

Metilacija promotora i ekspresija proteina SFRP4 u astrocitnim tumorima mozga čovjeka

Drmić, Denis

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:217:442511>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-03**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Denis Drmić

Metilacija promotora i ekspresija proteina SFRP4 u astrocitnim
tumorima mozga čovjeka

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

«Ovaj rad izrađen je na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga (HIIM) u Laboratoriju za neuronkologiju, pod vodstvom dr. sc. Anje Kafka. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.»

Zahvala

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Anji Kafka na vodstvu, podršci i strpljenju tijekom izrade diplomskog rada.

Također, zahvaljujem suvoditeljici prof. dr. sc. Dubravki Hranilović na korisnim savjetima i susretljivosti te prof. dr. sc. Nives Pećini-Šlaus na pruženoj prilici izrade diplomskog rada na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga.

Zahvaljujem i ostalim djelatnicima Laboratorija za neuroonkologiju na pomoći, savjetima i ugodnoj atmosferi.

Posebno hvala mojoj obitelji, djevojci i prijateljima na podršci i razumijevanju tijekom svih ovih godina.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

METILACIJA PROMOTORA I EKSPRESIJA PROTEINA SFRP4 U ASTROCITNIM TUMORIMA MOZGA ČOVJEKA

Denis Drmić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Astroцитomi su najčešća vrsta glioma, a klasificirani su u tri gradusa: difuzne astroцитome, anaplastične astroцитome i glioblastome. Signalni put Wnt esencijalan je u mnogim biološkim procesima, stoga njegova aberantna aktivnost ima jednu od ključnih uloga u tumorigenezi. Obitelj proteina SFRP (engl. *Secreted Frizzled-Related Protein*) modulira Wnt signalizaciju. U različitim tumorima se pokazalo da su ovi geni transkripcijski utišani hipermetilacijom promotorske regije, što u konačnici vodi nekontroliranom prepisivanju onkogeno. Cilj rada bio je utvrditi dolazi li do različite učestalosti promjena metilacijskog statusa promotora gena i razine ekspresije proteina SFRP4 kod različitih histoloških gradusa astroцитoma. Ekspresija proteina SFRP4 detektirana je metodom imunohistokemije, dok je metilacijski status promotora gena istih uzoraka ispitan metodom MS PCR. Statističkom analizom utvrđeno je da se povećanjem gradusa tumora smanjuje ekspresija proteina SFRP4 u astroцитomima ($p=0,008$), što ukazuje da bi SFRP4 mogao djelovati kao tumor supresor inhibirajući aktivnost signalnog puta Wnt te sprječavajući nastanak i progresiju ovih tumora. Analiza metilacije otkrila je da 72,7% difuznih astroцитoma ima metiliran promotor gena *SFRP4*, dok kod viših gradusa metiliranost promotora nije detektirana. Utvrđena je statistički značajna razlika u metilacijskom statusu gena *SFRP4* između pojedinih stupnjeva malignosti astroцитnih tumora ($p<0,001$). Ovi nalazi upućuju da je ekspresija SFRP4 u višim gradusima astroцитoma regulirana nekim drugim (epi)genetičkim mehanizmima.

(48 stranica, 12 slika, 7 tablica, 90 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: astroцитomi, signalni put Wnt, obitelj SFRP, MS PCR, imunohistokemija

Voditelj: dr. sc. Anja Kafka

Suvoditelj: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović, izv. prof. dr. sc. Maja Matulić, izv. prof. dr. sc. Petra Peharec Štefanić

Rad prihvaćen: 13.01.2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Master Thesis

SFRP4 PROMOTER METHYLATION AND PROTEIN EXPRESSION IN HUMAN ASTROCYTIC BRAIN TUMORS

Denis Drmić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Astrocytomas are the most common type of glioma. They are classified into three malignancy grades: diffuse astrocytoma, anaplastic astrocytoma, and glioblastoma. The Wnt signaling pathway is essential in many biological processes, so its aberrant activity has an important role in tumorigenesis. The Secreted Frizzled-Related Protein (SFRP) family modulates Wnt signaling. It has been shown in various tumors that these genes are frequently hypermethylated, and thereby transcriptionally silent, eventually leading to uncontrolled transcription of oncogenes. The aim of this study was to determine whether there is a different frequency of alterations in the methylation status and the level of SFRP4 protein expression between different histological grades of astrocytomas. SFRP4 protein expression was detected by immunohistochemistry, while promoter methylation of the same samples was examined by MS PCR. Statistical analysis revealed that increase in astrocytoma grade results in SFRP4 protein expression decrease ($p=0.008$), indicating its role as a tumor suppressor by inhibiting Wnt signaling pathway activity and preventing tumor formation and progression. Methylation analysis revealed that 72.7% *SFRP4* promoters in diffuse astrocytoma were methylated, while in higher tumor grades, methylated promoters were not detected. A statistically significant difference in the methylation status of the *SFRP4* gene was found between malignancy grades of astrocytic tumors ($p<0.001$). These findings suggest that some other epigenetic mechanisms regulate SFRP4 expression in higher astrocytoma grades.

(48 pages, 12 figures, 7 tables, 90 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: astrocytoma, Wnt signaling pathway, SFRP family, MS PCR, immunohistochemistry

Supervisor: Dr. Anja Kafka

Co-supervisor: Dr. Dubravka Hranilović, Prof.

Reviewers: Dr. Dubravka Hranilović, Prof., Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof., Dr. Petra Peharec Štefanić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 13.01.2022.

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Astrocitni tumori mozga čovjeka | 1 |
| 1.2. Signalni put Wnt..... | 3 |
| 1.3. Obitelj proteina SFRP (engl. <i>secreted Frizzled-Related Protein</i>) | 5 |
| 1.3.1. SFRP4..... | 6 |
| 1.4. Metilacija DNA | 9 |
| 1.5. PCR ovisan o metilaciji (MS PCR, engl. „ <i>Methylation-specific</i> “ <i>polymerase chain reaction</i>) | 11 |
| 1.6. Imunohistokemijska detekcija proteina..... | 12 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA | 14 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 15 |
| 3.1. Uzorci tkiva tumora..... | 15 |
| 3.2. Imunohistokemijska detekcija proteina SFRP4..... | 15 |
| 3.2.1 Analiza imunohistokemijskog bojenja proteina SFRP4 | 17 |
| 3.3. MS-PCR | 18 |
| 3.3.1. Izolacija genomske DNA iz tkiva tumora metodom fenol/kloroform..... | 18 |
| 3.3.2. Određivanje koncentracije i čistoće izolirane DNA | 19 |
| 3.3.3. Bisulfitna konverzija izolirane DNA..... | 20 |
| 3.3.4. MS PCR..... | 21 |
| 3.3.5. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu | 22 |
| 3.4. Statistička obrada podataka | 23 |
| 4. REZULTATI | 24 |
| 4.1. Uzorci tkiva tumora..... | 24 |
| 4.2. Ekspresija proteina SFRP4 u uzorcima astrocitoma..... | 26 |
| 4.3. Analiza metilacijskog statusa promotora gena SFRP4..... | 30 |
| 5. RASPRAVA | 34 |
| 6. ZAKLJUČAK | 39 |
| 7. LITERATURA | 40 |
| 8. ŽIVOTOPIS | 48 |

POPIS KRATICA

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

CK1 - engl. *Casein Kinase 1*, kazein kinaza 1

CRD - engl. *Cysteine-Rich Domains*, domene bogate cisteinom

DAB - 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid

DNMT - DNA – metiltransferaza

DVL - engl. *Dishevelled*

Fz - engl. *Frizzled*

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

HRP - engl. *Horseradish Peroxidase*, hrenova peroksidaza

IDH1 - izocitrat dehidrogenaza 1

IDH2 - izocitrat dehidrogenaza 2

IHK - imunohistokemija

IRS - engl. *Immunoreactivity Score*

LRP5/6 - engl. *Low-density lipoprotein-Receptor related Protein*, protein sličan receptoru LDL-a

MGMT - O⁶ – metilgvanin - DNA metiltransferaza

MS PCR - engl. „*Methylation-specific*“ *polymerase chain reaction*

NTR - engl. *Netrin-like domain*, domena slična netrinu

PBS - engl. *Phosphate-Buffered Saline*

PCR - engl. *Polymerase Chain Reaction*, lančana reakcija polimeraze

SAM - S-adenozil metionin

SFRP4 - engl. *Secreted Frizzled-Related Protein 4*

SZO - Svjetska zdravstvena organizacija

SŽS - središnji živčani sustav

TCF/LEF - engl. *T-Cell-Specific Transcription Factor/Lymphoid Enhancer Binding Factor 1*

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

Wnt - engl. *Wingless*

β -TrCP - engl. *β -Transducin Repeat Containing Protein*

1. UVOD

1.1. Astrocitni tumori mozga čovjeka

Ljudski mozak čine dvije temeljne vrste stanica, neuroni i glija stanice. Glija stanice (od grč. glía = ljepljivo) za razliku od neurona ne sudjeluju izravno u sinaptičkim interakcijama i električnoj signalizaciji, no njihova potporna uloga u uspostavi sinaptičkog kontakta i prijenosu signala je neophodna. Broj glija stanica u mozgu je 3 do 5 puta veći u odnosu na broj neurona. Generalno su manje od neurona te nemaju aksone i dendrite. Glija stanice u zreлом središnjem živčanom sustavu (SŽS) dijelimo na makrogliju (astrociti i oligodendrociti) i mikrogliju (Purves i sur., 2016).

Astrociti (od grč. astron = zvijezda) su specijalizirane glija stanice zvjezdolikog oblika čija je glavna uloga održavanje prikladnog kemijskog okoliša pogodnog za neuralnu signalizaciju. Obavljaju različite funkcije, uključujući kontrolu krvno-moždane barijere i protoka krvi, zaštitu neurona od oksidativnog stresa, uklanjanje viška neurotransmitera, određivanje sudbine endogenih neuralnih prekursora itd. (Blackburn i sur., 2009; Purves i sur., 2016).

Gliomi su najučestaliji primarni tumori središnjeg živčanog sustava te čine heterogenu skupinu neoplazmi različitih histoloških tipova i stupnjeva malignosti. Smatra se da gliomi potječu od glija stanica ili matičnih stanica koje razvijaju glijalne karakteristike prilikom neoplastične transformacije (Zong i sur., 2012; Ostrom i sur., 2014). Tradicionalna klasifikacija glioma temeljila se na histološkom tipiziranju i stupnjevanju malignosti, međutim, tijekom posljednja dva desetljeća postalo je jasno da neke molekularne karakteristike bolje koreliraju s biologijom glioma nego histološka dijagnoza. U novoj klasifikaciji tumora SŽS-a Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, engl. *World Health Organization*) iz 2016. godine, histološke i molekularne značajke su integrirane prilikom definiranja različitih tipova glioma. Skupinu glioma većinom čine difuzni gliomi, koji se dalje dijele na astrocitne, oligodendroglijalne i mješovite (Perry i Wesseling, 2016). Najčešća vrsta difuznih glioma su astrocitomi, koji proizlaze iz astrocita. Astrocitome karakterizira difuzni infiltrativni rast u parenhim središnjeg živčanog sustava. Ovisno o stupnju diferencijacije, histološkim i molekularnim karakteristikama, ovi tumori klasificirani su u tri gradusa: difuzni astrocitomi (WHO gradus II), anaplastični astrocitomi (WHO gradus III) i glioblastomi (WHO gradus IV) (Louis i sur., 2016).

Gradiranje astrocitoma na temelju histoloških karakteristika bazira se na prepoznavanju prisutnosti ili odsutnosti morfoloških značajki tkiva kao što su nuklearna atipija, broj mitoz, endotelna proliferacija i nekroza (Sukheeja i sur., 2015). Značajan utjecaj na razumijevanje molekularne neuropatologije difuznih glioma imalo je otkriće mutacija gena izocitrat dehidrogenaze 1 i 2 (*IDH1* i *IDH2*). Astrocitomi s divljim tipom i mutiranim *IDH* klinički su različiti tumori, bez obzira na slične histološke karakteristike. Mutacije gena *IDH* prvo su opažene u glioblastomima, no kasnije se otkrilo da su mnogo zastupljenije u gliomima nižih gradusa (WHO gradusima II i III). Glioblastomi koji imaju mutaciju *IDH* (10% slučajeva) nastaju malignom progresijom iz astrocitoma nižeg gradusa, dok glioblastomi s divljim tipom *IDH* (90% slučajeva) nastaju *de novo*. Mutacije gena *IDH* doprinose gliomogenezi tako što mijenjaju transkripciju gena diljem genoma putem poremećaja u metilaciji DNA. Klinički važan prediktivni biomarker je i metilacijski status O⁶-metilgvanin-DNA metiltransferaze (*MGMT*), enzima za popravak DNA. Utišavanje gena *MGMT* metilacijom promotora narušava mehanizam popravka DNA, što rezultira povećanom osjetljivošću na konvencionalnu kemoterapiju korištenjem alkilirajućih sredstava. Bolji uvid u dijagnostički potencijal molekularnih markera u gliomima i drugim tumorima SŽS-a rezultirao je revidiranim, 4. izdanjem WHO klasifikacije iz 2016. godine (Barthel i sur., 2018).

Difuzni astrocitomi (WHO gradus II) uglavnom se javljaju u odraslih osoba u 20-tim i 30-tim godinama života. Imaju tendenciju postupne progresije u glioblastome. Uobičajeno preživljenje je preko 5 godina. Karakterizira ih veća gustoća stanica nego u ostatku mozga, blagi do umjereni nuklearni pleomorfizam, velika varijabilnost citoplazmi, izostanak nekroze i vaskularne proliferacije te izostanak ili niska stopa mitoz (Burger i Scheithauer, 2007; Kapoor i Gupta, 2020). Anaplastični astrocitomi (WHO gradus III) se najčešće javljaju u odraslih osoba u 40-tim godinama života. Prosječno preživljenje je od 2 do 5 godina. Otprilike četvrtina anaplastičnih astrocitoma se razvije *de novo*, dok ostatak nastane transformacijom iz astrocitoma nižih gradusa. Karakterizira ih nuklearna atipija, povećana staničnost, povećana proliferativna aktivnost te izostanak endotelne proliferacije i nekroze (Grimm i Chamberlain, 2016; Kapoor i Gupta, 2020). Glioblastomi (WHO gradus IV) su najučestaliji maligni tumori mozga. Imaju lošu prognozu, s uobičajenim preživljenjem do godinu dana. Srednja dob oboljelih iznosi 65 godina. Većina glioblastoma spada u primarne tumore, što znači da se razvijaju *de novo*, dok manji broj nastaje malignom progresijom iz

nižih gradusa. Karakterizira ih stanična atipičnost, nuklearna hiperkromazija, abnormalna proliferacija, angiogeneza te nekroza. (Davis, 2016; Kapoor i Gupta, 2020).

1.2. Signalni put Wnt

Kaskada prijenosa signala potaknuta vezanjem liganda Wnt jedan je od glavnih regulatora embrionalnog razvoja mnogih organizama. Signalni put Wnt esencijalan je u brojnim biološkim procesima, kao što su proliferacija, diferencijacija, migracija i preživljenje stanica (Nusse i Clevers, 2017). Također, pokazao se kao jedan od ključnih morfogena u razvoju i sazrijevanju SŽS-a (Oliva i sur., 2018). Nasuprot tome, njegova aberantna aktivnost ima jednu od ključnih uloga u tumorigenezi, kao i nastanku specifičnih razvojnih defekata i neurodegenerativnih bolesti (Lee i sur., 2016). U osnovi, glikoproteini Wnt visoko su konzervirani faktori rasta koji dovode do proliferacije stanica. Svojstvo koje ih razlikuje od ostalih faktora rasta je što djeluju usmjeravajuće, dajući oblik rastućem tkivu (Schneider i sur., 2015). Do danas je opisano 19 gena *Wnt* u sisavaca. Njihovi produkti imaju sličan mehanizam signaliziranja i djelovanja na ciljne stanice, no funkcija im se razlikuje ovisno o tkivu gdje su eksprimirani (McMahon i sur., 1992; Dijksterhuis i sur., 2015). Proteini Wnt mogu aktivirati tri različita signalna puta: kanonski, nekanonski i put ovisan o ionima kalcija. Najbolje je istražen kanonski put ovisan o β -kateninu (Li i sur., 2015).

Tijekom sinteze u endoplazmatskom retikulumu (ER), proteini Wnt, veličine oko 40 kDa i bogati cisteinima, modificiraju se vezanjem palmitinske kiseline. Ovu posttranslacijsku modifikaciju izvodi posebna palmitoil transferaza, Porcupine (Rios-Esteves i Resh, 2013). Dodana lipidna skupina primarno djeluje kao vezujući motiv za receptor Frizzled, ali također čini protein Wnt hidrofobnijim zbog čega se lakše veže na staničnu membranu. Tijekom sazrijevanja proteina Wnt, transmembranski protein Wntless/Evi (Wls) veže se na njegov lipidirani oblik te ga transportira do stanične membrane, odakle se vjerojatno izlučuje sekretornim vezikulama (Yu i sur., 2014). Takve vezikule sadrže proteine Wls i Wnt, na način da je zreli protein Wnt prisutan na vanjskoj membrani vezikule, te je dostupan receptorima za vezanje (Farin i sur., 2016). U većini se tkiva Wnt signalizacija odvija parakrino, odnosno između susjednih stanica koje su u kontaktu (Alexandre i sur., 2014).

Tijekom signalizacije, proteini Wnt vežu se za membranski receptorski kompleks koji čine dvije molekule, Frizzled (Fz) i LRP5/6 (protein sličan receptoru LDL-a, engl. *Low-density lipoprotein-Receptor related Protein*). Proteini Fz imaju sedam transmembranskih domena te izvanstaničnu, N terminalnu domenu bogatu cisteinom (CRD, engl. *Cysteine-rich*

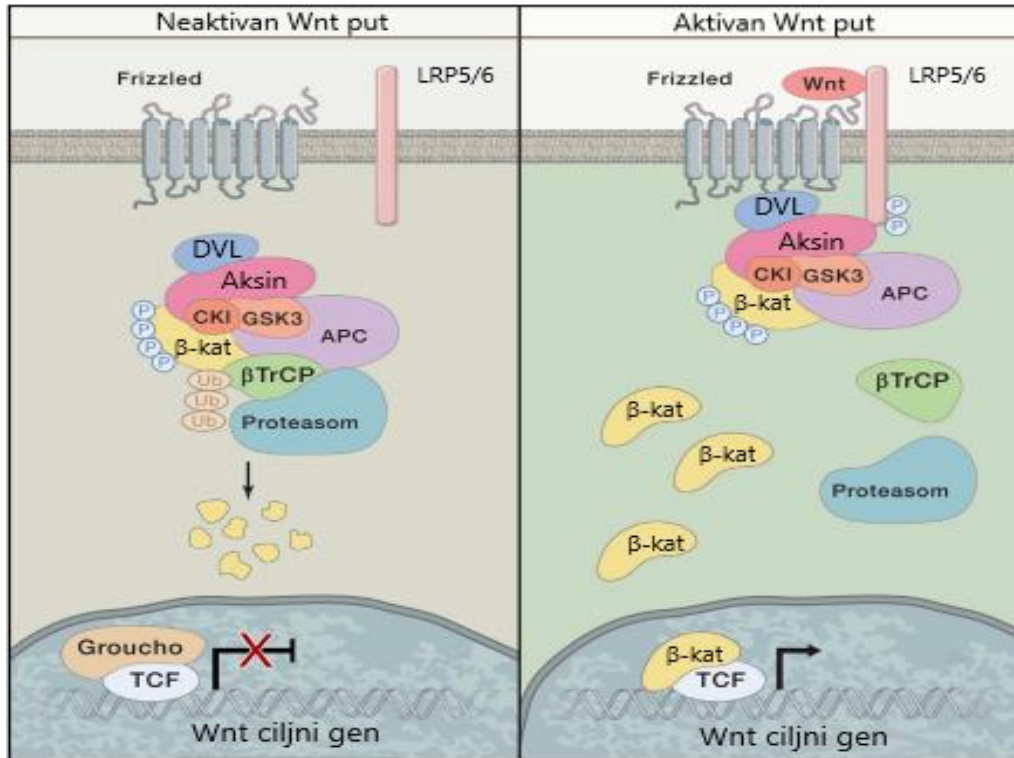
domain). CRD je primarni interakcijski modul za vezanje liganda Wnt (Bhanot i sur., 1996). Vezanje liganda dovodi do dimerizacije receptora Fz s ko-receptorom LRP5/6 i promjene njihove konformacije. Posljedično, citoplazmatski rep receptora LRP, nakon fosforilacije od strane nekoliko kinaza, veže protein aksin, koji djeluje kao „skela“ za vezanje drugih proteina. Jedna od tih kinaza je kinaza glikogen sintaze 3 (GSK3 β , eng. *Glycogen Synthase Kinase 3 beta*) koja fosforilira serine u motivu PPPSP. Ovaj motiv sadrže različite komponente signalnog puta Wnt, uključujući β -katenin, aksin i protein APC (APC, engl. *Adenomatous Polyposis Coli*) (Stamos i sur., 2014 Janda i sur., 2017). Citoplazmatski dio receptora Fz može se vezati za protein Dishevelled (DVL), koji putem domene DIX (koju ima i aksin) pruža platformu za interakciju između aksina i LRP-a (Schwarz-Romond i sur., 2007).

Ključna komponenta kanonskog puta je citoplazmatski protein β -katenin. Stabilnost mu ovisi o kompleksu za razgradnju β -katenina, kojeg čini protein skele aksin, APC te dvije konstitutivno aktivne serin-treonin kinaze, kazein kinaza 1 (CK1, engl. *Casein Kinase 1*) i GSK3 β . Protein APC esencijalan je za funkciju destruktivnog kompleksa. Sadrži tri motiva za vezanje aksina, koji su isprekidani serijama od 15 i 20 aminokiselina koje vežu β -katenin (Nusse i Clevers, 2017).

U nedostatku liganda Wnt, u citoplazmi se stvara destruktivni kompleks. CK1 i GSK3 β sekvencijalno fosforiliraju β -katenin vezan za aksin na nizu pravilno raspoređenih serinskih i treoninskih ostataka na njegovom N-terminusu. Prvo ga CK1 fosforilira na serinu 45 (Ser45), potom GSK3 β na treoninu 41 (Thr41), Ser37 i Ser33 (Liu i sur., 2002). Fosforilirani motivi djeluju kao pristanište za podjedinicu E3 ubikvitin ligaze β -TrCP (engl. *β -Transducin Repeat Containing Protein*), koja inducira ubikvitinaciju te posljedično proteasomsku razgradnju β -katenina. Tako razina β -katenina u stanici ostaje niska (Kitagawa i sur., 1999) (Slika 1).

Vezanjem liganda Wnt, destruktivni kompleks se premješta na membranu te dolazi do fosforilacije ko-receptora LRP5/6, djelovanjem kinaza CK1 i GSK3 β . Protein DVL stupa u kontakt s receptorom Fz i veže aksin, onemogućujući tako aktivnost aksina u destruktivnom kompleksu te sprječavajući vezanje β -katenina. Izostankom fosforilacije i ubikvitinacije β -katenina dolazi do njegove akumulacije u citoplazmi, te translokacije u jezgru stanice, gdje ulazi u interakcije s transkripcijskim faktorima iz obitelji TCF/LEF (engl. *T-Cell Factor/Lymphocyte Enhancer Factor*), potičući tako ekspresiju različitih Wnt ciljnih gena (*ciklin D1, c-jun, c-myc, fra-1*). Kada signalni put nije aktivan, represor Groucho veže TCF te

sprječava transkripciju spomenutih gena (Mulligan i Cheyette, 2012; Pećina-Šlaus i sur., 2016) (Slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz kanonskog signalnog puta Wnt. U odsustvu Wnt signalizacije, GSK3 β i CK1 fosforiliraju citoplazmatski β -katenin na konzerviranim serinima i treoninima, što dovodi do njegove ubikvitinacije i degradacije u proteasomu (lijevo). Vežanjem liganda na receptore dolazi do kaskade prijenosa signala, što rezultira depolimerizacijom destruktivnog kompleksa. To dovodi do akumulacije β -katenina u citoplazmi i translokacije u jezgu stanice, gdje interagira s transkripcijskim faktorima iz obitelji TCF/LEF, potičući tako ekspresiju različitih ciljnih gena Wnt (desno) (preuzeto i prilagođeno prema Nusse i Clevers, 2017).

1.3. Obitelj proteina SFRP

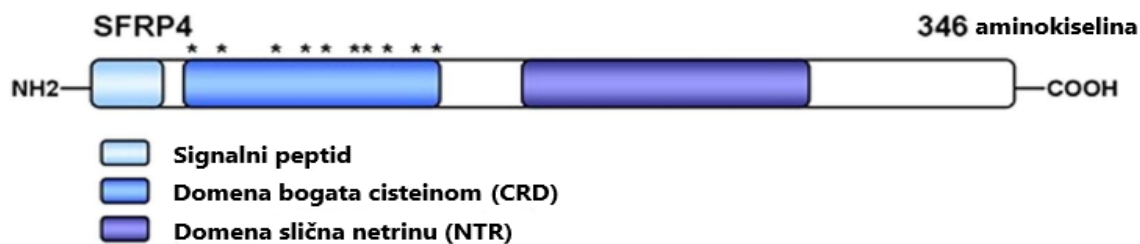
Fino podešena homeostatska ravnoteža između citoplazmatskog i nuklearnog β -katenina određuje konačan ishod signalnog puta Wnt. Ravnoteža se postiže izvanstaničnim antagonistima Wnt signalizacije (Schiefer i sur., 2014). Funkcionalno, antagoniste puta Wnt možemo podijeliti u dvije klase, SFRP (engl. *secreted Frizzled-Related Protein*) i Dickkopf

(DKK). Klasi SFRP pripadaju obitelji proteina SFRP, Cerberus i WIF-1 (engl. *Wnt inhibitory factor-1*). U ljudi, obitelj SFRP obuhvaća pet članova, od SFRP1 do SFRP5. Nadalje, na temelju homologije sekvenci, obitelj gena *SFRP* možemo podijeliti na dvije blisko srodne podgrupe. Jednu čine *SFRP1*, *SFRP2* i *SFRP5*, dok drugu čine *SFRP3* i *SFRP4* (Kawano i Kypta, 2003).

Proteini SFRP inhibiraju signalizaciju puta Wnt vezanjem na ligande Wnt ili na receptore Fz putem domene slične ekstracelularnoj domeni receptora Fz (Shi i sur., 2007). Ekspimirani su u različitim embrionalnim i odraslim tkivima te kontroliraju mnoštvo bioloških procesa tijekom razvoja i odraslog života (Pawar i Rao, 2018). Supresija signalnog puta Wnt proteinima SFRP doprinosi i normalnom razvoju astrocita (Sun i sur., 2015). Proteini iz obitelji SFRP pokazali su sposobnost senzibiliziranja stanica glioma na kemoterapeutike, sposobnost snižavanja njihove stope proliferacije te su inducirali apoptozu. U različitim se tumorima pokazalo da su ovi geni transkripcijski utišani hipermetilacijom promotorske regije (Schiefer i sur., 2014). Iako su članovi obitelji SFRP prvotno smatrani tumor supresorima koji inhibiraju signalizaciju Wnt, novija otkrića upućuju na prekomjernu ekspresiju proteina SFRP u stanicama karcinoma, što upućuje na njihovu dvostruku ulogu u signalizaciji putem Wnt i tumorigenezi (Mii i Taira 2011; Xavier i sur., 2014).

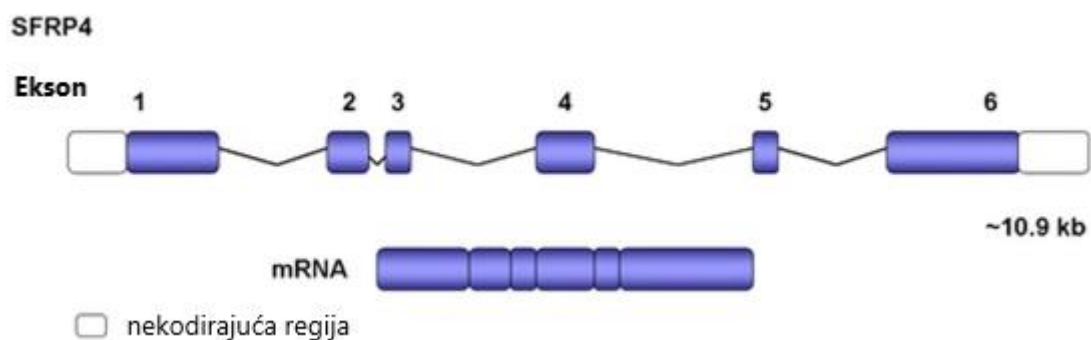
1.3.1. SFRP4

Protein SFRP4 veličine je 346 aminokiselina, a kodira ga gen *SFRP4*, veličine 10.99 kilobaza (kb). Na N-terminalnom kraju sadrži CRD, veličine oko 110-120 aminokiselina, s 10 konzerviranih cisteinskih ostataka. Domena CRD strukturno je 30 do 40% identična istoj domeni receptora Fz koja veže ligand Wnt. SFRP4 je modularni protein koji se savija u dvije nezavisne domene. N-terminalni kraj sadrži signalni peptid za sekreciju, iza kojeg slijedi CRD. Prisutnost signalnog peptida te nedostatak očitog transmembranskog segmenta upućuju na to da se izlučuje van stanice (Rattner i sur., 1997; Bovolenta i sur., 2008). C-terminalni kraj ima domenu sličnu netrinu (NTR, engl. *Netrin-like domain*) (Slika 2), te regiju bogatu serinima i treoninima, što omogućuje fosforilaciju serin/treonin kinazama. Domena NTR sadrži šest cisteinskih ostataka koji formiraju tri disulfidna mosta (Hoang i sur., 1996; Chong i sur., 2001).



Slika 2. Protein SFRP4. Na slici je prikazan signalni peptid dužine 20-30 aminokiselina te domene CRD i NTR. Konzervirani cisteini CRD domene označeni su sa * (preuzeto i prilagođeno prema Pawar i Rao, 2018).

Gen *SFRP4* nalazi se na kraćem kraku kromosoma 7 te se prepisuje u smjeru od centromere prema telomeri. Kodira ga šest eksona: 7p14-p13. Veličina mRNA transkripta je 2974 para baza (pb), od kojih kodirajuću sekvencu čini 1041 pb (Bovolenta i sur., 2008; Carmon i Loose, 2010) (Slika 3). Post-transkripcijskim prekrajanjem mRNA nastaju 3 transkripta (varijante) ovog gena. Ortolozi humanog *SFRP4*, kao i drugih gena iz obitelji *SFRP*, opisani su u različitim nižim organizmima. *SFRP4* je eksprimiran u različitim tkivima, uključujući endometriju, gušteraču, debelo crijevo, pluća, skeletne mišiće, testise, jajnike, bubrege, srce, kosti, oči, prostatu, jetru te mozak (Rattner i sur., 1997; Carmon i Loose, 2010).

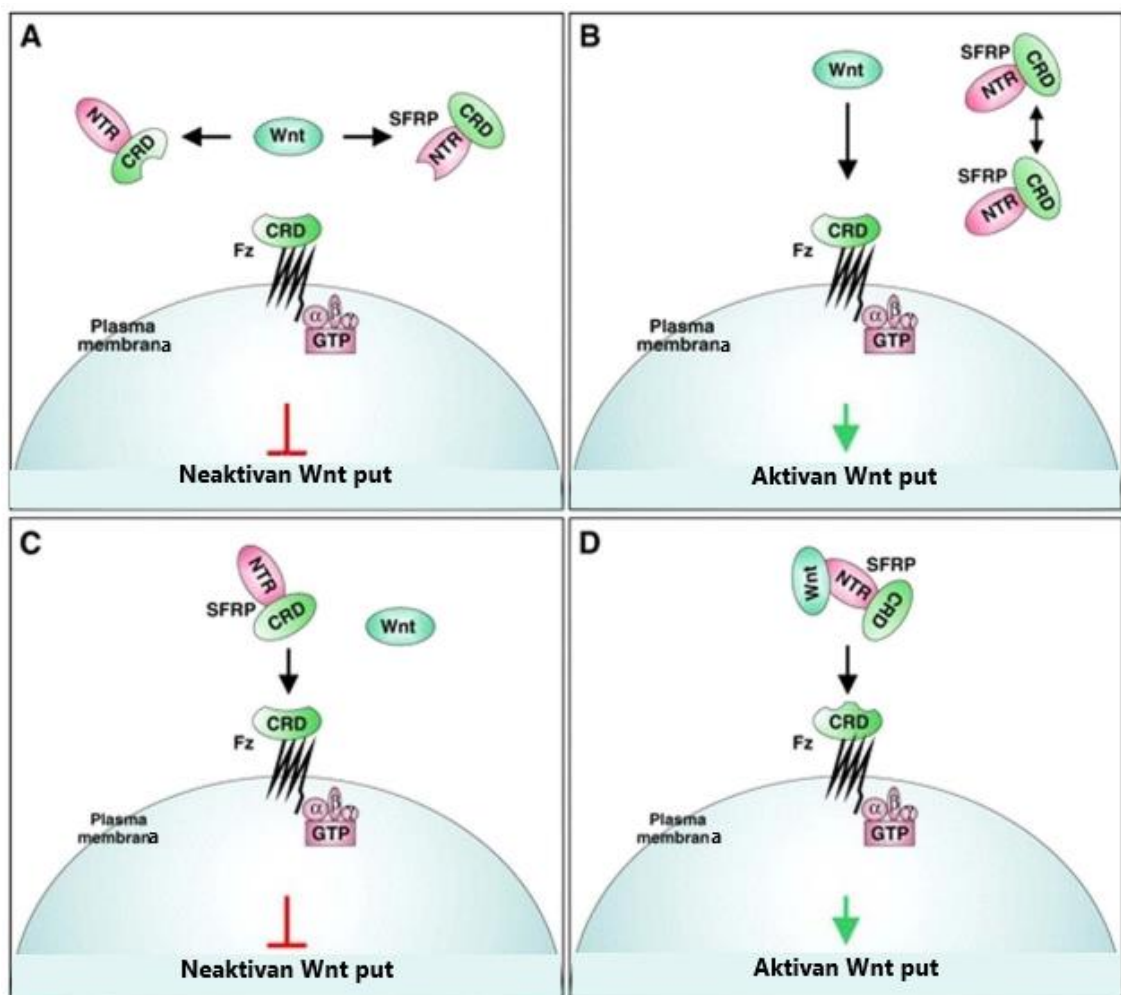


Slika 3. Gen *SFRP4*. Veličine je 10.99 kb i sastoji se od 6 eksona (preuzeto i prilagođeno prema Pawar i Rao, 2018).

Na molekulama SFRP otkrivena su višestruka mjesta vezanja molekule Wnt. Ovisno o post-translacijskim modifikacijama proteina SFRP, parovi SFRP-Wnt povezuju se s različitim afinitetom. Za optimalnu inhibiciju Wnt signalizacije nužne su i domene CRD i NTD. Iako C-terminalni kraj nije uključen u vezanje liganda Wnt, igra ključnu ulogu u stabilizaciji

tercijarne strukture proteina SFRP povećavajući tako afinitet vezanja za Wnt (Lin i sur., 1997).

Proteini SFRP mogu modulirati signalizaciju puta Wnt na više načina. Mogu djelovati kao klasični antagonisti, vežući ligand Wnt uz pomoć domena CRD i NTD (Slika 4A). Mogu potencirati signalizaciju međusobno se vežući (pri manjim koncentracijama proteina SFRP) (Slika 4B). Mogu formirati inaktivne komplekse s receptorima Fz te tako spriječiti prijenos signala (Slika 4C). Također, mogu promovirati prijenos signala, simultano se vežući na ligand Wnt i receptor Fz (Slika 4D) (Bovolenta i sur., 2008; Pawar i Rao, 2018).



Slika 4. Mehanizmi kojima proteini SFRP mogu modulirati Wnt signalizaciju (preuzeto i prilagođeno prema Pawar i Rao, 2018).

Promijenjena ekspresija *SFRP4* u različitim tipovima poremećaja ukazuje na njegovu bitnu ulogu u održavanju homeostaze tkiva. Neki od tih poremećaja su preeklampsija, sindrom policističnih jajnika, psorijaza, renalna fibroza, dijabetes tipa 2 i Pyleova bolest. Također, smanjena ekspresija ili utišavanje gena *SFRP4* rezultira prekomjernom aktivacijom puta Wnt, što dovodi do inhibicije apoptoze u tumorskim stanicama. *SFRP4* ima brojne CpG otoke kraj prvog eksona. Njihova hipermetilacija jedan je od mehanizama utišavanja gena, što stvara predispoziciju za premaligne promjene u mnogim tipovima tumora. Stanične linije karcinoma transficirane rekombinantnim *SFRP4* pokazale su povećanu osjetljivost na kemoterapeutike, smanjenu agresivnost te smanjenju invazivnost kod onih tumora u kojima je zabilježena smanjena ekspresija ovog proteina (Bovolenta i sur., 2008; Pawar i Rao, 2018).

1.4. Metilacija DNA

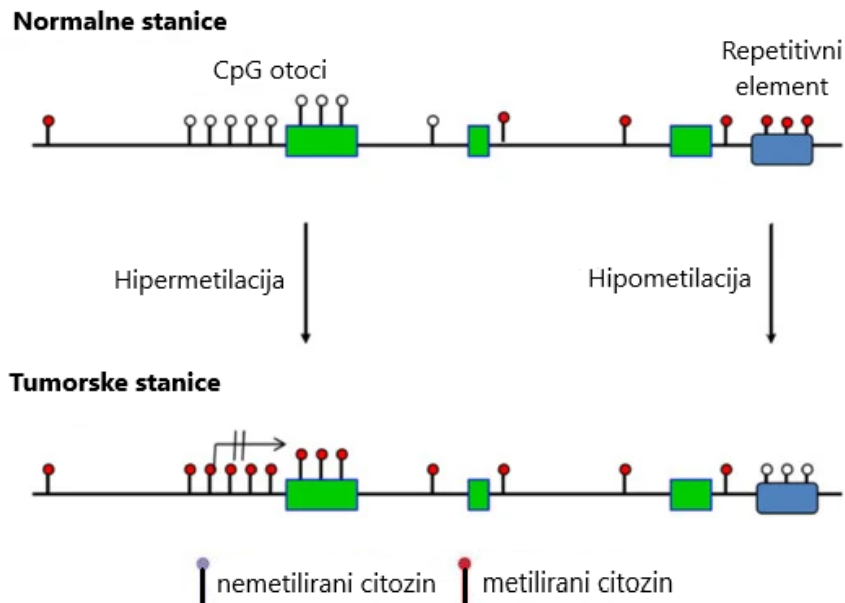
Epigenetika proučava nasljedne promjene u aktivnosti i funkciji gena, koje nisu povezane s promjenom DNA sekvence. Iako sve stanice u organizmu sadrže identičnu genetičku informaciju, nisu svi geni ekspimirani istovremeno u svim tipovima stanica. Epigenetički mehanizmi posreduju u raznolikim profilima ekspresije gena u različitim stanicama i tkivima (Moore i sur., 2013). Neki od epigenetičkih mehanizama su metilacija DNA, posttranslacijske modifikacije histona, nekodirajuće RNA molekule i pozicioniranje nukleosoma (Jin i sur., 2011).

Metilacija DNA nasljedna je epigenetička oznaka, koja uključuje kovalentni transfer metilne skupine (-CH₃) sa S-adenozil metionina (SAM) na C-5 poziciju citozinskog prstena na molekuli DNA. Reakcija je katalizirana enzimima iz obitelji DNA metiltransferaza (DNMT) (Robertson, 2005). U somatskim stanicama sisavaca, metilacija DNA se u 98% slučajeva odvija na CpG (citozin-gvanin) dinukleotidima, dok se u embrionalnim matičnim stanicama oko četvrtina metilacije događa van CpG dinukleotida. Metilacija DNA ima esencijalnu ulogu u normalnom razvoju organizma, te igra važnu ulogu u inaktivaciji X kromosoma, genomskom utiskivanju te supresiji transkripcije repetitivnih elemenata i transpozona. Deregulirana metilacija DNA doprinosi razvoju raznih bolesti, uključujući rak (Gopalakrishnan i sur., 2008; Lister i sur., 2009).

Regije bogate CpG dinukleotidima nazivaju se CpG otoci. Oko 70% promotora gena sadrži CpG otoke. Uglavnom su nemetilirani, dok su neki metilirani samo u stanicama određenih tkiva (Moore, 2013). Metilacija DNA u CpG otocima promotora gena u pravilu dovodi do utišavanja gena. U proces utišavanja uključeni su proteini koji se vežu na metilnu skupinu, te dovode komplekse za remodeliranje kromatina i modifikaciju histona na metilirano mjesto (Lauberth i sur., 2013). U blizini CpG otoka nalaze se „obale“ CpG otoka, mjesta s manjom gustoćom CpG dinukleotida. Njihovom metilacijom najčešće dolazi do smanjenja transkripcije. U tim regijama odvija se većina tkivno specifične metilacije, što utječe na diferencijaciju tkiva, epigenetičko reprogramiranje i razvoj tumora (Rao i sur., 2013).

Metilacija DNA regulirana je putem obitelji enzima DNMT, koju čine DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B i DNMT3L. DNMT1 primarno metilira hemimetiliranu DNA nastalu replikacijom, te tako održava uzorke metilacije. DNMT2 je metiltransferazni homolog koji metilira citozin 38 u antikodonskoj omći tRNA asparaginske kiseline. DNMT3A i DNMT3B uspostavljaju metilaciju *de novo* na nemetiliranim CpG dinukleotidima tijekom embriogeneze. DNMT3L nema katalitičku aktivnost, nego stimulira aktivnost DNMT3A i DNMT3B tako što povećava njihovu sposobnost vezanja za SAM, donora metilne skupine. Novija istraživanja pokazuju da bi DNMT1 mogla imati ulogu i u metilaciji *de novo*, a DNMT3A i DNMT3B u održavanju metilacije tijekom replikacije.

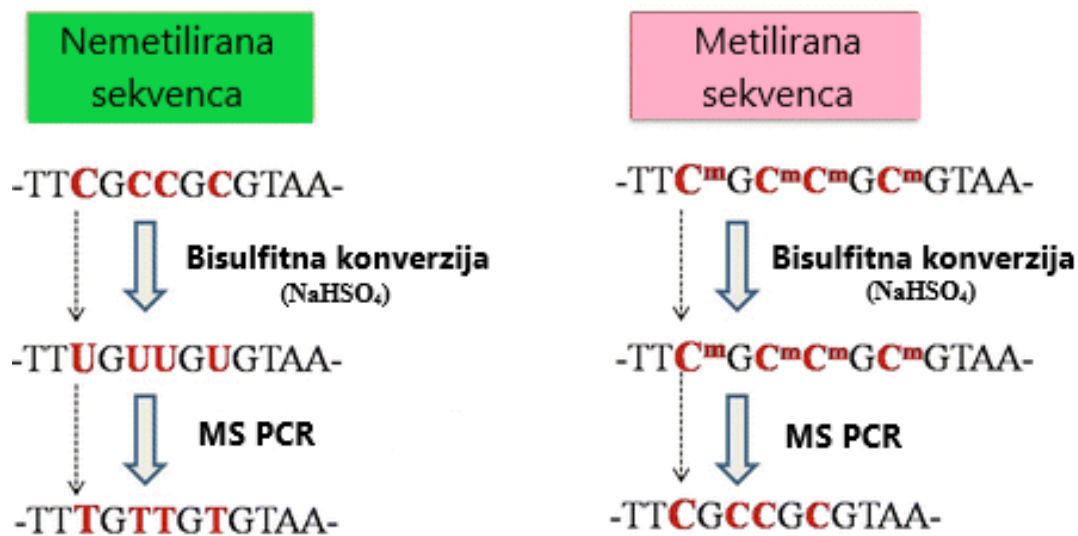
Poremećaji u metilaciji DNA usko se povezuju s nastankom tumora. Epigenetička obilježja tumora su globalna hipometilacija DNA i hipermetilacija CpG otoka specifična za lokus. Do hipometilacije DNA dolazi prvenstveno zbog gubitka metilacije na inače visoko metiliranim repetitivnim elementima, uključujući satelite i retrotranspozone, što dovodi do genomske nestabilnosti i aktivacije onkogeni. Hipermetilacija specifična za lokus obično se javlja na CpG otocima promotora tumor supresor gena, što rezultira transkripcijskim utišavanjem tih gena. Metilacija promotora fizički ometa vezanje regulatora transkripcije na gen (Slika 5). Metilirana DNA povezana je s raznim drugim epigenetičkim modifikacijama, stoga je istraživanje tih interakcija bitno za bolje razumijevanje molekularnih mehanizama represije transkripcije u razvoju i karcinogenezi (Jin i sur., 2011).



Slika 5. Promjene u metilaciji DNA tijekom nastanka tumora. Tijekom tumorigeneze dolazi do hipermetilacije CpG otoka promotora gena te do hipometilacije repetitivnih sekvenci (preuzeto i prilagođeno prema Pfeifer, 2018).

1.5. PCR ovisan o metilaciji

PCR ovisan o metilaciji (MS PCR, engl. „*Methylation-specific*“ *polymerase chain reaction*) je precizna i efikasna metoda za određivanje metilacijskog statusa molekule DNA. Prvi korak ove metode je reakcija bisulfitne konverzije prilikom koje se nemetilirani citozini, djelovanjem natrijeva bisulfita (NaHSO_4), deaminacijom konvertiraju u uracile, dok se metilirani citozini (5-metilcitozin) ne konvertiraju. U PCR reakciji koja slijedi, uracili nastali konverzijom bivaju prepoznati kao timini te se komplementarno sparuju s adeninima (Slika 6). Prilikom izvođenja MS PCR-a, za isti uzorak se radi metilirana i nemetilirana reakcija, koje se razlikuju u specifičnom setu početnica za sekvencu od interesa. Kod nemetilirane (UM, engl. *unmethylated*) DNA, citozini konvertirani u uracile se tijekom PCR reakcije sparuju s adeninima, dok se kod metilirane (M, engl. *methylated*) DNA nepromijenjeni citozini sparuju s gvaninima. Ovisno o tome u kojoj reakciji dolazi do umnažanja DNA, određuje se metilacijski status DNA sekvence (Li i Tollefsbol 2011).

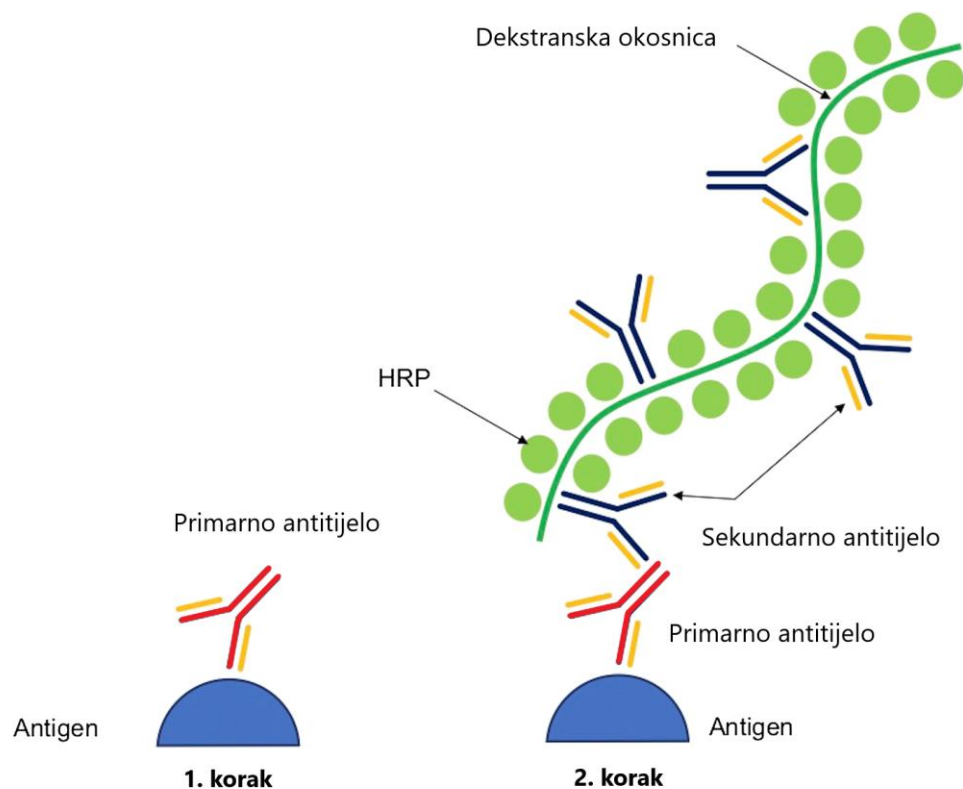


Slika 6. Bisulfitna konverzija i MS PCR. Bisulfitnom konverzijom se citozini (C) iz nemetiliranih sekvenci konvertiraju u uracile (U), dok metilirani citozini (C^m) ostaju nepromijenjeni. Prilikom PCR amplifikacije, uracili (U) se umnažaju kao timini (T), dok metilirani citozini (C^m) ostaju citozini (C), što omogućuje razlikovanje metiliranih od nemetiliranih sekvenci (preuzeto i prilagođeno prema Choudhury i sur., 2018).

1.6. Imunohistokemijska detekcija proteina

Imunohistokemija (IHK) je široko korištena tehnika za lokalizaciju i semikvantifikaciju ekspresije proteina u tkivima. Temelji se na detekciji ciljnih antigena korištenjem specifičnih antitijela (Binch i sur., 2020). IHK može biti direktna i indirektna. U direktnoj IHK, primarno antitijelo je izravno konjugirano s vizualizacijskim sredstvom (enzim ili fluorokrom), te je mjesto vezanja moguće detektirati mikroskopom. Direktna IHK se primarno koristi za detekciju visoko eksprimiranih antigena, dok za detekciju slabije eksprimiranih antigena nije efikasna jer nema amplifikacije signala. U indirektnoj IHK, prvo se aplicira neoznačeno primarno antitijelo, koje se veže za ciljni antigen u tkivu. Potom se dodaje sekundarno antitijelo označeno fluorescentnom bojom ili enzimom, koje se specifično veže za primarno antitijelo. Indirektna IHK mnogo je osjetljivija od direktne jer se signal amplificira vezanjem više sekundarnih antitijela na epitope jednog primarnog antitijela (Chen i sur., 2010). Jedna od indirektnih metoda IHK je *EnVision*, koja je korištena u ovom istraživanju. Ova metoda sastoji se od dva koraka. U prvom koraku se aplicira primarno antitijelo, nakon čega se dodaje polimerni konjugat, koji se sastoji od velikog broja

sekundarnih antitijela izravno vezanih za dekstransku okosnicu, na koju je vezana i hrenova peroksidaza (HRP, engl. *Horseradish Peroxidase*) (Slika 7). Jedan takav konjugat sadrži do 100 HRP molekula te do 15 sekundarnih antitijela (Kämmerer i sur., 2001). HRP konvertira supstrat - 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB) u permanentni smeđi precipitat na tkivu. Kontrastiranje s hematoksilinom omogućuje lokaliziranje te semikvantifikaciju imunopozitivnih i imunonegativnih stanica (Binch i sur., 2020).



Slika 7. Metoda *EnVision*. U prvom koraku, primarno antitijelo veže se na antigen. U drugom koraku, na primarno antitijelo se veže polimerni konjugat kojeg čine enzimi HRP i sekundarna antitijela vezani na dekstransku okosnicu (preuzeto i prilagođeno prema Boguszewska i sur., 2019).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj diplomskog rada je istražiti metilacijski status promotorske regije gena *SFRP4* u astrocitomima gradusa II, III i IV, pomoću metode MS PCR (engl. „*Methylation-specific polymerase chain reaction*“), te u istim uzorcima metodom imunohistokemije analizirati ekspresiju proteina SFRP4. Na kraju ćemo utvrditi dolazi li do različite učestalosti promjena metilacijskog statusa promotora gena i razine ekspresije proteina SFRP4 između različitih histoloških gradusa astrocitoma.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci tkiva tumora

Uzorci astrocitoma korišteni u istraživanju prikupljeni su od 50 pacijenata iz Kliničkog bolničkog centra Zagreb, te klasificirani od strane patologa u graduse II, III i IV. Patohistološkom analizom uzoraka, kod 10 pacijenata dijagnosticiran je difuzni astroцитom (WHO gradus II), kod 10 pacijenata dijagnosticiran je anaplastični astroцитom (WHO gradus III), dok je kod preostalih 30 pacijenata dijagnosticiran glioblastom (WHO gradus IV). Uzorci tkiva tumora korišteni za genetičku analizu smrznuti su nakon prikupljanja u tekućem dušiku te pohranjeni pri -80°C , do postupka izolacije DNA. Nakon izolacije DNA, uzorci su pohranjeni pri -20°C . Rezovi tumora istih pacijenata namijenjeni imunohistokemijskom određivanju ekspresije proteina fiksirani su u 4%-tnom formalinu i uklopljeni u parafin. Prikupljanje, pohrana i analiza uzoraka odobreni su dozvolom Etičkog povjerenstva KBC-a Zagreb (Ur.broj: 02/21/JG; Klasa: 8.1.-14/54-2) i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Ur.broj: 380-59-10106-14-55/147; Klasa: 641-01/14-02/01).

3.2. Imunohistokemijska detekcija proteina SFRP4

Imunohistokemija je tehnika koja omogućuje lokalizaciju antigena u tkivnim preparatima pomoću specifičnih antitijela te morfološku evaluaciju svjetlosnim mikroskopom (Pećina-Šlaus, 2009). Ekspresija proteina SFRP4 u različitim gradusima astrocitoma analizirana je na parafinskim rezovima debljine $4\ \mu\text{m}$. Za detekciju proteina korišteno je specifično monoklonsko antitijelo, kuniće Anti-sFRP-4 (Abcam). Kao negativna kontrola korišten je prerez tkiva jetre čovjeka, dok je kao pozitivna kontrola korišten prerez ljudskog karcinoma jajnika, budući da to tkivo, kako je navedeno u podatkovnom listu produkta (primarnog antitijela), eksprimira SFRP4.

Prvi korak imunohistokemije je deparafinizacija i rehidracija uzoraka. Predmetna stakalca na kojima su fiksirani uzorci tumora se deparafiniziraju inkubacijom u ksilenu (Kemika, Zagreb, Hrvatska) 2 puta po 5 minuta, nakon čega slijedi rehidracija uzoraka u padajućem gradijentu etanola (apsolutni etanol, 95%, 70%) (Kemika, Zagreb, Hrvatska) 2 puta po 3 minute. Završni korak je ispiranje u destiliranoj vodi 5 minuta. Prilikom svakog

prebacivanja stakalaca iz jednog u drugo otapalo, potrebno je pažljivo ukloniti višak tekućine. Također, treba paziti da se između prebacivanja uzorci ne osuše.

Sljedeći korak je oporavljanje epitopa. Formalinskom fiksacijom stvaraju se aldehidne veze između formaldehidskih i proteinskih molekula, što dovodi do maskiranja antigena na proteinu (Krenacs i sur., 2010). Preparati su kuhani u svježe pripremljenom 6 M citratnom puferu (1,05 g limunske kiseline, 0,5 L destilirane vode, pH 6) u mikrovalnoj pećnici. Uzorci su zagrijavani ukupno 7 minuta, prvo pri 450 W do vrenja, zatim pri 350 W do vrenja, te pri 300 W do vrenja. Potom je snaga mikrovalne pećnice postavljena na nešto niže od 300 W te su uzorci kuhani još 3 minute (pufer je pri toj snazi na rubu vrenja). Nakon toga uzorci su ohlađeni na sobnu temperaturu te je cijeli postupak zagrijavanja i hlađenja ponovljen još dva puta. Nakon zadnjeg hlađenja, slijedila su tri ispiranja po 5 minuta u 1x puferu PBS (engl. *Phosphate-Buffered Saline*) (10x PBS = 80 g NaCl, 2 g KCl, 23 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O, 2,4 g KH₂PO₄, destilirana voda do 1 L, pH 7,4), čime je uklonjen višak citratnog pufera.

Potom je slijedila blokada endogene stanične peroksidazne aktivnosti. Stanice imaju mnogo enzima peroksidaza, koje oksidiraju DAB te, ukoliko se one ne utišaju, dolazi do nespecifičnog obojenja tkiva, odnosno lažno pozitivnog signala. Vodikov peroksid (H₂O₂) blokira aktivnost endogenih peroksidaza. Uzorci su tretirani s 3%-tnom otopinom vodikovog peroksida (1,5 ml metanola, 1,5 μl 30%-tnog vodikovog peroksida, 500 μl destilirane vode), te inkubirani 10 minuta u vlažnoj komori, u mraku, na sobnoj temperaturi. Uslijedilo je ispiranje uzoraka 3 puta po 10 minuta u PBS-u,

Primarno antitijelo može se nespecifično adherirati na druge proteine u tkivu, što dovodi do nespecifičnog bojenja pozadine. Za blokadu nespecifičnog vezanja, uzorci su inkubirani 30 minuta pri 4°C u serumu *Protein block serum-free-ready-to-use* (Dako, Glostrup, Denmark). Nakon tretmana višak otopine uklonjen je pažljivim lupkanjem o papir (uzorci se ne ispiru).

Sljedeći korak bila je inkubacija uzoraka s primarnim antitijelom. Korišteno je monoklonsko antitijelo rabbit Anti-sFRP-4 [EPR9389] (Abcam), koje veže protein SFRP4. Uzorci i pozitivna kontrola inkubirani su u razrijeđenju protutijela 1:100 (1 μl antitijela u 99 μl PBS-a) preko noći pri 4°C. Na negativnu kontrolu nakapano je 100 μl pufera PBS te je također inkubirano preko noći.

Sutradan, uzorci su isprani 3 puta po 5 minuta u PBS-u, nakon čega su inkubirani sa sekundarnim antitijelom *EnVision* (Dako REAL™, EnVision™, Dako Glostrup Denmark), 45 minuta pri sobnoj temperaturi. Osnova *EnVisiona* je polimerni konjugat koji se sastoji od velikog broja sekundarnih antitijela izravno vezanih za dekstransku okosnicu, na koju je vezan i enzim HRP (Kämmerer i sur., 2001). Nakon inkubacije, uzorci su ispirani u PBS-u 4 puta po 7 minuta na tresilici.

Za vizualizaciju vezanja antitijela na antigen, uzorci su inkubirani s kromogenom DAB (Dako REAL™, EnVision™, Dako Glostrup Denmark) u trajanju od 30 sekundi. Optimizacijom protokola, utvrđeno je da inkubacija ne bi smjela trajati duže, da ne dođe do nespecifičnog bojenja. Enzim HRP konjugiran sa sekundarnim antitijelom pretvara DAB u permanentni smeđi precipitat na mjestu gdje se nalazi antigen (Binch i sur., 2020). Uslijedilo je ispiranje destiliranom vodom, 3 puta po 10 minuta. Treba napomenuti da je DAB kancerogen, zbog čega je prilikom rukovanja s njim važno koristiti zaštitu i biti oprezan.

Uzorci su nakon ispiranja kontrastirani hemalaunom. Ova pozitivno nabijena boja veže negativno nabijenu DNA te specifično boji jezgre stanica u plavo, što olakšava interpretaciju lokalizacije proteina u stanici. Inkubacija u hemalaunu trajala je 2 minute, nakon čega je višak vode uklonjen ispiranjem 10 minuta u vodovodnoj vodi.

Posljednji korak bila je dehidracija preparata u rastućem gradijentu etanola. Uzorci su prvo uronjeni 2 puta po 3 minute u 70%-tni etanol, zatim 2 puta po 3 minute u 95%-tni etanol, zatim 2 puta po 3 minute u apsolutni etanol te na kraju 2 puta po 5 minuta u ksilen, radi posvjetljivanja preparata. Na uzorke je potom nanešena kap medija za pokrivanje Histomounta (Agar Scientific a brand of Elektron Technology UK Ltd.), te su poklopljeni pokrovnim stakalcem. Preparati su se sušili preko noći te su sutradan analizirani pod mikroskopom.

3.2.1 Analiza imunohistokemijskog bojenja proteina SFRP4

Kvantitativna analiza rezultata imunohistokemije provedena je svjetlosnim mikroskopom Olympus BX53 i softverom ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, SAD). Rezultati reakcije imunohistokemije očitani su kao pozitivni ukoliko je primijećeno smeđe obojenje u citoplazmi i/ili membrani, i/ili jezgri tumorske stanice, odnosno negativni ukoliko je bilo prisutno samo plavo obojenje jezgara. Procjena intenziteta izražaja

proteina SFRP4 pomoću softvera ImageJ napravljena je pri povećanju mikroskopa od 200x na otprilike 200 ± 20 stanica po preparatu. Procjena imunopozitiviteta u citoplazmama i/ili jezgrama tumorskih stanica temeljila se na određivanju indeksa obojenja (IRS, engl. *Immunoreactivity Score*). IRS je broj koji dobijemo množenjem postotka stanica u kojima je signal prisutan (PP, engl. *Positive Cells Proportion Score*) s intenzitetom signala (SI, engl. *Staining Intensity Score*). Određeno je pet različitih kategorija snage obojenja (PP): (0) nema imunopozitiviteta u tumorskim stanicama, (1) imunopozitivitet u 1-25% tumorskih stanica, (2) imunopozitivitet u > 25-50% tumorskih stanica, (3) imunopozitivitet u > 50-85% tumorskih stanica, (4) imunopozitivitet u > 85% tumorskih stanica. Intenzitet bojenja preparata (SI) podijeljen je u tri kategorije: (1) nema/slab imunopozitivitet-žučkasto obojenje, (2) umjeren-smečkasto obojenje, (3) jak-tamno smeđe obojenje. Zbog potreba statističke analize IRS vrijednosti koje se kreću u rasponu od 0 do 12 pretvorene su u brojeve: 1 (IRS=0-4), 2 (IRS=6-8) i 3 (IRS=9-12).

3.3. MS PCR

3.3.1. Izolacija genomske DNA iz tkiva tumora metodom fenol/kloroform

Genomska DNA izolirana je iz tkiva astrocitnih tumora ekstrakcijom fenolom i kloroformom prema proceduri koju su opisali Sambrook i sur., 1989. Uzorci tkiva tumora korišteni u ovom istraživanju prethodno su pohranjeni pri -80°C . Nakon što su se uzorci otopili pri sobnoj temperaturi, odvojeno je približno 500 mg tkiva od svakog tumora te preneseno u sterilne epruvete (*Eppendorf*) volumena 1,5 ml. Tkivo je potom mehanički usitnjeno uz dodatak 1 ml pufera za lizu stanica (10mM TrisHCl, 0,5% Tween, 25 mM EDTA; pH 8,0). Nakon toga dodano je 15 μl proteinaze K (Sigma, Njemačka) u koncentraciji od 20 mg/ml. Proteinaza K je serinska proteaza koja nespecifično digestira proteine, između ostalog i nukleaze (DNaze), te tako sprječava degradaciju molekule DNA tijekom postupka izolacije (Hilz i sur., 1975). Preporuka je ovo napraviti u što kraćem vremenskom periodu da nukleaze iz citoplazme ne degradiraju DNA nakon lize stanica. Pripremljena smjesa inkubirana je preko noći u vodenoj kupelji pri 37°C .

Nakon inkubacije, sadržaj svake epruvete razdijeljen je u dvije nove epruvete od 1,5 ml te je na smjesu dodan jednak volumen fenola. Fenol je organsko otapalo pomoću kojeg se

uklanjaju proteini, lipidi i ugljikohidrati. Epruvete su potom stavljene na rotacijsku miješalicu (Stuart SB2) na lagano okretanje u trajanju od 10 minuta. Poslije toga smjesa je centrifugirana 10 minuta, na sobnoj temperaturi, pri 11 000 rpm (engl. *Revolutions Per Minute*) (Centrifuge 5415D, Eppendorf, rotor 100 mm). Nakon centrifugiranja dobiju se 3 sloja, gornji hidrofilni sloj u kojem je otopljena DNA, donji hidrofobni sloj kojeg čine fenol i druge molekule te proteinski prsten između ta dva sloja. Potrebno je oprezno pipetom odvojiti gornji vodeni sloj i prenijeti ga u novu epruvetu te na taj volumen dodati ½ volumena fenola i ½ volumena kloroforma. Kloroform je organsko otapalo koje djeluje slično kao fenol, s tim da uklanja i fenol iz uzoraka. Epruvete su ponovno stavljene na rotacijsku miješalicu 10 minuta, nakon čega je smjesa centrifugirana 10 minuta, pri sobnoj temperaturi, pri 11 000 rpm. Vodeni sloj je prenesen u čistu epruvetu i na njega je dodan jednak volumen kloroforma. Usljedilo je lagano miješanje od 10 minuta te centrifugiranje od 15 minuta, pri sobnoj temperaturi, pri 11 000 rpm. Nakon centrifugiranja pažljivo je izdvojen vodeni sloj u novu epruvetu i na dobiveni volumen dodano je 2,5 volumena apsolutnog etanola uz lagano okretanje epruvete dok se DNA nije precipitirala, u obliku bijelog klupka. Uzorci su stavljani u zamrzivač preko noći, pri -20°C.

Narednog dana, uzorci su centrifugirani 20 minuta, pri 4°C, pri 14 000 rpm (Hettich 32R, Universal). Nakon centrifugiranja pipetom je pažljivo odstranjen supernatant, na dnu epruvete ostaje bijeli talog. Epruvete s talogom stavljene su u termoblok na sušenje 10 minuta pri 37°C, dok zaostali etanol nije ispario. Talog je nakon sušenja otopljen dodavanjem 50 µl TE pufera (engl. *Tris-EDTA*: 10 mM Tris; 1mM EDTA; pH 7,6) i uzorci su pohranjeni pri 4°C.

3.3.2. Određivanje koncentracije i čistoće izolirane DNA

Koncentracija i čistoća izolirane DNA određene su pomoću mikrovolumnog spektrofotometra (*ND 1000*, NanoDrop, Wilmington, DE, USA), mjerenjem apsorbancije pri 230 nm, 260 nm i 280 nm. Valna duljina od 230 nm apsorpcijski je minimum nukleinskih kiselina i apsorpcijski maksimum peptidnih veza u proteinima, fenolu, EDTA i ugljikohidratima. Maksimalna apsorpcija nukleinskih kiselina događa se na valnoj duljini od 260 nm. Apsorpcija aromatskih aminokiselina, peptida, proteina te svih spojeva s aromatskim prstenom (npr. fenola) događa se pri 280 nm. Omjer apsorbancija izmjerenih pri 260 nm i 280 nm pokazuje količinu kontaminacija, poput fenola i proteina. Za DNA, taj bi omjer trebao biti između 1,8 i 2. Ako

je niži od toga ukazuje na prisutnost kontaminanata koji apsorbiraju pri 280 nm (fenoli, proteini), a ako je veći ukazuje na prisutnost RNA. Također, male promjene u pH otopine mogu uzrokovati veće promjene u ovom omjeru. Može se gledati i omjer apsorbancija izmjerenih pri 230 nm i 260 nm, koji bi trebao biti veći od 1,8. Ako je omjer niži od toga ukazuje na prisutnost kontaminacija kao što su EDTA, ugljikohidrati ili fenoli (Pećina-Šlaus 2009). Veća prisutnost kontaminanata može poremetiti vrlo osjetljive metode analize DNA, kao što je MS PCR.

3.3.3. Bisulfitna konverzija izolirane DNA

Bisulfitna konverzija je reakcija prilikom koje se nemetilirani citozini (C), djelovanjem natrijeva bisulfita (NaHSO_4), deaminacijom konvertiraju u uracile (U), dok se metilirani citozini (C^m , 5-metilcitozin) ne konvertiraju. Za bisulfitnu konverziju uzoraka korišten je komercijalno dostupan set reagensa *The MethylEdgeTM Bisulfite Conversion System* (Promega). U reakciju se kretalo s 800 ng genomske DNA izolirane iz tumora. Prvo se u pripremljeni uzorak DNA doda 130 μl reagensa za bisulfitnu konverziju (engl. *Bisulfite ME Conversion Reagent*, Promega), sadržaj se potom pipetom pažljivo resuspendira te kratko centrifugira (Centrifuge 5415D, Eppendorf, rotor 100 mm). Bisulfitna konverzija odvijala se u PCR uređaju (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, SAD) pri sljedećim uvjetima: 8 minuta pri 98°C, 60 minuta pri 54°C te hlađenje pri 4°C. Sljedeći korak bila je desulfonacija i pročišćavanje DNA. Bisulfitno konvertirani uzorak prebačen je u kolonu s membranom (engl. *ME Spin Column*), u koju je prethodno dodano 600 μl pufera za vezanje DNA (engl. *ME Binding Buffer*, Promega), te je nekoliko puta invertiran da se sadržaj pomiješa i centrifugiran pri maksimalnoj brzini 30 sekundi. Nakon centrifugiranja, DNA je ostala vezana za kolonu. Filtrat je odstranjen i na kolonu je dodano 100 μl pufera za ispiranje s etanolom (engl. *1X ME Wash Buffer*, Promega) te je sadržaj centrifugiran 30 sekundi pri maksimalnoj brzini. Potom je na kolonu dodano 200 μl desulfonacijskog pufera (engl. *ME Desulfonation Buffer*, Promega) i inkubirano 15 minuta pri sobnoj temperaturi. Slijedilo je ponovno centrifugiranje pri maksimalnoj brzini 30 sekundi. U sljedećem je koraku na kolonu dodano 200 μl pufera za ispiranje (engl. *ME Wash Buffer*, Promega), sadržaj je centrifugiran pri maksimalnoj brzini 30 sekundi, te je ovaj korak ponovljen još jednom. Na kraju je kolona prebačena u čistu epruvetu volumena 1,5 ml, dodano je 22 μl elucijskog pufera (engl. *ME Elution Buffer*, Promega) i sadržaj je centrifugiran pri maksimalnoj brzini 30 sekundi. Nakon 15 minuta inkubacije pri

sobnoj temperaturi, na mikrovolumnom spektrofotometru određena je koncentracija i čistoća bisulfitno konvertiranih uzoraka koji su potom pohranjeni pri -20°C.

3.3.4. MS PCR

Metoda MS PCR korištena je za određivanje metilacijskog statusa CpG otoka promotora gena *SFRP4*. Za isti uzorak napravljene su dvije reakcijske smjese, za metiliranu i nemetiliranu reakciju (Tablica 1), koje su se razlikovale u specifičnim početnicama (Tablica 2). Kod nemetilirane DNA, citozini konvertirani u uracile sparivali su se tijekom PCR reakcije s adeninima, dok su se kod metilirane DNA nepromijenjeni citozini sparivali s gvaninima. Metilacijski status promotora gena određen je ovisno o tome u kojoj je reakciji došlo do umnažanja DNA. Za MS PCR korišten je komercijalno dostupan set reagensa *TaKaRa*. Kao pozitivnu kontrolu za metiliranu reakciju korišten je *Methylated Human Control* (Promega, Madison, Wisconsin, USA), dok je kao pozitivna kontrola za nemetiliranu reakciju korišten *EpiTect Control DNA* (Qiagen, Hilden, Germany). Kao negativna kontrola za obje reakcije korištena je voda bez nukleaza. Sve reakcije MS PCR-a izvedene su u PCR uređaju *2720 Thermal Cycler* (Applied Biosystems, SAD) u ukupnom reakcijskom volumenu od 25 µl, tijekom 35 ciklusa umnažanja. Uvjeti umnažanja optimizirani su za obje reakcijske smjese (Tablica 3).

Tablica 1. Sastojci reakcijske smjese, njihove koncentracije i volumeni u jednoj PCR reakciji.

| Sastojak smjese | Konačna koncentracija | Konačni volumen |
|---|-----------------------|-----------------|
| TaKaRa EpiTaq HS | 5 U/ µl | 0,125 µl |
| EpiTaq PCR pufer | 1x | 2,5 µl |
| MgCl ₂ | 25 mM | 2,5 µl |
| dNTP Mix | 2,5 mM | 3 µl |
| SFRP4 F (engl. <i>forward</i>) početnica (MF ili UMF) | 10 pmol | 1 µl |
| SFRP4 R (engl. <i>reverse</i>) početnica (MR ili UMR) | 10 pmol | 1 µl |
| DNA kalup | 25 ng | 1 µl |
| H ₂ O | - | 13,875 µl |
| Ukupno | | 25 µl |

Tablica 2. Sekvence početnica za promotorsku regiju gena *SFRP4*. MF i MR – set početnica za metiliranu reakciju; UMF i UMR – set početnica za nemetiliranu reakciju; pb – parovi baza.

| Početnice | Slijed nukleotida | Produkt |
|--|---|---------|
| <i>SFRP4</i> – MF <i>SFRP4</i> – MR | 5' GGGTGATGTTATCGTTTTTGTATCGAC 3' 5' CCTCCCCTAACGTAAACTCGAAACG 3' | 111 pb |
| <i>SFRP4</i> – UMF <i>SFRP4</i> – UMR | 5' GGGGGTGATGTTATTGTTTTTGTATTGAT 3' 5' CACCTCCCCTAACATAAACTCAAACA 3' | 115 pb |

Tablica 3. Optimizirani uvjeti za umnažanje promotorske regije gena *SFRP4* metodom MS PCR.

| Korak | Temperatura | Trajanje |
|--------------------------------|--|----------|
| Početna denaturacija lanca DNA | 95 °C | 5 min |
| Denaturacija | 95 °C | 30 s |
| Vezanje početnica | 65 °C - metilirana reakcija 63 °C - nemetilirana reakcija | 30 s |
| Sinteza komplementarnog lanca | 72 °C | 30 s |
| Završno produljenje lanca DNA | 72 °C | 7 min |
| | 4 °C | ∞ |

} 35 x

3.3.5. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Uspješnost reakcije MS PCR provjerena je horizontalnom elektroforezom u 2%-tnom agaroznom gelu (Sigma, Njemačka). Elektroforeza se odvijala u puferu TAE (40 mM Tris-acetat; 1 mM EDTA; pH 8) 30 minuta, pri naponu od 110 V i jakosti struje od 80 mA, na uređaju *EPS 150/2000* (Elchrom Scientific, Švicarska). Za vizualizaciju produkata reakcije u gel je dodana boja Sybr Gold (0,5 µg/mL). Veličina produkata određena je usporedbom sa standardom DNA (50 bp DNA Ladder, Amresco, USA). Umnoženi fragmenti vizualizirani su na transiluminatoru pod UV svjetlom te fotografirani.

3.4. Statistička obrada podataka

Statistička analiza podataka napravljena je programskim paketom SPSS v.19.0.1 (SPSS, Chicago, IL, SAD), uz razinu značajnosti od $\alpha < 0,05$. Podatci analize metilacije promotora gena *SFRP4* i podatci analize izraženosti proteina SFRP4 dobiveni metodom imunohistokemije analizirani su međusobno i u odnosu na patohistološku dijagnozu, dob i spol bolesnika, te lokalizaciju tumora.

Normalnost raspodjele dobivenih podataka ispitana je Kolmogorov-Smirnovim testom. Značajnost niža od $p < 0,05$ upućuje da se distribucija značajno razlikuje od normalne. U slučaju normalne raspodjele, razlike u vrijednostima bioloških biljega među gradusima ispitane su pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA), a u slučaju odstupanja od normalnosti korišten je test Kruskal-Wallis. Razlike u vrijednostima između dvije skupine testirane su Studentovim t-testom u slučaju normalne raspodjele, a u slučaju odstupanja od normalnosti testom Mann-Whitney. Razlike u učestalosti analiziranih obilježja ispitane su Pearsonovim χ^2 – testom.

Korelacije između pojedinih parametara su, u slučaju normalne raspodjele, rađene Pearsonovom korelacijom, a ukoliko su odstupale od normalnosti u obzir su se uzimale vrijednosti dobivene Spearmanovom korelacijom.

4. REZULTATI

4.1. Uzorci tkiva tumora

Istraživanje ekspresije proteina SFRP4 i metilacijskog statusa promotora gena *SFRP4* napravljeno je na uzorcima tumora astrocitoma. Od 51. bolesnika čiji su uzorci analizirani, 29 je bilo muškog (57%), a 22 ženskog spola (43%) (Tablica 4). Srednja životna dob kod postavljanja dijagnoze bila je oko 51 godinu, a raspon dobi oboljelih od 6 do 83 godine. Prosječna dob oboljelih žena bila je oko 56, a muškaraca oko 47 godina (Tablica 5).

Tablica 4. Patohistološke karakteristike uzoraka astrocitoma korištenih u istraživanju te rezultati analize ekspresije proteina SFRP4 i metilacijskog statusa promotora gena *SFRP4*. AII – difuzni astroцитom; AIII – anaplastični astroцитom; GBM – glioblastom; M – muško; Ž – žensko; 1 – nema/slaba ekspresija; 2 – umjerena ekspresija; 3 – jaka ekspresija; C – citoplazma; M – membrana; N – jezgra (engl. *nucleus*) UM – nemetilirani promotor; M – metilirani promotor.

| Redni broj | Broj Banke | Histološki gradus | Dob | Spol | Ekspresija proteina SFRP4 | Lokalizacija proteina SFRP4 | Metilacija promotora gena <i>SFRP4</i> |
|------------|------------|-------------------|-----|------|---------------------------|-----------------------------|--|
| 1. | T572 | AII | 27 | M | 3 | C+M+N | M |
| 2. | T526 | AII | 32 | M | 1 | C | UM |
| 3. | T316 | AII | 48 | M | 2 | C+M | M |
| 4. | T279 | AII | 49 | M | 3 | C+M+N | M |
| 5. | T545 | AII | 44 | M | - | - | M |
| 6. | T315 | AII | 56 | M | 2 | C+M | M |
| 7. | T317 | AII | 38 | Ž | 1 | C+M+N | M |
| 8. | T535 | AII | 36 | Ž | 1 | C+M+N | UM |
| 9. | T298 | AII | 31 | Ž | 2 | C | UM |
| 10. | T301 | AII | 39 | M | 2 | C+M+N | M |
| 11. | T564 | AII | 31 | Ž | 1 | C | M |
| 12. | T278 | AIII | 34 | Ž | 1 | C | UM |
| 13. | T318 | AIII | 55 | Ž | 2 | C+M | UM |
| 14. | T561 | AIII | 29 | M | 1 | C+M+N | UM |
| 15. | T519 | AIII | 34 | M | 1 | C+M+N | UM |
| 16. | T536 | AIII | 51 | M | 2 | C+M+N | UM |

Tablica 4. - nastavak

| | | | | | | | |
|-----|------|------|----|---|---|-------|----|
| 17. | T543 | AIII | 24 | M | 2 | C+M+N | UM |
| 18. | T26 | AIII | 35 | M | 1 | C | UM |
| 19. | T299 | AIII | 66 | Ž | 1 | C+M+N | - |
| 20. | T320 | AIII | 46 | M | 1 | C+M+N | UM |
| 21. | T319 | AIII | 58 | M | 3 | C+M | UM |
| 22. | T554 | GBM | 58 | M | 1 | C | UM |
| 23. | T557 | GBM | 83 | M | 1 | C | UM |
| 24. | T558 | GBM | 68 | M | 1 | C+M+N | UM |
| 25. | T560 | GBM | 56 | M | 1 | C | UM |
| 26. | T563 | GBM | 54 | M | 1 | C | UM |
| 27. | T570 | GBM | 54 | M | 1 | C | UM |
| 28. | T571 | GBM | 42 | M | 1 | C | UM |
| 29. | T553 | GBM | 39 | Ž | 1 | C+M+N | UM |
| 30. | T559 | GBM | 71 | Ž | 2 | C+M | UM |
| 31. | T284 | GBM | 55 | Ž | 2 | C+M+N | UM |
| 32. | T562 | GBM | 65 | Ž | 1 | C+M | UM |
| 33. | T537 | GBM | 30 | M | 1 | - | UM |
| 34. | T527 | GBM | 62 | M | 2 | C | UM |
| 35. | T528 | GBM | 68 | M | 1 | C | UM |
| 36. | T540 | GBM | 6 | M | 1 | C+N | UM |
| 37. | T541 | GBM | 69 | M | 1 | C+M+N | UM |
| 38. | T280 | GBM | 79 | M | 1 | C | UM |
| 39. | T547 | GBM | 62 | M | 1 | C | UM |
| 40. | T539 | GBM | 6 | M | 1 | C | UM |
| 41. | T525 | GBM | 61 | Ž | 1 | - | UM |
| 42. | T532 | GBM | 40 | Ž | 1 | C | UM |
| 43. | T533 | GBM | 72 | Ž | 2 | C | UM |
| 44. | T544 | GBM | 65 | Ž | 1 | C | UM |
| 45. | T522 | GBM | 70 | Ž | 1 | C | UM |
| 46. | T524 | GBM | 77 | Ž | 1 | C | UM |
| 47. | T518 | GBM | 67 | Ž | 1 | C+M | UM |
| 48. | T538 | GBM | 77 | Ž | 1 | C+M+N | UM |
| 49. | T534 | GBM | 65 | Ž | 1 | C | UM |
| 50. | T293 | GBM | 67 | Ž | 1 | C+M+N | - |
| 51. | T550 | GBM | 53 | Ž | 1 | C+M | UM |

Prema gradusu tumora bilo je 11 uzoraka difuznih astrocitoma (21,6%), 10 anaplastičnih astrocitoma (19,6%) te 30 glioblastoma (58,8%). Nadalje, uspoređena je dob obolijevanja pacijenata i gradus astrocitoma. Rezultati testa ANOVA pokazali su značajne razlike između dobi obolijevanja i gradusa astrocitoma ($p=0,002$). Utvrđeno je da se glioblastomi javljaju u kasnijoj životnoj dobi u odnosu na difuzne ($p=0,003$) i anaplastične astrocitome ($p=0,027$).

Tablica 5. Raspodjela spola i dobi po gradusima astrocitoma.

| Gradus astrocitoma | Broj oboljelih | | | Dob (srednja vrijednost) \pm standardna devijacija | | |
|-------------------------|----------------|----------|--------|--|-------------------|-------------------|
| | Žene | Muškarci | Ukupno | Žene | Muškarci | Svi |
| Difuzni astrocitom | 4 | 7 | 11 | 34 \pm 3,56 | 42,14 \pm 10,16 | 39,18 \pm 9,09 |
| Anaplastični astrocitom | 3 | 7 | 10 | 51,67 \pm 16,26 | 39,57 \pm 12,38 | 43,2 \pm 13,96 |
| Glioblastom | 15 | 15 | 30 | 62,93 \pm 11,66 | 53,13 \pm 22,54 | 58,03 \pm 18,73 |
| Ukupno | 22 | 29 | 51 | 56,14 \pm 15,71 | 47,21 \pm 18,89 | 51,06 \pm 18,1 |

4.2. Ekspresija proteina SFRP4 u uzorcima astrocitoma

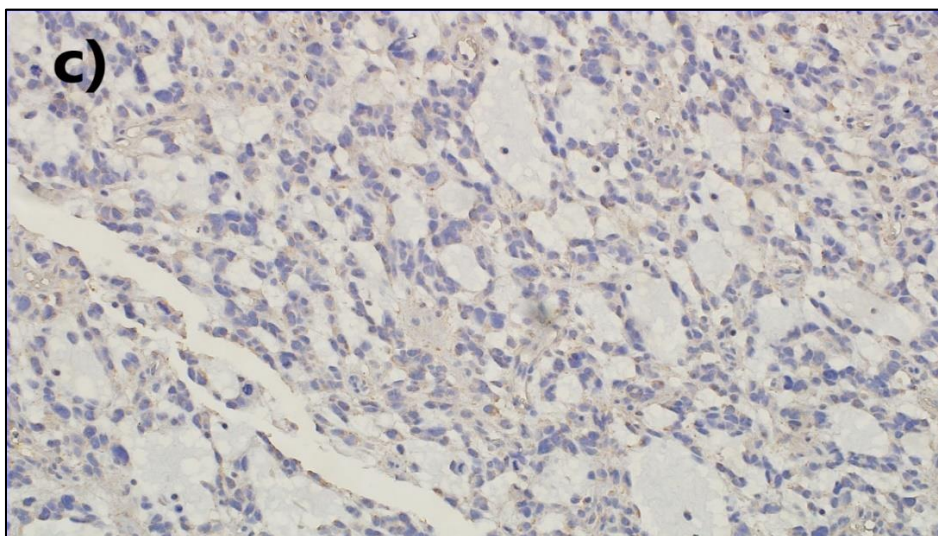
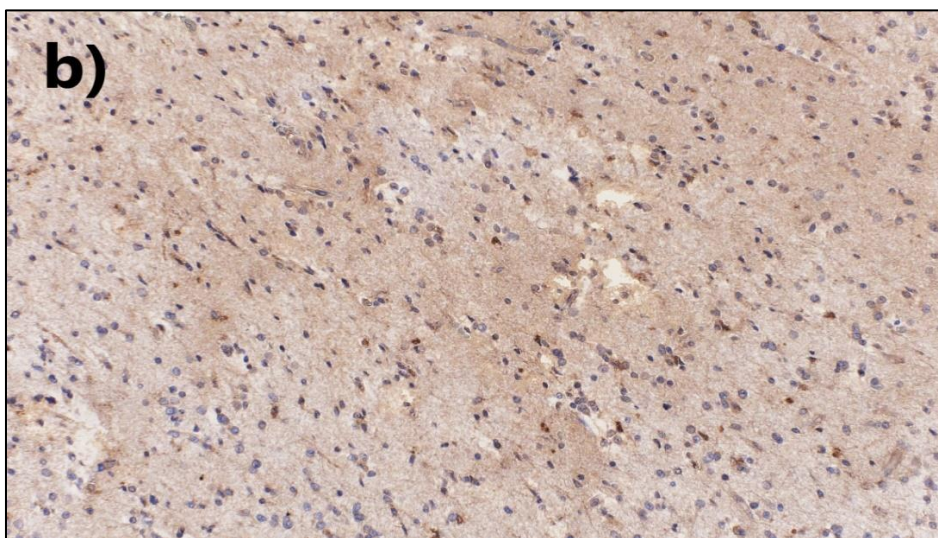
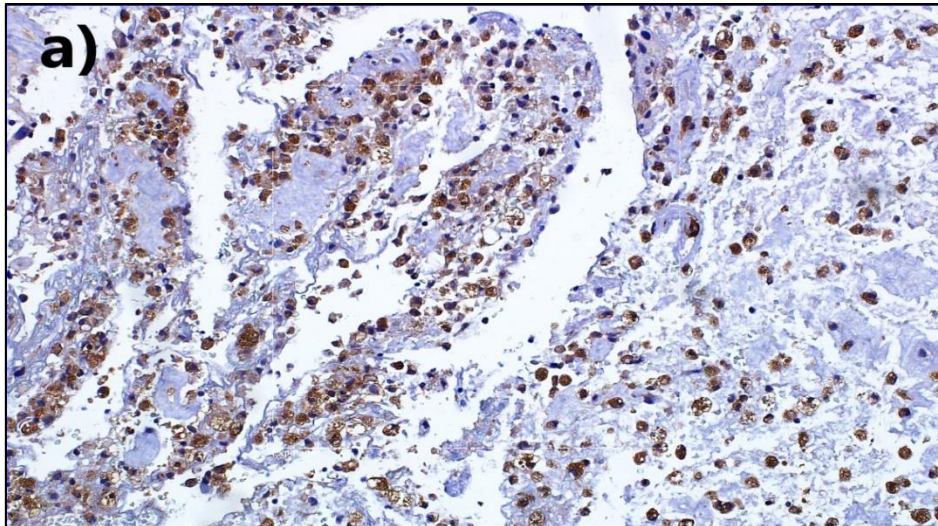
Ekspresija proteina SFRP4 u uzorcima tkiva astrocitoma istražena je metodom imunohistokemije. Uzorci su bili uklopljeni u parafin i obrađeni imunohistokemijskim bojenjem pomoću specifičnog antitijela. Intenzitet i učestalost obojenja analizirani su pod svjetlosnim mikroskopom. Analiza ekspresije proteina SFRP4 na ukupno 50 uzoraka astrocitoma različitih gradusa pokazala je slabu ili nikakvu ekspresiju u 72%, umjerenu u 22% te jaku u 6% uzoraka. Kruscal-Wallis test otkrio je značajnu razliku između razine ekspresije proteina SFRP4 u odnosu na gradus tumora ($p=0,008$), a Spearmanov korelacijski test također

je potvrdio umjerenu negativnu povezanost između analiziranih varijabli ($rs=-0,442$, $p=0,001$). U skupini difuznih astrocitoma prisutan je bio značajno veći broj uzoraka s umjerenom i jakom ekspresijom dok su kod viših gradusa astrocitoma prevladavali uzorci s niskom ekspresijom proteina ($p=0,002$). Difuzni astroцитomi pokazali su slabu ili nikakvu ekspresiju kod 40% (4/10) uzoraka, umjerenu također kod 40% (4/10) uzoraka, dok je jaku ekspresiju imalo 20% (2/10) uzoraka. Kod anaplastičnih astrocitoma, 60% (6/10) uzoraka pokazalo je slabu ili nikakvu ekspresiju, 30% (3/10) umjerenu te 10% (1/10) jaku. Ekspresija proteina SFRP4 u glioblastomima bila je u 86,7% uzoraka slaba ili nikakva, a u 13,3% (4/30) uzoraka umjerena (Tablica 6, Slika 9). Signal je u svim analiziranim uzorcima bio lokaliziran u citoplazmi, u većini uzoraka je bio prisutan i na membrani te u određenom broju i u jezgri (Slika 8).

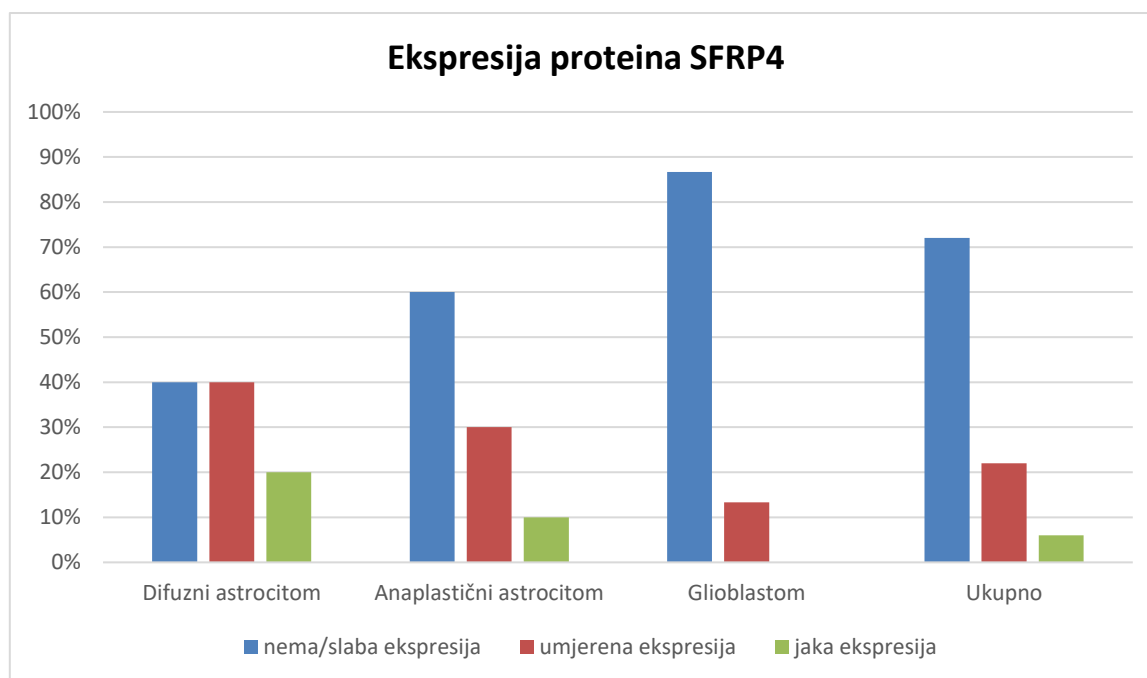
Tablica 6. Ekspresija proteina SFRP4 u astroцитomima različitih gradusa.

| IRS vrijednost | | SFRP4 | | |
|----------------|---|-------|------|------|
| | | AII | AIII | GBM |
| IRS 0-4 | N | 4 | 6 | 26 |
| | % | 40 | 60 | 86,7 |
| IRS 6-8 | N | 4 | 3 | 4 |
| | % | 40 | 30 | 13,3 |
| IRS 9-12 | N | 2 | 1 | - |
| | % | 20 | 10 | - |
| Ukupno | N | 10 | 10 | 30 |
| | % | 100 | 100 | 100 |

N - broj uzoraka, % - postotak uzoraka



Slika 8. Prikaz rezultata imunohistokemijskog bojenja (povećanje 200x) a) difuznog astrocitoma, b) anaplastičnog astrocitoma, c) glioblastoma. Slika pokazuje jaku (a), umjerenu (b) te slabu (c) ekspresiju proteina SFRP4 u citoplazmama, membranama i jezgrama stanica.



Slika 9. Ekspresija proteina SFRP4 po različitim gradusima astrocitoma. Proteini su u uzorcima tumora detektirani imunohistokemijskim bojenjem pomoću antitijela na protein SFRP4, te je mikroskopski određen intenzitet i učestalost obojenja.

4.3. Analiza metilacijskog statusa promotora gena *SFRP4*

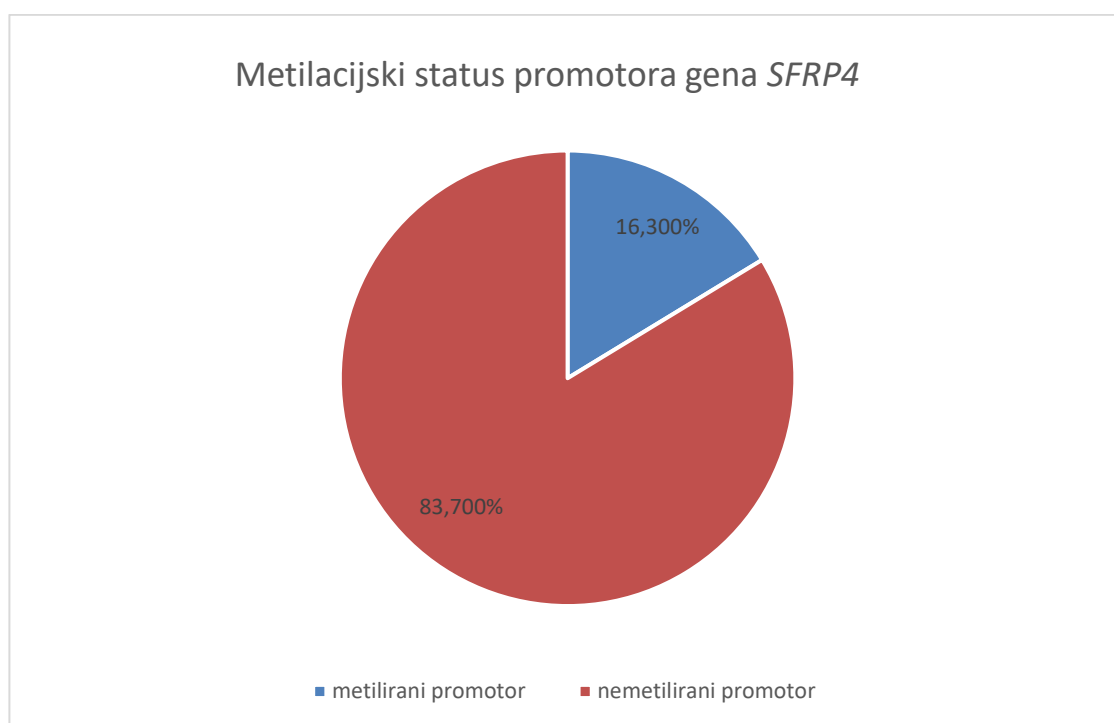
Metodom MS PCR analiziran je metilacijski status CpG otoka promotora gena *SFRP4*, u uzorcima astrocitoma. Iz tkiva je izolirana DNA, napravljena je bisulfitna konverzija, te reakcija PCR koja ovisi o metilacijskom statusu. Detektirani produkt bio je veličine između 100 i 150 pb. Uvjeti reakcije MS PCR smatrani su optimiziranim kad je uzorak metilirane kontrole dao produkt željene veličine samo u metiliranoj reakciji metilirane kontrole, a uzorak nemetilirane kontrole u nemetiliranoj reakciji nemetilirane kontrole. Kao negativna kontrola korištena je voda bez nukleaza te je izostanak nastanka produkta u istoj bio dokaz da u reakciji nisu bile prisutne kontaminacije. U slučaju da je produkt dobiven samo u nemetiliranoj reakciji, uzorak je smatran nemetiliranim. U slučaju da je produkt dobiven u metiliranoj i u nemetiliranoj reakciji, uzorak je smatran metiliranim. Rezultati reakcije za svaki uzorak prikazani su u Tablici 4 i na Slici 12.

Od ukupno 49 analiziranih uzoraka, 16,3% (8/49) imalo je metiliran promotor, a 83,7% (41/49) uzoraka imalo je nemetiliran promotor (Slika 10). Kod difuznih astrocitoma, 72,7% (8/11) uzoraka imalo je metiliran promotor a 27,3% (3/11) nemetiliran. Svi uzorci anaplastičnih astrocitoma (9/9) i glioblastoma (29/29) imali su nemetilirane promotore (Slika 11). Pearsonov χ^2 – test pokazao je značajne razlike u metilacijskom statusu gena *SFRP4* između pojedinih stupnjeva malignosti astrocitnih tumora ($p < 0,001$). Post-hoc analizom χ^2 -testa utvrđeno je da je u difuznim astrocitomima promotorska regija gena *SFRP4* statistički značajno češće metilirana u odnosu na glioblastome ($p < 0,001$), dok su, s druge strane, glioblastomi imali statistički značajno veći broj nemetiliranih uzoraka u usporedbi s astrocitomima gradusa II ($p < 0,001$). Kruskal – Wallis testom također je potvrđeno postojanje statistički značajnih razlika u uzorku metilacije unutar različitih gradusa astrocitoma ($\lambda = 22,149$; $p < 0,001$). Mann-Whitneyev U test otkrio je da astrocitomi gradusa II imaju statistički značajno više metiliranih uzoraka u usporedbi s astrocitomima gradusa III ($p = 0,004$) i astrocitomima gradusa IV ($p < 0,001$).

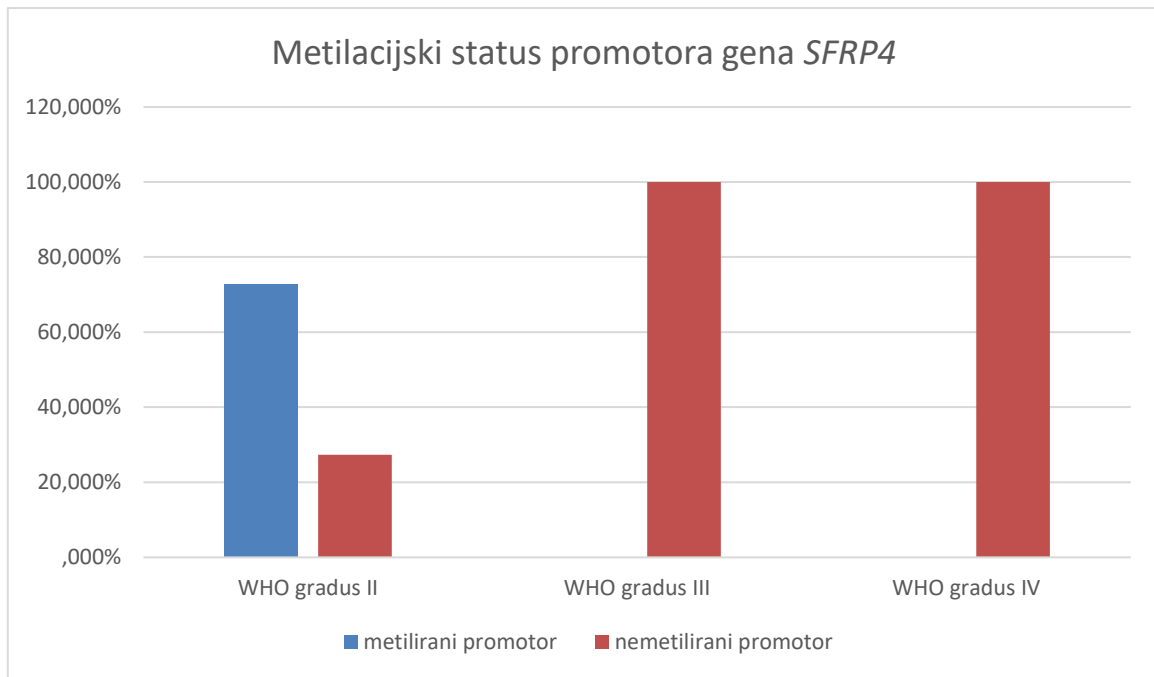
Studentov t-test pokazao je značajnu povezanost između dobi obolijevanja i metilacije promotora gena *SFRP4* ($p = 0,011$). Pacijenti mlađe životne dobi češće su imali metiliran promotor analiziranog gena. Prosječna životna dob pacijenata s nemetiliranim promotorom bila je viša (52,37 godina) u odnosu na one s metiliranim promotorom (41,5 godina) (Tablica 7). Rezultati reakcije MS PCR pokazali su prisutnost metilacije promotora gena *SFRP4* u većini uzoraka difuznih astrocitoma te izostanak metiliranosti u višim gradusima astrocitoma.

Tablica 7. Prosječna životna dob pacijenata s metiliranim i nemetiliranim promotorom gena *SFRP4*

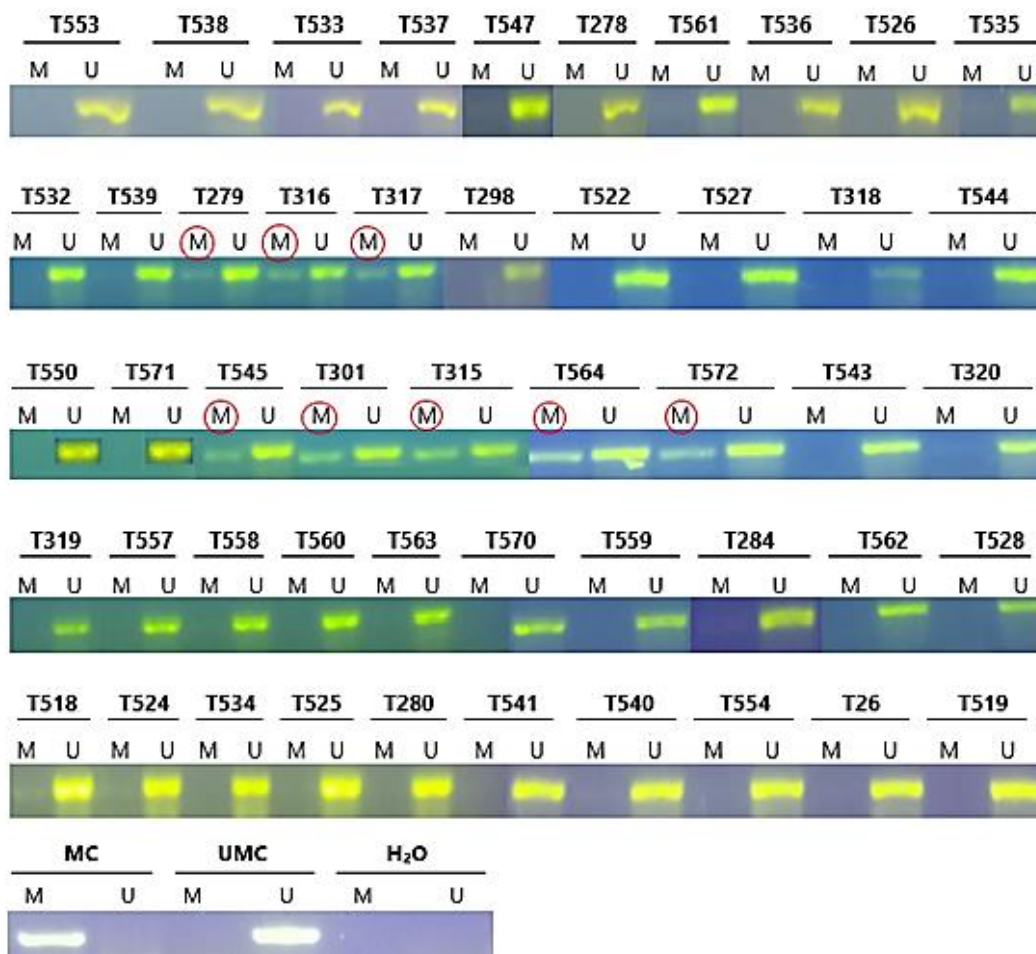
| Metilacijski status | Broj uzoraka | Dob (srednja vrijednost) ± standardna devijacija |
|---------------------|--------------|--|
| Metilirani uzorci | 8 | 41,5±9,67 |
| Nemetilirani uzorci | 41 | 52,37±18,81 |



Slika 10. Metilacijski status CpG otoka promotora gena *SFRP4* u 49 uzoraka astrocitoma različitih gradusa.



Slika 11. Postotak metiliranosti promotora gena *SFRP4* kod različitih gradusa astrocitoma.



Slika 12. Analiza metilacije promotora gena *SFRP4* u uzorcima astrocitoma različitih gradusa. Na slici su prikazani rezultati reakcije MS PCR svih 49 analiziranih uzoraka. Prisutnost produkta u nemetiliranoj reakciji ukazuje na to da promotor nije metiliran; prisutnost produkta u metiliranoj reakciji ukazuje na metiliranost promotora. Crvenom bojom označeni su metilirani uzorci (8). M – metilirana reakcija; U – nemetilirana reakcija; MC – metilirana kontrola; UMC – nemetilirana kontrola; H₂O (voda) – negativna kontrola.

Rezultati χ^2 -testa pokazali su da postoji statistički značajna povezanost između metilacije gena i izraženosti proteina SFRP4 ($p=0,007$). Slaba izraženost proteina SFRP4 opažena je u 28,5% metiliranih i 78% uzoraka s nemetiliranim promotorom. Umjerena ili jaka ekspresija SFRP4 bila je prisutna u 71,5% astrocitoma s metilacijom *SFRP4* i 22% nemetiliranih uzoraka.

5. RASPRAVA

Signalni put Wnt esencijalan je u brojnim biološkim procesima, kao što su proliferacija, diferencijacija, migracija i preživljenje stanica, stoga njegova aberantna aktivnost ima jednu od ključnih uloga u tumorigenezi kao i nastanku specifičnih razvojnih defekata i neurodegenerativnih bolesti (Lee i sur., 2016; Nusse i Clevers, 2017). Zbog svoje uključenosti u embrionalni razvoj središnjeg živčanog sustava, istraživanja su pokazala kako uz ostale signalne puteve, i put Wnt ima značajnu ulogu u nastanku i progresiji astrocitnih tumora (Kafka i sur. 2018). Zang i sur. (2011) demonstrirali su da je interakcija transkripcijskog faktora FoxM1 i β -katenina potrebna za formiranje glioma, što predstavlja jedan od mogućih mehanizama putem kojih Wnt potiče tumorigenezu. Kahlert i sur., (2012) pokazali su da Wnt signalizacija pojačava pokretljivost stanica glioblastoma *in vitro* aktivacijom molekula koje potiču mezenhimski fenotip. Astroцитomi su najučestaliji tip tumora mozga u ljudi, pri čemu su glioblastomi posebno proliferativni te njihova invazivna priroda korelira s lošim kliničkim ishodima (Paw i sur., 2015; Wang i sur., 2015). Glioblastomi u 10% slučajeva nastaju malignom progresijom iz astrocitoma nižeg gradusa (mutirani gen *IDH*), dok u 90% slučajeva nastaju *de novo* (divlji tip gena *IDH*) (Barthel i sur., 2018).

Obitelj proteina SFRP modulira signalizaciju puta Wnt te obuhvaća pet članova, od SFRP1 do SFRP5. Obitelj gena *SFRP* možemo podijeliti na dvije blisko srodne podgrupe. Jednu čine *SFRP1*, *SFRP2* i *SFRP5*, a drugu *SFRP3* i *SFRP4* (Kawano i Kypta, 2003). Iako se članovi obitelji SFRP generalno smatraju antagonistima signalnog puta Wnt, njihova uloga nije uvijek inhibitorna (Pećina-Šlaus i sur., 2016). Novija otkrića upućuju na prekomjernu ekspresiju proteina SFRP u stanicama nekih karcinoma, što govori o njihovoj dvostrukoj ulozi u Wnt signalizaciji i tumorigenezi (Mii i Taira 2011; Xavier i sur., 2014).

Promijenjena ekspresija gena *SFRP4* u različitim tipovima poremećaja ukazuje na njegovu bitnu ulogu u održavanju homeostaze tkiva. Smanjena ekspresija ili utišavanje gena *SFRP4* rezultira prekomjernom aktivacijom puta Wnt, dovodeći do inhibicije apoptoze u tumorskim stanicama. *SFRP4* ima guste CpG otoke kraj prvog eksona. Njihova hipermetilacija jedan je od mehanizama utišavanja gena, što stvara predispoziciju za pre-maligne promjene u mnogim tipovima tumora (Bovolenta i sur., 2008; Pawar i Rao, 2018). Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi dolazi li do različite učestalosti promjena metilacijskog statusa promotora gena i razine ekspresije proteina SFRP4 između različitih histoloških gradusa astrocitoma.

U ovom istraživanju, metodom imunohistokemije otkriveno je da je u skupini difuznih astrocitoma bio prisutan značajno veći broj uzoraka s umjerenom (40%) i jakom (20%) ekspresijom, dok su kod viših gradusa astrocitoma prevladavali uzorci s niskom ekspresijom proteina SFRP4. Kod anaplastičnih astrocitoma, 60% uzoraka pokazalo je slabu ili nikakvu ekspresiju analiziranog proteina, dok je istu imalo 86,7% uzoraka glioblastoma. Statističkom analizom utvrđena je značajna razlika između razine ekspresije proteina SFRP4 u odnosu na gradus tumora ($p=0,008$), a potvrđena je i umjereno negativna povezanost između analiziranih varijabli ($rs=-0,442$, $p=0,001$). Slično tome, rezultati istraživanja Hreznjaka i sur. (2014) pokazali su smanjenu ekspresiju proteina SFRP4 u agresivnijim oblicima sarkoma endometrija u usporedbi sa sarkomima endometrija nižih gradusa. Slične rezultate dobili su Carmon i Loose (2008) prilikom istraživanja karcinoma endometrija. Povezanost gubitka ili smanjene ekspresije proteina SFRP4 s progresijom tumora dokumentirana je u uzorcima karcinoma jednjaka (Zou i sur., 2005), gušterače (Bu i sur., 2008), mezoteliomu (He i sur., 2005) te adenomu hipofize (Wu i sur., 2015). U studiji iz 2009., Drake i sur. su imunohistokemijskom analizom uzoraka tumora jajnika utvrdili da je ekspresija proteina SFRP4 u negativnoj korelaciji s ekspresijom β -katenina. Navedeni rezultati u skladu su s rezultatima našeg istraživanja, uzimajući u obzir da je u normalnom zdravom tkivu mozga protein SFRP4 eksprimiran umjereno (Wawelwala i sur., 2008). Iz navedenog se može zaključiti da SFRP4 ima značajnu fiziološku ulogu u odraslom mozgu čovjeka. Naši nalazi upućuju da povećanjem gradusa tumora dolazi do smanjenja ekspresije proteina SFRP4 u astrocitomima, što ukazuje na to da on djeluje kao tumor supresor inhibirajući aktivnost signalnog puta Wnt te sprječavajući nastanak i progresiju tumora. S druge strane, postoje studije koje pokazuju pozitivnu korelaciju između ekspresije proteina SFRP4 i povećanja maligniteta tumora (Abu-Jawdeh i sur., 1999). Neke studije ukazuju na povećanu ekspresiju proteina SFRP4 u uzorcima karcinoma jajnika te kolorektalnog karcinoma (Drake i sur., 2009; Huang i sur., 2010). U istraživanju Lianga i sur. (2019) pokazano je da nuklearni SFRP3 i SFRP4 pojačavaju regrutiranje β -katenina uz transkripcijski faktor TCF4, promovirajući transkripcijsku aktivnost posredovanu kompleksom β -katenin/TCF4, što pridonosi nastanku fenotipa tumorskih matičnih stanica. Navedeno ukazuje na njegov potencijalni proonkogeni učinak u nekim tumorima, što ide u prilog tvrdnjama o njegovoj dvojnoj ulozi u tumorigenezi. Rezultati našeg istraživanja pokazuju smanjenu ekspresiju nuklearnog SFRP4 u glioblastomima u odnosu na difuzne i anaplastične astrocitome, što ne ukazuje na postojanje proonkogenog učinka u ovim tumorima, već govori o njegovom karakteru tumor supresora.

Metilacija DNA epigenetički je mehanizam koji može smanjiti ekspresiju tumor supresor gena i potaknuti ekspresiju onkogeni. Metilaciju promotorske regije tumor supresor gena povezujemo sa smanjenom ekspresijom proteina, što pospješuje rast tumorskih stanica i progresiju u maligniji oblik tumora (Phillips, 2008; Delpu i sur. 2013). U ovom istraživanju, analizom metilacijskog statusa promotorske regije gena *SFRP4* na uzorku od 49 astrocitoma različitih gradusa pokazano je da 83,7% ispitanih uzoraka nema metilirani promotor. Gledajući po gradusima, svi uzorci anaplastičnih astrocitoma i glioblastoma imali su nemetilirane promotore, dok je čak 72,7% difuznih astrocitoma imalo metilirani promotor. Statističkom analizom utvrđene su značajne razlike u metilacijskom statusu gena *SFRP4* između pojedinih stupnjeva malignosti astrocitnih tumora ($p < 0,001$), kao i to da astrocitomi gradusa II imaju statistički značajno više metiliranih uzoraka u usporedbi s astrocitomima gradusa III ($p = 0,004$) i astrocitomima gradusa IV ($p < 0,001$). Više različitih istraživanja ukazuje na hipermetilaciju promotora gena *SFRP4* te smanjenu ekspresiju proteina SFRP4 u tumorima endometrija, vrata maternice, mokraćnog mjehura, gušterače, bubrega, jednjaka, hipofize te mezoteliomu (Pohl i sur., 2015). Ukupno 19 studija s 2440 uzoraka uključeno je u meta-analizu koju su proveli Yu i sur. (2019), s ciljem određivanja učinka hipermetilacije promotora gena *SFRP4* na rizik od raka. Analizom je otkriven značajno povećan rizik od raka povezan s metilacijom promotora *SFRP4* u kolorektalnom karcinomu te karcinomima jajnika, vrata maternice i bubrega, dok poveznica nije pronađena u karcinomima endometrija i želuca. Ipak, kroz studiju je uočena velika heterogenost unutar grupa. Rezultati istraživanja Schiefera i sur. (2014) pokazuju da je utišavanje gena *SFRP4* izazvano metilacijom promotora jedno od moguće ključnih obilježja glioblastoma. Istraživanje je provedeno na 4 stanične linije glioblastoma tretirane 5-azacitidinom, inhibitorom metilacije DNA, koje su stoga imale nemetilirane promotore gena *SFRP4*. Western blot analizom nakon tretmana pokazano je povećanje ekspresije proteina SFRP4 u svim staničnim linijama. S druge strane, neka istraživanja pokazuju manje učestalu hipermetilaciju promotora gena *SFRP4* u usporedbi s drugim članovima obitelji *SFRP* u kolorektalnim karcinomima te postoje proturječni dokazi o razini njegove ekspresije u istima (Feng Han i sur., 2006). Iako je u tumorima jajnika utvrđeno smanjenje ekspresije proteina SFRP4, otkriveno je da se frekvencije metilacije promotora gena *SFRP4* ne razlikuju značajno između različitih gradusa tumora (Su i sur., 2009).

U našem istraživanju, svi metilirani uzorci dali su signale u metiliranoj i u nemetiliranoj reakciji, s tim da su signali u nemetiliranoj reakciji bili intenzivniji. S obzirom

da se tumor sastoji od heterogenih stanica, moguće je da neke od njih sadrže metilirane a neke nemetilirane promotore. Također, moguće objašnjenje je da se u astrocitomima nižih gradusa aktivno odvija proces demetilacije promotora, budući da u višim gradusima astrocitoma nije zabilježena metiliranost promotora. U prethodnim istraživanjima ovog laboratorija ispitana je prisutnost metilacije promotora *SFRP1* u različitim gradusima astrocitoma. Ukupno je 32% uzoraka pokazalo metilaciju promotora, no, suprotno nalazima na *SFRP4*, u glioblastomima je pronađen statistički značajno veći udio metiliranih slučajeva u odnosu na graduse II i III (Kafka i sur., 2018). Sukladno nalazima na razini molekule DNA, uzorci s metiliranim promotorom *SFRP1* ekspimirali su manje proteina što ukazuje da bi gubitak SFRP1 mogao biti uključen u progresiju astrocitoma. S druge strane, rezultati iste istraživačke grupe dobiveni imunohistokemijskom analizom proteina SFRP3 u uzorcima astrocitoma gradusa I-IV, sugeriraju da bi SFRP3 mogao djelovati kao agonist Wnt signalizacije i poticati invazivno ponašanje. Naime, Pećina-Šlaus i sur., (2018) pokazali su da je razina ekspresije proteina SFRP3 smanjena u jezgri kod astrocitoma višeg stupnja (što ukazuje na očekivano ponašanje antagonista Wnt signalizacije), dok je u istoj skupini uzoraka pronađena povećana razina citoplazmatskog SFRP3 u usporedbi s astrocitomima nižeg gradusa.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju i statistički značajnu povezanost između dobi obolijevanja i metilacije promotora gena *SFRP4* ($p=0,011$). Pacijenti mlađe životne dobi češće su imali metiliran promotor analiziranog gena, vjerojatno zbog toga što se glioblastomi javljaju u kasnijoj životnoj dobi u odnosu na difuzne i anaplastične astrocitome, a moguće da gubitku metilnih skupina doprinosi i proces starenja (Unnikrishnan i sur. 2019). Budući da smo pokazali da se ekspresija proteina SFRP4 smanjuje s povećanjem gradusa astrocitoma, to upućuje da je njegova ekspresija u višim gradusima astrocitoma regulirana nekim drugim (epi)genetičkim mehanizmima. Kao što je ranije spomenuto, većina glioblastoma ne nastaje progresijom iz astocitoma nižeg gradusa, nego *de novo*. Iako su u oba tipa glioblastoma promijenjeni isti signalni putevi, potvrđeno je da se primarni i sekundarni glioblastomi razlikuju s obzirom na epigenetičke promjene i učestalost mutacija pojedinih gena (Barthel i sur., 2018). Istraživanje Foltza i sur. (2010) indicira da su posttranslacijske modifikacije histona odgovorne za epigenetičku modulaciju antagonista puta Wnt, između ostalog i proteina SFRP1. Daljnjim molekularnim analizama trebalo bi utvrditi točan epigenetički mehanizam utišavanja proteina SFRP4 u višim gradusima astrocitoma. Naše istraživanje ograničeno je relativno malim brojem uzoraka, što umanjuje statističku moć te nas moguće sprječava u otkrivanju nekih postojećih poveznica. Potrebne su daljnje studije na većem broju

uzoraka da bi razjasnili precizan mehanizam kojim SFRP4 utječe na nastanak i razvoj astrocitoma.

Stanične linije više različitih karcinoma transfecirane rekombinantnim *SFRP4* pokazale su povećanu osjetljivost na kemoterapeutike, smanjenu agresivnost te smanjenju invazivnost kod onih tumora u kojima je zabilježena smanjena ekspresija ovog proteina (Pohl i sur., 2015). Warriar i sur. (2013) pružili su snažne dokaze da je SFRP4 sposoban senzibilizirati stanice glioma i matične stanice glioma na kemoterapeutike cisplatin i doksorubicin. To ukazuje da bi SFRP4 mogao imati sposobnost uništavanja matičnih stanica glioma te je kao takav potencijalno efikasan u tretiranju glioblastoma. Ipak, s obzirom na sposobnost bifaznog djelovanja, pojačavanje njegove ekspresije može biti riskantno jer u nekim tkivima može potencirati aktivaciju signalnog puta Wnt (Xavier i sur. 2014). Zbog toga je neophodno upoznavanje svih segmenata kaskada signalnih puteva, građe i interakcija proteina te stanične epigenetike (Surana i sur., 2014).

6. ZAKLJUČAK

Aberantna aktivnost signalnog puta Wnt ima značajnu ulogu u nastanku i progresiji mnogih tumora, pa tako i astrocitoma. Obitelj proteina SFRP, u koju spada i SFRP4, modulira Wnt signalizaciju te ima bitnu ulogu u održavanju homeostaze tkiva. Tijekom ovog istraživanja obrađen je 51 uzorak astrocitoma različitih gradusa. Analiza ekspresije proteina i metilacijskog statusa promotora gena *SFRP4* doveli su do sljedećih zaključaka:

1. Utvrđena je statistički značajna razlika između razine ekspresije proteina SFRP4 u odnosu na gradus tumora ($p=0,008$). Uzimajući u obzir njegovu umjerenu ekspresiju u zdravom tkivu mozga, rezultati upućuju na to da povećanjem gradusa tumora dolazi do smanjenja ekspresije proteina SFRP4 u astrocitomima, što ukazuje da bi SFRP4 mogao djelovati kao tumor supresor inhibirajući aktivnost signalnog puta Wnt te sprječavajući nastanak i progresiju ovih tumora.

2. Statističkom analizom utvrđene su značajne razlike u metilacijskom statusu gena *SFRP4* između pojedinih stupnjeva malignosti astrocitnih tumora ($p<0,001$). Astrocitomi gradusa II imaju statistički značajno više metiliranih uzoraka u usporedbi s astrocitomima gradusa III ($p=0,004$) i astrocitomima gradusa IV ($p<0,001$). Iz navedenog možemo zaključiti da se metiliranost promotora gena *SFRP4* smanjuje s povećanjem gradusa astrocitoma.

3. Svi metilirani uzorci dali su signale u metiliranoj i u nemetiliranoj reakciji, s tim su signali u nemetiliranoj reakciji bili intenzivniji. S obzirom na ranije navedeno, ovo upućuje da se u astrocitomima nižih gradusa aktivno odvija proces demetilacije promotora.

4. Rezultati pokazuju statistički značajnu povezanost između dobi obolijevanja i metilacije promotora gena *SFRP4* ($p=0,011$). Mlađi pacijenti češće su imali metiliran promotor u odnosu na starije, vjerojatno zbog toga što se glioblastomi javljaju u kasnijoj životnoj dobi u odnosu na niže graduse astrocitoma, a moguće da gubitku metilnih skupina doprinosi i sam proces starenja.

5. Smanjenje ekspresije proteina SFRP4 s povećanjem gradusa astrocitoma upućuje na to da je njegova ekspresija u višim gradusima regulirana nekim drugim (epi)genetičkim mehanizmima.

6. Daljnjim molekularnim analizama na većem broju uzoraka trebalo bi utvrditi točan (epi)genetički mehanizam utišavanja ekspresije proteina SFRP4 u višim gradusima astrocitoma te razjasniti njegov utjecaj na nastanak i razvoj astrocitoma.

7. LITERATURA

Abu-Jawdeh, G., Comella, N., Tomita, Y., Brown, L.F., Tognazzi, K., Sokol, S.Y. Kocher, O. (1999): Differential expression of frpHE: A novel human stromal protein of the secreted frizzled gene family, during the endometrial cycle and malignancy. *Laboratory Investigation*, 79: 439-447.

Alexandre, C., Baena-Lopez, A., Vincent, J. P. (2014): Patterning and growth control by membrane-tethered Wingless. *Nature*, 505(7482): 180–185.

Barthel, F.P., Johnson, K.C., Wesseling, P., Verhaak, R.G.W. (2018): Evolving Insights into the Molecular Neuropathology of Diffuse Gliomas in Adults. *Neurologic Clinics*, 36(3): 421-437.

Bhanot, P., Brink, M., Samos, C. H., Hsieh, J. C., Wang, Y., Macke, J. P., Andrew, D., Nathans, J., Nusse, R. (1996): A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature*, 382(6588): 225–230.

Binch, A., Snuggs, J., Le Maitre, C. L. (2020): Immunohistochemical analysis of protein expression in formalin fixed paraffin embedded human intervertebral disc tissues. *Journal of Orthopedic Research spine*, 3(3): 1098.

Blackburn, D., Sargsyan, S., Monk, P. N., Shaw, P. J. (2009): Astrocyte function and role in motor neuron disease: a future therapeutic target? *Glia*, 57(12): 1251–1264.

Boguszewska, K., Szewczuk, M., Urbaniak, S., Karwowski, B. T. (2019): Review: immunoassays in DNA damage and instability detection. *Cellular and molecular life sciences*, 76(23): 4689–4704.

Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J., Cisneros, E., Lopez-Rios, J. (2008): Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted frizzled-related proteins in development and disease. *Journal of Cell Science*, 121(6): 737–746.

Bu, X.M., Zhao, C.H., Zhang, N., Gao, F., Lin, S., Dai, X.W. (2008): Hypermethylation and aberrant expression of secreted frizzled-related protein genes in pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 14: 3421–4

Burger, P.C., Scheithauer, B.W. (2007): *Tumors of the Central Nervous System (Afip Atlas of Tumor Pathology)* (4th ed.). American Registry of Pathology, Washington: pp. 34.

Carmon, K. S., Loose, D. S. (2008): Secreted frizzled-related protein 4 regulates two Wnt7a signaling pathways and inhibits proliferation in endometrial cancer cells. *Molecular cancer research*, 6(6): 1017–1028.

Carmon, K.S., Loose, D.S. (2010): SFRP4 [secreted frizzled-related protein 4], *Atlas. Genetics. Cytogenetics. Oncology, Hematology*, 14(3): 296–300.

- Chen, X., Cho, D. B., Yang, P. C. (2010): Double staining immunohistochemistry. *North American journal of medical sciences*, 2(5): 241–245.
- Chong, J., Üren, A., Rubin, J., Speicher, D. (2001): Disulfide bond assignments of secreted frizzled-related protein-1 provide insights about frizzled homology and netrin modules. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7): 5134–5144.
- Choudhury, J.H., Das, R., Laskar, S., Kundu, S., Kumar, M., Das, P. P., Choudhury, Y., Mondal, R., Ghosh, S. K. (2018): Detection of p16 Promoter Hypermethylation by Methylation-Specific PCR. *Methods in Molecular Biology*, 1726: 111–122.
- Davis M. E. (2016): Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clinical journal of oncology nursing*, 20(5): 2–8.
- Delpu, Y., Cordelier, P., Cho, W.C., Torrisani, J. (2013): DNA Methylation and Cancer Diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7): 15029–15058.
- Dijksterhuis, J.P., Baljinnyam, B., Stanger, K., Sercan, H.O., Ji, Y., Andres, O., Rubin, J.S., Hannoush, R.N., Schulte, G. (2015): Systematic Mapping of WNT-FZD Protein Interactions Reveals Functional Selectivity by Distinct WNT-FZD Pairs. *Journal of Biological Chemistry*, 290(11): 6789-6798.
- Drake, J., Shearwood, A.M., White, J., Friis, R., Zeps, N., Charles, A., Dharmarajan, A. (2009): Expression of secreted frizzled-related protein 4 (SFRP4) in primary serous ovarian tumors. *European Journal of Gynecological Oncology*, 30: 133-141.
- Farin, H. F., Jordens, I., Mosa, M. H., Basak, O., Korving, J., Tauriello, D. V., de Punder, K., Angers, S., Peters, P. J., Maurice, M. M., Clevers, H. (2016): Visualization of a short-range Wnt gradient in the intestinal stem-cell niche. *Nature*, 530(7590): 340–343.
- Feng Han, Q., Zhao, W., Bentel, J., Shearwood, A.M., Zeps, N., Joseph, D. (2006): Expression of sFRP-4 and beta-catenin in human colorectal carcinoma. *Cancer Letters*, 231: 129–37.
- Foltz, G., Yoon, J. G., Lee, H., Ma, L., Tian, Q., Hood, L., Madan, A. (2010): Epigenetic regulation of Wnt pathway antagonists in human glioblastoma multiforme. *Genes & cancer*, 1(1): 81–90.
- Gopalakrishnan, S., Van Emburgh, B.O., Robertson, K.D. (2008): DNA methylation in development and human disease. *Mutation Research*, 647(1-2): 30-8.
- Grimm S.A., Chamberlain M.C. (2016): Anaplastic astrocytoma. *Central Nervous System Oncology* 5: 145- 157.
- He, B., Lee, A. Y., Dadfarmay, S., You, L., Xu, Z., Reguart, N., Mazieres, J., Mikami, I., McCormick, F., Jablons, D. M. (2005): Secreted frizzled-related protein 4 is silenced by hypermethylation and induces apoptosis in beta-catenin-deficient human mesothelioma cells. *Cancer research*, 65(3): 743–748.

- Hilz, H., Wieggers, U., Adamietz, P. (1975): Stimulation of proteinase K action by denaturing agents: application to the isolation of nucleic acids and the degradation of 'masked' proteins. *European journal of biochemistry*, 56(1): 103–108.
- Hoang, B., Moos, M., Jr, Vukicevic, S., Luyten, F. P. (1996): Primary structure and tissue distribution of FRZB, a novel protein related to *Drosophila* frizzled, suggest a role in skeletal morphogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 271(42): 26131–26137.
- Hrzenjak, A., Tippl, M., Kremser, M. L., Strohmeier, B., Guelly, C., Neumeister, D., Lax, S., Moinfar, F., Tabrizi, A. D., Isadi-Moud, N., Zatloukal, K., Denk, H. (2004): Inverse correlation of secreted frizzled-related protein 4 and beta-catenin expression in endometrial stromal sarcomas. *The Journal of pathology*, 204(1): 19–27.
- Huang, D., Yu, B., Deng, Y., Sheng, W., Peng, Z., Qin, W., Du, X. (2010): SFRP4 was overexpressed in colorectal carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 136(3): 395–401.
- Janda, C., Dang, L., You, C., Chang, J., de Lau, W., Zhong, Z. A., Yan, K. S., Marecic, O., Siepe, D., Li, X., Moody, J. D., Williams, B. O., Clevers, H., Piehler, J., Baker, D., Kuo, C. J., Garcia, K. C. (2017): Surrogate Wnt agonists that phenocopy canonical Wnt and β -catenin signalling. *Nature*, 545(7653): 234–237.
- Jin, B., Li, Y., Robertson, K. D. (2011): DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes & cancer*, 2(6): 607–617.
- Kafka, A., Karin, V., Šerman, Lj., Bukovac, A., Njirić, N., Jakovčević, A., Pećina-Šlaus, N. (2018): Hypermethylation of Secreted Frizzled Related Protein 1 gene promoter in different astrocytoma grades. *Croatian Medical Journal*, 59(5):213-223.
- Kahlert, U. D., Maciaczyk, D., Doostkam, S., Orr, B. A., Simons, B., Bogiel, T., Reithmeier, T., Prinz, M., Schubert, J., Niedermann, G., Brabletz, T., Eberhart, C. G., Nikkhah, G., Maciaczyk, J. (2012): Activation of canonical WNT/ β -catenin signaling enhances in vitro motility of glioblastoma cells by activation of ZEB1 and other activators of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer letters*, 325(1): 42–53.
- Kämmerer, U., Kapp, M., Gassel, A. M., Richter, T., Tank, C., Dietl, J., Ruck, P. (2001): A New Rapid Immunohistochemical Staining Technique Using the EnVision Antibody Complex. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49(5): 623–630.
- Kapoor M., Gupta V. (2020): Astrocytoma. StatPearls Publishing, StatPearls. Treasure Island.
- Kawano, Y., Kypta, R. (2003): Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway, *Journal of Cell Science*, 116(13): 2627–2634.
- Kierulf-Vieira, K. S., Sandberg, C. J., Grieg, Z., Günther, C. C., Langmoen, I. A., Vik-Mo, E. O. (2016): Wnt inhibition is dysregulated in gliomas and its re-establishment inhibits proliferation and tumor sphere formation. *Experimental cell research*, 340(1): 53–61.

- Kitagawa, M., Hatakeyama, S., Shirane, M., Matsumoto, M., Ishida, N., Hattori, K., Nakamichi, I., Kikuchi, A., Nakayama, K., Nakayama, K. (1999): An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 18(9): 2401–2410.
- Krenacs, L., Krenacs, T., Stelkovic, E., Raffeld, M. (2010): Heat-induced antigen retrieval for immunohistochemical reactions in routinely processed paraffin sections. *Methods in molecular biology*, 588: 103–119.
- Lauberth S. M., Nakayama T., Wu X., Ferris A. L., Tang Z., Hughes S. H., Roeder R. G. (2013): H3K4me3 interactions with TAF3 regulate preinitiation complex assembly and selective gene activation. *Cell*, 152(5): 1021–1036.
- Lee, Y., Lee, J. K., Ahn, S. H., Lee, J., Nam, D. H. (2016): WNT signaling in glioblastoma and therapeutic opportunities. *Laboratory investigation*, 96(2): 137-150.
- Li, C., Bellusci, S., Borok, Z., Minoo, P. (2015): Non-canonical WNT signaling in the lung. *The Journal of Biochemistry*, 158(5): 355–365.
- Liang, C. J., Wang, Z. W., Chang, Y. W., Lee, K. C., Lin, W. H., Lee, J. L. (2019): SFRPs Are Biphasic Modulators of Wnt-Signaling-Elicited Cancer Stem Cell Properties beyond Extracellular Control. *Cell reports*, 28(6): 1511–1525.
- Lin, K., Wang, S., Julius, M. A., Kitajewski, J., Moos, M., Jr, Luyten, F. P. (1997): The cysteine-rich frizzled domain of Frzb-1 is required and sufficient for modulation of Wnt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(21): 11196–11200.
- Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R.H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J. R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q. M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Millar, A. H., Thomson, J. A., Ren, B., Ecker, J. R. (2009): Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 462(7271): 315-22.
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G. H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., He, X. (2002): Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*, 108(6): 837–847.
- Li, Y., Tollefsbol, T. O. (2011): DNA methylation detection: bisulfite genomic sequencing analysis. *Methods in molecular biology*, 791: 11–21.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., Ellison, D. W. (2016): The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta neuropathologica*, 131(6): 803–820.
- McMahon, A.P., Joyner, A.L., Bradley, A., McMahon, J.A. (1992): The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt-1-/Wnt-1- mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell*, 69: 581–595.

- Mii, Y., Taira, M. (2011): Secreted Wnt “inhibitors” are not just inhibitors: Regulation of extracellular Wnt by secreted Frizzled-related proteins. *Development, growth & differentiation*, 53(8): 911-923.
- Moore, L., Le, T., Fan, G. (2013): DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, 38: 23–38.
- Mulligan, K.A., Cheyette, B.N. (2012): Wnt signaling in vertebrate neural development and function. *Journal of neuroimmune pharmacology*, 7: 774-787.
- Nusse, R., Clevers, H. (2017): Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*, 169(6): 985–999.
- Oliva, C. A., Montecinos-Oliva, C., Inestrosa, N. C. (2018): Wnt Signaling in the Central Nervous System: New Insights in Health and Disease. *Progress in molecular biology and translational science*, 153: 81–130.
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Liao, P., Rouse, C., Chen, Y., Dowling, J., Wolinsky, Y., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J. (2014): CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro-oncology*, 16(4): 1–63.
- Paw, I., Carpenter, R.C., Watabe, K., Debinski, W., Lo, H.W. (2015): Mechanisms regulating glioma invasion. *Cancer Letters*, 362: 1-7.
- Pawar, N. M., Rao, P. (2018): Secreted frizzled related protein 4 (sFRP4) update: A brief review. *Cellular signalling*, 45: 63–70.
- Pećina-Šlaus, N. (2009): *Odabrane metode molekularne biologije – laboratorijski priručnik*. 1. izd. Medicinska naklada d.o.o., Zagreb.
- Pećina-Šlaus, N., Kafka, A., Lechpammer, M. (2016): Molecular genetics of intracranial meningiomas with emphasis on canonical Wnt signalling. *Cancers*, 8: 67-88.
- Pećina-Šlaus, N., Kafka, A., Varošanec, A.M., Marković, L., Krsnik, Z., Njirić, N., Mrak, G. (2016): Expression patterns of Wnt signaling component sFRP3 in astrocytoma and glioblastoma. *Molecular Medicine Reports*, 13: 4245-51.
- Perry, A., Wesseling, P. (2016): Histologic classification of gliomas. U: Berger, M.S., Weller M. (ur.) *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V.: 71-95.
- Pfeifer, G. P. (2018): Defining Driver DNA Methylation Changes in Human Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4): 1166.
- Phillips, T. (2008): The role of methylation in gene expression. *Nature Education*, 1: 116.
- Pohl, S., Scott, R., Arfuso, F., Perumal, V., Dharmarajan, A. (2015): Secreted frizzled-related protein 4 and its implications in cancer and apoptosis. *Tumor biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(1): 143–152.

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al., editors. (2001): Neuroscience. 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland (MA), Neuroglial Cells.

Rao, X., Evans, J., Chae, H., Pilrose, J., Kim, S., Yan, P., Huang, R. L., Lai, H. C., Lin, H., Liu, Y., Miller, D., Rhee, J. K., Huang, Y. W., Gu, F., Gray, J. W., Huang, T. M., Nephew, K. P. (2013): CpG island shore methylation regulates caveolin-1 expression in breast cancer. *Oncogene*, 32(38): 4519–4528.

Rattner, A., Hsieh, J. C., Smallwood, P. M., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Nathans, J. (1997): A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7): 2859–2863.

Rios-Esteves, J., Resh, M. D. (2013): Stearoyl CoA desaturase is required to produce active, lipid-modified Wnt proteins. *Cell reports*, 4(6): 1072–1081.

Robertson, K.D. (2005): DNA methylation and human disease. *Nature Reviews Genetics*, 6(8): 597-610.

Sambrook, J., Fritsch, E. R., Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schiefer, L., Visweswaran, M., Perumal, V., Arfuso, F., Groth, D., Newsholme, P., Warriar, S., Dharmarajan, A. (2014): Epigenetic regulation of the secreted frizzled-related protein family in human glioblastoma multiforme. *Cancer gene therapy*, 21(7): 297–303.

Schneider, J., Arraf, A.A., Grinstein, M., Yelin, R., Schultheiss, T.M. (2015): Wnt signaling orients the proximal-distal axis of chick kidney nephrons. *Development* 142: 2686–2695.

Schwarz-Romond, T., Fiedler, M., Shibata, N., Butler, P. J., Kikuchi, A., Higuchi, Y., Bienz, M. (2007): The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. *Nature structural & molecular biology*, 14(6): 484–492.

Shi, Y., He, B., You, L., Jablons, D. M. (2007): Roles of secreted frizzled-related proteins in cancer. *Acta Pharmacologica Sinica*, 28(9): 1499-1504.

Stamos, J. L., Chu, M. L., Enos, M. D., Shah, N., Weis, W. I. (2014): Structural basis of GSK-3 inhibition by N-terminal phosphorylation and by the Wnt receptor LRP6. *eLife*, 3: 01998.

Su, H. Y., Lai, H. C., Lin, Y. W., Chou, Y. C., Liu, C. Y., Yu, M. H. (2009): An epigenetic marker panel for screening and prognostic prediction of ovarian cancer. *International journal of cancer*, 124(2): 387–393.

Sukheeja, D., Singhvi, S., Rai, N. N., Midya, M. (2015): A Comparative Study of Histopathology of Astrocytomas with Intraoperative Cytology with Special Reference to MIB-1 Labelling Index. *Journal of clinical and diagnostic research*, 9(8): 1–3.

- Sun, J., Bonaguidi, M.A., Jun, H., Guo, J. U., Sun, G. J., Will, B., Yang, Z., Jang, M. H., Song, H., Ming, G. L., Christian, K. M. (2015): A septo-temporal molecular gradient of sfrp3 in the dentate gyrus differentially regulates quiescent adult hippocampal neural stem cell activation. *Molecular Brain*, 8: 52.
- Surana, R., Sikka, S., Cai, W., Shin, E. M., Warriar, S. R., Tan, H. J., Arfuso, F., Fox, S. A., Dharmarajan, A. M., Kumar, A. P. (2014): Secreted frizzled related proteins: Implications in cancers. *Biochimica et biophysica acta*, 1845(1): 53–65.
- Unnikrishnan, A., Freeman, W. M., Jackson, J., Wren, J.D., Porter, H., Richardson, A. (2019): The role of DNA methylation in epigenetics of aging. *Pharmacology & Therapeutics*, 195: 172–185.
- Wang, H., Xu, T., Jiang, Y., Xu, H., Yan, Y., Fu, D., Chen, J. (2015): The challenges and the promise of molecular targeted therapy in malignant gliomas. *Neoplasia*, 17: 239-255.
- Warriar, S., Balu, S.K., Kumar, A.P., Millward, M., Dharmarajan, A. (2013): Wnt antagonist, secreted frizzled-related protein 4 (sFRP4), increases chemotherapeutic response of glioma stem-like cells. *Oncology Research*, 21: 93–102.
- Wu, Y., Bai, J., Li, Z., Wang, F., Cao, L., Liu, C., Yu, S., Yu, G., Zhang, Y. (2015): Low expression of secreted frizzled-related protein 4 in aggressive pituitary adenoma. *Pituitary*, 18(3): 335–342.
- Wawelwala, C.C., De Silva, K.R.D., Samarasinghe, K., Mandawala, A.M., Dharmarajan, D.E.N. (2008): SFRP-4, a secreted frizzled protein, in human brain. *Journal of Neurochemistry*, 98(1): 57-58.
- Xavier, C.P., Melikovaa, M., Chumana, Y., Üren, A., Baljinnyam, B., Rubin, J.S. (2014): Secreted frizzled-related protein potentiation versus inhibition of Wnt3a/ β -catenin signaling. *Cell Signal*, 26: 94-101.
- Yu, J., Chia, J., Canning, C. A., Jones, C. M., Bard, F. A., Virshup, D. M. (2014): WLS retrograde transport to the endoplasmic reticulum during Wnt secretion. *Developmental cell*, 29(3): 277–291.
- Yu, J., Xie, Y., Li, M., Zhou, F., Zhong, Z., Liu, Y., Wang, F., Qi, J. (2019): Association between SFRP promoter hypermethylation and different types of cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oncology letters*, 18(4): 3481–3492.
- Zhang, N., Wei, P., Gong, A., Chiu, W. T., Lee, H. T., Colman, H., Huang, H., Xue, J., Liu, M., Wang, Y., Sawaya, R., Xie, K., Yung, W. K., Medema, R. H., He, X., Huang, S. (2011): FoxM1 promotes β -catenin nuclear localization and controls Wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis. *Cancer cell*, 20(4): 427–442.
- Zong, H., Verhaak, R. G., Canoll, P. (2012): The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements. *Expert review of molecular diagnostics*, 12(4): 383–394.

Zou, H., Molina, J.R., Harrington, J.J., Osborn, N.K., Klatt, K.K., Romero, Y. (2005): Aberrant methylation of secreted frizzled-related protein genes in esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus. *International Journal of Cancer*, 116: 584–91.

8. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 25. kolovoza 1995. u Livnu. Završio sam opću gimnaziju Marka Marulića u Tomislavgradu, 2014. godine. Godine 2015. upisujem preddiplomski studij biologije na Fakultetu prirodoslovno-matematičkih i odgojnih znanosti, Sveučilišta u Mostaru. Zvanje prvostupnika biologije stječem 2018. godine te iste godine upisujem Diplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu. Uz hrvatski, aktivno govorim engleski i njemački jezik.

PROJEKTI

- | | |
|---------------------|--|
| 03/2021. – 07/2021. | Diplomski rad na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga (HIIM), Laboratorij za neuroonkologiju, Sveučilište u Zagrebu (Metilacija promotora i ekspresija proteina SFRP4 u astrocitnim tumorima mozga čovjeka) |
| 04/2018. – 07/2018. | Završni rad na Odjelu za biologiju, Fakultet prirodoslovno-matematičkih i odgojnih znanosti, Sveučilište u Mostaru (CRISPR-Cas9) |

ZNANSTVENA AKTIVNOST

Kafka A, Bukovac A, Brglez E, Drmić D, Jarmek AM, Poljak K, Brlek P, Žarković K, Njirić N, Pećina-Šlaus N. Methylation patterns of DKK1, DKK3, SFRP4, and GSK3 β are accompanied with different expression levels in human astrocytoma. 8th Croatian Neuroscience Congress - Book of Abstracts Zagreb, Croatia, September 24-25, 2021.