. Berger M, Hervey-Jumper S, Wick W. Astrocytic gliomas WHO grades II and III. *Handb Clin Neurol.* 2016;134:345–60.
23. Marko NF, Weil RJ. The molecular biology of WHO grade II gliomas. *Neurosurg Focus.* 2013;34:E1.
24. Paw I, Carpenter RC, Watabe K, Debinski W, Lo HW: Mechanisms regulating glioma invasion. *Cancer Lett.* 2015;1:1-7.
25. The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008;455:1061–8.
26. Brennan C. Genomic profiles of glioma. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2011;11:291–7.
27. Appin CL, Brat DJ. Molecular genetics of gliomas. *Cancer J.* 2014;20:66-72.
28. Nasser MM, Mehdipour P. Exploration of Involved Key Genes and Signaling Diversity in Brain Tumors. *Cell Mol Neurobiol.* 2017;1–27.
29. Appin CL1, Brat DJ. Molecular pathways in gliomagenesis and their relevance to neuropathologic diagnosis. *Adv Anat Pathol.* 2015;22:50-8.
30. Masui K, Mischel PS, Reifenberger G. Molecular classification of gliomas. *Handb Clin Neurol.* 2016;134:97-120.
31. Riemenschneider MJ, Reifenberger G. Astrocytic tumors. *Recent Results Cancer Res.* 2009;171:3-24.

32. Gessi M, Engels AC, Lambert S, Rothämel T, von Hornstein S, Collins VP, i sur. Molecular characterization of disseminated pilocytic astrocytomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2016;42:273-8.
33. Riemenschneider MJ, Reifenberger G. Molecular neuropathology of low-grade gliomas and its clinical impact. *Adv Tech Stand Neurosurg.* 2010;35:35-64.
34. Shibahara I, Sonoda Y, Kanamori M, Saito R, Yamashita Y, Kumabe T, i sur. IDH1/2 gene status defines the prognosis and molecular profiles in patients with grade III gliomas. *Int J Clin Oncol.* 2012;17:551-61.
35. Riemenschneider MJ, Reifenberger G. Molecular neuropathology of gliomas. *Int J Mol Sci.* 2009;10:184-212.
36. Brennan C, Verhaak RGW, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, i sur. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 2013;155:462–77.
37. Karsy M, Neil JA, Guan J, Mahan MA, Colman H, Jensen RL. A practical review of prognostic correlations of molecular biomarkers in glioblastoma. *Neurosurg Focus.* 2015;38:E4.
38. Boots-Sprenger SH, Sijben A, Rijntjes J, Tops BB, Idema AJ, Rivera AL, i sur. Significance of complete 1p/19q co-deletion, IDH1 mutation and MGMT promoter methylation in gliomas: use with caution. *Mod Pathol.* 2013;26:922-9.
39. Bleeker FE, Molenaar RJ, Leenstra S. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *J Neurooncol.* 2012;108:11-27.
40. Park J-I, Venteicher AS, Hong JY, Choi J, Jun S, Shkreli M, i sur. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature.* 2009;460:66–72.
41. Nakamura M, Watanabe T, Klangby U, Asker C, Wiman K, Yonekawa Y, i sur. p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol.* 2001;11:159-68.
42. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, i sur. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 2004;64:6892-9.
43. Knudsen ES1, Wang JY. Targeting the RB-pathway in cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2010;16:1094-9.
44. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007;170:1445-53.
45. Kita D, Yonekawa Y, Weller M, Ohgaki H. PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol.* 2007;113:295-302.

46. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646-74.
47. Biernat W, Huang H, Yokoo H, Kleihues P, Ohgaki H. Predominant expression of mutant EGFR (EGFRvIII) is rare in primary glioblastomas. *Brain Pathol*. 2004;14:131-6.
48. Rossi M, Magnoni L, Miracco C, Mori E, Tosi P, Pirtoli L, et al. β -catenin and Gli1 are prognostic markers in glioblastoma. *Cancer Biol Ther*. 2011;11:753-61.
49. Akhavan D, Cloughesy TF, Mischel PS. mTOR signaling in glioblastoma: lessons learned from bench to bedside. *Neuro Oncol*. 2010;12:882-9.
50. Hirose Y, Sasaki H, Abe M, Hattori N, Adachi K, Nishiyama Y, et al. Subgrouping of gliomas on the basis of genetic profiles. *Brain Tumor Pathol*. 2013;30:203-8.
51. Nusse R, Varmus H. Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. *EMBO*. 2012;31:2670–84.
52. Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:387-98.
53. Mulligan KA, Cheyette BNR. Wnt signaling in vertebrate neural development and function. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2012;7:774–87.
54. Varela-Nallar L, Inestrosa NC. Wnt signaling in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Front Cell Neurosci*. 2013;7:1-11.
55. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*. 2009;17:9–26.
56. Pecina-Slaus N. Wnt signal transduction pathway and apoptosis: a review. *Cancer Cell Int*. 2010;10:22-6.
57. Patapoutian A, Reichardt LF. Roles of wnt proteins in neural development maintenance. *Curr Opin Neurobiol*. 2010;10:392-9.
58. Howng SL, Wu CH, Cheng TS, Sy WD, Lin PC, Wang C, et al. Differential expression of Wnt genes, beta-catenin and E-cadherin in human brain tumors. *Cancer Lett*. 2002;183:95-101.
59. Cadigan KM, Waterman ML. TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4.
60. Xu W, Kimelman D. Mechanistic insights from structural studies of β -catenin and its binding partners. *J Cell Sci*. 2007;120:3337–43.
61. Stamos JL, Weis WI. The β -catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5:1-16.

62. Ravindranath A, O'Connell A, Johnston PG, El-Tanani MK. The role of LEF/TCF factors in neoplastic transformation. *Current Mol Med.* 2008;8:38-50.
63. Shitashige M, Hirohashi S, Yamada T. Wnt signaling inside the nucleus. *Cancer Sci.* 2008;99:631-7.
64. Polakis P. Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4.
65. Wallmen B, Schrempp M, Hecht A. Intrinsic properties of Tcf1 and Tcf4 splice variants determine cell-type-specific Wnt/ β -catenin target gene expression. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:9455-69.
66. Pećina-Šlaus N, Kafka A, Lechpammer M. Molecular genetics of intracranial meningiomas with emphasis on canonical Wnt signalling. *Cancers* 2016;8:67-88.
67. Daniels DL, Weis WI. β -catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol.* 2005;12:364-71.
68. Boutros M, Mlodzik M. Dishevelled: at the crossroads of divergent intracellular signaling pathways. *Mech Dev* 1999;83:27-37.
69. Lee Y-N, Gao Y, Wang H-y. Differential mediation of the wnt canonical pathway by mammalian Dishevelleds-1, -2, and 3. *Cell Signal.* 2008;20:443-52.
70. Dillman AR, Minor PJ, Sternberg PW. Origin and evolution of dishevelled. *G3(Bethesda)* 2013;3:251-62.
71. Gao C, Chen YG. Dishevelled: The hub of wnt signaling. *Cell Signal.* 2010;22:717-27.
72. Kafka A, Bašić-Kinda S, Pećina-Šlaus N. The cellular story of Dishevelleds. *Croat Med J* 2014;55:459-67.
73. Hino S, Michiue T, Asashima M, Kikuchi A. Casein kinase I epsilon enhances the binding of Dvl-1 to Frat-1 and is essential for Wnt-3a-induced accumulation of beta-catenin. *J Biol Chem.* 2003;278:14066-73.
74. Wong HC, Bourdelas A, Krauss A, Lee HJ, Shao Y, Wu D, et al. Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol Cell.* 2003;12:1251-60.
75. Kafka A, Bašić-Kinda S, Pećina-Šlaus N. The cellular story of Dishevelleds. *Croat Med J.* 2014;55:459-67.
76. Xu W, He X. DEEP insights through the DEP domain. *Structure.* 2010;18:1223-5.
77. Wallingford JB, Habas R. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development.* 2005;132:4421-36.

78. Weitzman JB. Dishevelled nuclear shuttling. *J Biol.* 2005;4:1.
79. Itoh K, Brott BK, Bae G, Ratcliffe MJ, Sokol SY. Nuclear localization is required for Dishevelled function in Wnt/ β -catenin signaling. *J Biol.* 2005;4:2.
80. Gan X, Wang J, Ying X, Wu Z, Li Y, Li L. Nuclear Dvl, c-Jun, β -catenin, and TCF form a complex leading to stabilization of β -catenin-TCF interaction. *J Cell Biol.* 2008;180:1087-100.
81. Yanfeng WA, Berhane H, Mola M, Singh J, Jenny A, Mlodzik M. Functional dissection of phosphorylation of Dishevelled in *Drosophila*. *Dev Biol.* 2011;360:132–42.
82. Jung H, Kim B-G, Han WH, Lee JH, Cho J-Y, Park WS, et al. Ubiquitination of Dishevelled by Usp14 is required for Wnt signaling. *Oncogenesis.* 2013;2:e64.
83. Keith A Wharton, Jr. Running with the Dvl: Proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction. *Dev Biol.* 2003;253:1-17.
84. Arce L, Yokoyama NN, Waterman ML. Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene.* 2006;25:7492-504.
85. Arce L, Pate KT, Waterman ML. Groucho binds two conserved regions of LEF-1 for HDAC-dependent repression. *BMC Cancer.* 2009;9:159-72.
86. Vacik T, Lemke G. Dominant-negative isoforms of Tcf/Lef proteins in development and disease. *Cell Cycle.* 2011;10:4199-200.
87. Hrckulak D, Kolar M, Strnad H, Korinek V. TCF/LEF transcription factors: An update from the internet resources. *Cancers.* 2016;8:piiE70.
88. Fishel R. Mismatch repair. *J Biol Chem.* 2015;290:26395–403.
89. Pećina-Šlaus N, Bukovac A, Salamon I, Kafka A. Microsatellite instability as a driving force for cancer progression. *Cancer Hypotheses.* 2017;1:1-16.
90. Yamamoto H, Imai K. Microsatellite instability: an update. *Arch Toxicol.* 2015;89:899–921.
91. Tóth G, Gáspári Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.* 2000;10:967–81.
92. Bhargava A, Fuentes FF. Mutational dynamics of microsatellites. *Mol Biotechnol.* 2010;44:250-66.
93. Hause RJ, Pritchard CC, Shendure J, Salipante SJ. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat Med.* 2016;22:1342-50.

94. Shastry BS. SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods Mol Biol.* 2009;578:3–22.
95. Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning – a laboratory manual (Volume 2)*. 4. izd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
96. Pećina-Šlaus N. *Odabrane metode molekularne biologije - laboratorijski priručnik*. 1. izd. Zagreb: Medicinska naklada d.o.o.; 2009.
97. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:1215.
98. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-73.
99. Zadeh MD, Amini R, Firoozray M, Derakhshandeh-Peykar P. Frequent homozygous deletion of p16/CDKN2A gene in malignant gliomas of Iranian patients. *Pak J Biol Sci.* 2007;10:4246–50.
100. Ono Y, Ueki K, Joseph JT, Louis DN. Homozygous deletions of the CDKN2/p16 gene in dural hemangiopericytomas. *Acta Neuropathol.* 1996;91:221–5.
101. Shang S, Hua F, Hu ZW. The regulation of β -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget.* 2017;8:33972-89.
102. Johnson ML, Recker RR. Exploiting the WNT signaling pathway for clinical purposes. *Curr Osteoporos Rep.* 2017;15:153-61.
103. Mason WP, Cairncross JG. The expanding impact of molecular biology on the diagnosis and treatment of gliomas. *Neurology.* 2008;71:365-73.
104. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, i sur. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell.* 2010;17:98–110.
105. Sturm D, Witt H, Hovestadt V, i sur. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell.* 2012;22:425–37.
106. Weathers SP, Gilbert MR. Advances in treating glioblastoma. *F1000Prime Rep.* 2014;6:46-54.
107. Sareddy GR, Panigrahi M, Challa S, Mahadevan A, Babu PP. Activation of Wnt/ β -catenin/Tcf signaling pathways in human astrocytomas. *Neurochem Int.* 2009;55:307-17.

108. Nikuseva Martić T, Pecina-Slaus N, Kusec V, Kokotović T, Musinović H, Tomas D, i sur. Changes of AXIN-1 and β -catenin in neuroepithelial brain tumors. *Pathol Oncol Res.* 2010;16:75-9.
109. Li X, Xu Y, Chen Y, Chen S, Jia X, Sun T, i sur. SOX2 promotes tumor metastasis by stimulating epithelial-to-mesenchymal transition via regulation of Wnt/ β -catenin signal network. *Cancer Lett.* 2013;336:379-89.
110. Torkamani A, Schork NJ. Identification of rare cancer driver mutations by network reconstruction. *Genome Res.* 2009;19:1570-8.
111. Jovčevska I, Zupanec N, Urlep Ž, Vranič A, Matos B, Stokin CL, i sur. Differentially expressed proteins in glioblastoma multiforme identified with a nanobody-based anti-proteome approach and confirmed by OncoFinder as possible tumor-class predictive biomarker candidates. *Oncotarget.* 2017.
112. Kinnersley B, Labussière M, Holroyd A, Di Stefano AL, Broderick P, Vijayakrishnan J, i sur. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for glioma. *Nat Commun.* 2015;6:8559-67.
113. Nikuseva-Martić T, Beros V, Pećina-Slaus N, Pećina HI, Bulić-Jakus F. Genetic changes of CDH1, APC, and CTNNB1 found in human brain tumors. *Pathol Res Pract.* 2007;203:779-87.
114. Breivik J, Gaudernack G. Genomic instability, DNA methylation, and natural selection in colorectal carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 1999;9:245-54.
115. Tomlinson IP, Novelli MR, Bodmer WF. The mutation rate and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:14800-3.
116. Tsukamoto K, Ito N, Yoshimoto M, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G, Nakamura Y, Emi M. Allelic loss on chromosome 1p is associated with progression and lymph node metastasis of primary breast carcinoma. *Cancer.* 1998;82:317-22.
117. Benn DE, Dwight T, Richardson AL, Delbridge L, Bambach CP, Stowasser M, i sur. Sporadic and familial pheochromocytomas are associated with loss of at least two discrete intervals on chromosome 1p. *Cancer Res.* 2000;60:7048-51.
118. Girard L, Zöchbauer-Müller S, Virmani AK, Gazdar AF, Minna JD. Genome-wide allelotyping of lung cancer identifies new regions of allelic loss, differences between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer, and loci clustering. *Cancer Res.* 2000;60:4894-906.
119. Kurashina K, Yamashita Y, Ueno T, Koinuma K, Ohashi J, Horie H, I sur. Chromosome copy number analysis in screening for prognosis-related genomic regions in colorectal carcinoma. *Cancer Sci.* 2008;99:1835-40.

120. Mizoguchi M, Yoshimoto K, Ma X, Guan Y, Hata N, Amano T, i sur. Molecular characteristics of glioblastoma with 1p/19q co-deletion. *Brain Tumor Pathol.* 2012;29:148-53.
121. Castro GN, Cayado-Gutiérrez N, Moncalero VL, Lima P, De Angelis RL, Chávez V, i sur. Hsp27 (HSPB1): a possible surrogate molecular marker for loss of heterozygosity (LOH) of chromosome 1p in oligodendrogliomas but not in astrocytomas. *Cell Stress Chaperones.* 2012;17:779-90.
122. White GR, Stack M, Santibanez-Koref M, Liscia DS, Venesio T, Wang JC i sur. High levels of loss at the 17p telomere suggest the close proximity of a tumor suppressor. *Br J Cancer.* 1996;74:863-70.
123. Konishi H, Takahashi T, Kozaki K, Yatabe Y, Mitsudomi T, Fujii Y, i sur. Detailed deletion mapping suggests the involvement of a tumor suppressor gene at 17p13.3, distal to p53, in the pathogenesis of lung cancers. *Oncogene.* 1998;17:2095-100.
124. Wiper DW, Zanotti KM, Kennedy AW, Belinson JL, Casey G. Analysis of allelic imbalance in chromosome 17p13 in stage I and stage II epithelial ovarian cancers. *Gynecol Oncol.* 1998;71:77-82.
125. Orellana C, Hernandez-Marti M, Martinez F, Castel V, Millan JM, Alvarez-Garijo JA, i sur. Pediatric brain tumors: loss of heterozygosity at 17p and TP53 gene mutations. *Cancer Genet Cytogenet.* 1998;102:93-9.
126. Lee SH, Kim JH, Rhee CH, Kang YS, Lee JH, Hong SI, i sur. Loss of heterozygosity on chromosome 10, 13q(Rb), 17p, and p53 gene mutations in human brain gliomas. *J Korean Med Sci.* 1995;10:442-8.
127. Hu J, Jiang C, Ng HK, Pang JC, Tong CY, Chen S. Chromosome 17p may harbour multiple tumor suppressor genes associated with primary glioblastoma multiforme. *Chin J Cancer Res.* 2002;14:60-3
128. Hu J, Jiang C, Ng HK, Pang JC, Tong CY, Chen S. Chromosome 3 may harbour multiple tumor suppressor genes associated with primary glioblastoma multiforme. *Chin J Cancer Res.* 2002;14:183-6.
129. Hui AB, Lo KW, Yin XL, Poon WS, Ng HK. Detection of multiple gene amplifications in glioblastoma multiforme using array-based comparative genomic hybridization. *Lab Invest.* 2001;81:717-23.
130. Dams E, Van de Kelft EJ, Martin JJ, Verlooy J, Willems PJ: Instability of microsatellites in human gliomas. *Cancer Res.* 1995;55:1547-9.
131. Zhu J, Guo SZ, Beggs AH, Maruyama T, Santarius T, Dashner K, Olsen N, Wu JK, Black P: Microsatellite instability analysis of primary human brain tumors. *Oncogene.* 1996;12:1417-23.

132. Izumoto S, Arita N, Ohnishi T, Hiraga S, Taki T, Tomita N, Ohue M, Hayakawa T: Microsatellite instability and mutated type II transforming growth factor- β receptor gene in gliomas. *Cancer Lett.* 1997;112:251–6.
133. Leung SY, Chan TL, Chung LP, Chan AS, Fan YW, Hung KN, i sur. Microsatellite instability and mutation of DNA mismatch repair genes in gliomas. *Am J Pathol.* 1998;153:1181-8.
134. Martinez R, Schackert HK, Appelt H, Plaschke J, Baretton G, Schackert G. Low-level microsatellite instability phenotype in sporadic glioblastoma multiforme. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005;131:87–93.
135. Eckert A, Kloor M, Giersch A, Ahmadi R, Herold-Mende C, Hampl JA, i sur. Microsatellite instability in pediatric and adult high-grade gliomas. *Brain Pathol.* 2007;17:146-50.
136. Vladimirova V, Denkhaus D, Soerensen N, Wagner S, Wolff JE, Pietsch T. Low level of microsatellite instability in paediatric malignant astrocytomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2008;34:547-54.
137. Rodríguez-Hernández I, Garcia JL, Santos-Briz A, Hernández-Laín A, González-Valero JM, Gómez-Moreta JA, i sur. Integrated analysis of mismatch repair system in malignant astrocytomas. *PLoS One.* 2013;8:1-10.
138. Karunasena E, McIver LJ, Rood BR, Wu X, Zhu H, Bavarva JH, i sur. Somatic intronic microsatellite loci differentiate glioblastoma from lower-grade gliomas. *Oncotarget.* 2014;5:6003-14.
139. Uematsu K, He B, You L, Xu ZBM, McCormick F, Jablons DM. Activation of the Wnt pathway in non small cell lung cancer:evidence of disheveled overexpression. *Oncogene.* 2003;22:7218-21.
140. Uematsu K, Kanazawa S, You L, He B, Xu Z, Li K, i sur. Wnt pathway activation in Mesothelioma: Evidence of Dishevelled overexpression and transcriptional activity of β -catenin. *Cancer .* 2003;63:4547-51.
141. Okino K, Nagai H, Hatta M, Nagahata T, Yoneyama K, Ohta Y, i sur. Up-regulation and overproduction of DVL-1, the human counterpart of the *Drosophila* dishevelled gene, in cervical squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2003;10:1219-23.
142. Nagahata T, Shimada T, Harada A, Nagai H, Onda M, Yokoyama S, i sur. Amplification, up-regulation and over-expression of DVL-1, the human counterpart of the *Drosophila* disheveled gene, in primary breast cancer. *Cancer Sci.* 2003;10:1219-23.

143. Mizutani K, Miyamoto S, Nagahata T, Konishi N, Emi M, Onda M. Upregulation and overexpression of DVL1, the human counterpart of the *Drosophila* dishevelled gene, in prostate cancer. *Tumori*. 2005;91:546-51.
144. Wei Q, Zhao Y, Yang Z-Q, Dong Q-Z, Dong X-J, Han Y, i sur. Dishevelled family proteins are expressed in non-small cell lung cancer and function differentially on tumor progression. *Lung Cancer*. 2008;62:181-92.
145. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013;13:11-26.
146. Zimmerli D, Hausmann G, Cantù C, Basler K. Pharmacological interventions in the Wnt pathway: Inhibition of Wnt secretion versus disrupting the protein-protein interfaces of nuclear factors. *Br J Pharmacol*. 2017
147. Mlodzik M. The Dishevelled protein family: Still rather a mystery after over 20 years of molecular studies. *Curr Top Dev Biol*. 2016;117:75-91.
148. Krylova O, Messenger MJ, Salinas PC. Dishevelled-1 regulates microtubule stability: A new function mediated by Glycogen Synthase Kinase-3 β . *J Cell Biol*. 2000;151:83-94.
149. Pulvirenti T, Van Der Heijden M, Droms LA, Huse JT, Tabar V, Hall A. Dishevelled 2 signaling promotes self-renewal and tumorigenicity in human gliomas. *Cancer Res*. 2011;71:280-90.
150. Kahlert UD, Suwala AK, Koch K, Natsumeda M, Orr BA, Hayashi M, i sur. Pharmacologic Wnt inhibition reduces proliferation, survival, and clonogenicity of glioblastoma cells. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2015;74:889-900.
151. Lee Y, Lee JK, Ahn SH, Lee J, Nam DH. WNT signaling in glioblastoma and therapeutic opportunities. *Lab Invest*. 2016;96:137-50.
152. Habas R, Dawid IB. Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *J Biol*. 2005;4:2.
153. Wang Y, Wang H. Dvl3 translocates IPMK to the cell membrane in response to Wnt. *Cell Signal*. 2012;24:2389-95.
154. Sareddy GR, Geeviman K, Panigrahi M, Challa S, Mahadevan A, Babu PP. Increased beta-catenin/Tcf signaling in pilocytic astrocytomas: a comparative study to distinguish pilocytic astrocytomas from low-grade diffuse astrocytomas. *Neurochem Res*. 2012;37:96-104.
155. Li J, Guo G, Li J, Hao J, Zhang J, Guo Y, i sur. The expression and significance of dishevelled in human glioma. *J Surg Res*. 2014;192:509-14.

156. Li X-Y, Liu S-L, Cha N, Zhao Y-J, Wang S-C, Li W-N, i sur. Transcription expression and clinical significance of Dishevelled-3 mRNA and δ -catenin mRNA in pleural effusions from patients with lung cancer. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:1-6.
157. Prasad CP, Gupta SD, Rath G, Ralhan R. Wnt signaling pathway in invasive ductal carcinoma of the breast: relationship between beta-catenin, dishevelled and cyclin D1 expression. *Oncology*. 2007;73:112-7.
158. You XJ, Bryant PJ, Jurnak F, Holcombe RF. Expression of Wnt pathway components frizzled and dishevelled in colon cancer arising in patients with inflammatory bowel disease. *Oncol Rep*. 2007;18:691-4.
159. Metcalfe C, Ibrahim AE, Graeb M, de la Roche M, Schwarz-Romond T, Fiedler M, i sur. Dvl2 promotes intestinal length and neoplasia in the ApcMin mouse model for colorectal cancer. *Cancer Res*. 2010;70:6629–38.
160. Stewart DJ. Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106:1-11.
161. Kafka A, Tomas D, Beroš V, Pećina HI, Zeljko M, Pećina-Šlaus N. Brain metastases from lung cancer show increased expression of DVL1, DVL3 and beta-catenin and down-regulation of E-cadherin. *Int J Mol Sci*. 2014;15:10635-51.
162. Zeljko M, Pecina-Slaus N, Nikuseva Martić T, Kusec V, Beros V, Tomas D. Molecular alterations of E-cadherin and beta-catenin in brain metastases. *Front Biosci*. 2011;E3:616-24.
163. Pecina-Slaus N, Cicvara-Pecina T, Kafka A. Epithelial-to-mesenchymal transition: possible role in meningiomas. *Front Biosci*. 2012; E4:889-96.
164. Kim K, Lu Z, Hay ED. Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol Int*. 2002;26:463-76.
165. Nguyen A, Rosner A, Milovanović T, Hope C, Planutis K, Saha B, i sur. WNT pathway component LEF1 mediates tumor cell invasion and is expressed in human and murine breast cancers lacking ErbB2 (her-2/neu) overexpression. *Int J Oncol*. 2005;27:949-56.
166. Najdi R, Holcombe RF, Waterman ML. Wnt signaling and colon carcinogenesis: Beyond APC. *J Carcinog*. 2011;10:5.
167. Nikuševa-Martić T, Serman L, Zeljko M, Vidas Z, Gašparov S, Zeljko HM, i sur. Expression of secreted frizzled-related protein 1 and 3, T-cell factor 1 and lymphoid enhancer factor 1 in clear cell renal cell carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2013;19:545-51.
168. Hovanes K, Li TW, Munguia JE, Truong T, Milovanovic T, Lawrence Marsh J, i sur. Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nat Genet*. 2001;28:53-7.

169. Li TW, Ting JH, Yokoyama NN, Bernstein A, van de Wetering M, Waterman ML. Wnt activation and alternative promoter repression of LEF1 in colon cancer. *Mol Cell Biol.* 2006;26:5284-99.
170. Rossi M, Magnoni L, Miracco C, Mori E, Tosi P, Pirtoli L, et al. β -Catenin and GLI1 are prognostic markers in glioblastoma. *Cancer Biol Ther.* 2011;11:753–61.
171. Liu C, Tu Y, Sun X, Jiang J, Jin X, Bo X, et al. WNT/ β -catenin pathway in human glioma: expression pattern and clinical/prognostic correlations. *Clin Exp Med.* 2008;11:105–12.

11. ŽIVOTOPIS

Anja Kafka rođena je 1. prosinca 1986. u Pakracu, gdje završava osnovnu školu i opću gimnaziju. Diplomirala je 2011. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, te stekla naziv magistre eksperimentalne biologije. Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo upisuje 2012. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te počinje s izradom disertacije pod mentorstvom prof.dr.sc. Nives Pećine-Šlaus. Od 2012. godine zaposlena je kao znanstveni-novak asistent na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom svog zaposlenja bila je suradnik na 6 domaćih i jednom projektu financiranom iz sredstava EU. Sudjeluje u nastavi na 4 kolegija na dodiplomskom studiju, te na 3 kolegija na poslijediplomskim studiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Autorica je 13 znanstvenih radova u časopisima s međunarodnom recenzijom, od kojih je 6 indeksirano u CC, te je i koautorica na 26 kongresnih priopćenja. Prema bazi WoS do sada je citirana 46 puta, a h-indeks joj iznosi 3. Dobitnica je nekoliko stipendija uključujući one Sveučilišta u Zagrebu za akademsku mobilnost (2014.) i potporu doktorandima (2015.), te FEBS (Europskog društva biokemičara) (2015. i 2017.), HDHG (Hrvatskog društva za humanu genetiku) (2016.) i EACR (Europskog društva za istraživanje raka) (2017.). Članica je brojnih međunarodnih i domaćih znanstvenih i stručnih organizacija.