

# Promjene gena DVL1 u intrakranijalnim meningeomima čovjeka

---

**Dragičević, Katarina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:374204>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-11**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Katarina Dragičević

**Promjene gena *DVLI* u intrakranijalnim meningeomima čovjeka**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Katarina Dragičević

**Alterations of *DVL1* gene in human intracranial meningioma**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za neuroonkologiju na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Nives Pećine-Šlaus i suvoditeljstvom doc. dr. sc. Sofije Ane Blažević i predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

## **Zahvala**

*Najljepše se zahvaljujem svojoj mentorici, prof.dr.sc Nives Pećini-Šlaus na ukazanom povjerenju, pomoći i pružanju mogućnosti za izradu ovog diplomskog rada u Laboratoriju za neuroonkologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.*

*Također se zahvaljujem i doc.dr.sc. Sofiji Ani Blažević, suvoditeljici ovog diplomskog rada, na pomoći i svim savjetima tijekom njegovog nastanka.*

*Posebno bih se željela zahvaliti Anji Bukovac na strpljenju, prijateljstvu i najviše na znanju koje mi je prenijela prilikom izrade ovog rada.*

*Veliko hvala i kolegama iz laboratorija Anji Kafki, Petru Brleku, Emiliji Brglez, Mariju Stojanoviću i Borni Puljku na pozitivnoj energiji kojom su me svaki dan okruživali.*

*Za kraj, hvala Luciji, Vidi, Mariji, Mislavu, Mateju i Leu na podršci koju su mi pružali od prvog dana. Posebice hvala mojim roditeljima i bratu na bezuvjetnoj ljubavi kojom sam svaki dan okružena, divni ste.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### PROMJENE GENA *DVLI* U INTRAKRANIJALNIM MENINGEOMIMA ČOVJEKA

Katarina Dragičević  
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Meningeomi su najčešći primarni tumori središnjeg živčanog sustava, koji u manje od 20% slučajeva mogu pokazivati agresivnost, recidive i metastaze. Među signalnim putevima uključenima u progresiju meningeoma nalazi se i signalni put Wnt čiji je središnji medijator protein DVL1 koji inhibira djelovanje destruktivnog kompleksa za razgradnju  $\beta$ -katenina. Uslijed toga se  $\beta$ -katenin nakuplja u citoplazmi i premješta u jezgru gdje potiče transkripciju onkogeno. Budući da je dokazana uloga proteina iz porodice DVL u progresiji tumora središnjeg živčanog sustava, cilj je ovog rada bio istražiti utjecaj promjena gena *DVLI* na progresiju intrakranijalnih meningeoma čovjeka. Izolirana je DNA tumora i periferne krvi pacijenata te su amplificirani mikrosatelitni biljeg D1S468 i genska regija koja kodira domenu PDZ, važnu u prijenosu signala Wnt. Gel-elektroforezom umnoženog biljega D1S468 utvrđeno je postojanje mikrosatelitne nestabilnosti u 9,09% uzoraka i gubitka heterozigotnosti u 6,06% uzoraka. Analizom taljenja visoke rezolucije i Sangerovim sekvenciranjem genske regije PDZ, utvrđene su mutacije u 100% sekvenciranih uzoraka. Rezultati analize pokazali su kako dio otkrivenih mutacija ima štetan učinak na biološku funkciju proteina DVL1, mijenjanjem mjesta prekrajanja ili promjenama okvira čitanja sekvence. Ukupni rezultati ovog istraživanja pokazuju ulogu promjena gena *DVLI* u razvoju intrakranijalnih meningeomima.

47 stranica, 19 slika, 9 tablica, 51 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski jezik

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: intrakranijalni meningeom, *DVLI*, signalni put Wnt, domena PDZ

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

Suvoditelj: doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Ocjenitelji: doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

doc. dr. sc. Romana Gračan

izv. prof. dr. sc. Petra Korać

Rad prihvaćen: 11.01.2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master Thesis

### ALTERATIONS OF *DVLI* GENE IN HUMAN INTRACRANIAL MENINGIOMA

Katarina Dragičević  
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Meningiomas are the most common primary tumours of the central nervous system, which in less than 20% of cases may show aggression, recurrence, and metastasis. Among the signalling pathways involved in meningioma progression is the Wnt signalling pathway. The central mediator of the Wnt signalling pathway is the DVL1 protein which inhibits the destruction complex that targets  $\beta$ -catenin. This results in the accumulation of  $\beta$ -catenin in the cytoplasm and its translocation to the nucleus, where it promotes oncogene transcription. Since it has been shown that proteins from the DVL family play a role in the progression of central nervous system tumours, the aim of this study was to investigate the influence of alterations in the *DVLI* gene on the progression of human intracranial meningiomas. The microsatellite marker D1S468 and the gene region encoding the PDZ domain, important in transducing the Wnt signal, were amplified from DNA that has been isolated from tumour and peripheral blood samples of the patients. Gel electrophoresis of the amplified marker D1S468 revealed the existence of microsatellite instability in 9.09% of samples, loss of heterozygosity in 6.06% of samples. High-resolution melting analysis and Sanger sequencing of the PDZ gene region revealed mutations in 100% of sequenced samples. The results of the analysis showed that some of the detected mutations have a deleterious effect on the biological function of the DVL1 protein, by altering the splice site or shifting the reading frame of the sequence. The overall results of this study demonstrate the role of alterations in *DVLI* gene in intracranial meningiomas.

47 pages, 19 figures, 9 tables, 51 references, original in: Croatian language

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: intracranial meningioma, DVL1, Wnt signaling pathway, PDZ domene

Supervisor: prof. dr. sc. Nives Pećina-Šlaus

Co-supervisor: doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Reviewers: doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

doc. dr. sc. Romana Gračan

izv. prof. dr. sc. Petra Korać

Thesis accepted: 11.01.2021.

# Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1 Tumori središnjeg živčanog sustava .....	1
1.2. Intrakranijalni meningeomi.....	1
1.2.1. Patohistološka podjela intrakranijalnih meningeoma .....	3
1.2.2. Molekularni mehanizmi koji pogoduju razvoju meningeoma .....	4
1.2.3. Liječenje meningeoma .....	6
1.2. Signalni put Wnt .....	6
1.3. Protein „Dishevelled“ .....	9
1.3.1. Struktura proteina „Dishevelled“ .....	10
1.3.2. Genomska nestabilnost, velike delecije i protein „Dishevelled“ .....	12
2. Cilj istraživanja .....	14
3. Materijali i metode .....	15
3.1. Prikupljanje i obrada uzoraka intrakranijalnih meningeoma .....	15
3.2. Izolacija DNA iz tumorskog tkiva metodom fenol/kloroform.....	17
3.3. Izolacija DNA iz krvi metodom isoljavanja.....	18
3.4. Provjera koncentracije i čistoće molekule DNA izolirane iz tumorskog tkiva i krvi.....	19
3.5. Umnažanje metodom lančane reakcije polimerazom .....	19
3.5.1. Umnažanje molekularnog biljega D1S468 metodom PCR u svrhu vizualizacije genskih nestabilnosti na Spreadex gelovima.....	19
3.5.2. Optimizacija uvjeta i umnažanje domene PDZ gena <i>DVLI</i> metodom PCR u svrhu detekcije mutacija Sangerovim sekvenciranjem .....	21
3.6. Provjera uspješnosti umnažanja ciljanih gena horizontalnom elektroforezom u agaroznom gelu ..	23
3.7. Analiza genskih promjena pomoću mikrosatelitnog biljega D1S468 horizontalnom elektroforezom na gelovima Spreadex .....	23
3.8. Utvrđivanje mutacija u domeni PDZ gena <i>DVLI</i> analizom taljenja visoke rezolucije.....	24
3.9. Utvrđivanje vrste mutacija u domeni PDZ Sangerovom metodom sekvenciranja .....	26
3.10. Analiza podataka statističkim metodama.....	27
4. Rezultati .....	28
4.1. Rezultati analize mikrosatelitne nestabilnosti i gubitka heterozigotnosti gena <i>DVLI</i> .....	30
4.2. Rezultati analize taljenja visoke rezolucije i Sangerovog sekvenciranja genske regije <i>DVLI</i> koja kodira domenu PDZ.....	31
5. Rasprava.....	35
6. Zaključci .....	41
7. Literatura.....	42
8. Životopis .....	47



## POPIS KRATICA

AKT1	engl. <i>AKT serine/threonine kinase 1</i>
APC	engl. <i>adenomatous polyposis coli</i> , adenomatozna polipoza kolona
BLAST	engl. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CIN	engl. <i>chromosomal instability</i> , nestabilnost kromosoma
CK1	engl. <i>casein kinase I</i> , kinaza kazeina I
CK2	engl. <i>casein kinase II</i> , kinaza kazeina II
DAAM1	engl. <i>dishevelled associated activator of morphogenesis 1</i>
DVL	engl. <i>disheveled</i>
Fz	engl. <i>Frizzled</i>
GLI	engl. <i>glioma-associated oncogene</i> , onkogen povezan s gliomima
GSK3 $\beta$	engl. <i>glycogen synthase kinase 3<math>\beta</math></i> , kinaza sintaze glikogena 3 $\beta$
Hh	engl. <i>hedgehog</i>
HPF	engl. <i>high power field</i> , vidno polje velikog povećanja
HRM	engl. <i>high resolution melting</i> , metoda analize taljenja visoke rezolucije
JNK	engl. <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KLF4	engl. <i>kruppel like factor 4</i>
LOH	engl. <i>loss of heterozygosity</i> , gubitak heterozigotnosti
LRP5 i LRP6	engl. <i>low density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6</i> , protein sličan receptoru LDL-a
MEK	engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i> , protein kinaza aktivirana mitogenom
MLH	engl. <i>MutL homolog</i>
MMR	engl. <i>mismatch repair</i> , sustav za popravak pogrešno sparenih parova baza
MMTV	engl. <i>mouse mammary tumor virus</i> , virus tumora mliježne žlijezde miševa
MSH2	engl. <i>MutS homolog 2</i>
MSI	engl. <i>microsatellite instability</i> , mikrosatelitna nestabilnost
mTOR	engl. <i>mammalian target of rapamycin</i> , ciljna molekula rapamicina u sisavaca
NCBI	engl. <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NES	engl. <i>nuclear export signal</i> , izlazni signal jezgre
NF2	engl. <i>neurofibromin 2</i> , neurofibromin 2
NLS	engl. <i>nuclear localization Signal</i> , lokalizacijski signal jezgre
PAK	engl. <i>rac1-activated kinase</i> , kinaza aktivirana proteinom Rac1
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , lančana reakcija polimerazom
PI3K	engl. <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i> , fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat
PIK3CA	engl. <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
Porcn	engl. <i>porcupine</i>
PROVEAN	engl. <i>Protein Variation Effect Analyzer</i>

RAC1	engl. <i>rac family small GTPase 1</i> , mala GTP-aza iz Rac porodice 1
Raf	engl. <i>raf Proto-Oncogene Serine/Threonine Protein Kinase</i>
RCLB	engl. <i>red blood cell lysis buffer</i> , pufer za lizu crvenih krvnih stanica
RFU	engl. <i>relative fluorescence units</i> , relativne jedinice fluorescencije
ROS	engl. <i>reactive oxygen species</i> , reaktivne kisikove vrste
SDS-a	engl. <i>sodium-dodecylsulphate</i> , natrij dodecil sulfat
SE pufer	engl. <i>sodium EDTA</i> pufer
SNP	engl. <i>single nucleotide polymorfism</i> , polimorfizam jednog nukleotida
Src	engl. <i>proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>
STAT	engl. <i>signal transducer and activator of transcription</i>
TCF/LEF	engl. <i>T-cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer binding factor 1</i>
TE pufer	engl. <i>tris-EDTA</i> pufer
TRAF7	engl. <i>TNF receptor associated factor 7</i>
WLS	engl. <i>Wnt ligand secretion mediator</i> , medijator sekrecije Wnt liganda

# 1. Uvod

## 1.1 Tumori središnjeg živčanog sustava

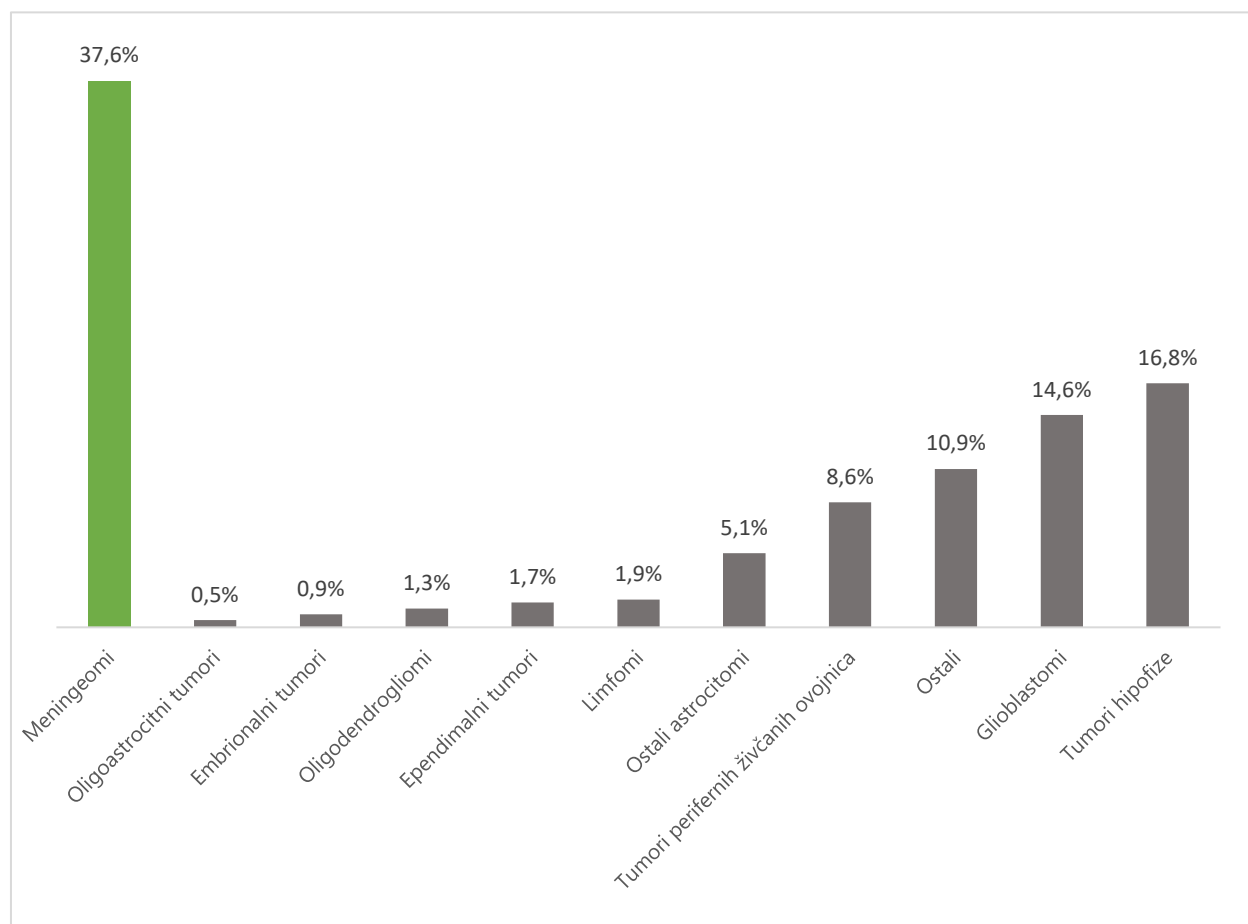
Pojam tumora središnjeg živčanog sustava opisuje nastanak heterogenih i abnormalnih nakupina genetički promijenjenih stanica u tkivima mozga i leđne moždine. Primarni tumori središnjeg živčanog sustava rijetka su bolest prisutna u svim dobnim skupinama te, uslijed svoje heterogenosti i različite biološke podloge, često zahtijevaju prilagođeni tijek liječenja koji u konačnici može imati različit ishod. Osim mnoštva genetičkih promjena koje se mogu pronaći u tumorima središnjeg živčanog sustava, dodatni otežavajući faktori u liječenju ovih bolesti su i prisutnost krvno-moždane barijere koja otežava prolazak i djelovanje lijekova, te nemogućnost kirurškog liječenja u slučajevima lokalizacije tumora u teško dostupnim i osjetljivim regijama središnjeg živčanog sustava (Wöhrer, 2013; Mulcahy, 2020).

Iako su maligni tumori najčešće dijagnosticiran i liječen tip, od velike su važnosti i dijagnoze benignih tumora zbog mogućnosti njihove progresije u maligni stadij i lokalizacije koja može utjecati na rad važnih regija središnjeg živčanog sustava (Wöhrer, 2013). Među tumorima benignog tipa najčešći su intrakranijalni meningeomi.

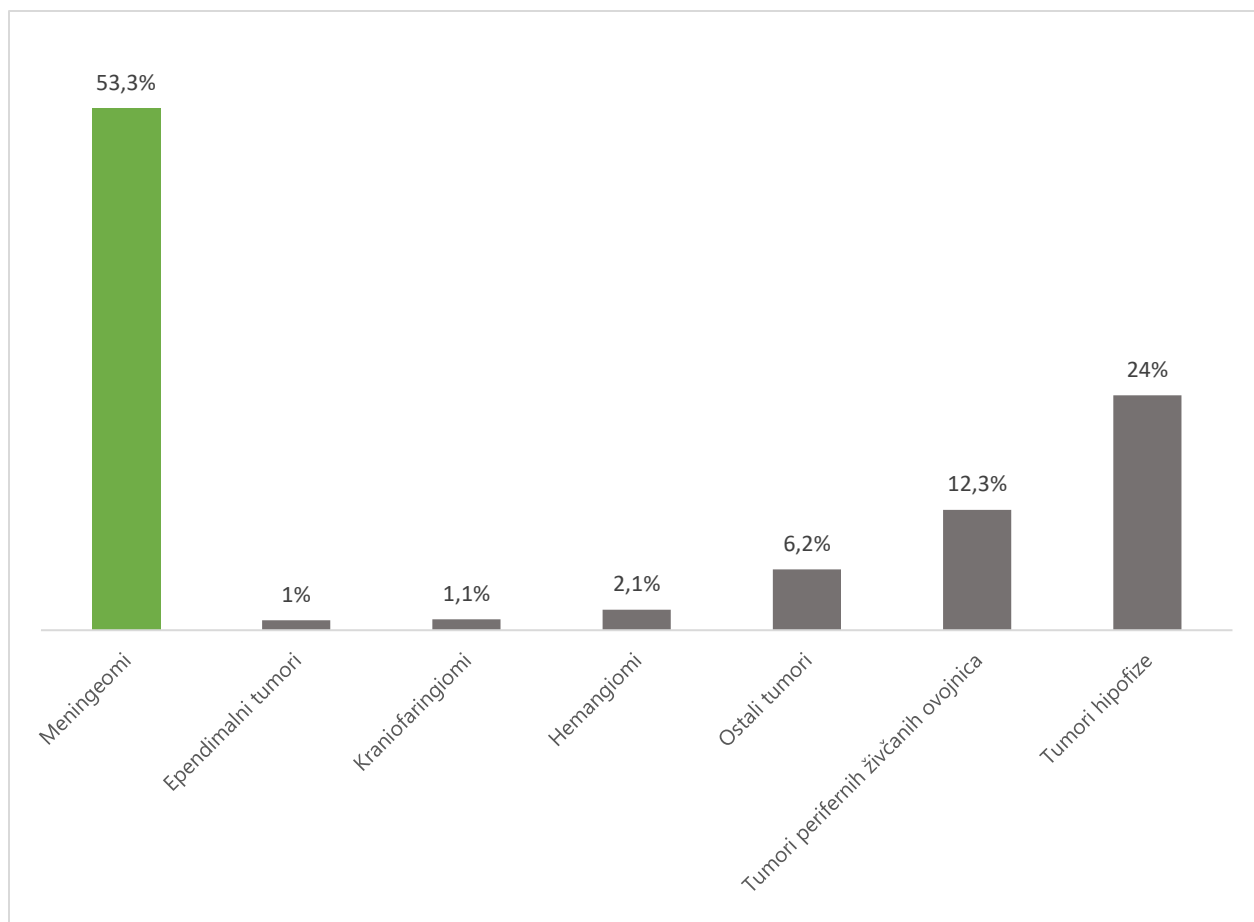
## 1.2. Intrakranijalni meningeomi

Mozak je okružen trima ovojnicama, dura mater, pia mater i arachnoidea, zajedničkog imena „meninge“ te se shodno tome tumori nastali u tom području nazivaju meningeomima. Pretpostavka je da se stanično podrijetlo meningeoma nalazi u arahnoidalnim kapa stanicama leptomeninge, s kojima dijele antigene i različita morfološka svojstva (Kalamarides i sur., 2011; Bukovac i sur., 2019). Meningeomi pretežito nastaju u lubanji, intrakranijalno, a oko 10% meningeoma smješteno je intraspinalno u području leđne moždine (Foda, 2019). Prema mitotskoj aktivnosti, histopatološkim svojstvima i kliničkom fenotipu, Svjetska zdravstvena organizacija podijelila je meningeome u tri gradusa: gradus I (78-81%), gradus II (15-20%) i gradus III (1-4%). Od njih najčešće obolijevaju odrasle žene u šezdesetim godinama života koje imaju 2,2 puta veću šansu obolijevanja od muškaraca, ali samo kada su u pitanju tumori nižeg gradusa, dok u atipičnih i anaplastičnih meningeoma udio oboljelih muškaraca nadmašuje udio oboljelih žena (Shao, 2020).

Prema statističkim podacima iz zadnjeg izvještaja neprofitne organizacije CBTRUS (engl. *The Central Brain Tumor Registry of the United States*, <https://cbtrus.org/>) od 2012. do 2016. godine, udio meningeoma u ukupnom uzorku tumora mozga iznosi 37,1% (Slika 1), a među svim benignim tumorima mozga iznosi 53,1% (Slika 2). Prema navedenim podacima, meningeomi su trenutno najčešći primarni tumori središnjeg živčanog sustava čovjeka (Ostrom, 2019).



**Slika 1.** Incidencija različitih tipova tumora središnjeg živčanog sustava (prilagođeno prema Ostrom, 2019).



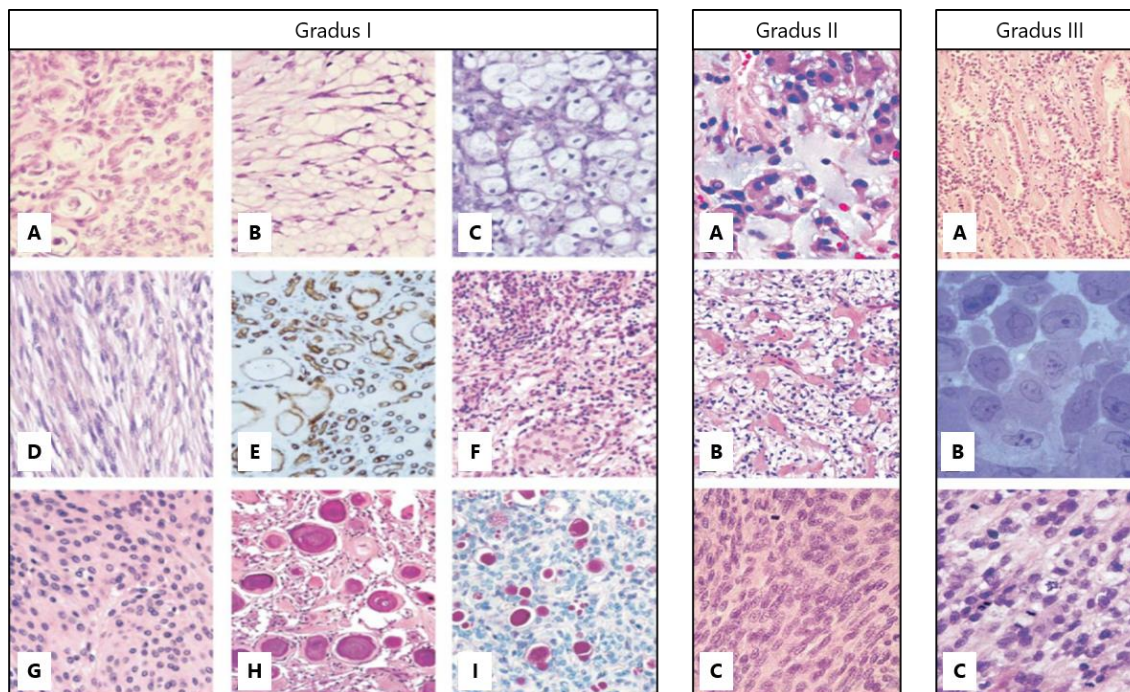
**Slika 2.** Incidencija različitih tipova benignih tumora središnjeg živčanog sustava (prilagođeno prema Ostrom, 2019).

### 1.2.1. Patohistološka podjela intrakranijalnih meningeoma

Prema patohistološkoj podjeli Svjetske zdravstvene organizacije, meningeomi se uz podjelu na tri gradusa, dijele i na petnaest patohistoloških podtipova (Slika 3). Meningeomima gradusa I pripadaju meningotelijalni, tranzicijski, fibrozni, angiomatozni, psamomski, sekretorni, mikrocistični, metaplastični i meningeomi bogati limfoplazmocitima. Navedenih 9 podtipova karakterizira spori rast, neinvazivno ponašanje i indeks mitotske aktivnosti<sup>1</sup> manji od 4 mitoze/10 HPF (engl. *high power field*). Meningeomi gradusa II dijele se na atipične, hordoidne i meningeome svijetlih stanica, a opisani su indeksom mitotske aktivnosti većim od 5 mitoze/10

<sup>1</sup> Indeks mitotske aktivnosti – broj mitotski aktivnih stanica u odnosu na broj mitotski neaktivnih stanica u 10 mikroskopskih polja visoke snage (eng. *high power field*, HPF), tj. polja povećanja većeg od 40x. Mjerna jedinica indeksa označava se kao broj mitoze/10 HPF (Meuten i sur. 2015).

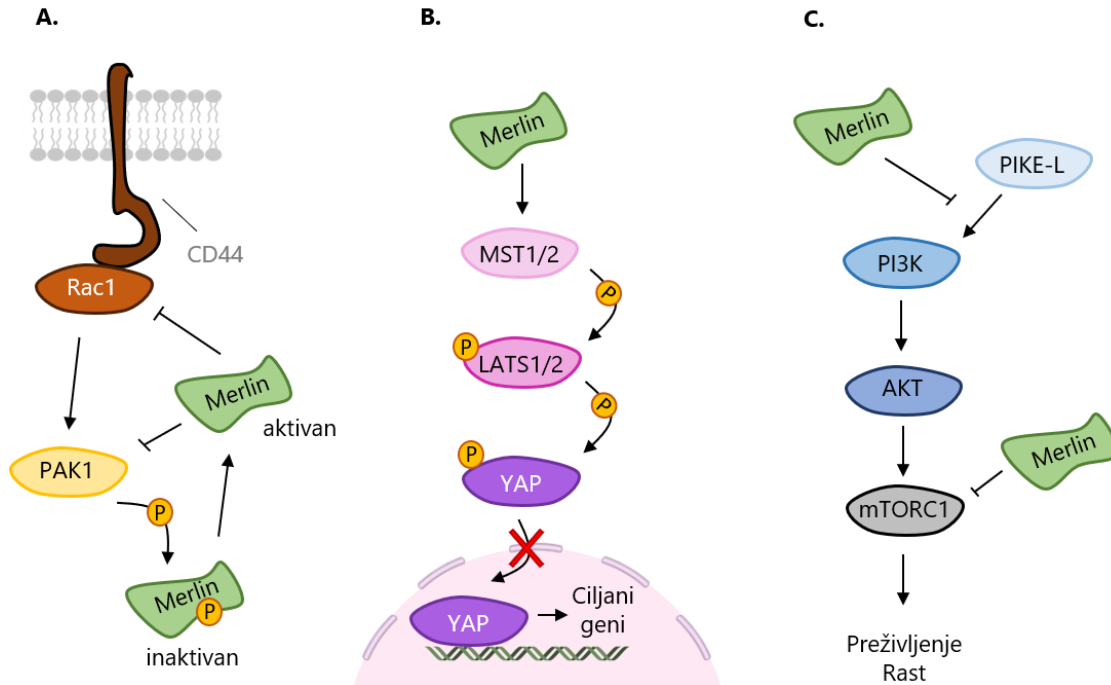
HPF. Odlikuje ih povišena proliferativna aktivnost, invazivnost i pleomorfizam jezgri. Zadnja i najrjeđa skupina gradusa III dijeli se na papilarne, rabdoidne i anaplastične meningeome koji pokazuju visoku tendenciju prema stvaranju metastaza, učestalu pojavu recidiva i visok indeks mitotske aktivnosti od preko 20 mitoza/10 HPF. (Harter i sur., 2017; Sumkovski i sur., 2019; Bukovac i sur., 2019).



**Slika 3.** Histološki prerezi svih podtipova meningeoma. Gradus I: A – tranzicijski, B – mikrocistični, C – metaplastični, D – fibrozni, E – angiomatozni, F – bogati limfoplazmatskim stanicama mikrocistični, G – meningotelijalni, H – psamomatozni, I – sekretorni. Gradus II: A – hordoidni, B – meningeom svijetlih stanica, C – atipični. Gradus III: A – papilarni, B – rabdoidni, C – anaplastični. (preuzeto iz Riemenschneider i sur., 2006).

### 1.2.2. Molekularni mehanizmi koji pogoduju razvoju meningeoma

Nedavni razvoj raznovrsnih metoda sekvenciranja nove generacije doprinio je razumijevanju genetičkih promjena i molekularnih mehanizama odgovornih za nastanak meningeoma. Među promjenama u meningealnim tkivima, najčešća je bialelni gubitak tumorsupresorskog gena neurofibrin2 (*NF2*), čiji je proteinski produkt „Merlin“ uključen u regulaciju velikog broja signalnih puteva poput PI3K-AKT-mTOR, Rac1-PAK i signalnog puta Hippo (Pećina-Šlaus, 2013; Lee i sur., 2019) (Slika 4.).



**Slika 4.** Signalni putevi u koje je uključen protein „Merlin“. Prikazani su A. Signalni put Rac-PAK kontaktne inhibicije, B. signalni put Hippo i C. signalni put PI3K-AKT-mTOR uključen u preživljenje i rast stanica (prilagođeno prema Lee i sur., 2019).

Mutacije gena *NF2* uzrokuju genetski nasljednu bolest neurofibromatozu tipa 2, koja doprinosi nastanku meningeoma, ependioma i švanoma. Transkripcijom i translacijom gena *NF2* nastaje protein „Merlin“ koji sudjeluje kao modulator u mnogobrojnim signalnim putevima vezanim za adheziju stanica, kontaktnu inhibiciju i dr. Gubitkom proteina „Merlin“, dolazi do raznih staničnih poremećaja i povećane razine reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) koji uzrokuju stanični stres. Nastali ROS-ovi uzrokuju i povećanu transkripciju faktora GLI, transkripcijskog faktora signalnog puta „Hedgehog“ (Hh). Povećanjem staničnog stresa i aktivnosti signalnog puta Hh uslijed gubitka proteina „Merlin“, povećana je i invazivnost stanica što pogoduje nastanku tumora. Upravo je zahvaljujući nasljednom sindromu neurofibromatozi tipa 2, mutacija gena *NF2* okarakterizirana kao jedna od ključnih pokretačkih mutacija za nastanak meningeoma. Osim gena *NF2*, novija istraživanja otkrila su da mutacije na genima *TRAF7*, *AKT1*, *KLF4* i *PIK3CA* također pogoduju razvoju meningeoma i time otvorila mogućnost stvaranja novih terapija za oboljele (Pećina-Šlaus i sur., 2016; Das i sur., 2017; Youngblood i Günel, 2020).

### 1.2.3. Liječenje meningeoma

Dugo vremena su prva linija liječenja meningeoma bili neurokirurški zahvati koji mogu biti invazivni i neefikasni kod malignih slučajeva sa sklonošću prema recidivu. Nekirurška alternativa liječenja uključuje različite vrste radioterapije koja je manje invazivna i omogućava liječenje meningeoma na teško dostupnim mjestima. Ipak, iako je invazivnost postupka veća kod neurokirurških zahvata, oni omogućavaju izvođenje biopsije i uspostavljanje patohistološke dijagnoze tumora, što je onemogućeno korištenjem radioterapije. Također, djelovanje radioterapije može imati negativne posljedice kod meningeoma velikih dimenzija i lokalizacije uz osjetljive regije mozga. Trenutno su u tijeku istraživanja kojima je cilj otkriće i razvoj ciljanih inhibitora za molekule koje doprinose nastanku i progresiji meningeoma (Rogers i sur., 2015; Youngblood i Günel, 2020). Iako su meningeomi najčešći oblik primarnih intrakranijalnih tumora, standardne metode liječenja nisu dovoljno razvijene, a molekularni mehanizmi koji pogoduju njihovom razvoju i dalje su slabo istraženi.

## 1.2. Signalni put Wnt

Istraživanjem gena čije mutacije imaju ulogu u progresiji meningeoma, utvrđeno je nekoliko ključnih signalnih puteva čija aktivacija ili deaktivacija djeluje na razvoj meningealnih tumorskih stanica. Među signalnim putevima s dokazanom uključenošću u etiologiju meningeoma nalaze se signalni putevi PI3K-AKT-mTOR, Ras-Raf-MEK i Rac-PAK-JNK (Pećina-Šlaus i sur., 2016). Aktivnost molekula navedenih signalnih puteva, kao što su PI3K, AKT, Stat i Src, regulirana je dodatno i ubrzanim nastankom ranije navedenih ROS-ova nastalih uslijed gubitka tumor-supresorskog proteina „Merlin“. Uz njih dolazi do povećane aktivnosti i drugih molekula poput liganda Wnt i proteina  $\beta$ -katenina koji čine ključne proteine signalnog puta Wnt (Das i sur., 2017). Budući da su u tumorigenezi od iznimne važnosti putevi koji reguliraju rast, razvoj i preživljenje stanica, unazad nekoliko godina sve je veća pozornost posvećena signalnom putu Wnt – kompleksnoj interakcijskoj mreži proteina odgovornih za pravilan nastanak i rad središnjeg živčanog sustava.

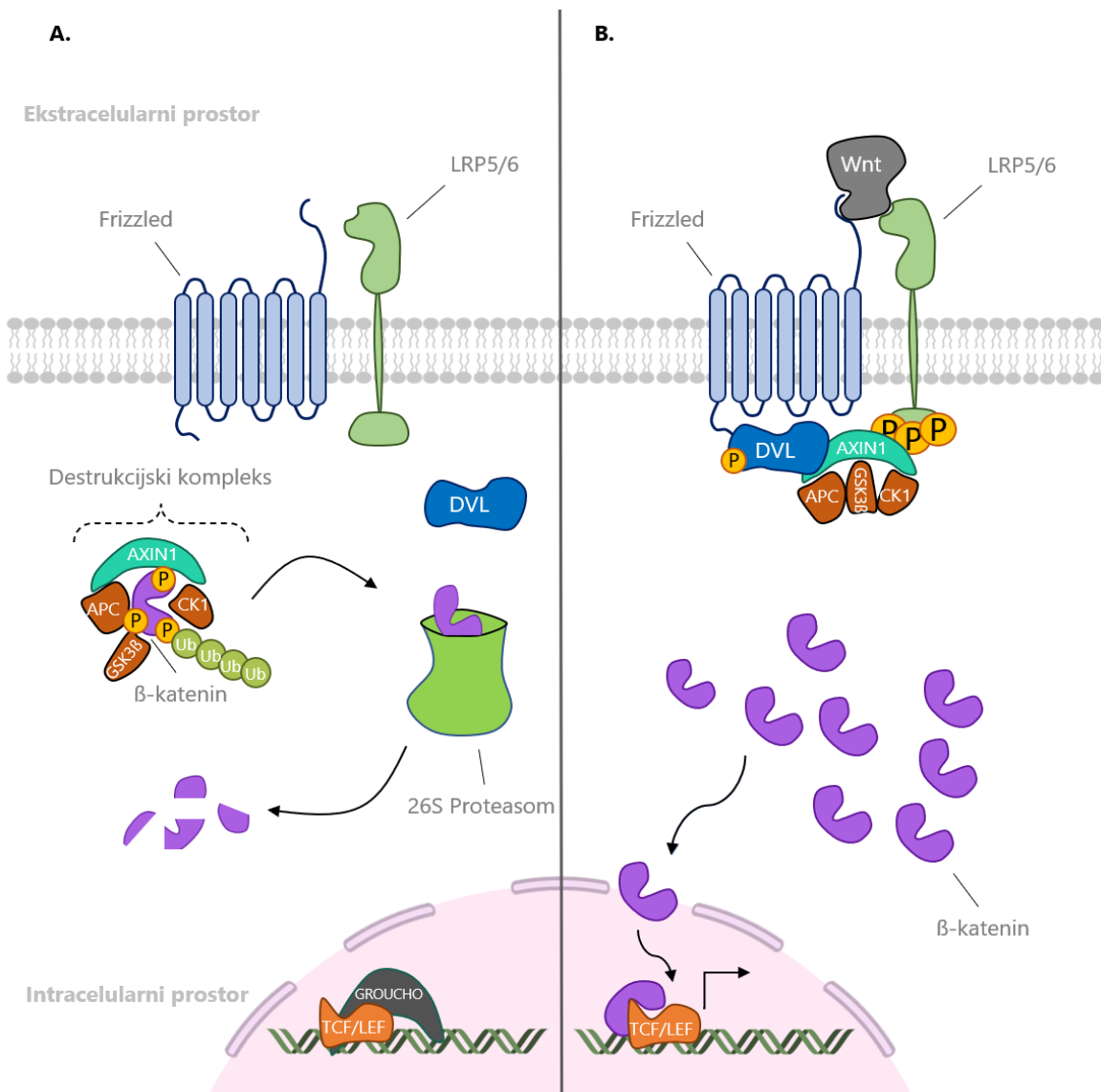
Za otkriće signalnog puta Wnt od ključnog su značaja dvije studije objavljene osamdesetih godina prošloga stoljeća. Prva je provedena 1980. godine kada je otkriven razvojni gen *Wingless*



odgovoran za fenotip vrste *Drosophila melanogaster* (Nusslein-Volhard i Wieschaus, 1980). Dvije godine kasnije objavljen je članak o otkriću gena *Int-1*, protoonkogen aktiviranog u miševima inficiranim virusom MMTV (engl. *mouse mammary tumor virus*, virus tumora mliječne žlijezde miševa) (Nusse i Varmus, 1982). Budući da je kasnije dokazana homologija između gena *Int-1* i *Wingless*, dogovoren je zajednički naziv „Wnt“ kako bi se odalo priznanje i jednom i drugom istraživanju.

Signalna kaskada puta Wnt, potaknuta vezanjem jednog od 19 liganda za specifične receptore, može se nastaviti u jednom od tri oblika – kanonskom/ $\beta$ -kateninskom putu, nekanonskom putu stanične polarnosti i staničnom putu Wnt/ $Ca^{2+}$  (Kafka i sur., 2014). Ispravna regulacija svih oblika signalnog puta Wnt nužna je za homeostazu, proliferaciju, adheziju, organogenezu i migraciju stanica. Istraživanja o tumorigenezi veću su važnost pridala kanonskom signalnom putu Wnt čija povišena aktivnost s posljedicom nakupljanja proteina  $\beta$ -katenina, dovodi do pojačane transkripcije onkogeni koji stimuliraju proliferaciju. U stanju homeostaze, signalni put Wnt je neaktivan, a koncentracija proteina  $\beta$ -katenina regulirana je destruktivnim kompleksom sastavljenim od proteina AXIN (aksin), APC (adenomatozna polipoza kolona), GSK3 $\beta$  (glikogen sintaza kinaza 3 beta) i CK1 (kazein kinaza 1), koji razgrađuju suvišan  $\beta$ -katenin. Time je onemogućena njegova translokacija u jezgu i vezanje za faktore transkripcije TCF/LEF (engl. *T-cell factor/lymphoid enhancer factor*) (Slika 5.A.) Aktivacijom kanonskog signalnog puta Wnt, hidrofobni ligandi Wnt palmitolizirani su proteinom Protein-serinska O-palmitoleoiltransferaza „Porcupine“ (PORCN) u endoplazmatskom retikulumu kako bi im bilo omogućeno vezanje za transportni protein WLS (engl. *Wnt ligand secretion mediator*) i prijenos do stanične membrane. Otpuštanjem proteina WLS mogu dalje djelovati autokrino ili parakrino, ali samo na stanice u blizini zbog otežane difuzije kroz hidrofilni izvanstanični okoliš. Sekretorni ligandi Wnt vežu se za kompleks transmembranskog receptora „Frizzled“ (Fz) i koreceptora LRP5/6 (engl. *low density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6*) u interakcijski kompleks Wnt-Fz-LRP5/6. On fosforilacijom aktivira protein „Dishevelled“ (DVL) koji se veže za Fz i potiče fosforilaciju citoplazmatske domene receptora LRP5/6 kinazama GSK3 $\beta$  i CK1. Time dolazi do konformacijske promjene fosforilirane domene receptora LRP5/6 i stvaranja veznog mjesta na membrani namijenjenog proteinu AXIN1 koji za sobom povlači ostale proteine destruktivnog kompleksa i veže se za DVL. Time je regulacija destrukcije  $\beta$ -katenina narušena te se on nakuplja, premiješta u jezgu, veže za faktore TCF/LEF (s kojih se otpušta represor

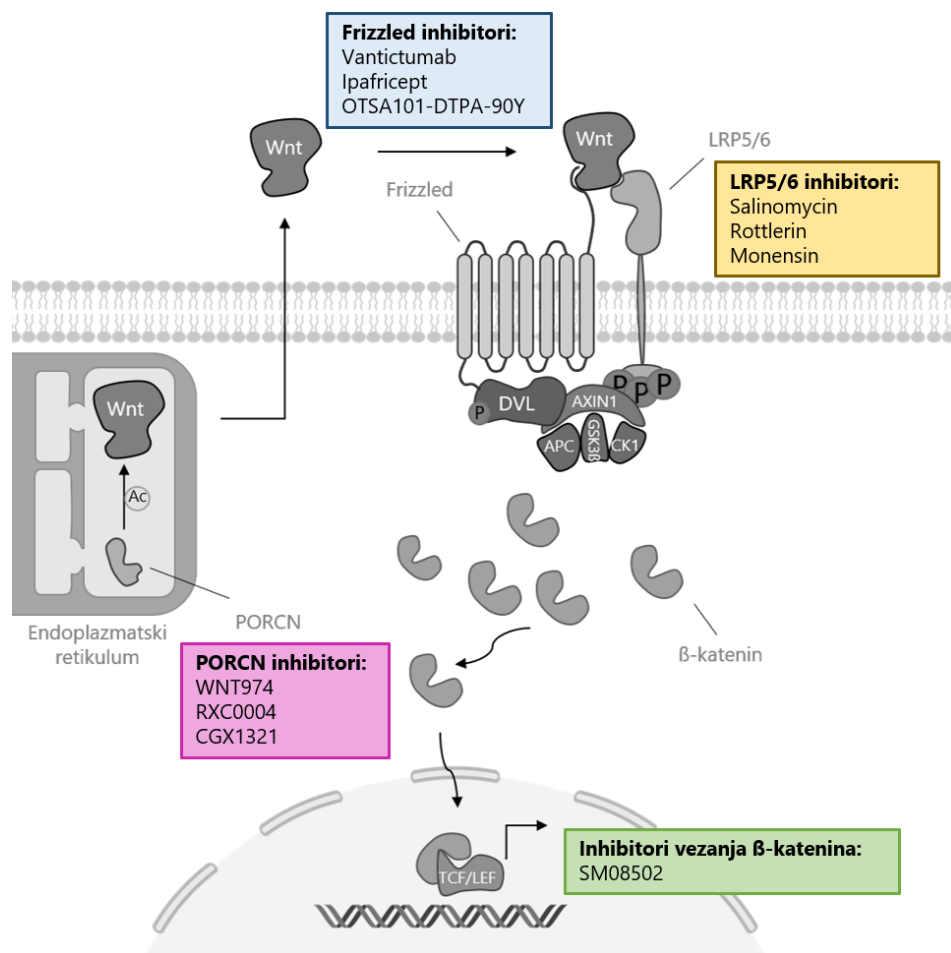
„Groucho“) i potiče transkripciju ciljanih onkogenata (Slika 5.B.) (Kafka i sur., 2014; Yu i sur., 2014; Wiese i sur., 2018; Jackstadt i sur., 2020).



**Slika 5.** Kanonski oblik signalnog puta Wnt. A. prikazuje rad destruktivnog kompleksa u normalnim uvjetima bez signala Wnt i razaranje suvišnog  $\beta$ -katenina u proteasomu. B. prikazuje aktivan signalni put Wnt – premještanje destruktivnog kompleksa na membranu, a  $\beta$ -katenina u jezgru (prilagođeno prema Pećina-Šlaus i sur., 2016).

S obzirom na poznatu ulogu kanonskog oblika signalnog puta Wnt u progresiji mnogih tumora među kojima su i meningeomi (Pećina-Šlaus i sur., 2016), važan je nastavak istraživanja i kliničkih ispitivanja potencijalnih inhibitora prijenosa signala Wnt (Slika 6.). Nedavno su otkriveni inhibitori proteina PORCN koji blokiraju postranslacijske modifikacije liganda Wnt u endoplazmatskom retikulumu i time sprječavaju njegovo izlučivanje. Uz njih, istraživanja su

pokazala kako blokada veznih mjesta receptora Frizzled i LRP5/6 monoklonalnim antitijelima i rekombinantnim fuzijskim proteinima također ima jak efekt inhibicije signala. Mnoge prekliničke studije rade na izradi inhibitora  $\beta$ -katenina i faktora TCF/LEF te na aktivatorima pojačane proteosomalne razgradnje  $\beta$ -katenina. Nažalost, budući da navedeni pristupi nisu tkivno-specifični i ne ciljaju isključivo tumorske stanice, zbog uloge signalnog puta Wnt u brojnim fiziološkim procesima, djelovanje inhibitora nosi sa sobom brojne nuspojave poput povraćanja, dijareje, poremećaja u koštanom metabolizmu i opće slabosti (Jung i Park, 2020).



**Slika 6.** Inhibitori signalnog puta Wnt u prošlim i trenutnim kliničkim ispitivanjima (prilagođeno prema Jung i Park, 2020).

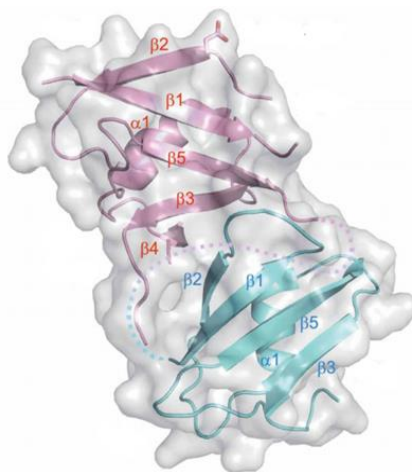
### 1.3. Protein „Dishevelled“

Kao središnji medijator interakcija komponenti kanonskog oblika signalnog puta Wnt, protein „Dishevelled“ (DVL) postaje sve privlačnija meta istraživanja kojima je cilj otkriti

inhibitore ovog signalnog puta. Porodica proteina „Dishevelled“ vrlo je konzervirana i multifunkcionalna skupina proteina koja sadrži ukupno tri ljudska homologa – DVL1, DVL2 i DVL3. Prekomjerna ekspresija proteina „Dishevelled“ dokazano uzrokuje pojačanu aktivaciju signalnog puta Wnt u različitim vrstama tumora (Kafka i sur., 2014).

### 1.3.1. Struktura proteina „Dishevelled“

Svi članovi porodice proteina DVL sadrže tri osnovne konzervirane domene. S aminoterminalne strane nalazi se domena DIX (engl. *dishevelled*, *axin*) koja se sastoji od 82 do 85 aminokiselina ovisno o homologu. Domena DIX predstavlja važno mjesto vezanja proteina AXIN, koji i sam sadrži vlastitu domenu DIX. Upravo je interakcija između ovih dvaju DIX domena jedan od najvažnijih staničnih događaja u signalnom putu Wnt, budući da priječi vezanje proteina AXIN za destruktivski kompleks i omogućava nakupljanje i odlazak  $\beta$ -katenina u jezgru (Sharma i sur., 2018). Yamanishi i sur. (2019) otkrili su detaljnu molekularnu arhitekturu heterodimernog kompleksa DIX proteina DVL1 i AXIN (Slika 7.). U njihovom radu također je pokazano da domena AXIN-DIX ima veći afinitet vezanja za domenu DVL1-DIX nego za samu sebe, što objašnjava lakoću narušavanja destruktivskog kompleksa od strane proteina DVL prilikom aktivacije signalnog puta Wnt.



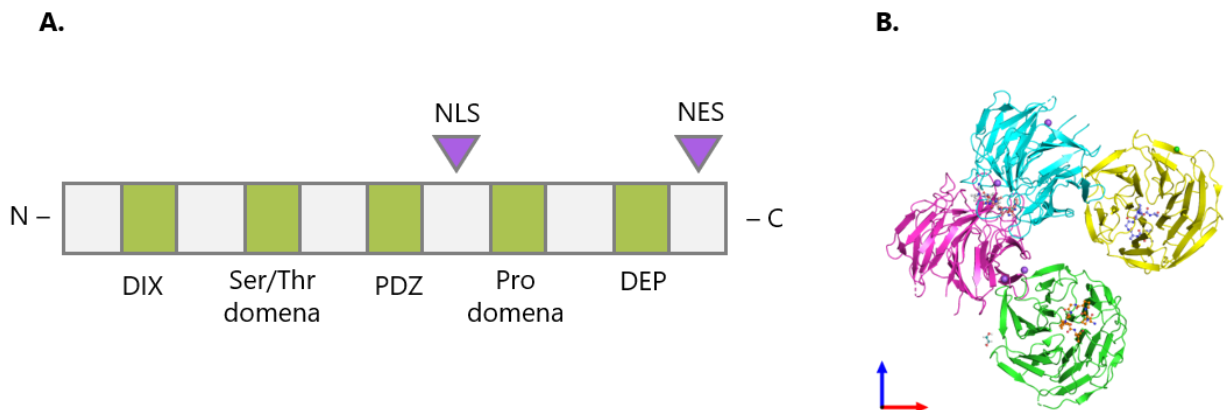
**Slika 7.** Kristalna struktura heterodimernog kompleksa domene DIX proteina AXIN i DVL1. Ružičasta predstavlja vezanje AXIN-DIX, a plava DVL1-DIX (Yamanishi i sur., 2019).

S karboksiterminalne strane proteina DVL nalazi se domena DEP (engl. *dishevelled*, *egl-10*, *pleckstrin*) sastavljena od 75 aminokiselina. Domena DEP ključna je u interakcijama proteina

DVL s proteinom DAAM1 (engl. *dishevelled associated activator of morphogenesis 1*) u  $\beta$ -katenin neovisnom obliku signalnog puta Wnt (Sharma i sur., 2018).

Između ovih dviju domena nalazi se središnja domena PDZ (engl. *postsynaptic density 95, discs large, zonula occludens-1*) sastavljena od 73 aminokiseline. Domena PDZ kao centralna domena ima ulogu i u kanonskom i u nekanonskom obliku signalnog puta Wnt. Nužna je za interakciju proteina DVL s karboksiterminalnom domenom receptora Frizzled, što ju čini posebno zanimljivim kandidatom za ciljane inhibitorne terapije. Na domeni PDZ odvija se i fosforilacija proteina DVL pomoću kazein kinaza CK1 i CK2. Navedene uloge domene PDZ upućuju na njezinu iznimnu važnost u medijaciji različitih interakcija proteina DVL u signalnom putu Wnt (Sharma i sur., 2018).

Treba također napomenuti da su između ovih triju konzerviranih domena proteina DVL, naknadno otkriveni jezgri lokalizacijski i eksportni signali NLS (engl. *nuclear localization signal*) i NES (engl. *nuclear export signal*) (Sharma i sur., 2018). Pokazano je kako su navedene domene bitne za djelovanje nuklearne inačice proteina DVL koja se veže na faktor TCF zajedno s  $\beta$ -kateninom i pojačava signal Wnt. U konačnici, između domena DIX i PDZ nalazi se bazična regija, sastavljena od treoninskih i serinskih aminokiselinskih ostataka, a između domena PDZ i DEP se nalazi regija bogata prolinom. Navedene regije sudjeluju u interakcijama proteina DVL s proteinima kanonskog i nekanonskog oblika signalnog puta Wnt (Gao i Chen, 2010). Cjelokupna shematska i kristalografska struktura proteina DVL prikazana je na Slici 8.



**Slika 8.** A. Shematski prikaz domena od kojih je sastavljen protein DVL, prilagođeno prema Sharma i sur., 2018. B. Kristalografska struktura proteina DVL1 preuzeta sa online dostupne proteinske baze podataka PDBE (<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/6ttk/analysis>).

### 1.3.2. Genomska nestabilnost, velike delecije i protein „Dishevelled“

Nestabilnost genoma uzrokuje povećanu frekvenciju mutacija ranije spomenutih gena iz potpoglavlja 1.2.2. Nestabilnost genoma jedna je od glavnih karakteristika stanica tumorskih tkiva, a može se podijeliti na kromosomsku nestabilnost (engl. *chromosomal instability*, CIN) i mikrosatelitnu nestabilnost (engl. *microsatellite instability*, MSI). Abnormalne promjene kromosomskih struktura uzrokovane CIN-om, zamijećene su još prošlog stoljeća te obuhvaćaju promjene broja čitavih kromosoma (gubitak ili dobitak kromosoma) i promjene na dijelovima kromosoma. Iako je CIN najčešći oblik genomske nestabilnosti, ne treba zanemariti ulogu MSI u progresiji tumora. MSI predstavlja povećanje ili smanjenje broja oligonukleotidnih ponavljajućih sljedova u mikrosatelitnim sekvencama (Negrini i sur., 2010; Kafka, 2017). Dokazano je da i dio meningealnih tumora pokazuje MSI, koji nastaju kao posljedica narušene funkcionalnosti sustava za popravak pogrešno sparenih baza molekule DNA (engl. *mismatch repair*, MMR). MMR je postreplikacijski proces odgovoran za popravak pogrešaka uzrokovanih radom enzima DNA polimeraze koje u prosjeku nastaju svakih  $10^5$  nukleotida. Sustav za MMR prvi je put istražen u bakteriji *E. coli* gdje su otkrivena četiri gena proteinskih produkata uključenih u proces popravka, *MutS*, *MutL*, *MutH* i *uvrD*. Kasnije je utvrđeno osam ljudskih homologa sustava za MMR koji se mogu podijeliti na homologe proteina MutS (MSH) i homologe proteina MutL (MLH). Mutacije koje su odgovorne za nastanak nefunkcionalnih proteina sustava za MMR, dovode do nakupljanja mikrosatelitnih insercija i delecija koje doprinose nastanku i progresiji tumora (Pećina-Šlaus i sur., 2020). Uporabom mikrosatelitnih markera može se uočiti i postojanje gubitka heterozigotnosti gena (engl. *loss of heterozygosity*, LOH). Zanimljivo je da u nekim istraživanjima uočena korelacija između gubitka heterozigotnosti alela na kromosomima 1, 6, 10, 22 i 24 i malignosti meningeoma (Och i sur., 2016).

MSI i LOH gena iz porodice proteina „Dishevelled“ zabilježeni su u nekoliko vrsta tumora. U genu *DVL3* zabilježeno je oko 22% MSI u meningeomima koja je snažno korelirala s anaplastičnim patohistološkim podtipom agresivnih meningeoma gradusa III (Pećina-Šlaus i sur., 2017), a u tumorima dojke zabilježene su prekomjerne amplifikacije i LOH gena *DVLI* (Nagahata i sur., 2003). Sva tri gena, *DVLI*, *DVL2* i *DVL3*, pokazala su postojanje MSI i LOH u različitim gradusima astrocitoma te je pokazana potencijalna uloga gena *DVLI* i *DVL2* u ranim stadijima astrocitoma, a gena *DVL3* u kasnijim stadijima (Kafka i sur., 2018). Uključenost gena iz porodice

DVL nije do sada dovoljno istražena na meningeomima te navedena istraživanja o njihovoj u tumorigenezi i neistraženost molekularnih mehanizama razvoja meningeoma, upućuju na nužnost daljnjeg ispitivanja promjena gena *DVL1*, *DVL2* i *DVL3*, kao mogućih faktora progresije meningeoma.

## 2. Cilj istraživanja

Opći cilj ovog rada je istražiti promjene gena *DVLI* i njegovu ulogu u progresiji intrakranijalnih meningeoma. Budući da je istraživanjima uočena pojačana aktivacija signalnog puta Wnt u tumorskim stanicama čiji su središnji prijenosnici signala proteini iz porodice DVL, dokaz o ulozi gena *DVLI* kao faktora progresije meningeoma, omogućio bi nove mogućnosti stvaranja manje invazivnih terapija za meningeome.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

1. Utvrditi značaj frekvencija MSI i LOH gena *DVLI* s obzirom na intrakranijalnu lokalizaciju, patohistološki podtip i gradus meningeoma te dob i spol pacijenata.
2. Utvrditi postojanje mutacija u domeni PDZ gena *DVLI*, ključnoj domeni u interakciji proteina DVL1 s proteinom Fz u trenutku prijenosa signala.
3. Odrediti vrstu mutacija u domeni PDZ i njihov potencijalni utjecaj na strukturu i rad proteina DVL1.



### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Prikupljanje i obrada uzoraka intrakranijalnih meningeoma

Prikupljena su 33 uzorka intrakranijalnih meningeoma i pripadajuće periferne krvi s Klinike za neurokirurgiju i Zavoda za patologiju „Ljudevit Jurak“ Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu, Klinike za neurokirurgiju i Zavoda za neuropatologiju Kliničkog bolničkog centra „Zagreb“ te Kliničkog zavoda za patologiju i Zavoda za neurokirurgiju Kliničke bolnice Dubrava u Zagrebu. Istraživanje je odobreno dozvolom Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Ur. Broj: 380-59-10106-17-100/98, Klasa: 641-01/17-02/01, datum: 23.3.2017). Svi su uzorci tumora klasificirani od strane patologa prema kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije (Al-Rashed i sur., 2020.), a pacijenti prije operacije nisu podvrgnuti nikakvim onkološkim metodama liječenja koje bi mogle utjecati na rezultate genske analize.

Uzorci tumorskog tkiva prikupljeni su za vrijeme kirurškog zahvata, smrznuti u tekućem dušiku i pohranjeni na  $-80^{\circ}\text{C}$  do izolacije molekula DNA pacijenata. Osim uzoraka tumorskog tkiva, uzeti su i uzorci periferne krvi pacijenata koja je također pohranjena na  $-80^{\circ}\text{C}$  u krio-epruvetama uz prethodni dodatak antikoagulansa EDTA. Uz patohistološku dijagnozu i gradus tumora, za pojedini uzorak prikupljeni su i parametri poput spola, lokalizacije i dobi pacijenta prikazani u Tablici 1.

**Tablica 1.** Patohistološki i demografski parametri pacijenata oboljelih od intrakranijalnih meningeoma. Legenda: M – muški spol, Ž – ženski spol, D – desno, L – lijevo.

Redni broj	Oznaka uzorka (Tumor / Krv)	Gradus	Patohistološki tip meningeoma	Spol	Dob	Lokalizacija
1.	T251 / OT251	I	Tranzicijski	Ž	71	Frontalno D
2.	T252 / OT252	I	Tranzicijski	Ž	64	Okcipitalno D
3.	T253 / OT253	I	Meningotelijalni	M	71	Frontotemporalno D
4.	T254 / OT254	I	Tranzicijski	Ž	66	Okcipitalno L
5.	T255 / OT255	I	Tranzicijski	Ž	73	Frontoparijentalno L
6.	T266 / OT266	III	Anaplastični	M	67	Okcipitalno D
7.	T285 / OT285	I	Fibrozni	Ž	68	Okcipitalno D
8.	T286 / OT286	I	Tranzicijski	Ž	46	Frontalno D

**Tablica 1.** – Nastavak.

<b>Redni broj</b>	<b>Oznaka uzorka (Tumor / Krv)</b>	<b>Gradus</b>	<b>Patohistološki tip meningeoma</b>	<b>Spol</b>	<b>Dob</b>	<b>Lokalizacija</b>
9.	T287 / OT287	I	Meningotelijalni	Ž	71	Baza lubanje
10.	T291 / OT291	I	Psamomski	Ž	55	Frontalno L
11.	T294 / OT294	I	Psamomski	Ž	78	Parijeto-okcipitalno L
12.	T295 / OT295	I	Psamomski	Ž	55	Temporalno D
13.	T297 / OT297	I	Meningotelijalni	M	77	Frontobazalno obostrano
14.	T324 / OT324	I	Meningotelijalni	Ž	48	Temporalno L
15.	T325 / OT325	I	Meningotelijalni	Ž	43	Petroklivalno L
16.	T328 / OT328	I	Meningotelijalni	Ž	37	Frontalno L
17.	T443 / OT443	II	Atipični	Ž	69	Parijetalno D
18.	T444 / OT444	II/III	Atipični/Anaplastični	M	41	Srednja lubanjska jama sa širenjem
19.	T451 / OT451	II	Atipični	Ž	38	Temporalno L sa širenjem u pterigopalatinalnu jamu
20.	T452 / OT452	II	Atipični	Ž	64	Parasagitalnoparijetalno L
21.	T453 / OT453	II	Atipični	M	76	Frontalno L
22.	T454 / OT454	II	Atipični	M	69	Frontalno D
23.	T455 / OT455	II	Atipični	M	57	Parijetalno D
24.	T456 / OT456	II	Atipični	M	64	Sfenoidalni greben
25.	T457 / OT457	I	Meningotelijalni	Ž	69	Frontotemporalno L
26.	T458 / OT458	II	Atipični	Ž	70	Frontotemporalno D
27.	T459 / OT459	II	Atipični	Ž	30	Frontalno L
28.	T460 / OT460	II	Atipični	M	67	Frontalno D
29.	T461 / OT461	II	Atipični	M	73	Frontalno L
30.	T462 / OT462	II	Atipični	Ž	58	Frontotemporalno D
31.	T479 / OT479	III	Anaplastični	Ž	23	Temporoparijetalno D
32.	T481 / OT481	III	Anaplastični	M	85	Frontotemporalno D
33.	T482 / OT482	III	Anaplastični	Ž	74	Pontocerebelarni kut D i moždano deblo

### 3.2 Izolacija DNA iz tumorskog tkiva metodom fenol/kloroform

U okviru ovog diplomskog rada iz tumorskog tkiva pacijenata izolirana je DNA metodom fenol/kloroform prema Green i Sambrook (2012). Tumorsko tkivo, prethodno pohranjeno na  $-80^{\circ}\text{C}$ , otopljeno je na sobnoj temperaturi te je podijeljeno na manje dijelove čija je masa iznosila oko 450 mg. Dijelovi tkiva su zatim prebačeni u staklene epruvete od 1,5 mL te im je dodan 1 mL pufera za lizu stanica (10 mM TrisHCl, pH 8,0; 0.5% Tween) i 15  $\mu\text{l}$  proteinaze K (20 mg/mL). Pripremljeni uzorci su inkubirani u vodenoj kupelji uz miješanje na  $37^{\circ}\text{C}$  preko noći.

Nakon inkubacije je sadržaj svake epruvete podijeljen pipetom u dvije nove epruvete od 1,5 mL te je u svaku epruvetu dodan jednak volumen fenola unutar digestora. Epruvete s uzorcima su potom postavljene 10 minuta na rotacijsku miješalicu u svrhu homogenizacije, a zatim su uzorci centrifugirani 10 minuta na sobnoj temperaturi i 10000 okretaja u minuti kako bi došlo do odvajanja sadržaja epruvete na dvije faze – vodenu i fenolnu. Budući da se u vodenoj fazi nalazi DNA, ona je odvojena pipetom bez povlačenja fenolne faze i prenesena u novu sterilnu epruvetu od 1,5 mL. Unutar digestora je u novu epruvetu na volumen vodene faze dodano pola volumena fenola i pola volumena kloroforma. Uzorci su postavljeni još jednom 10 minuta na rotacijsku miješalicu i centrifugirani 10 minuta na 10 000 okretaja u minuti pri sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja dobivene su gornja/vodena faza i donja/organska faza sa srednjim proteinskim slojem. Vodena faza je pažljivo, bez povlačenja proteinskog i organskog sloja, odvojena u novu sterilnu epruvetu te je na njezin volumen dodan jednak volumen kloroforma. Uslijedili su postupci miješanja na rotacijskog miješalici i centrifugiranja pri istim uvjetima kao i u prethodnom koraku izdvajanja. Time su ponovno nastale dvije faze s proteinskim slojem od kojih je gornja/vodena izdvojena u novu sterilnu epruvetu. Na njezin je volumen dodano 2,5 volumena apsolutnog etanola ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) kako bi se smanjila dielektrična konstanta otopine, čime je omogućena precipitacija molekule DNA u obliku paučinaste nakupine vorteksiranjem smjese.

Uzorci s precipitiranom molekulom DNA ostavljeni su preko noći na  $-20^{\circ}\text{C}$  i sljedeći dan centrifugirani 20 minuta na  $4^{\circ}\text{C}$  i 14000 okretaja po minuti. Na dnu epruveta time je stvoren bijeli talog što je olakšalo uklanjanje supernatanta koji je sadržavao etanol, a zaostali etanol uklonjen je isparavanjem u termo miješalici na  $37^{\circ}\text{C}$ . U epruvete je dodano 200  $\mu\text{L}$  pufera TE (Tris-EDTA:

10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,6) u kojemu se na termo miješalici otapao bijeli talog nakon čega su uzorci s tumorskom DNA pohranjeni na 4°C.

### 3.3. Izolacija DNA iz krvi metodom izoliranja

Genomska DNA iz krvi izolirana je iz leukocita metodom izoliranja prema Miller i sur. (1998). Pohranjena krv pacijenata odleđena je na sobnoj temperaturi te je oko 5 mL njezinog volumena preliveno u Falcon epruvetu volumena 50 mL. Na uzorak krvi dodan je pufer za lizu eritrocita, RCLB (engl. *red blood cell lysis buffer*; 0,16 M NH<sub>4</sub>Cl; 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 10 mM EDTA, pH 7,6) u volumenu omjera 1:3. Smjesa pufera i krvi snažno je protresena i stavljena 15 minuta na led uz povremeno protresanje. Potom je smjesa stavljena u centrifugu 10 minuta na 4°C i 3700 okretaja u minuti. Tim je postupkom došlo do nakupljanja taloga s leukocitima u epruveti, a supernatant je odliven. Talog je zatim otopljen ponovnim dodavanjem pufera RCLB do punog volumena epruvete te su dijelovi neotopljenog taloga razbijeni snažnim protresanjem. Zatim je ponovljen postupak centrifugiranja pri istim uvjetima i postupak odlijevanja supernatanta. Postupak tretiranja taloga s puferom RCLB ponovljen je još nekoliko puta do potpunog ispiranja zaostalih eritrocita iz taloga. Pročišćeni talog u epruvetama je 10 minuta prosušen na zraku te je na njega zatim dodano 2 mL pufera za uklanjanje DNaza i RNAza, SE (engl. *sodium EDTA*, 75 mM NaCl, 25 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,0), 200 µL 10% deterdženta SDS (engl. *sodium-dodecylsulfate*), i 10 µL proteinaze K (20 mg/mL). Tako priređena smjesa inkubirana je preko noći u vodenoj kupelji na 37°C, a zatim su uzorci sljedeći dan razdijeljeni u epruvete od 25 mL te je na volumen uzorka dodana trećina volumena 5 M NaCl-a (~720 µL). Tretirani uzorci su vorteksirani 20 sekundi i stavljeni u centrifugu 15 minuta pri sobnoj temperaturi na 3700 okretaja po minuti. Centrifugiranjem došlo je do razdvajanja supernatanta koji je sačuvan prebacivanjem u novu epruvetu. Postupak pročišćavanja supernatanta od taloga centrifugiranjem ponovljen je još 2 do 3 puta do potpunog nestanka taloga. U supernatant dodan je jednaki volumen 2-propanola u svrhu precipitacije molekule DNA iz otopine smanjenjem dielektrične konstante otopine. Precipitirana paučinasta molekula DNA uhvaćena je steriliziranom staklenom kukicom i prenesena u novu epruvetu od 1,5 mL u koju je prethodno dodano 100-200 µL pufera TE. Uzorci su ostavljeni u epruvetama na sobnoj temperaturi preko noći u svrhu otapanja te su sljedeći dan pohranjeni na 4 °C.

### **3.4. Provjera koncentracije i čistoće molekule DNA izolirane iz tumorskog tkiva i krvi**

Koncentracija i čistoća izolirane DNA izmjerena je pomoću spektrofotometra NanoDrop ND 1000 (TermoFisher Scientific, SAD) mjerenjem apsorbancije uzoraka na tri valnim duljinama – 230 nm, 260 nm i 280 nm. Omjer valnih duljina A260/A280 manji od vrijednosti 2,0 ukazuje na onečišćenje fenolom i proteinima zaostalima od izolacije. Omjer valnih duljina A260/A230 ukazuje na onečišćenje molekulama RNA ukoliko je omjer u iznosu većem od 2,0 te na onečišćenje fenolom/proteinima ukoliko je manji od 1,8. Navedeni omjeri i koncentracija uzorka određeni su nanošenjem 1  $\mu$ L uzorka na fotodiodu spektrofotometra uz prethodno vorteksiranje u svrhu homogenizacije otopine molekule DNA i pufera TE.

### **3.5. Umnažanje metodom lančane reakcije polimerazom**

Metoda lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) koristi se za umnažanje željenih dijelova molekule DNA u uvjetima *in vitro*. Navedena metoda koristi sljedove kratkih oligonukleotida koje se nazivaju početnice te su komplementarne krajevima ciljane DNA, kako bi se pokrenula reakcija polimerizacije na mjestu njihovog specifičnog vezanja.

#### **3.5.1. Umnažanje molekularnog biljega D1S468 metodom PCR u svrhu vizualizacije genskih nestabilnosti na Spreadex gelovima**

U svrhu umnažanja molekularnog biljega D1S468 korištena su dva komercijalna reakcijska kompleta, GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, SAD) i PicoMaxx High Fidelity PCR System (Agilent, SAD). Većina uzoraka umnožena je pomoću polimeraze GoTaq, dok su uzorci smanjene čistoće i koncentracije umnoženi polimerazom veće osjetljivosti, PicoMaxx. Reakcijska smjesa za jedan uzorak volumena 25  $\mu$ L pripremljena je prema Tablici 2. za reakcijski komplet GoTaq i prema Tablici 3. za reakcijski komplet PicoMaxx.

**Tablica 2.** Sadržaj i volumen smjese komercijalnog kompleta GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, SAD) za jednu reakciju.

<i>Sastojak</i>	<b>Volumen sastojka (µl)</b>
<b>Bezbojni pufer 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer</b>	5
<b>MgCl<sub>2</sub> (25 mM)</b>	1,5
<b>dNTP (2,5 mM)</b>	0,5
<b>5' početnica (10 µM)</b>	1
<b>3' početnica (10 µM)</b>	1
<b>DNA polimeraza Taq</b>	0,2
<b>Deionizirana voda</b>	11,8
<b>Genomska DNA (~250 ng/µL)</b>	4

**Tablica 3.** Sadržaj i volumen komercijalnog kompleta PicoMaxx High Fidelity PCR System (Agilent, SAD) za jednu reakciju.

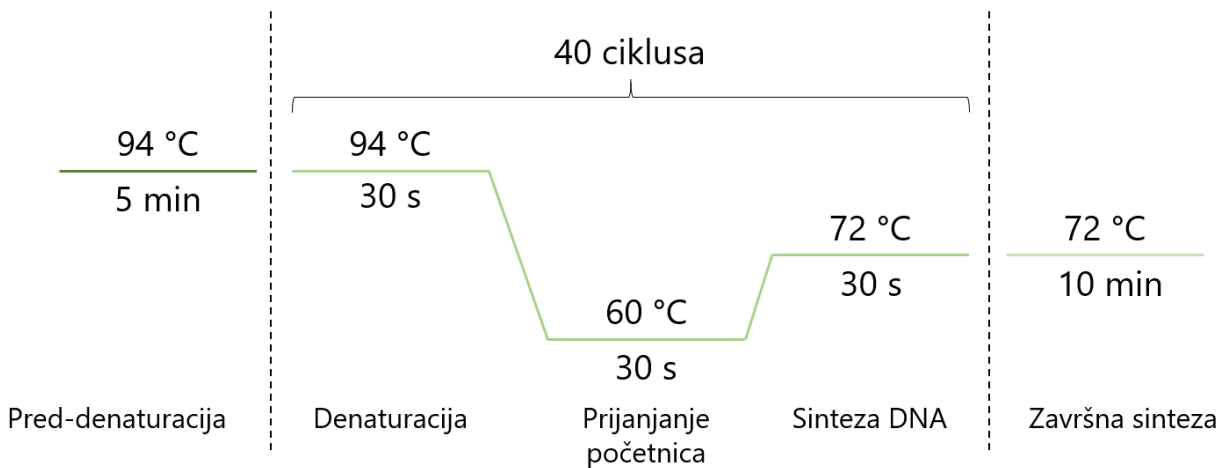
<b>Sastojak</b>	<b>Volumen sastojka (µL)</b>
<b>Pufer 10X PicoMaxx Reaction Buffer</b>	2,5
<b>dNTP (2,5 mM)</b>	0,2
<b>5' početnica (10 µM)</b>	0,5
<b>3' početnica (10 µM)</b>	0,5
<b>DNA polimeraza PicoMaxx</b>	0,5
<b>Deionizirana voda</b>	19,8
<b>Genomska DNA (~150 ng/µL)</b>	1

Za analizu mikrosatelitne nestabilnosti i gubitka heterozigotnosti gena *DVLI* odabran je fizički blizak mikrosatelitni biljeg D1S468 pretraživanjem baze podataka Ensembl (<http://www.ensembl.org>). Produkt mikrosatelitnog biljega D1S468 veličine 135 pb umnožen je početnicama koje su odabrane s liste baze podataka Ensembl ([https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Marker/Details?m=Z23994](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Marker/Details?m=Z23994)) (Tablica 4.).

**Tablica 4.** Nukleotidni slijed i karakteristike početnica za umnažanje biljega D1S468.

Veličina PCR produkta	Nukleotidni slijed početnica (5'-3')	Duljina	Temperatura taljenja (T <sub>m</sub> )
135 pb	TTAACCGTTTTGGTCCTACC	20 pb	55,29 °C
	CTCTGACCAGCATTAAGATTC	22 pb	54,91 °C

Reakcija se odvijala u termokružniku GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, SAD) prema uvjetima danima na Slika .



**Slika 9.** Uvjeti za umnažanje biljega D1S468 metodom PCR.

### 3.5.2. Optimizacija uvjeta i umnažanje domene PDZ gena *DVLI* metodom PCR u svrhu detekcije mutacija Sangerovim sekvenciranjem

Za umnažanje genske regije koja kodira domenu PDZ metodom PCR dizajnirane su početnice (Tablica 5.) korištenjem baze podataka NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) i alata za dizajn početnica pomoću referentne sekvence ciljanog gena – Primer-Blast (Ye i sur., 2012.). Početnicama je obuhvaćen veći dio domene PDZ: dio introna 7, intron 8, egzon 8 i dio egzona 9.

**Tablica 5.** Nukleotidni slijed i karakteristike početnica za umnažanje domene PDZ.

Veličina PCR produkta	Nukleotidni slijed početnica (5'-3')	Duljina	Temperatura taljenja ( $T_m$ )	Genomske koordinate
553 pb	TAACCGACTCCACCATGTCC	20 pb	59,10 °C	1340297 - 1340278
	GAAACGATCTCCCGCAGCA	19 pb	60,45 °C	1339745 - 1339763

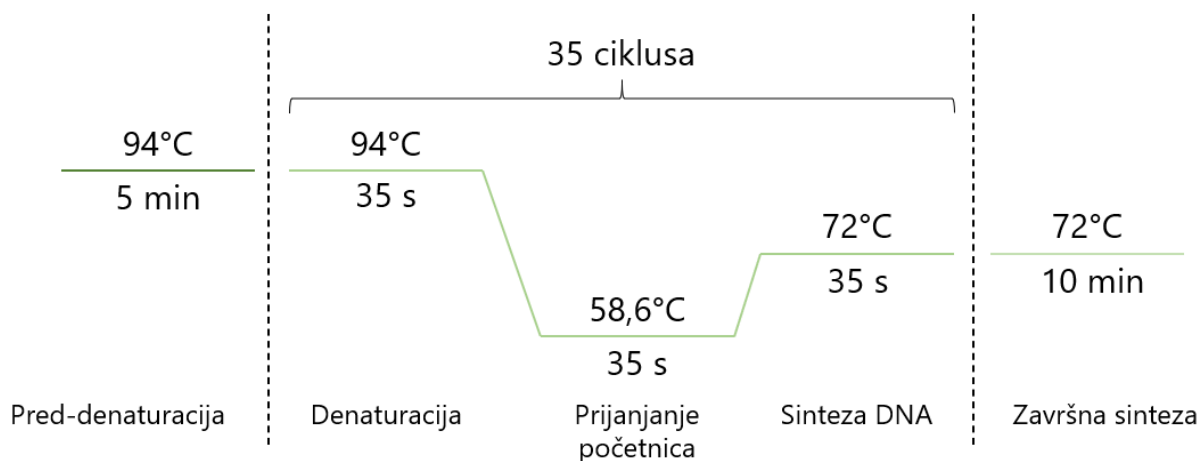
Navedene početnice korištene su u kombinaciji s komercijalnim reakcijskim PCR kompletom GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, SAD). Pripremljena smjesa za jednu reakciju ukupnog je volumena 50  $\mu$ L. Sadržaj i konačni volumeni sastojaka reakcijske smjese nakon optimizacije uvjeta za umnažanje dizajniranim početnicama prikazani su u Tablica .

**Tablica 6.** Volumeni sastojaka reakcijske smjese za umnažanje domene PDZ

Sastojak	Volumen sastojka ( $\mu$ L)
Bezbojni pufer 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer	5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,8
dNTP (2,5 mM)	0,4
5' početnica (10 $\mu$ M)	0,8
3' početnica (10 $\mu$ M)	0,8
DNA polimeraza Taq	0,2
Deionizirana voda	12
Genomska DNA (~200 ng/ $\mu$ L)	4

Prema uputama tvrtke za sekvenciranje Macrogen Europe B.V. dostupnima na poveznici [https://dna.macrogen-europe.com/eng/support/ces/guide/order\\_guide.jsp](https://dna.macrogen-europe.com/eng/support/ces/guide/order_guide.jsp), uzorci su prije reakcije umnažanja razrijeđeni u deioniziranoj vodi na 200 ng/ $\mu$ L, kako bi se smanjio udio pufera TE koji bi mogao narušiti kvalitetu rezultata sekvenciranja. Nadalje, uz volumene sastojaka reakcijske smjese, optimizirana je i temperatura prijanjanja početnica te je konačna izabrana temperatura prijanjanja početnica iznosila 58,6 °C. Temperaturni uvjeti za umnažanje prikazani su na Slika 10.





**Slika 10.** Optimizirani uvjeti za umnažanje biljega D1S468 metodom PCR.

### 3.6. Provjera uspješnosti umnažanja ciljanih gena horizontalnom elektroforezom u agaroznom gelu

Uspješnost PCR reakcije provjerena je elektroforezom u 2% agaroznom gelu (Sigma, Njemačka) uz dodatak fluorescentne boje SYBR Safe (ThermoFisher Scientific, SAD). U jažice polimeriziranog agaroznog gela dodano je 4  $\mu$ L produkta PCR reakcije i 1  $\mu$ L pufera za nanošenje uzorka (AL-Labortechnik, AL-Diagnostic GmbH, Austrija). U prvu jažicu svakog reda nanoseno je 4  $\mu$ L standarda, tzv. DNA-ljestvi (50 pb) kako bi se potvrdila odgovarajuća veličina traženih fragmenata i uklonila mogućnost postojanja fragmenata nastalih nespecifičnim vezanjem.

Elektroforeza je provedena u horizontalnoj kadici u trajanju od 10 do 15 minuta pri 120 V. Rezultati elektroforeze, tzv. DNA vrpce, vizualizirani su pod UV svjetlom na transiluminatoru pri valnoj duljini od 254 nm.

### 3.7. Analiza genskih promjena pomoću mikrosatelitnog biljega D1S468 horizontalnom elektroforezom na gelovima Spreadex

Genske promjene poput mikrosatelitne nestabilnosti (engl. *microsatellite instability*, MSI) i gubitka heterozigotnosti (engl. *loss of heterozygosity*, LOH) moguće je vizualizirati na komercijalno dostupnim gelovima Spreadex zbog njihove izuzetno visoke razlučivosti.

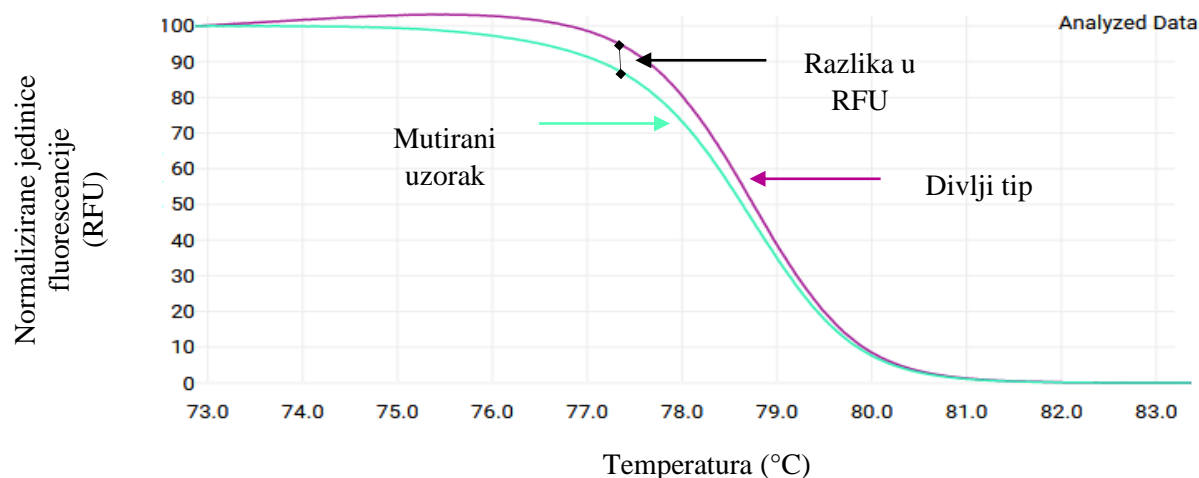
Za analizu korišteni su gelovi Spreadex EL400 Mini (AL-Labortechnik, AL-Diagnostic GmbH, Austrija) razlučivosti u iznosu od 1 pb i sustav za elektroforezu ORIGINS by Elchrom™ Scientific (AL-Labortechnik, AL-Diagnostic GmbH, Austrija). U jažice gela dodani su redom standard (50 pb) i upareni uzorci tumora i pripadajuće krvi kako bi se promjene gena u uzorku tumora mogle usporediti s kontrolnim uzorkom krvi istog pacijenta.

Elektroforeza se odvijala 60 minuta pri 55 °C i 120 V u puferu TAE pH 8 (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA). Nakon elektroforeze, gelovi s uzorcima bojani su 20 minuta bojom Sybr Gold (Molecular probes, SAD) u mraku tako da je u 50 mL pufera TAE dodano 5 µL boje Sybr Gold. Otopina s bojom zatim je dekantirana i dodano je 0,5 mL otopine za odbojavanje (ABC Biopply, Švicarska), 20 mL pufera TAE i 29,5 mL dH<sub>2</sub>O kako bi se gel odbojao unutar 30 minuta. U konačnici je gel prebačen na transiluminator te su DNA vrpce vizualizirane i fotografirane pod UV svjetlom valne duljine 254 nm.

### **3.8. Utvrđivanje mutacija u domeni PDZ gena *DVLI* analizom taljenja visoke rezolucije**

Analiza taljenja visoke rezolucije (engl. *high resolution melting analysis*, HRM) je post-PCR metoda analize s ciljem detekcije razlika u nukleotidnim sljedovima uzoraka.

Metoda uključuje dvije osnovne faze, fazu PCR reakcije u stvarnom vremenu (engl. *real-time PCR*), tijekom koje dolazi do umnažanja gena od interesa, i fazu taljenja, tijekom koje dolazi do smanjenja fluorescentnog signala denaturacijom molekule DNA kontinuiranim povećavanjem temperature. Izmjerena količina fluorescencije u mjernoj jedinici RFU (engl. *relative fluorescence units*) pretvara se u krivulju pomoću softvera za HRM te se na temelju razlika u krivuljama uzorka i kontrolne sekvence utvrđuje mogućnost postojanja mutacija (Slika .).



**Slika 11.** Krivulja taljenja nastala metodom HRM i analizirana u besplatnom softveru uAnalyze SM (Dwight i sur., 2012.). Za potrebe generiranja krivulje korišteni su demo-podaci dostupni na internet stranici softvera. (<https://dna-utah.org/ua/uanalyze.html>). RFU (eng. *relative fluorescence units*) predstavlja količinu svjetlosti koju je izmjerio uređaj za HRM.

Za pripremu reakcijske smjese korišten je komercijalno dostupan komplet LightCycler® 480 High Resolution Melting Master. Reakcijska smjesa pripremljena je za adekvatan broj uzoraka u Eppendorfer epruveti volumena 1,5 mL na ledu prema Tablici 6. Ukupan volumen reakcijske smjese iznosi 20  $\mu\text{L}$  te su u svrhu umnažanja domene PDZ i detekcije mutacija korištene početnice opisane u Tablica .

**Tablica 7.** Volumeni sastojaka reakcijske smjese jednog uzorka za provođenje metode HRM.

Sastojak smjese	Volumen sastojaka za jednu reakciju ( $\mu\text{L}$ )
LightCycler® 480 High Resolution Melting Master 2x	10
Resolight dye	2
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	0,8
5' početnica za domenu PDZ (10 $\mu\text{M}$ )	0,8
3' početnica za domenu PDZ (10 $\mu\text{M}$ )	2,4
H <sub>2</sub> O	4
DNA (15 ~ 20 ng/ $\mu\text{L}$ )	

Smjesa je lagano protresena kako bi se svi sastojci promiješali te je razdijeljena u epruvete za PCR povezane u traku (engl. *strip tubes*). Stripovi se sastoje od 8 epruveta u koje je razdijeljena reakcijska smjesa. U prvih sedam epruveta dodano je 4  $\mu\text{L}$  DNA uzorka tumora ili krvi, a u osmu

epruvetu s reakcijskom smjesom dodano je 4  $\mu$ L vode umjesto DNA kao negativna kontrola potencijalnog zagađenja smjese. Ukoliko je neka od epruveta na stripu ostala prazna, dodano je 20  $\mu$ L vode. Stripovi su zatim zatvoreni i smješteni u uređaj za HRM (Roche LightCycler®Nano System) kako bi se pokrenula reakcija unutar softvera za HRM (LightCycler®Nano, Roche) prema uvjetima u Tablici 8.

**Tablica 8.** Uvjeti umnažanja i taljenja DNA u metodi HRM.

HRM faza		Temperatura	Stopa promjene temperature (engl. <i>Temperature ramp</i> )	Trajanje
Zadržavanje (engl. <i>hold</i> )		96°C	5	200 s
Amplifikacija u 3 koraka (45 ciklusa)	<i>Denaturacija</i>	95°C	4	35 s
	<i>Prianjanje</i>	59°C	4	35 s
	<i>Sinteza DNA</i>	72°C	4	35 s
Zadržavanje prije topljenja I (engl. <i>pre-melt hold I</i> )		95°C	4	60 s
Zadržavanje prije topljenja II (engl. <i>pre-melt hold II</i> )		40°C	4	60 s
Početna faza topljenja visoke rezolucije		65°C	4	1 s
Krajnja faza topljenja visoke rezolucije		90°C	0,05	1 s

### 3.9. Utvrđivanje vrste mutacija u domeni PDZ Sangerovom metodom sekvenciranja

Uzorci tumora umnoženi su metodom PCR kao što je opisano u potpoglavlju 3.5.2. Zatim su PCR produkti enzimski pročišćeni pomoću kompleta FastAP (ThermoFisher Scientific, SAD) i sekvencirani pomoću kompleta BigDyeTerminator v3.1 Cycle Sequencing na uređaju ABI 3730XL (Applied Biosystems, SAD) tvrtke Macrogen Europe B.V. (Amsterdam, Nizozemska). Dobivene tumorske sekvence domene PDZ gena *DVLI* uspoređene su sa sekvencom dostupnom u bazi podataka NCBI na poveznici: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NG\\_008048?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast\\_rank=1&RID=0](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NG_008048?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=1&RID=0). Provjera utjecaja mutacija na biološku funkciju proteina DVL1 provedena je pomoću javno dostupnog programa PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>).

### 3.10. Analiza podataka statističkim metodama

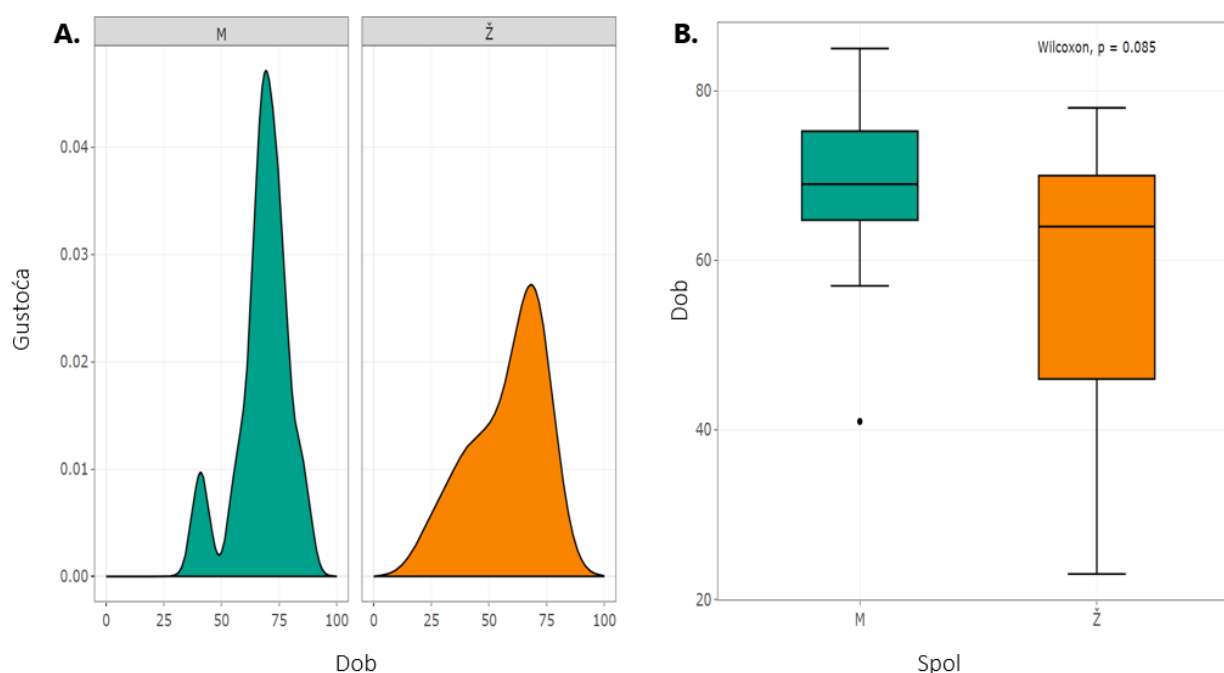
Rezultati istraživanja obrađeni su u javno dostupnom programu RStudio (<https://rstudio.com/>) pomoću programskog jezika R te su prikazani i grafički korištenjem R-paketa *ggplot2*, *ggpubr* i *plotly* sa službenog R repozitorija CRAN (<https://cran.r-project.org/>). Za obradu rezultata korištena je razina značajnosti  $\alpha < 0,05$ .

Prije podvrgavanja statističkim testovima podacima je provjerena normalnost distribucije pomoću testa Shapiro-Wilk, budući da je u ovaj rad uključeno manje od 50 uzoraka. Uzorak se smatra normalno distribuiranim u slučaju kada mu je p vrijednost Shapiro-Wilk testa veća od 0,05.

Ovisno o rezultatima testa normalnosti, za odnos između dobi pacijenata i ostalih varijabli korišteni su parametrijski testovi t-test i ANOVA, odnosno njihove neparametrijske inačice Mann-Whitney U test i Kruskal-Wallis test. Za usporedbu kategoričkih varijabli korišten je  $\chi^2$  test, odnosno Fisherov test ukoliko je kategorija sadržavala manje od 5 uzoraka.

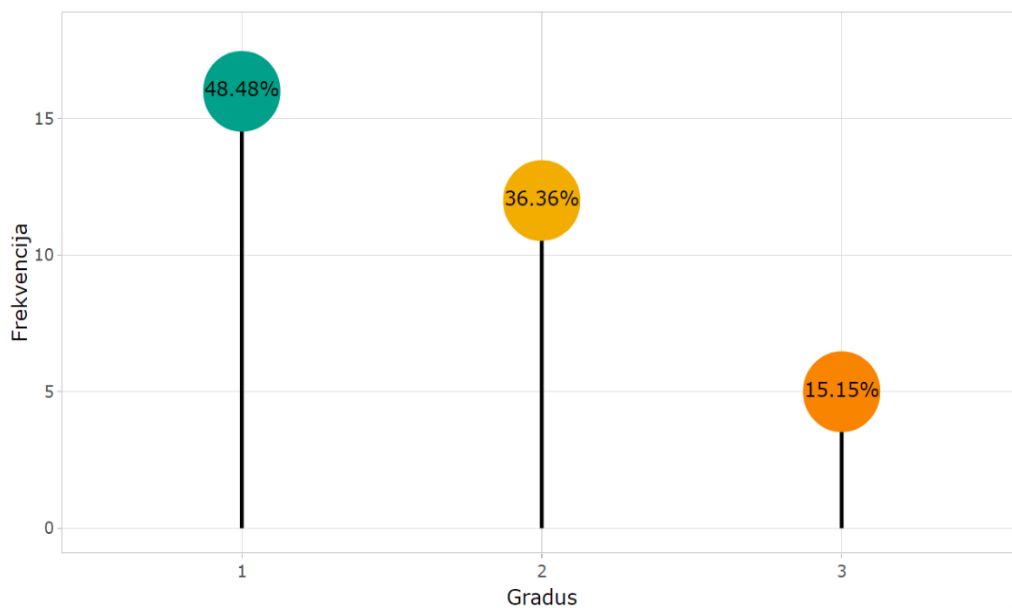
## 4. Rezultati

Analizirana su 33 uzorka intrakranijalnih meningeoma i pripadajuće periferne krvi, među kojima je 22 uzorka (66,67%) pripadalo pacijentima ženskog spola, a 11 uzorka (33,33%) pacijentima muškog spola. Životna dob pacijenata nalazila se u rasponu od 23 do 85 godina sa srednjom vrijednošću od 61,12 godina i medijanom od 67 godina. Rezultati testa Shapiro-Wilk pokazali su da dobna distribucija odstupa od normalne, zbog čega su dalje u rezultatima korištene neparametrijske inačice statističkih testova. Usporedbom distribucija dobi muških i ženskih pacijenata nije utvrđena statistički značajna razlika ( $p=0,085$ ) (Slika 12.).



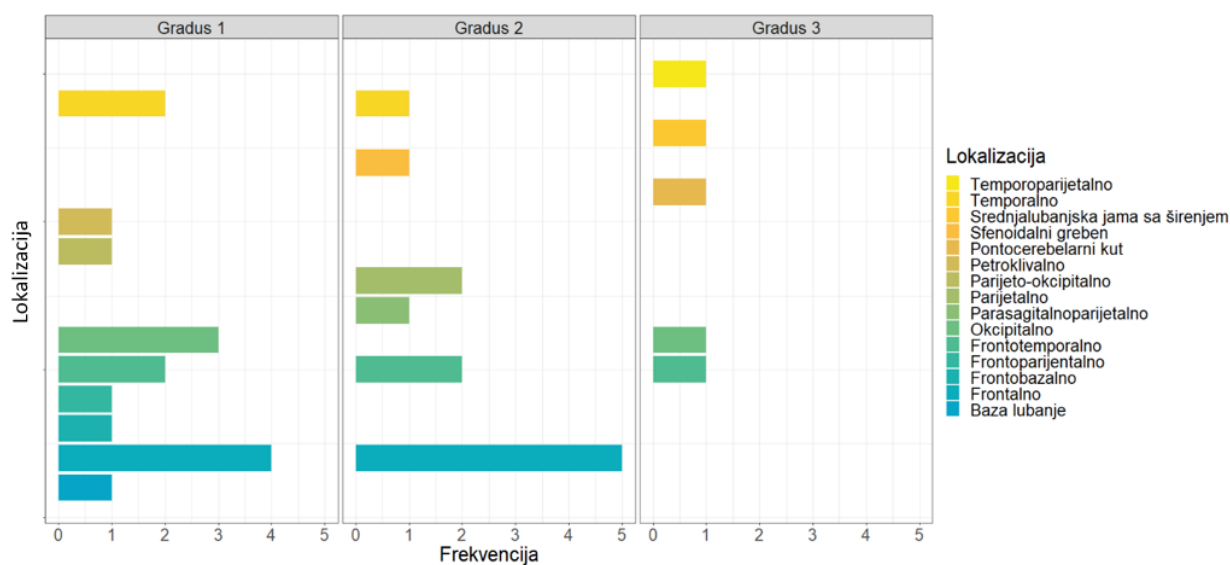
**Slika 12.** Dobne distribucije muških (M) i ženskih (Ž) pacijenata. A. Izgled dobnih distribucija pacijenata muškog i ženskog spola. B. Vizualno i numerički prikazan je rezultat Mann-Whitney U testa pomoću dijagrama s pravokutnom (eng. *boxplot*). Točka ispod zelenog dijagrama s pravokutnikom predstavlja ekstremnu vrijednost dobi jednog pacijenta.

Analizirano je 16 uzoraka gradusa I, 12 uzoraka gradusa II i 5 uzoraka gradusa III (Slika 13.). Nije utvrđena statistički značajna razlika između pojavnosti pojedinih gradusa intrakranijalnih meningeoma s obzirom na dob pacijenata pomoću testa Kruskal-Wallis ( $p = 0,259$ ). Upotrebom Fisherovog testa utvrđena je statistički značajna razlika između pojavnosti pojedinog gradusa tumora u odnosu na spol pacijenata ( $p = 0,026$ ), pri čemu muškarci pokazuju veću tendenciju prema razvijanju intrakranijalnih meningeoma viših gradusa, a žene nižih.



**Slika 13.** Pojavnost različitih gradusa u uzorku intrakranijalnih meningeoma.

Svi prikupljeni tumori gradusa II klasificirani su kao atipični, a svi tumori gradusa III kao anaplastični intrakranijalni meningeomi. Varijabilnost patohistoloških podtipova meningeoma gradusa I bila je veća – prikupljeno je ukupno 7 meningotelijalnih, 5 tranzicijskih, 3 psamomska i 1 fibrozni meningeom. Prikupljeni tumori bili su najčešće smješteni u frontalnim dijelovima mozga, a sve lokalizacije tumora s obzirom na gradus prikazane su na Slici 14.

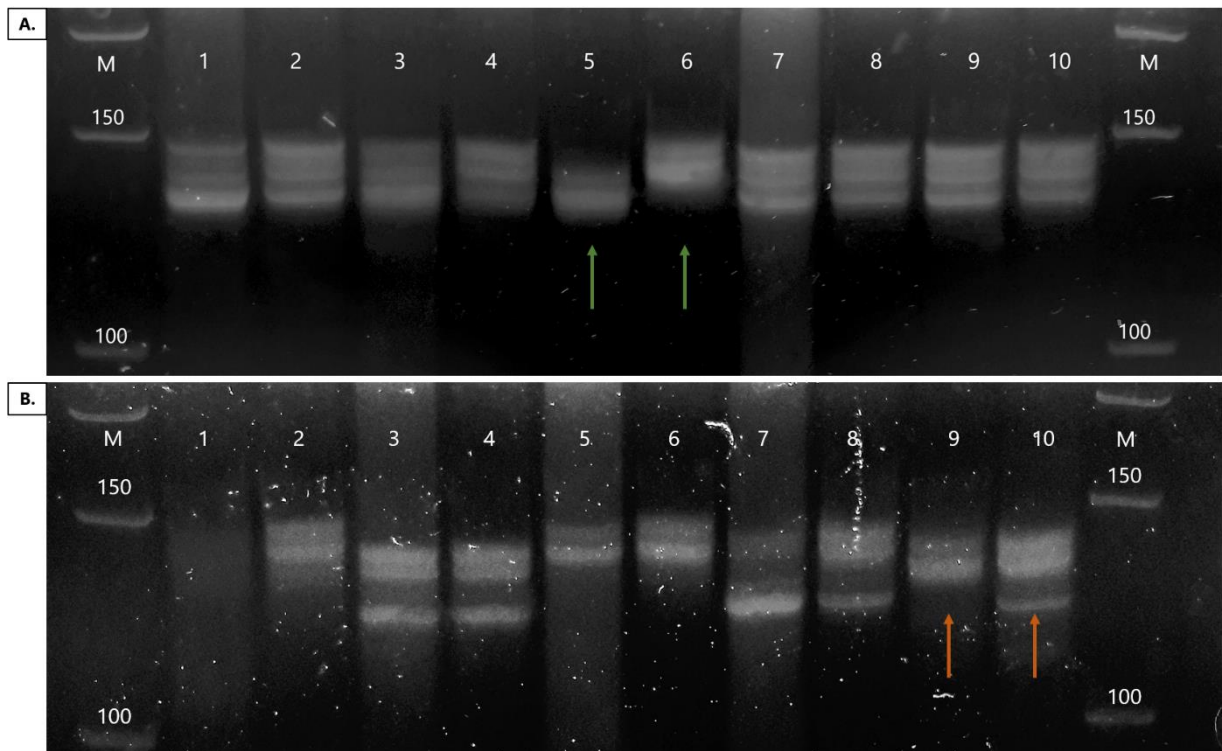


**Slika 14.** Frekvencija lokalizacija prikupljenih uzoraka intrakranijalnih meningeoma s obzirom na gradus.

#### 4.1. Rezultati analize mikrosatelitne nestabilnosti i gubitka heterozigotnosti gena *DVLI*

Mikrosatelitni biljeg za gen *DVLI* D1S468 pokazao se visokoinformativnim s obzirom na ukupan postotak heterozigotnosti u iznosu od 100%.

Od 33 analizirana intrakranijalna meningeoma, 3 uzorka (9,09%) pokazala su mikrosatelitnu nestabilnost (MSI), a 2 uzorka (6,06%) pokazala su gubitak heterozigotnosti (LOH). Ukupan broj uzoraka u kojima je gen *DVLI* bio promijenjen iznosio je 15,15%. Od ukupno 5 uzoraka u kojima je pronađena jedna od ovih dviju promjena, 4 uzorka pripadala su pacijentima ženskog spola. S obzirom na rezultate Fisherovog testa nije dokazana statistički značajna razlika između spola pacijenata i MSI ili LOH ( $p = 1,000$ ,  $p = 0,542$ ) niti između gradusa uzoraka i MSI ili LOH ( $p = 0,053$ ,  $p = 1,000$ ). Primjeri promjena MSI i LOH prikazani su na Slici 15.



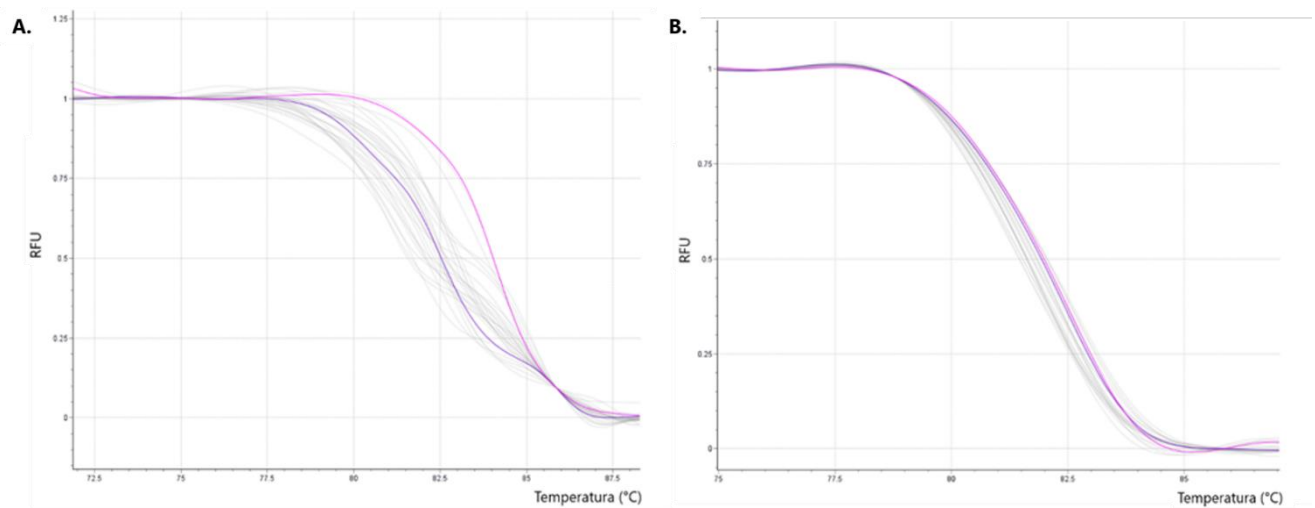
**Slika 15.** Rezultati analize MSI i LOH na Spreadex gelovima. Slovom M označene su pruge sa standardom. Brojevima 1, 3, 5, 7, i 9 označene su pruge s tumorskim uzorcima, a brojevima 2, 4, 6, 8 i 10 s uzorcima pripadajuće periferne krvi. A. – zelenim strelicama prikazan je MSI, B. – narančastim strelicama prikazan je LOH.



## 4.2. Rezultati analize taljenja visoke rezolucije i Sangerovog sekvenciranja genske regije *DVLI* koja kodira domenu PDZ

Analizom taljenja visoke rezolucije (HRM) i usporedbom krivulja nukleotidnih sekvenci tumora i pripadajuće periferne krvi probrani su uzorci koji su potencijalno pogođeni mutacijom.

Od ukupno 33 uzorka, metodom HRM utvrđene su promjene usporedbom krivulja tumora i pripadajuće krvi u gotovo svim uzorcima, pri čemu je 10 uzoraka (30,30%) pokazalo velika odstupanja krivulje tumora od kontrolne krivulje (Slika 16.).



**Slika 16.** Prikaz mutiranog (A.) i nemutiranog uzorka (B.). Jedinice fluorescencije (RFU) normalizirane su bilinearnom normalizacijom radi lakše usporedbe krivulje tumora i krivulje krvi.

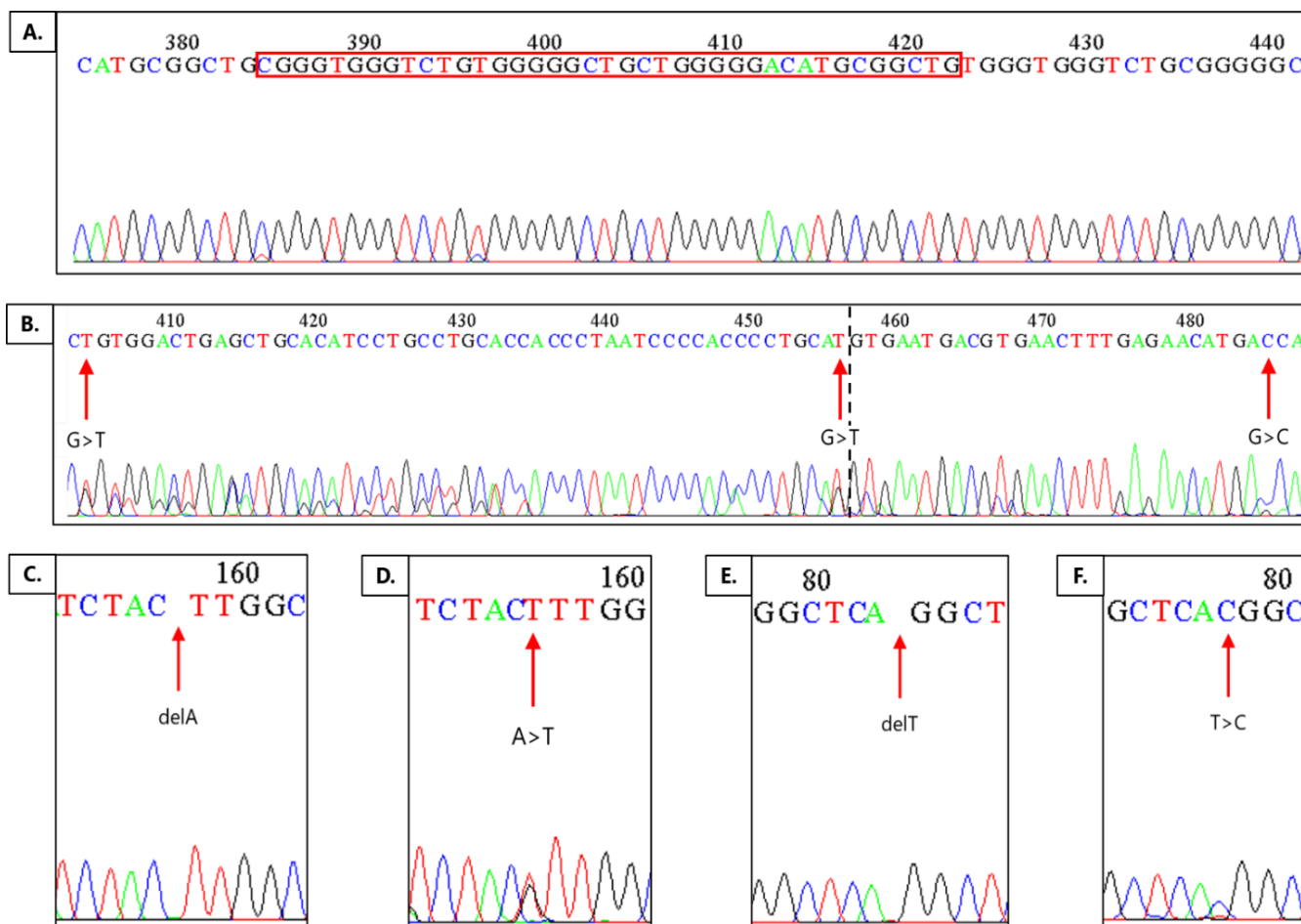
Budući da metoda HRM ponekad može dati lažno pozitivne rezultate te da pomoću nje nije moguće utvrditi vrstu mutacija, uzorci su sekvencirani metodom klasičnog Sangerovog sekvenciranja.

Uspješno je umnožena regija gena *DVLI* koja kodira domenu PDZ, te je Sangerovom metodom sekvencirano 26 uzoraka tumorske DNA. Analiza poravnanja redoslijeda 26 sekvenci u odnosu na referentnu sekvencu (NG\_008048.2, 27.12.2018.) programom BLAST pokazala je podudarnost poravnanja u rasponu od 98% do 99%. Usporedbom tumorskih sekvenci s

referentnom utvrđeno je postojanje nukleotidnih promjena u 100% sekvenciranih uzoraka koje su sistematizirane u Tablici 9 te prikazane na Slici 17.

**Tablica 9.** Sistematizacija mutacija utvrđenih metodom Sangerovog sekvenciranja.

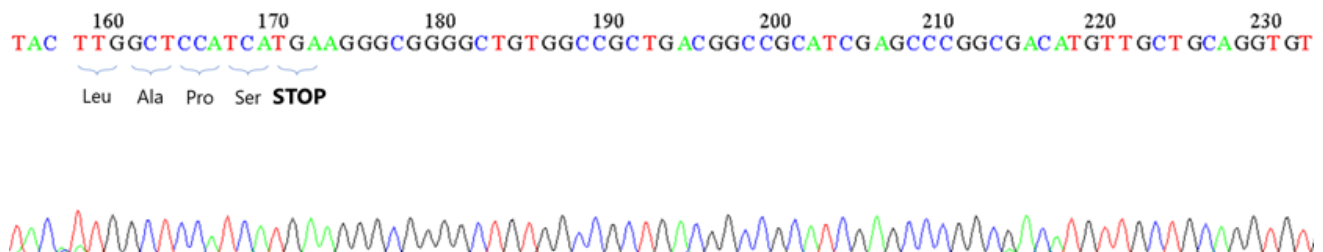
Mjesto mutacije	Mutacija	Broj uzoraka s mutacijom
Intron 7	NG_008048.2: g.13921delT	7
Intron 7	NG_008048.2: g.13921T>C	1
Egzon 8	NG_008048.2: g.14004delA	4
Egzon 8	NG_008048.2: g.14004A>T	1
Intron 8	NG_008048.2: g.14228_14267dup	25
Intron 8	NG_008048.2: g.14248G>T, g.14300G>T	1
Egzon 9	g.14329G>C	1



**Slika 17.** Mutacije detektirane metodom Sangerovog sekvenciranja. A – g.14228\_14267dup (crveni okvir), B – g.14248G>T, g.14300G>T, g.14329G>C, C – g.14004delA, D – g.14004A>T, E – g.13921delT, F – g.13921T>C. Isprekidana linija označava mjesto prekraranja molekule pre-mRNA.

Pri utvrđivanju mutacija metodom HRM većina uzoraka nije pokazala potpuno preklapanje tumorskih i kontrolnih krivulja. Rezultatima Sangerovog sekvenciranja utvrđena je velika intronska duplikacija od 39 pb g.14228\_14267dup koja je utvrđena u 96% (25/26 sekvenciranih) uzoraka. Usporedbom rezultata metode HRM i metode Sangerovog sekvenciranja utvrđeno je da promjene g.13921delT te g.14004A>T i g.13921T>C uzrokuju slabije odstupanje tumorskih krivulja od krivulja pripadajuće periferne krvi. Za razliku od njih, promjena g.14004delA pokazala je puno veće odstupanje u svim HRM krivuljama sekvenciranih uzoraka koji su pogođeni tom mutacijom, kao i promjene g.14248G>T, g.14300G>T i g.14329G>C koje su sve pronađene u samo jednom uzorku. Među odabranim uzorcima koji su poslani na sekvenciranje, utvrđen je samo jedan lažno pozitivan rezultat HRM analize. Od ukupno 8 vrsta utvrđenih promjena, promjene s najvećom frekvencijom bile su g.14228\_14267dup pronađena u 25 uzoraka (96,15%), g.13921delT pronađena u 7 uzoraka (26,92%) i g.14004delA pronađena u 4 uzorka (15,38%). Rezultati statističkih testova nisu pokazali značajnu povezanost promjena s gradusom tumora i spolom pacijenata ( $p = 0,509$ ,  $p = 0,43$ ).

Analizom otkrivenih promjena u tumorskim sekvencama genske regije koja kodira domenu PDZ, utvrđeni su njihovi mogući učinci na rad i funkciju proteina DVL1. Delecija nukleotida A u egzonu 8 (g.14004delA) mijenja okvir čitanja prilikom translacije (tzv. *frameshift* mutacija). Nalazi se na mjestu kodona ATT iz kojega prilikom sinteze proteina nastaje aminokiselina izoleucin. Promjena okvira čitanja uzrokovana ovom delecijom dovodi do nastanka stop-kodona u istom egzonu nizvodno od delecije, koji uzrokuje skraćeni oblik proteina DVL1 s promijenjenom aktivnošću i funkcionalnošću (Slika 18.).



**Slika 18.** Posljedica delecije nukleotida u egzonu 8 gena *DVL1*.

Supstitucija nukleotida A u T (g.14004A>T) opažena u jednom uzorku uzrokuje promjenu kodona ATT u TTT i mijenja aminokiselinu Ile u Phe. Pomoću alata za analizu efekta varijacija u proteinu PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>) utvrđeno je da ova mutacija ima štetan biološki učinak na protein DVL1. Nadalje, supstitucija g.14329G>C uzrokuje promjenu aminokiseline Ser u aminokiselinu Thr, ali analizom ove promjene utvrđeno je da ne dolazi do narušavanja tercijarne i kvartarne strukture proteina DVL1 niti promjene njegove biološke funkcije.

Analizom delecije nukleotida T (g.13921delT) i supstitucije istog nukleotida T u C (g.13921T>C) u intronu 7 te duplikacije g.14228\_14267dup u intronu 8, nije utvrđen učinak ovih promjena na biološku funkciju proteina DVL1 programom PROVEAN.

Promjene g.14248G>T i g.14300G>T utvrđene su u intronu 8 istog uzorka. S obzirom da se nalaze u intronu, nemaju direktan utjecaj na aminokiselinski slijed domene PDZ, ali se g.14300G>T nalazi u samom mjestu prekrajanja na granici introna 8 i egzona 9, a g.14248G>T nalazi se u blizini istog mjesta. Zbog svoje lokacije, navedene promjene okarakterizirane su kao mutacije mjesta prekrajanja (engl. *Splice site mutation*) koje mijenjaju duljinu proteina DVL1.

## 5. Rasprava

Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti promjene na genu *DVLI* kako bi se utvrdio njegov značaj i uloga u nastanku i progresiji meningeoma. Iz demografskih podataka i patohistološke dijagnoze utvrđena je statistički značajna razlika između gradusa tumora i spola koja upućuje na to da su muškarci češće oboljevali od anaplastičnih i atipičnih meningeoma u odnosu na žene. Navedeni rezultati u skladu su s dosadašnjim istraživanjima (Shao, 2020) u kojima je pokazano kako maligniji oblici meningeoma češće pogađaju muškarce, a benigni oblici češće pogađaju žene.

Visoko informativni mikrosatelitni biljeg D1S467 nalazi se nedaleko od gena *DVLI* u kromosomskoj regiji 1p36 i omogućava pouzdano utvrđivanje promjena na ovom genu. Rezultati analize uporabom biljega D1S468 pokazali su postojanje mikrosatelitne nestabilnosti na genu *DVLI* u 9,09% uzoraka i gubitka heterozigotnosti na genu *DVLI* u 6,06% uzoraka. S obzirom da je za analizu korišten samo jedan biljeg, rezultati jasno upućuju da je gen *DVLI* pogođen u dijelu meningeoma. Rezultati statističkih testova pokazali su da ne postoji povezanost MSI i LOH gena *DVLI* sa demografskim ili patohistološkim podacima pacijenata. Iako je očekivano da će se frekvencija MSI i LOH povećavati s tumorskim gradusom, promjene su bile podjednako distribuirane u svim gradusima.

Dosadašnja istraživanja opisuju ulogu gena iz porodice DVL u nekoliko vrsta tumora, ali većina sadrži analize proteinske ekspresije bez genskih analiza. Još početkom prošlog desetljeća utvrđena je uloga proteina DVL1 u tumorima dojke analizom amplifikacije gena *DVLI*, gubitka heterozigotnosti i proteinske ekspresije (Nagahata i sur., 2003). Prema tom istraživanju, LOH je utvrđen u 10% uzoraka, što otprilike odgovara rezultatima i ovog diplomskog rada. Kolektivni rezultati tog rada upućuju na ulogu proteina DVL1 u progresiji tumora dojke. Uz DVL1, Zhu i sur. (2012) pokazali su uključenost i proteina DVL2 u progresiju tumora dojke kao dio signalnog puta DVL2/Daam1/RhoA čija aktivacija potiče migraciju tumorskih stanica. Nadalje, u svom radu su Pećina-Šlaus i sur. (2017) otkrili povišenu frekvenciju MSI i LOH gena *DVL3* u meningeomima koja je pozitivno korelirala s gradusom III. U istom radu otkrivene su i promjene gena *MSH2*, čiji je produkt važan u postreplikacijskom popravku krivo sparenih baza i objašnjava nastanak MSI. S obzirom da je u ovaj diplomski rad uključen mali broj uzoraka gradusa III, vrijedilo bi uključiti

više uzoraka tog gradusa kako bi se utvrdilo postoji li korelacija između MSI i LOH gena *DVLI* s gradusom III intrakranijalnih meningeoma.

Za ovaj diplomski rad od velike je važnosti i istraživanje u kojem su Kafka i sur. (2018) utvrdili su postojanje MSI i LOH gena *DVLI* u astrocitomima koristeći dva mikrosatelitna biljega. Jedan od korištenih biljega je i D1S468, koji je upotrijebljen i u ovom diplomskom radu. Ovaj je biljeg pokazao visoku frekvenciju MSI u svim gradusima astrocitoma i u glioblastomima, što nije u skladu s rezultatima ovog diplomskog rada, koji su pokazali MSI u samo tri uzorka. Analiza LOH istim biljegom pokazala je postojanje ove promjene isključivo u glioblastomima u 8,6% uzoraka. Frekvencija LOH gena *DVLI* u astrocitomima slična je rezultatima ovog diplomskog rada koji pokazuju postojanje LOH u 6,06% intrakranijalnih meningeoma. Ukoliko se uzme u obzir i ranije spomenuto istraživanje na tumorima dojke (Nagahata i sur., 2003), može se uvidjeti kako postojanje LOH u genu *DVLI* nije toliko učestala pojava. Ipak, budući da je korištenjem dodatnog mikrosatelitnog biljega u radu od Kafka i sur. (2018) utvrđena veća frekvencija LOH u astrocitomima, vrijedilo bi istražiti pojavu LOH i MSI uporabom većeg broja biljega za gen *DVLI* kako bi se produbili rezultati ovog diplomskog rada.

Uzmu li se u obzir kolektivni rezultati ovog diplomskog rada, analiza frekvencije pojavljivanja MSI i LOH nije pokazala trend porasta ili pada s obzirom na gradus tumora kao što je to bilo očekivano. Budući da je upotrijebljen samo jedan mikrosatelitni biljeg uzvodno od ciljanog gena, u budućim bi se istraživanjima trebalo upotrijebiti više biljega u blizini gena *DVLI* te bi se u istraživanje trebalo uključiti više uzoraka, posebice uzoraka gradusa III, kako bi se s većom sigurnošću mogla utvrditi biološka važnost MSI i LOH u genu *DVLI* u intrakranijalnim meningeomima. Uz navedeno, buduća istraživanja trebala bi uključiti i korelacijsku analizu između promjena gena *DVLI* i ekspresije proteina DVL1 nakon dodatnih metoda analize proteina.

Za razliku od analize MSI i LOH gena *DVLI*, rezultati analize taljenja visoke rezolucije (HRM) i Sangerovog sekvenciranja dali su bolji uvid u ulogu gena *DVLI* u intrakranijalnim meningeomima. Uočene su mutacije u svim sekvenciranim uzorcima te je njihova važnost određena s obzirom na genomsku lokaciju koju su pogodile i potencijalne posljedice koje mogu nositi vezane za strukturu i rad proteina DVL1 upotrebom prediktivnih programa.

Budući da je HRM metoda s visokom specifičnošću i rezolucijom, analizom razlike u odstupanju krivulja moguće je naslutiti i vrstu mutacije. Primjerice, promjena nukleotida A/T u

G/C rezultat će većim odstupanjem krivulja od promjena u kojima dolazi do očuvanja broja veza između nukleotida. Također, veće insercije i delecije rezultat će većim odstupanjem krivulja od manjih promjena broja nukleotida (Bilbao-Sieyro i sur., 2014; Turner i sur., 2016). Ova svojstva metode HRM važna su u tumačenju rezultata ovog diplomskog rada. Naime, činjenica da je u gotovo svim rezultatima zabilježena duplikacija g.14228\_14267dup od 39 pb objašnjava zašto je većina krivulja pokazala odstupanje od referentne. Tumorske krivulje koje su pokazale najveće odstupanje od krivulja pripadajuće periferne krvi, odgovaraju sekvenciranim uzorcima u kojima je utvrđena delecija A u egzonu 8, g. 14004delA, i uzorku u kojem su pronađene tri mutacije, g.14248G>T, g.14300G>T i g.14329G>C. Krivulja uzorka sa štetnom mutacijom g.14004A>T, koja mijenja aminokiselinski sastav proteina DVL1, manje je odstupala od referentne što je posljedica već spomenutog očuvanja broja veza između parova baza supstitucijom A u T. Za razliku od njih, krivulje uzoraka s promjenama g.13921delT i g.13921T>C, koji su također sadržavali i promjenu g.14228\_14267dup, pokazale su jednako odstupanje kao i krivulje čiji su uzorci sadržavali samo duplikaciju g.14228\_14267dup. Zbog ove pojave i činjenice da nije utvrđen utjecaj ovih dviju promjena na strukturu proteina DVL1, moguće je da su navedene promjene polimorfizmi jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorfism*, SNP). Budući da dosadašnja istraživanja nisu pokazala postojanje polimorfizama na ovim lokacijama, u daljnjim istraživanjima potrebno je sekvencirati i uzorke pripadajuće periferne krvi kako bi se utvrdilo postoje li navedene promjene i u njima te da bi se mogle sa sigurnošću odrediti kao SNP-ovi.

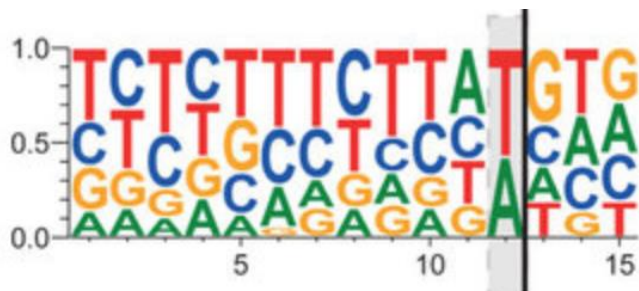
Najčešće zabilježena promjena je duplikacija u intronu 8, g.14228\_14267dup, za koju analizom uz upotrebu prediktivnih softvera nije utvrđen značajan utjecaj na rad proteina DVL1. Ipak, mnoga istraživanja pokazuju kako *indel* mutacije introna, točkaste mutacije i druge promjene koje nisu u samom mjestu prekrajanja (donorskom ili akceptorskom), mogu imati utjecaj na alternativno prekrajanje molekule pre-mRNA (Ars i sur., 2000; Buratti i Baralle, 2004; Rogic i sur., 2008; Rubtsov, 2016). Naime, duplikacija od 39 pb poput ove mogla bi utjecati na promjene sekundarne strukture pre-mRNA koje bi mogle djelovati na rad mašinerije za prekrajanje. Tako se s jedne strane može teoretizirati da nova sekundarna struktura uzrokuje zadržavanje postojećeg introna zbog nemogućnosti prilaska mašinerije za prekrajanje 5' donorskom i 3' akceptorskom mjestu prekrajanja introna zbog čega nastaje dulji protein. S druge strane, može doći i do nastanka RNA petlje koja se sastoji od introna, ali uključuje i jedan od susjednih egzona. Prekrojanje takve petlje dovodi do izrezivanja i zahvaćenog egzona čime nastaje kraći protein. Kao što je opisano u

radu od Lin i sur. (2016), strukture peteljke (engl. *stem*) u mjestima prekrajanja mogu dovesti do alternativnog prekrajanja genske regije i posljedično do nastanka mRNA izoformi specifičnih za neke bolesti, a često i tumore. Strukture peteljke zbog svoje dvolančane prirode inhibiraju i vezanje pojačivača prekrajanja (engl. *splicing enhancers*) koji imaju veći afinitet za vezanje na jednolančane regije. Također je dokazano i da sastav nukleotida G i C može utjecati na nastanak sekundarnih struktura jer viši postotak GC parova baza pozitivno korelira s postotkom alternativno prekrojenih egzona. Ova činjenica je posebno važna u kontekstu proučavanja domene PDZ zbog prirodno visokog postotka GC parova baza u regiji, koji se dodatno povećava duplikacijom g.14228\_14267dup. Budući da dosadašnja istraživanja nisu zabilježila ovakvu pojavu u proteinima iz porodice DVL, potrebno je u budućnosti potvrditi učinak ove duplikacije na rad proteina DVL1 metodama analize proteinske ekspresije i analizom duljine proteinskog produkta gena *DVLI*.

Mutacija s najjačim potencijalnim efektom je delecija nukleotida A u egzonu 8, g.14004delA. Analizom je utvrđeno da ova mutacija mijenja okvir čitanja i uzrokuje skraćenu verziju proteina DVL1 nastankom preuranjenog stop-kodona u egzonu 8 genske regije koja kodira domenu PDZ. Ovakve mutacije u većini slučajeva djeluju štetno stvarajući nefunkcionalne proteine koji nemaju mogućnost obavljanja svoje stanične uloge, no postoje istraživanja koja su pokazala kako skraćene verzije proteina mogu pogodovati nastanku i razvitku tumora. U svojem su istraživanju Brennan i sur. (2004) otkrili da skraćene verzije koreceptora LRP5/6 stabiliziraju  $\beta$ -katenin neovisno o ostalim membranskim proteinima koji sudjeluju u prijenosu Wnt signala te da je skraćeni oblik LRP5/6 koreceptora otporan na degradaciju i endocitozu. Zbog svih navedenih svojstava pretpostavljena je moguća protoonkogeni uloga koreceptora LRP5/6 u stanicama tumora koja potiče konstitutivni prijenos kanonskog signalnog puta Wnt. Osim LRP5/6, u radu od Schneikert i Behrens (2007) utvrđena je uloga i skraćenog oblika proteina APC u kolorektalnom tumoru. Prema njihovom istraživanju, skraćeni oblik proteina APC stimulira migraciju stanica kolorektalnog tumora i potiče nastanak kromosomske nestabilnosti. Ova istraživanja upućuju na to da bi skraćeni oblik proteina DVL1 uzrokovan mutacijom g.14004delA u 15,38% uzoraka, mogao biti svojstven u intrakranijalnim meningeomima te uzrokovati pojačani prijenos signalnog puta Wnt i time stimulirati tumorigenezu.



Jedan je uzorak pokazao supstituciju nukleotida G na 3 mjesta. Supstitucije g.14248G>T i g.14300G>T u intronu 8 određene su kao mutacije mjesta prekrajanja. Nastanak novog alternativnog mjesta prekrajanja mogu objasniti rezultati iz rada Sibley i sur. (2016), a konzensus sekvenca novog mjesta prekrajanja prikazana je na Slici 19. Uslijed ovih dviju supstitucija moguć nastanak duljeg proteina DVL1 koji zadržava dio introna 8.



**Slika 19.** Prikaz atipičnog mjesta prekrajanja utvrđenog u radu Sibley i sur. (2016) koje odgovara promjeni u domeni PDZ jednog uzorka. (Preuzeto iz Sibley i sur., 2016).

Treća supstitucija u ovom uzorku uzrokuje promjenu aminokiseline Ser u aminokiselinu Thr i utvrđeno je da vjerojatno nema utjecaja na strukturu i rad proteina DVL1, kao što je rečeno i u radu od Castro-Chavez (2010). Takav oblik mutacije pripada tipu tzv. *konzervativnih supstitucija* koje predstavljaju zamjenu jedne aminokiseline drugom aminokiselinom sličnih biokemijskih svojstava poput veličine, naboja i hidrofobnosti. Zbog sličnih biokemijskih svojstava, takve zamjene najčešće ne uzrokuju promjene u radu proteina i imaju manji utjecaj na njegovu strukturu od tzv. *radikalnih supstitucija*. Ipak, ukoliko dolazi do promjene mjesta prekrajanja uslijed prve dvije mutacije u intronu 8, moguće je da nastaje i novi okvir čitanja koji utječe i na ovu supstituciju u egzonu 9 te zbog toga nastaje protein s promijenjenim aminokiselinskim sastavom i novom strukturom.

Kako bi se detaljnije istražili utjecaji otkrivenih promjena u domeni PDZ gena *DVL1* potrebno je u budućim istraživanjima pomoću metoda proteinske kvantifikacije odrediti aktivnost i ekspresiju proteina DVL1. Također, s obzirom da su navedene mutacije prisutne u domeni PDZ koja je ključna za vezanje proteina DVL1 na protein Frizzled i prijenos signala Wnt, vrijedilo bi ispitati i utjecaj mutacija na snagu proteinskih interakcija proteina DVL1 s ostalim molekulama signalnog puta Wnt u uzorcima intrakranijalnih meningeoma.

Rezultati ovog diplomskog rada doprinose boljem razumijevanju uloge promjena na genu *DVL1* u intrakranijalnim meningeomima čovjeka. Korištenjem mikrosatelitnog biljega D1S468

jasno je pokazano kako promjene poput MSI i LOH gena *DVLI* iako prisutne u niskim frekvencijama nisu karakteristične za progresiju meningeoma. Upotreba dodatnih biljega i korištenje većeg broja uzoraka produbilo bi rezultate ove analize. Istraživanje je pokazalo, međutim, veliku frekvenciju mutacija u domeni PDZ ovoga gena. Dokazano je postojanje mutacija u domeni PDZ koje mogu imati potencijalno štetan učinak na biološku funkciju proteina DVL1, zatim mutacija koje uzrokuju skraćene i produžene varijante proteina DVL1 s još neutvrđenim utjecajem na funkcionalnost proteina i mutacija koje nemaju utjecaja na protein DVL1. Daljnje utvrđivanje učinka otkrivenih mutacija u budućim istraživanjima jasnije će odrediti ulogu DVL1, glavnog medijatora signalnog puta Wnt. Bolje razumijevanje ovog proteina moglo bi dovesti do razvoja inhibitora proteina DVL1 čiji bi eventualan daljnji razvoj ponudio i specifične lijekove. Karakterizacija mutacijskog spektra gena *DVLI* također doprinosi razvoju molekularnih biljega intrakranijalnih meningeoma korisnih u dijagnostici i metodama liječenja, što bi oboljelima pružilo veću mogućnost preživljenja.

## 6. Zaključci

1. Rezultati analize pomoću mikrosatelitnog biljega D1S468, pokazali su postojanje MSI i LOH gena *DVLI* u oba spola i svim gradusima intrakranijalnih meningeoma. Testovima nije dokazan statistički značaj pojave MSI i/ili LOH u odnosu na gradus tumora i spol pacijenata. Na temelju ovih rezultata može se zaključiti kako promjene gena *DVLI*, iako dio genetičkog profila, nisu vezane uz progresiju intrakranijalnih meningeoma.
2. Rezultati o prisutnosti promjena u domeni PDZ pokazali su visoku frekvenciju njihove pojave. Postojanje barem jednog tipa nukleotidnih promjena nađeno je u 100% sekvenciranih uzoraka. Točkastim mutacijama g.14004delA, g.14004A>T i g.14329G>C utvrđen je potencijalno štetan učinak na biološku funkcionalnost domene PDZ proteina DVL1, promjenom okvira čitanja i nastankom preuranjenog stop-kodona. Nukleotidne promjene g.13921delT i g.13921T>C određene su kao potencijalni SNP-ovi. Mutacije u blizini mjesta prekrajanja g.14248G>T i g.14300G>T vjerojatno utječu na promjenu dužine i funkcionalnost proteina DVL1.
3. Iako prisustvo mutacija nije statistički značajno povezano sa stupnjem gradusa tumora ili spolom pacijenta, velika pogođenost promjenama regije koja kodira domenu PDZ gena *DVLI* upućuje na ulogu proteina DVL1 u intrakranijalnim meningeomima.

## 7. Literatura

- Al-Rashed, M., Foshay, K., Abedalthagafi, M., 2020. Recent advances in meningioma immunogenetics. *Frontiers in Oncology*, 9., 1472.
- Ars, E., Serra, E., García, J., Kruyer, H., Gaona, A., Lázaro, C., Estivill, X., 2000. Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. *Human Molecular Genetics*, 9(2), 237-247.
- Bilbao-Sieyro, C., Santana, G., Moreno, M., Torres, L., Santana-Lopez, G., Rodriguez-Medina, C., Perera, M., Bellosillo, B., de la Iglesia, S., Molero, T., Gomez-Casares, M., 2014. High resolution melting analysis: A rapid and accurate method to detect CALR mutations. *PLoS ONE*, 9(7), 103511.
- Brennan, K., Gonzalez-Sancho, J., Castelo-Soccio, L., Howe, L., Brown, A., 2004. Truncated mutants of the putative Wnt receptor LRP6/Arrow can stabilize  $\beta$ -catenin independently of Frizzled proteins. *Oncogene*, 23(28), 4873-4884.
- Bukovac, A., Kafka, A., Hrašćan, R., Vladušić, T., Pećina-Šlaus, N., 2019. Nucleotide variations of TP53 exon 4 found in intracranial meningioma and insilico prediction of their significance. *Molecular and Clinical Oncology*, 11, 563-572.
- Buratti, E., Baralle, F., 2004. Influence of RNA secondary structure on the pre-mRNA splicing process. *Molecular and Cellular Biology*, 24(24), 10505-10514.
- Castro-Chavez, F., 2010. The rules of variation: Amino acid exchange according to the rotating circular genetic code. *Journal of Theoretical Biology*, 264(3), 711-721.
- Das, S., Jackson, W., Prasain, J., Hanna, A., Bailey, S., Tucker, J., Bae, S., Wilson, L., Samant, R., Barnes, S., Shevde, L., 2017. Loss of Merlin induces metabolomic adaptation that engages dependence on Hedgehog signaling. *Scientific Reports*, 7(1), 40773.
- Dwight, Z., Palais, R., Wittwer, C., 2012. uAnalyze: web-based high-resolution DNA melting analysis with comparison to thermodynamic predictions. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*, 9(6), 1805-1811.

Foda, A., Alam, M., Ikram, N., Rafi, S., Elnaghi, K., 2019. Spinal versus intracranial meningioma: Expression of E-cadherin and Fascin with relation to clinicopathological features. *Cancer Biomarkers*, 25(4), 333-339.

Gao, C., Chen, Y., 2010. Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cellular Signalling*, 22(5), 717-727.

Green M., Sambrook J., 2012. *Molecular Cloning – a laboratory manual*. 4. izd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Harter, P., Braun, Y., Plate, K., 2017. Classification of meningiomas—advances and controversies. *Chinese Clinical Oncology*, 6(Suppl 1), S2.

Jackstadt, R., Hodder, M., Sansom, O., 2020. WNT and  $\beta$ -Catenin in cancer: genes and therapy. *Annual Review of Cancer Biology*, 4(1), 177-196.

Jung, Y., Park, J., 2020. Wnt signaling in cancer: therapeutic targeting of Wnt signaling beyond  $\beta$ -catenin and the destruction complex. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(2), 183-191.

Kafka, A., Bačić, M., Tomas, D., Žarković, K., Bukovac, A., Njirić, N., Mrak, G., Krsnik, Ž., Pećina-Šlaus, N., 2018. Different behaviour of DVL1, DVL2, DVL3 in astrocytoma malignancy grades and their association to TCF1 and LEF1 upregulation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(1), 641-655.

Kafka, A., 2017. 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. Disertacija. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Kafka, A., Bačić-Kinda, S., Pećina-Šlaus, N., 2014. The cellular story of dishevelleds. *Croatian Medical Journal*, 55(5), 459-46667.

Kalamarides, M., Stemmer-Rachamimov, A., Niwa-Kawakita, M., Chareyre, F., Taranchon, E., Han, Z., Martinelli, C., Lusic, E., Hegedus, B., Gutmann, D., Giovannini, M., 2011. Identification of a progenitor cell of origin capable of generating diverse meningioma histological subtypes. *Oncogene*, 30(20), 2333-2344.

Lee, S., Karas, P., Hadley, C., Bayley V, J., Khan, A., Jalali, A., Sweeney, A., Klisch, T., Patel, A., 2019. The Role of Merlin/NF2 Loss in Meningioma Biology. *Cancers*, 11(11), 1633.

Lin, C., Taggart, A., Fairbrother, W., 2016. RNA structure in splicing: An evolutionary perspective. *RNA Biology*, 13(9), 766-771.

Meuten, D., Moore, F., George, J., 2015. Mitotic count and the field of view area. *Veterinary Pathology*, 53(1), 7-9.

Miller S., Dykes D., Polesky H., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16(3), 1215.

Mulcahy, E., Colón, R., Abounader, R., 2020. HGF/MET signaling in malignant brain tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7546.

Nagahata, T., Shimada, T., Harada, A., Nagai, H., Onda, M., Yokoyama, S., Shiba, T., Jin, E., Kawanami, O., Emi, M., 2003. Amplification, up-regulation and over-expression of DVL-1, the human counterpart of the *Drosophila* disheveled gene, in primary breast cancers. *Cancer Science*, 94(6), 515-518.

Negrini, S., Gorgoulis, V., Halazonetis, T., 2010. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(3), 220-228.

Nusse, R., Varmus, H., 1982. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 31(1), 99-109.

Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E., 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 287(5785), 795-801.

Och, W., Szmuda, T., Sikorska, B., Springer, J., Jaskólski, D., Zakrzewska, M., Liberski, P., 2016. Recurrence-associated chromosomal anomalies in meningiomas: Single-institution study and a systematic review with meta-analysis. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, 50(6), 439-448.

Ostrom, Q., Cioffi, G., Gittleman, H., Patil, N., Waite, K., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J., 2019. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the united states in 2012–2016. *Neuro-Oncology*, 21, v1-v100.

- Pećina-Šlaus, N., Kafka, A., Salamon, I., Bukovac, A., 2020. Mismatch repair pathway, genome stability and cancer. *Frontiers In Molecular Biosciences*, 7, 122.
- Pećina-Šlaus, N., Kafka, A., Bukovac, A., Vladušić, T., Tomas, D., Hrašćan, R., 2017. Genetic changes of MLH1 and MSH2 genes could explain constant findings on microsatellite instability in intracranial meningioma. *Tumor Biology*, 39(7), 1–9.
- Pećina-Šlaus, N., Kafka, A., Lechpammer, M., 2016. Molecular genetics of intracranial meningiomas with emphasis on canonical Wnt signalling. *Cancers*, 8(7), 67.
- Pećina-Šlaus, N., 2013. Merlin, the NF2 gene product. *Pathology & Oncology Research*, 19(3), 365-373.
- Riemenschneider, M., Perry, A., Reifenberger, G., 2006. Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *The Lancet Neurology*, 5(12), 1045-1054.
- Rogers, L., Barani, I., Chamberlain, M., Kaley, T., McDermott, M., Raizer, J., Schiff, D., Weber, D., Wen, P., Vogelbaum, M., 2015. Meningiomas: knowledge base, treatment outcomes, and uncertainties. A RANO review. *Journal of Neurosurgery*, 122(1), 4-23.
- Rogic, S., Montpetit, B., Hoos, H., Mackworth, A., Ouellette, B., Hieter, P., 2008. Correlation between the secondary structure of pre-mRNA introns and the efficiency of splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*, 9(1), 355.
- Rubtsov, P., 2016. Role of pre-mRNA secondary structures in the regulation of alternative splicing. *Molecular Biology*, 50(6), 823-830.
- Schneikert, J., Behrens, J., 2006. Truncated APC is required for cell proliferation and DNA replication. *International Journal of Cancer*, 119(1), 74-79.
- Sibley, C., Blazquez, L., Ule, J., 2016. Lessons from non-canonical splicing. *Nature Reviews Genetics*, 17(7), 407-421.
- Shao, Z., Liu, L., Zheng, Y., Tu, S., Pan, Y., Yan, S., Wei, Q., Shao, A., Zhang, J., 2020. Molecular mechanism and approach in progression of meningioma. *Frontiers in Oncology*, 10, 538845.

- Sharma, M., Castro-Piedras, I., Simmons, G., Pruitt, K., 2018. Dishevelled: A masterful conductor of complex Wnt signals. *Cellular Signalling*, 47, 52-64.
- Sumkovski, R., Micunovic, M., Kocevski, I., Ilievski, B., Petrov, I., 2019. Surgical treatment of meningiomas - outcome associated with type of resection, recurrence, Karnofsky performance score, mitotic count. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 7(1), 56-64.
- Turner, A., Sasse, J., Varadi, A., 2016. Rapid detection of pathological mutations and deletions of the haemoglobin beta gene (HBB) by High Resolution Melting (HRM) analysis and Gene Ratio Analysis Copy Enumeration PCR (GRACE-PCR). *BMC Medical Genetics*, 17(1), 75.
- Wiese, K., Nusse, R., van Amerongen, R., 2018. Wnt signalling: conquering complexity. *Development*, 145(12), 165902.
- Wöhler, A., 2013. Epidemiology and Brain Tumours: Practical Usefulness. *European Association of NeuroOncology Magazine*, 3(2), 56-60.
- Yamanishi, K., Fiedler, M., Terawaki, S., Higuchi, Y., Bienz, M., Shibata, N., 2019. A direct heterotypic interaction between the DIX domains of Dishevelled and Axin mediates signaling to  $\beta$ -catenin. *Science Signaling*, 12(611), 5505.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T., 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 134.
- Youngblood, M., Günel, M., 2020. Molecular genetics of meningiomas. *Handbook of Clinical Neurology: Meningiomas, Part I*, 169, 101-119.
- Yu, J., Virshup, D., 2014. Updating the Wnt pathways. *Bioscience Reports*, 34(5), e00142.
- Zhu, Y., Tian, Y., Du, J., Hu, Z., Yang, L., Liu, J., Gu, L., 2012. Dvl2-dependent activation of Daam1 and RhoA regulates Wnt5a-induced breast cancer cell migration. *PLoS ONE*, 7(5), e37823.



## 8. Životopis

### OSOBNE INFORMACIJE:

**Ime i prezime:** Katarina Dragičević

**Datum rođenja:** 11.06.1996.

### OBRAZOVANJE:

**2018.-2021.** Sveučilišni diplomski studij Molekularna biologija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

**2015.-2018.** Sveučilišni preddiplomski studij Molekularna biologija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

**2011.-2015.** Gimnazija Lucijana Vranjanina, Zagreb, Hrvatska

### PROJEKTI:

**2020. (u tijeku)** Efekti majčinske inflamacije na neuralne stanice embrija koristeći tehnologiju „single-cell RNA sequencing“, Biotech Research and Innovation Centre, Kopenhagen, Danska

**2018.-2020.** Uloga signalnog puta WNT u epitelno-mezenhimske tranziciji, Laboratorij za Neuroonkologiju, Hrvatski institut za istraživanje mozga, Zagreb, Hrvatska

**2018.-2019.** Istraživanje osobina Primorske gušterice (*Podarcis sicula*), Laboratorij za istraživanje ponašanja životinja, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

### PRIZNANJA I NAGRADE:

**2020.** Dvostruka dobitnica stipendije Erasmus+ stručna praksa (SMP)

**2018.** Završila preddiplomski studij s pohvalom (*cum laude*)

**2017.-2018.** Dobitnica STEM stipendije

### VOLONTIRANJA:

**2020.** Škola za život, predavač na online predavanju: Život Barbare McClintock

**2019.** 18. Tjedan mozga, predavač

**2018.-2019.** Noć biologije, voditelj radionice

**2015.-2017.** Otvoreni dani kemije, voditelj radionice

### SUDJELOVANJA:

**2019.** Simpozij studenata bioloških usmjerenja (SISB5), Zagreb, Hrvatska

**2019.** Sedmi hrvatski kongres neuroznanosti s međunarodnim sudjelovanjem, Zadar, Hrvatska

**2019.** Neuroznanstvena konferencija „Sinapsa“ – SNC'19, Ljubljana, Slovenija