Ekspresija proteina sFRP3 i DVL3, ključnih molekula signalnog puta Wnt u glioblastomu

Gabud, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:907670

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Tea Gabud

Ekspresija proteina sFRP3 i DVL3, ključnih molekula signalnog puta Wnt u glioblastomu

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj rad je izrađen u Hrvatskom institutu za istraživanje mozga, pod vodstvom prof. dr. sc. Nives Pećina-Šlaus. Rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost u sklopu projekta WNT4EMT br. 6625. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvale

Zahvalila bih svojoj mentorici Nives Pećini-Šlaus i njenoj doktorandici Anji Kafki na strpljenju, detaljnoj informacijskoj potpori, uvijek spremnom i brzom odgovoru i šansi da ovaj rad bude realiziran, te suvoditeljici Gordani Lacković-Venturin na suradnji i susretljivosti.

Hrvatskoj zakladi za znanost zahvaljujem na financijskoj potpori za realizaciju eksperimenta.

Također zahvaljujem Marku Štenglu, Janku Marijanu, tati i Liji bez čije emotivne potpore vjerojatno ne bih uspjela finalizirati rad u obliku teksta.

Zahvaljujem svojim prijateljima Petru Glažaru i Vedranu Frankeu na konzultacijama iz statistike.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

EKSPRESIJA PROTEINA sFRP3 I DVL3, KLJUČNIH MOLEKULA SIGNALNOG PUTA WNT U GLIOBLASTOMU

Tea Gabud

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sažetak:

Oboljeli od glioblastoma uz trenutno dostupne terapije imaju medijan preživljenja kraći od godinu dana. Cilj diplomskog rada je identificirati status ključnih proteina signalnog puta Wnt (sFRP3 I DVL3) u stanicama ljudskog glioblastoma, provjeriti postoji li poveznica statusa s kliničkim karakteristikama bolesnika i ukazati na eventualne nove mete za razvoj ciljnih terapija. Na preparatima ljudskog glioblastoma proteini su detektirani metodom imunohistokemije. Tkiva su analizirana pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus BH-2). Razina ekspresije proteina određena je semikvantitativnom metodom u 3 stupnja jačine signala uz oznaku tkivne i subcelularne lokalizacije. Oba proteina su eksprimirana u stanicama glioblastoma. Nema korelacije između njihove ekspresije, kao ni korelacije jačine signala s kliničkim parametrima. Dominacija jakog signala u stanicama dovedena je u vezu sa simultanom lokalizacijom proteina DVL3 u citoplazmi i nukleusu, te proteina sFRP3 simultano u citoplazmi i ekstracelularno uz izostanak signala u nukleusu. Prognoze oboljelih od glioblastoma su loše čak i uz kombiniranje dostupnih terapija, jer je glioblastom jedan od agresivnijih i malignijih tipova tumora, često neoperabilan zbog lokalizacije. Glioblastom je vrlo heterogenog porijekla i histopatološke slike, specifičan za oboljelog, bitno je razviti metode kojima će se detektirati individualna slika stanja. Tek će detaljnije poznavanje mreže signalnih puteva moći ukazati na optimalne pristupe terapijskim rješenjima.

(47 stranica, 13 slika, 4 tablice, 55 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: imunohistokemija, karcinom, maligni gliom, β-katenin, signalizacija, DAB
Voditeljica: prof. dr. sc. Nives Pećina-Šlaus
Suvoditeljica: prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin
Ocjenitelji:
Rad prihvaćen:

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

EXPRESSION OF PROTEINS sFRP3 AND DVL3, KEY MOLECULES OF WNT SIGNAcPATHWAY IN GLIOBLASTOMA

Tea Gabud

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Abstract:

Glioblastoma patients have a median survival of less than a year. Thesis aim is to identify key proteins' (sFRP3 and DVL3) status in Wnt signaling pathway in human glioblastoma samples, search for their connection with clinical data and point out possible new target therapy objects. Proteins are detected by immunohistochemistry. Tissues are analyzed under a light microscope (Olympus BH-2). The expression levels are determined by the semiquantitative method in the 3-stage signal strength with tissue and subcellular localization labels. Both proteins are expressed in glioblastoma. There is no correlation between their expression, as well as signal strength correlation with clinical parameters. Strong signal dominance was brought into connection with simultaneous localization of DVL3 in the cytoplasm and nucleus, and sFRP3 simultaneously in the cytoplasm and extracellularly along with the absence of signal in the nucleus. Prognosis for glioblastoma patients are bad even with the combination of all available therapies. It is one of the most aggressive and malignant tumor types, often inoperable due to localization. Glioblastoma is highly heterogeneous in origin and histopathological images so developing methods for detecting individual condition traits are essential. Only a more detailed knowledge of signaling pathways network could give the optimal therapeutic solutions.

(47 pages, 13 figures, 4 tables, 55 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library
Key words: immunohistochemistry, cancer, malignant glioma, β-catenin, signaling, DAB
Supervisor: Nives Pećina-Šlaus, PhD, Associate professor
Co-supervisor: prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin
Reviewers:
Thesis accepted:

Sadržaj

1. Uvod 7
1.1. Signalni put Wnt 7
1.2. Poveznica signalnog puta Wnt s karcinomom 10
1.3. Uloge proteina DVL3 i sFRP3 u stanici 13
1.4. Cilj istraživanja 19
2. Materijali i metode 20
2.1. Preparati 20
2.2. Imunohistokemija 20
2.3. Protutijela 24
3. Rezultati 26
3.1. Analiza preparata 26
3.2. Korelacija signala s kliničkim parametrima 32
3.3. Distribucija signala s obzirom na subcelularnu lokalizaciju 35
4. Rasprava 38
5. Zaključak 42
6. Literatura 43
7. Životopis 48

1. Uvod

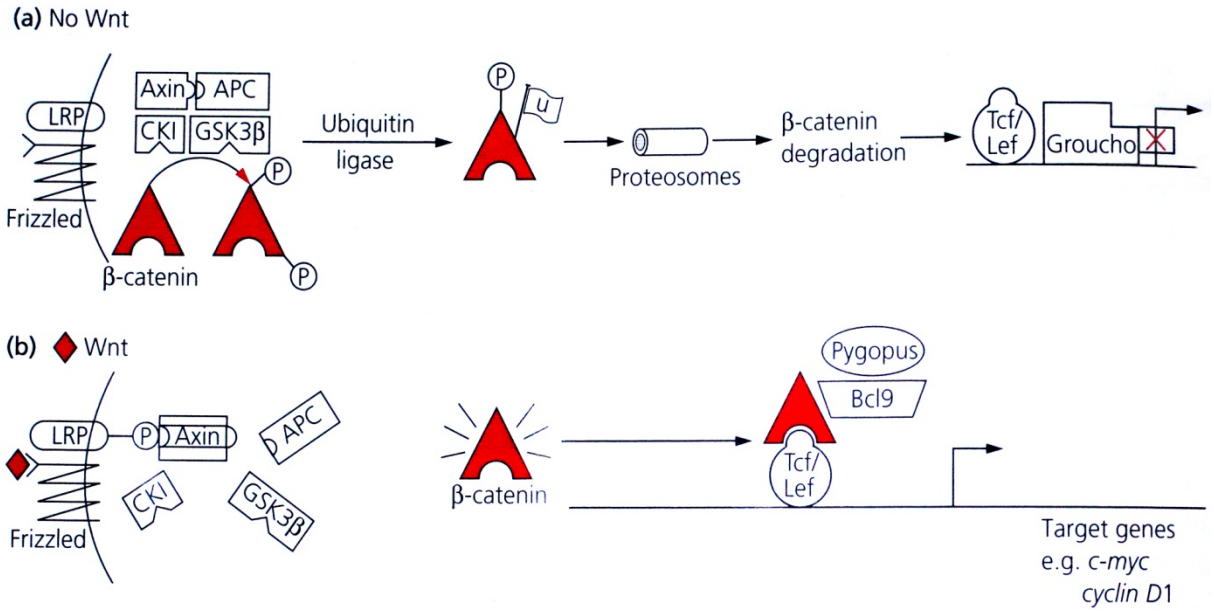
Glioblastoma multiforme (GBM) je najučestaliji primarni intrakranijalni tumor kod čovjeka odrasle dobi, ujedno i jedan od najagresivnijih tumora kod ljudi (Li i sur. 2014). Prema klasifikaciji svjetske zdravstvene organizacije (WHO, engl. World Health Organisation) naziva se glioblastomom, a istovjetan je gradusu IV astrocitoma. Nastaje iz glija stanica ili njezinih prekursora (Schiefer i sur. 2014). Prema klasifikaciji WHO u astrocitnim tumorima postoje 4 gradusa/stupnja malignosti,. Gradus I označava biološki najmanje agresivne tumore dok gradus IV stoji za biološki najagresivnije tumore. Pilocitični astrocitomi su dobroćudni i gradusa I, dok su difuzni i anaplastični astrocitomi zloćudni s nižim gradusom tj. stupnjem malignosti, a najzloćudniji je glioblastom s gradusom IV (Louis i sur. 2007). Novije spoznaje pokazuju da važnu ulogu u nastanku i ponašanju glioblastoma ima enzim IDH1 (isocitrat dehidrogenaza 1), te se danas koristi kao marker u klasifikaciji glioblastoma. Razlika između astrocitoma gradusa III i glioblastoma je citološka i morfološka. Kod glioblastoma su prisutne aplastične stanice oko nekrotizirajućeg tkiva kao i hiperplazija krvnih žila. Glioblastom čini 52% svih tumora funkcionalnih tkiva mozga i 20% svih intrakranijalnih tumora (Burger i Scheithauer, 2007). Smatra se da je njegova pojava sporadična, jer su primjeri s potencijalnom genetičkom predispozicijom malobrojni. Tkiva glioblastoma izrazito su heterogena na staničnoj i molekularnoj razini. Trenutno dostupni tretmani, uz kirurški zahvat i radioterapiju, uključuju ciljanu terapiju farmakološkim inhibitorima ključnih molekula aberantnih signalnih puteva, te genotoksične agense poput temozolomida (Indranil i sur. 2013). Prognoza kod pacijenata višeg histopatološkog gradusa tumora je loša s preživljenjem do godinu dana uz kombiniranu terapiju, a 4.5 mjeseci bez terapijskog tretmana. Terapijski napreci trebali bi ići u smjeru detekcije poremećaja u signalizaciji i razvoja novih ciljnih terapija.

1.1. Signalni put Wnt

Wnt proteini čine veliku obitelj palmitoiliranih signalnih sekretornih glikoproteina (Bovolenta i sur. 2008). Razvili su se tijekom pojave Metazoa, nakon divergencije hoanoflagelata. Kako već spužve posjeduju nekoliko Wnt proteina, a kod jednostaničnih organizama ne nalazimo niti jedan, postulira se da je njihova pojava imala značajnu

evolucijsku ulogu u nastanku višestaničnih organizama (Clevers i Nusse 2012). U genomu sisavaca, uključujući i ljudski, detektirano je 19 Wnt gena, koji su raspoređeni u 12 očuvanih Wnt podobitelji. Ova skupina proteina je bogata cisteinom. U prosjeku sadrže 350-400 aminokiselina i posjeduju N-terminalni signalni slijed za sekreciju (MacDonald i sur. 2009). Wnt proteini odgovaraju klasičnoj definiciji morfogena što znači da signalizaciju vrše stvaranjem gradijenta kroz manje udaljenosti u nekom tkivu. Ovisno o lokalnoj koncentraciji određuju sudbinu stanica (Clevers i Nusse 2012). Wnt signalni put jedan je od najistraživanijih kod životinja (Mii i Taira 2011). Regulira čitav niz staničnih procesa za vrijeme embrionalnog razvoja, ali i u odraslim stanicama. Utječe na diobu stanica, staničnu polarnost i determinaciju stanične sudbine za vrijeme embrionalnog razvoja (npr. formiranje dorzoventralne osi, apoptozu), te kroz spomenute procese održava tkivnu homeostazu (Logan i Nusse 2004). U njegovoj regulaciji sudjeluje velik broj sekretornih glikoproteina. Sekretorni proteini djeluju kao ligandi ili okidači specifične kaskade signalnog puta. Wnt signalni put može u stanici biti u aktivnom ili neaktivnom stanju, ovisno o prisutnosti Wnt liganda s ekstracelularne strane membrane. Kad je Wnt odsutan nekoliko proteina s citoplazmatske strane formira degradacijski kompleks. On se sastoji od aksina, adenomatous polyposis coli proteina (APC), glikogen sintaze kinaze (GSK3β) i kazein kinaze I (CKI). Spomenute kinaze spadaju u skupinu serin/treonin kinaza, a druga dva proteina čine strukturnu jezgru kompleksa. Svrha ovog kompleksa je modifikacija transkripcijskog kofaktora β-katenina. CKI fosforilira serin 45 i treonin 41, a GSK3β serine na pozicijama 33 i 37 (svi su na amino terminalnoj regiji). Upravo ove aminokiseline često su mutirane kod karcinoma. Slijedi ubikvitinizacija pomoću E3 podjedinice ubikvitin ligaze- β-transducin repeat containing protein (β-TrCP) čiji F box/WD ponavljajući motiv prepoznaje fosforilirano mjesto (MacDonald i sur. 2009). Ubikvitinizacija je oznaka koja β-katenin šalje u degradaciju 26S proteasomom. Posljedično, on ne ulazi u nukleus i izostaje aktivacija obitelji transkripcijskih faktora T-cell factor/lymphoid enhancing factor (TCF/LEF) tj. održava se stanje represije. TCF se u ovom stanju veže za traskripcijski represor Groucho. Wnt ligand se s vanjske strane stanične membrane veže za sedmerostruki transmembranski receptor Frizzled (Fz) i njegov koreceptor low-density lipoprotein receptor related protein (LRP6 ili srodni protein LRP5). Citoplazmatski rep LRP-a fosforiliran je kompleksom Wnt-Fz-LRP6 (vjerojatno uz simultanu regrutaciju proteina DVL) i s tom modifikacijom regrutira aksin. Aksin više nije dostupan kao slobodan u citoplazmi i stoga onemogućuje formiranje degradacijskog kompleksa. Koncentracija β-katenina u citoplazmi raste i β-katenin je transportiran u nukleus gdje aktivira transkripcijske faktore porodice TCF/LEF i njihove ciljne gene. Nuklearni proteini Bcl9 i

Pygopus također sudjeluju u aktivaciji ciljnih gena (Pecorino 2012) (slika 1). Vezanje Wnt na Fz receptor uzokuje hiperfosforilaciju proteina dishevelled (DVL) koji time postaje aktivan i djeluje kao inhibitor GSK3β. DVL djeluje na sjecištu na kojem se Wnt signalni put grana na dva segmenta (Giles i sur. 2003).



Slika 1. Pojednostavljeni prikaz signalnog puta Wnt u neaktivnom i aktivnom stanju. (P) označava fosforilaciju, (u) označava ubikvitinizaciju. (Pecorino 2012)

Wnt signalni put grana se na kanonski i nekanonski (Mii i Taira 2011). Kanonski segment kao nizvodni efekt ima aktivaciju β-katenina i znanosti je poznato mnogo više detalja vezanih za ovaj segment puta. Nekanonski segment grana se na još dva moguća nizvodna efekta. Wnt signal se prenosi na c-*Jun* N-terminalnu kinazu (JNK signalni put) ili na Ca^{2+}-otpuštajući put preko Frizzled receptora. JNK signalni put upravlja polarnošću planarne stanice u gastrulaciji (ima ključnu u ulogu u morfogenezi). Wnt/Ca^{2+} grana puta blokira Wnt/β-katenin put preko fosforilacije DVL. Iako je mnogo varijabli koje mogu poremetiti Wnt signalni put, krajnji rezultat se uvijek očituje na koncentraciji β-katenina. Kako je Wnt/Ca^{2+} grana puta povezana s β-kateninom, logično je da postoji implikacija u karcinogenezi (Giles i sur. 2003). Za ovaj diplomski rad važnije je fokusirati se na kanonski segment Wnt signalnog puta i posljedice njegove aberantne aktivacije. Pritom treba imati na umu da njihovo djelovanje u stanici ne može biti promatrano kao potpuno nezavisno, jer su međusobno povezani na više razina. Tako npr. nekanonsko Wnt signaliziranje može inhibirati transkripcijsku aktivnost β-katenina ubrzavajući njegov turnover ili kroz redukciju interakcije kompleksa β-katenin/TCF s DNA (Xavier i sur. 2014).

Wnt signalni put reguliran je većim brojem agonista i antagonista što omogućuje preciznu modulaciju puta. Secreted frizzled related (sFRP) obitelj proteina i Wnt inhibitory protein 1 (WIF1) vežu Wnt, sFRP veže i Fz, te se općenito može reći da djeluju kao antagonisti kanonskog i nekanonskog segmenta Wnt signalnog puta. Pojedini proteini sFRP mogu imati i agonističko djelovanje ili djelovanje ovisno o staničnom kontekstu. Isti proteini utječu na stabilnost Wnt-a, njegovu ekstracelularnu difuziju i distribuciju (MacDonald i sur. 2009).

1.2. Poveznica signalnog puta Wnt s karcinomom

Signalni putevi čije promjene utječu na preživljenje stanica, proliferaciju i migraciju fundamentalni su u tumorigenezi. *Wnt1* je jedan od prvih otkrivenih protoonkogena, poznat još od 1982. godine (pod izvornim nazivom Int-1), čiji je gen bio aktiviran viralnom integracijom DNA i kao takav uzrokovao karcinom mliječnih žlijezda kod miševa (Clevers i Nusse 2012). Aktivan Wnt signalni put može nadvladati apoptozu i potiče proliferaciju (Pećina-Šlaus 2010). Brojni su tipovi karcinoma koji nose konstitutivnu aktivaciju Wnt signalnog puta kao posljedicu mutacije nekog od segmenata kaskade (npr. aktivan je kod 90% slučajeva kolorektalnog karcinoma). Ovo je stanje najfrekventnije uočljivo kod tkiva koja i u odrasloj dobi nužno održavaju Wnt signalni put aktivnim zbog potrebe za samoobnavljanjem ili popravkom (Clevers i Nusse 2012). Najčešće su mutacije koje inaktiviraju APC (gen *Apc* ima ulogu tumor supresora) ili aktiviraju β-katenin, dok su promjene na samom ligandu Wnt izuzetno rijetke (Pecorino 2012), a manje učestale promjene u genu *CTNNB1* koji kodira za β-katenin ili *AXIN* genu (Giles i sur. 2003). AXIN1 je tumor supresor protein i njegova je ekspresija u glioblastomima često utišana (31% uzoraka tkiva) u odnosu na zdravo moždano tkivo, no više je primjera pojačane ekspresije (38.1% uzoraka tkiva) (Pećina-Šlaus i sur. 2011). Mutacije u Wnt signalnoj kaskadi potenciraju razvoj različitih tipova tumora (tablica 1). Primjeri mutacija dovode do zaključka da mnogi segmenti kaskade mogu reaktivirati put samoobnavljanja stanica. Stanice ovih karakteristika nazivamo *de novo* matičnim stanicama pri čemu se misli na stanice koje su ove karakteristike zadobile mutacijom, a ne diobom iz „zdrave“ samoobnavljajuće stanice ili matične stanice. Matične stanice raka uzrok su inicijacije ove skupine bolesti kao i razlog njenog recidiva, te pokazuju visoki stupanj otpornosti na radijaciju i kemoterapiju (Surana i sur. 2014)

Tablica 1. Pregled mutacija Wnt signalnog puta u odabranim karcinomima kod ljudi (Giles i sur. 2003)

TIP KARCINOMA	MUTIRANI GEN	FREKVENCIJA MUTACIJE*
kolorektalni karcinom	*APC*	80%
	CTNNB1	10%
karcinom želuca	*CTNNB1*	26%
adenom želuca	*APC*	76%
melanom	*APC*	3%
	CTNNB1	2%
polimatricoma	*CTNNB1*	77%
adenokarcinom pluća	*CTNNB1*	3%
karcinom jajnika	*CTNNB1*	16%
	APC	2%
	AXIN1	4%
karcinom endometrija maternice	*CTNNB1*	13%
fibromatoza dojke	*APC*	33%
	CTNNB1	45%
karcinom prostate	*CTNNB1*	5%
	APC	14%
karcinom tiroidne žlijezde	*CTNNB1*	46%
hepatoblastom	*CTNNB1*	65%
	AXIN1	7%
hepatocelularni karcinom	*CTNNB1*	18%
	AXIN1	8%
meduloblastom	*CTNNB1*	5%
	APC	21%
	AXIN1	12%
Wilmsov tumor (bubreg)	*CTNNB1*	14%

karcinom jetre	*CTNNB1*	83%
sinovijalni sarkom	*CTNNB1*	8%
	APC	8%

* kad izvor citira više različitih informacija o frekvenciji, uzeta je kao najpouzdanija informacija s najviše obrađenih uzoraka

Nuklearni β-katenin vrši transaktivaciju TCF/LEF ciljnih gena, što za rezultat ima poticanje staničnog rasta i represiju programa diferencijacije. Među ciljnim genima su *c-myc*, *N-myc*, *c-jun*, *ciklin D1* koji sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa tj. diobe, geni *EPH* obitelji gena odgovorne za kodiranje adhezijskih molekula, te geni za Survivin, VEGF, IL-8, EGFR. Time veza između aktivnog Wnt signalnog puta i karcinoma postaje jasnija (Indranil i sur. 2013). Pojačana ekspresija proteina TCF-1 detektirana je u 51.6% uzoraka glioblastoma, a proteina LEF-1 u 71% uzoraka. Pojačana ekspresija LEF-1 sama po sebi može biti biljeg za razlikovanje astrocitoma gradusa II i III od glioblastoma. LEF-1 stoga može poslužiti kao marker malignosti kod tumora mozga (Pećina-Šlaus i sur. 2014).

Detekcija β-katenina u nukleusu biljeg je aktivnog Wnt signalnog puta (Li i sur. 2014), jer je kontrola njegove stabilnosti konačni produkt svih agonističkih i antagonističkih regulatora.

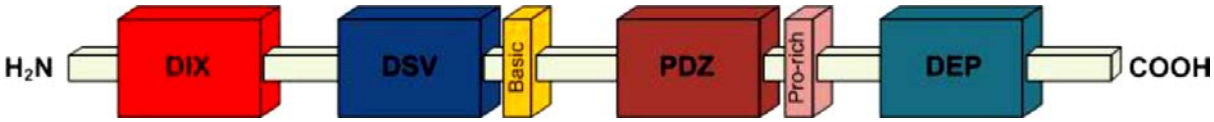
Aberantna aktivacija Wnt signalnog puta ne doprinosi samo umnažanju stanica raka, nego pojačava njihovu otpornost na radijaciju i kemoterapiju, te može utjecati na represiju diferencijacije i mogućnost stanice da migrira. Od najvećeg je interesa u kontekstu kancerogeneze sposobnost aktivnog Wnt puta da održava stanice u funkciji matičnih stanica. Matične stanice sadrže intrinzičnu uputu za diferencijaciju, stoga je pretpostavka da aktivacija Wnt signalnog puta može zaobići diferencijaciju blokirajući ili suprimirajući za to specifičan set gena (Clevers i Nusse 2012). Aberantne ekspresije ili mutacije proteina APC i β-katenina mijenjaju staničnu migratornu sposobnost. β-katenin osim uloge u Wnt signalnom putu u epitelnim stanicama utječe na još jedan proces. Esencijalan je vezujući protein u interakciji s citoplazmatskim repom skupine kadherina. Tipičan primjer je E-kadherin u zonulama adherens između stanica. Obavljajući ovu funkciju β-katenin je izričito stabilan u usporedbi s citoplazmatskim čiji se signalizacijski poluživot broji u minutama (Clevers i Nusse 2012). U normalnim uvjetima, ovi proteini stupaju u interakciju s aktinom i mikrotubularnim citoskeletnim sustavom. Mutirani β-katenin slabije veže E-kadherin na što upućuju studije s

delecijama dijelova *CTNNB1* gena kod stanica karcinoma želuca (Giles i sur. 2003). Precizno uspostavljena ravnoteža između koncentracije citoplazmatskog i nuklearnog β-katenina određuje ishode Wnt signalnog puta preciznije od iznosa apsolutnih koncentracija (Schiefer i sur. 2014).

1.3. Uloge proteina DVL3 i sFRP3 u stanici

DISHEVELLED, DVL3

Dishevelled (dsh) je forsforilirani protein s višestrukom funkcijom u fazi razvoja, izvorno detektiran kod vinske mušice (*Drosophila melanogaster*). Homologni geni kod ljudi koji pokazuju visoki stupanj sličnosti nazvani su *DVL1*, *DVL2* i *DVL3*. Protein od interesa, DVL3, sadrži 716 aminokiselina i njegov gen *DVL3* je lociran na 3q27. Sva tri gena imaju kooperativne i nezavisne funkcije kod miša. DVL3 kod ljudi egzistira u dvije izoforme koje nastaju alternativnim izrezivanjem. DVL proteini posjeduju tri očuvane domene: aminoterminalnu domenu DIX (dishevelled, axin), centralnu PDZ (postsynaptic density 95, disc large, zonula occludens-1) i karboksiterminalnu DEP (dishevelled, Egl-10, pleckstrin). Posjeduju dodatne dvije domene koje nose pozitivan naboj: bazičnu (bogatu serinom i treoninom) i regiju bogatu prolinom (SH3;*src* homology 3). Pretpostavlja se da postoji i četvrta očuvana domena DSV (dishevelled domain) s do sad nepoznatom funkcijom (Kafka i sur. 2014) (slika 2).



Slika 2. Shematizirana struktura očuvanih domena i regija proteina DVL (Kafka i sur. 2014)

DVL proteini su protoonkogeni regulatori puta Wnt (Li i sur. 2014). DVL sudjeluje u formaciji velikog molekularnog kompleksa koji se sastoji od proteina Wnt-Fz-LRP5/6-DVL-AXIN i lokalizira na staničnoj membrani. DVL stupa u interakciju s citoplazmatskim dijelom Fz receptora, što olakšava interakciju repa proteina LRP s AXIN-om.

DIX domena proteina DVL, slična je domeni koju posjedije AXIN i ova dva proteina se preko nje mogu direktno vezati. Multimeri DVL-AXIN molekula vezanih za receptore

potiču dimerizaciju LRP-a i Fz-a. Svi su ovi kompleksi detektirani u stanici (Clevers i Nusse 2012). U slučaju proteina DVL3, DIX domenu čine 82 aminokiseline. DIX domena je neophodna za stvaranje interakcije s AXIN-om, međutim nije sama po sebi dovoljna, nego ukupna interakcija ovisi o drugim regijama koje su najvjerojatnije smještene u blizini ove domene (Kafka i sur. 2014). Kompleks svih spomenutih proteina dovodi do uništenja mehanizma za degradaciju β-katenina što za posljedicu ima njegovu akumulaciju u nukleusu i aktivaciju TCF/LEF ciljnih gena. Preko DIX domene na plazma membrani se odvija oligomerizacija DVL proteina (Gao i Chen, 2010).

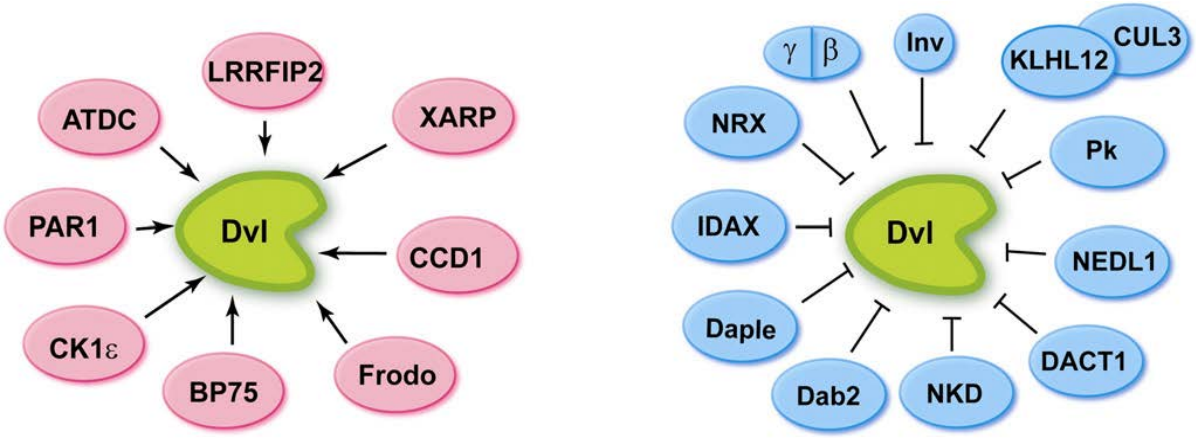
PDZ domenu čine 73 aminokiseline u slučaju sva tri homologa kod ljudi. Za ovu domenu se najčešće vežu proteini iz submembranske zone koji su po funkciji u stanici fosfataze, protein kinaze ili adaptorski proteini. Preko ove domene DVL stupa u interakciju s Fz (Keith i Wharton, 2003).

DEP domenu čini 75 aminokiselina kod sva tri ljudska homologa. Ista je domena detektirana kod članova iz skupine G-signalnih proteina (RGS obitelj proteina). DEP domena posreduje interakciju između DVL i DAAM-1 (dishevelled associated activator of morphogenesis 1) koji sudjeuje u procesu polimerizacije aktina. Bazični ostaci DEP domene omogućuju njeno vezanje za lipidnu membranu (Kafka i sur. 2014).

Kao važan segment degradacijskog kompleksa DVL se dovodi u vezu s degenerativnim bolestima i karcinomom. Smatra se da ima ključnu ulogu u regulaciji razine β-katenina u citoplazmi, „spašavajući“ ga od degradacije (Kafka i sur. 2014). DVL proteini stupaju u interakciju s mnogim drugim proteinima u stanici (CKI, PP2A, Nkd, Stbm, Frat1, Dapper kod vertebrata) što ih upliće u vrlo kompleksnu mrežu interakcija i utjecaja na pozitivnu ili negativnu regulaciju Wnt signalnog puta. U kontekstu njihove uloge u stanicama glioblastoma ključna je interakcija s proteinom CKI koji ih može fosforilirati i tako modificirane potaknuti na usmjeravanje u kanonski segment Wnt puta, te ih preusmjeriti od nekanonskog. Kako je količina citoplazmatske rezerve proteina DVL ograničena, njegova regrutacija u kanonskom segmentu ga oduzima od sudjelovanja u nekanonskom segmentu Wnt signalnog puta i obrnuto (Giles i sur. 2003). DVL može lokalizirati i u nukleusu gdje ima transkripcijsku funkciju. Tamo izvršava funkciju provedbe završnog koraka kanonskog segmenta Wnt signalnog puta, dok u citoplazmi njegova uloga može biti dvojaka. Promet u nukleus i izvan njega reguliran je atipičnim nuklearnim lokalizacijskim signalom (NLS) i nuklearnim eksportirajućim signalom (NES) koji je sličan kao i kod drugih proteina koji

mogu zauzeti obje niše. U nukleusu formira i stabilizira kompleks DVL-c-jun-beta-katenin-TCF koji se preko HMG box-a TCF-a veže za promotor Wnt ciljnih gena (Gao i Chen, 2010).

Aktivnost proteina DVL pod kontrolom je niza pozitivnih i negativnih regulatora, a za sad ih je poznato najmanje 18 (Keith i Wharton, 2003). Pozitivna regulacija se postiže fosforilacijom i hiperfosforilacijom protein kinazama (CK1, CK2, PAR1, β-arrestin). Negativna regulacija se posreduje ubikvitinacijom proteinima KLHL12, NEDL1, Dapper1, Prickle1 i inverzinom. Postoje i proteini koji mogu imati dvojaki efekt ovisno o podjedinici na koju djeluju (PP2A). DUB vrši deubkvitinizaciju DVL-a (Kafka i sur. 2014). Precizna regulacija omogućuje DVL proteinima dinamičnu organizaciju kompleksa, točno usmjeravanje protoka signala specifičnog puta, signalnu amplifikaciju i kontrolu povratnom spregom (Keith i Wharton, 2003)(slika 3).



Slika 3. Shema interakcija DVL-vezujućih proteina;lijevo – pozitivni regulatori; desno. negativni regulatori (Gao i Chen, 2010)

DVL degradiraju proteasomi kroz nekoliko puteva ubikvitinacije. Prickle 1, koji posjeduje E3 ubikvitin ligaznu aktivnost, vjerojatno pospješje razgradnju DVL3 proteina , te je smanjena ekspresija Prickle 1 povezana s povećanim razinama DVL3, akumulacijom β-katenina i rastom hepatocelularnog karcinoma kod ljudi (Gao i Chen, 2010).

Preptpostavlja se da višestruka regulacija diktira usmjeravanje proteina DVL u kanonski ili nekanonski segment signalnog puta Wnt. Međutim, cijeli spektar aktivnost proteina DVL još nije potpuno poznat. Detektirana je njegova polimerizacija/agregacija. Njegove interakcije s proteinima AXIN-om i Fz su relativno slabe. S AXIN-om stupa u dinamičnu polimerizaciju preko homologne DIX domene koja se nalazi na oba proteina. Još nije sigurno regulira li Wnt ovu polimerizaciju. DVL stimulira sintezu fosfatidilinozitol 4, 5-

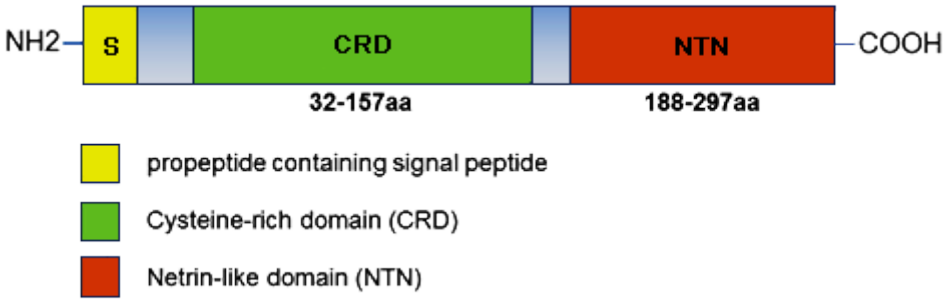
bisfosfata (PIP_2) koji vjerojatno potiče nakupljanje LRP6 i njegovu fosforilaciju. Stvaranje agregata i sinteza PIP_2 zajedno osiguravaju nakupljanje, fosforilaciju i aktivaciju LRP6. Postoji mogućnost da Fz i DVL mogu aktivirati Wnt signalni put neovisno o LRP6 tj. kod nekih vrsta je put dokazano aktiviran i u njegovom odsutstvu. Rekombinantni DVL može potaknuti degradaciju AXIN-a (MacDonald i sur. 2009).

Dosadašnja istraživanja pokazuju da povećana ekspresija *Dvl* gena najvjerojatnije doprinosi malignoj proliferaciji i invaziji stanica glioma (DVL proteini uključeni su u proces epitelno mezenhimalne tranzicije-EMT), te ekspresija korelira s gradusom tumora. Također je jasno uspostavljena korelacija između ekspresije *Dvl* i količine nuklearnog β-katenina. Akumulacija nuklearnog β-katenina inducira EMT aktivirajući represore E-kadherina, Snail i Slug (Li i sur. 2014). Pojačana ekspresija je detektirana u različitim tipovima karcinoma, a rak prostate, pluća, dojke i gliomi su samo neki od primjera. Pojačana ekspresija u nekim je slučajevima posredovana amplifikacijom gena *Dvl,* no postoje i primjeri delecije. Pojačana ekspresija proteina DVL3 primijećena je kod adenokarcinoma i moždanih metastaza raka pluća (Kafka i sur. 2014_2).

sFRP OBITELJ PROTEINA, sFRP3

sFRP3 pripada obitelji secreted frizzled related proteina (sFRP-a). Radi se o najvećoj skupini sekretornih topivih inhibitora Wnt signalnog puta. Pet je članova sFRP obitelji proteina kod sisavaca, pa tako i kod ljudi (1-5). Smatralo se da je njihova primarna funkcija ekstracelularna atenuacija Wnt signalnog puta, kao i u slučaju Dickkopf (Dkk) obitelji proteina, s važnom ulogom tijekom embriogeneze i onkogeneze (Galli i sur. 2006), međutim kasnija istraživanja su pokazala da je uloga ove skupine proteina mnogo kompleksnija i ovisna o kontekstu (Mii i Taira 2011). sFRP proteini su modularni proteini koji se smataju u dvije nezavisne domene (Bovolenta i sur. 2008). Nisu nađeni kod beskralješnjaka, no unatoč tome većina ih eksperimentalno inhibira Wnt-ov homolog Wingless (Wg) kod vinske mušice. Ortolozi postoje kod svih skupina kralješnjaka. Protein sFRP3 prvotno je nazvan FrzB i kao takav se često navodi u starijoj literaturi. Istraživanja homologije proteina unutar obitelji upućuju na postojanje dviju podgrupa od kojih jednu po stupnju sličnosti čine sFRP1, sFRP2 i sFRP5, a drugu sFRP3 i sFRP4, koji se od prve značajno razlikuju (Kawano i Kypta, 2003). sFRP3 i sFRP4 kodirani su sa 6 egzona koji se nalaze na kromosomu 2q31-q33, odnosno 7p14-p13 (Bovolenta i sur. 2008).

Općenito, članovi ove obitelji proteina imaju vrlo raznolik spektar biološkog djelovanja. Svi proteini iz ove obitelji imaju aminoterminalnu CDR domenu bogatu cisteinom (sličnu CDR domeni na Frizzled proteinima) i karboksiterminalnu NTR domenu (heparin-binding netrin-like dimain). CDR domena dijeli 30-50% podudarnosti u slijedu, uključujući 10 specifično očuvanih cisteinskih ostataka, s Fz proteinima. Kako se Fz proteini CDR domenom vežu za Wnt proteine, logično je bilo krenuti od pretpostavke da sFRP proteini djeluju na Wnt signalni put i da je antagonističko djelovanje sFRP-a također posredovano vezanjem za Wnt. Eksperimentalno je zapaženo da je avidnost u slučaju sFRP-a ipak značajno manja, međutim uočeno je da sFRP i Fz CDR domenom mogu stvarati homodimere i heterodimere što otvara nove mogućnosti regulacije signalnog puta (Xavier i sur. 2014). Direktna interakcija između sFRP proteina i Fz receptora svakako je zapažena. sFRP3 koji u standardnoj strukturi veže Wnt1, nije to u mogućnosti ukoliko mu se odstrani CDR domena. Karboksiterminalni dio sFRP proteina sadrži pozitivno nabijene aminokiseline raspoređene u segmente koji imaju sposobnost vezanja heparina. Na ovom kraju nalazi se i 6 cisteinskih ostataka koji tvore disulfidne mostove. Ova dva segmenta definiraju NTR modul koji postoji i kod drugih proteina poput netrina (Bovolenta i sur. 2008) (slika 4). Teoretski je logično pretpostaviti da su u tom slučaju članovi sFRP obitelji proteina u stanju inhibirati kanonski i nekanonski segment signalnog puta Wnt, što ih čini nespecifičnim inhibitorima (Kawano i Kypta, 2003). sFRP proteini također mogu djelovati antagonistički jedni na druge, unutar skupine, utjecati na usmjeravanje aksona, djelovati kao inhibitori proteinaza i stupati u interakciju s receptorima i proteinima staničnog matriksa (Bovolenta i sur. 2008).



Slika 4. Shematizirana struktura očuvanih domena i regija proteina sFRP (preuzeto iz 55.)

sFRP3 je prvotno izoliran kao hondronergični faktor iz hrskavičnog tkiva, a primijećen zbog sličnosti u slijedu koju dijeli sa Fz receptorom (Bovolenta i sur. 2008). Već su Galli i suradnici uočili da se sFRP3, koji ne atenuira signalni put Wnt, funkcionalno razlikuje od svojih srodnih proteina sFRP1 i sFRP2. Ovo bi se zapažanje moglo objasniti postojanjem

višestrukih veznih regija na samim sFRP molekulama ili ostvarivanjem veza s Wnt proteinima s različitim afinitetima ovisno o konformaciji proteina i posttranslacijskoj doradi. U svakom slučaju, obje domene su neophodne za uspješnu atenuaciju Wnt signala kako je deonstrirano na primjeru proteina sFRP1. Za ovu funkciju neophodan je specifičan tirozinski ostatak unutar CDR domene, zajedno s 19 aminokiselina domene NTR. Stehiometrijski odnosi vezanja sFRP proteina i Wnt-ova nisu ekvivalentni što sugerira sudjelovanje dodatnih molekula koje posreduju ovu interakciju *in vivo.* sFRP proteini stupaju u interakciju i s drugim proteinima koji nisu dio signalnog puta Wnt (fibronektin, Unc5H3, NF-kB, RANKL, BMP) (Bovolenta i sur. 2008).

sFRP3 je topiv protein koji lokalizira u ekstracelularnom prostoru i veže se na membranu s vanjske strane, međutim može lokalizirati u citoplazmi i intermembranskom prostoru.

Za vrijeme razvoja tumora, sFRP geni (1-5) učestalo su hipermetilirani, što uzrokuje utišavanje transkripcije. Schiefer i suradnici su 2014. godine ispitivali utjecaj 5-azacitidina, već poznatog terapeutika u liječenju nekih tipova karcinoma, na inhibiciju DNA metiltransferaze kako bi inducirali demetilaciju promotorske regije DNA ovih gena. sFRP koji djeluju kao antagonisti Wnt signalnog puta imaju ulogu tumor supresora i mogli bi se koristiti u terapeutske svrhe s ciljem ponovnog poticanja njihove ekspresije (Xavier i sur. 2014). sFRP proteini stimuliraju prijenos signala Wnt puta. Članovi sFRP obitelji proteina s antagonističkim djelovanjem na Wnt imaju potencijal potaknuti apoptozu stanica, usporiti diobu i pojačati osjetljivost stanica glioblastoma na kemoterapiju, što ih čini zanimljivim u terapeutske svrhe (Schiefer i sur. 2014). Drugi način utišavanja kod karcinoma je gubitak alela. Delecija sfrp3 na lokusu 2q31-33 česta je kod raka dojke, kolorektalnog karcinoma, neuroblastoma i raka pluća (Bovolenta i sur. 2008).

Kao kontrast, kod nekih tipova karcinoma postoji zabilježena i pojačana ekspresija *SFRP*-a. Kod tumora koji nastaju iz prekursora glija stanica detektirana je pojačana ekspresija sFRP1 i sFRP2. Iako niti jedan od proteina iz obitelji ne utječe na proliferaciju glija stanica ni osjetljivost na apototičku stimulaciju, sFRP2 potiče rast tumora kod miševa, dok za sFRP1 to nije točno (Kawano i Kypta, 2003). sFRP4 utječe na smanjenj populacije matičnih stanica glioma (GSC) i reducira ekspresiju markera za matičnost stanice (Surana i sur. 2014). Izraženost sFRP3 je reducirana u stanicama melanoma iz uzoraka i staničnih linija u odnosu na normalne stanice što je posljedica hipermetilacije *SFRP3* gena. Rekombinantan gen *SFRP3*

utišava migraciju i invaziju stanica melanoma. (Ekström i sur. 2011). U terapeutske svrhe s ciljem reaktivacije inhibitora Wnt puta iz skupine proteina sFRP do sad su bili testirani NSAID lijekovi (Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs), vitamini i Imatinib mezilat, međutim nisu se pokazali efikasni u kliničkim uvjetima. Kako su *SFRP* geni kod karcinoma često utišani hipermetilacijom, reverzija ovog događaja može poslužiti u terapeutske svrhe.

Xavier i suradnici su 2014. demonstrirali da sFRP1 ima kompleksan odgovor u sklopu regulacije signalnog puta Wnt. U mogućnosti je djelovati kao njegov pojačivač ili inhibitor ovisno o staničnom kontekstu, koncentraciji (u nižim koncentracijama stabilizira β-katenin i obrnuto) i uzorku ekspresije Fz receptora. Njegova aktivnost može se opisati kao bifazna. (Roth i sur. 2000). Ovaj izolirani primjer služi kao dobra ilustracija kompleksnosti signalizaije i raznolikosti bioloških funkcija sFRP obitelji proteina.

sFRP3 kod čovjeka i miša ima vrlo zanimljive uloge u moždanim stanicama. Regulira antidepresivni odgovor i neurogenezu u hipokampusu odraslih ljudi pod utjecajem aktivnosti (Jang i sur. 2013).

1.4. Cilj istraživanja

Poremećena ili netipična signalizacija u sklopu kaskade Wnt signalnog puta može dovesti do formiranja tumora i česta je kod anatomski i histološki različitih tipova karcinoma. Učestalost promjena u kaskadi Wnt puta varijabilna je s obzirom na lokalizaciju tumora i gradus (Giles i sur. 2003). Sudeći po trenutno dostupnoj znanstvenoj literaturi signalni put Wnt slabije je istraživan na stanicama glioblastoma u osnosu na druge tipove karcinoma, a glioblastom generalno ima slabu prognozu kod pacijenata i medijan preživljenja kraći od godinu dana uz primjenu kombiniranog tretmana. Cilj diplomskog rada je identificirati status ključnih molekula signalnog puta Wnt (sFRP3, DVL3) u stanicama ljudskog glioblastoma, odrediti stupanj njihove izraženosti i lokalizaciju unutar stanice, provjeriti postoji li poveznica statusa s kliničkim parametrima i ukazati na eventualne nove mete za razvoj ciljnih terapija.

2. Materijali i metode

Za detekciju i vizualizaciju ciljnih proteina (DVL3 i sFRP3) u tkivnim prerezima glioblastoma korištena je metoda imunohistokemije.

2.1. Preparati

Preprati tankih prereza tkiva glioblastoma uklopljenih u parafinsku smolu preuzeti su iz Zavoda za patologiju Ljudevit Jurak Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“. Ukupno 34 preparata pacijenata varijabilnog spola i dobi tretirano je imunohistokemijskim postupkom. 34 preparata obilježena su primarnim protutijelima za proteine DVL3, a 32 protutijelima za sFRP3 (2 preparata s obilježenim DVL3 korištena su za testiranje i modificiranje metode). Kao pozitivna kontrola za tkiva u kojima je bio cilj detektirati sFRP3 korišteni su preparati melanoma. Melanomi imaju konstitutivnu ekspresiju *sFrp3*. Kao negativna kontrola korišteni su preparati tkiva ljudske posteljice i tretirani PBS-om umjesto primarnim protutijelom. Kontrole za preprate u kojima je detektiran DVL3 postavljene su obrnuto. Pozitivna kontrola je tkivo ljudske posteljice koje ima konstitutivnu ekspresiju *Dvl3,* a negativna je tkivo melanoma tretirano PBS-om umjesto primarnim protutijelom.

2.2. Imunohistokemija

Imunohistokemijske analize važna su i korisna metoda u histopatologiji (Hirano i sur. 2014). Imunohistokemijske metode omogućuju lokalizaciju specifičnih antigena u tkivu pomoću ciljno usmjerenih protutijela (protutijelo prepoznaje i veže samo ciljni antigen). Metode su razvijane u dijagnostičke, prognostičke i prediktivne, te znanstveno-istraživačke svrhe kroz mogućnost detekcije staničnih markera i ekspresije gena pri analizi tkiva.

Priprema tkiva za imunohistokemijsku analizu nužno uključuje njegovu fiksaciju kako bi se očuvali antigeni. Pritom postoji i rizik od njihovog oštećivanja, te je usavršavanje metode uglavnom bilo usmjeravano tim kritičnim korakom. U procesu razotkrivanja antigena može doći do induciranih promjena na epitopu i posljedično gubitka specifičnosti upotrebljenog protutijela (cross-reactivity tj. unakrsna reakcija). Kvantifikacija ekspresije u

tkivu može biti otežana specifičnom lokalizacijom proteina u tkivu (procjena je teža ako je signal u citoplazmi) (Hirano i sur. 2014).

Prema standardnom protokolu (Pećina-Šlaus 2009) korištenom u ovom eksperimentu proces se odvija u tri koraka uz manje modifikacije pojedinačnih procesa u svrhu dobivanja jasnijeg rezultata. Modificirani koraci bit će posebno napomenuti i obrazloženi.

Tkivni prerezi prolaze procese (1) deparafinizacije, (2) ponovnog otkrivanja epitopa (eng. retrieval) i (3) bojanja (eng. staining procedure).

(1) DEPARAFINIZACIJA

Deparafinizacijom se uklanja medij u kojem je uklopljeno tkivo kako bi se zaštitilo od oštećenja. Preparati se uranjaju u staklene posude sa stalkom za predmetna stakalca i to redom u:

- ksilen 2 x 5 min
- apsolutni etanol 2 x 3 min
- 95%-tni etanol 2 x 3 min

Pri prelasku u drugačije otapalo potrebno je pažljivo ukloniti višak tekućine s predmetnog stakalca (eng. tap-off) bez da se ošteti tkivo. Deparafinizacija se završava uranjanjem preparata u destiliranu vodu u trajanju od 30 sekundi.

(2) RETRIEVAL

Kako bi se ponovno omogućio pristup epitopu u tkivu, slijedi niz iskuhavanja preparata u 6 M citratnom puferu. Citratni pufer se priprema otapanjem citratne kiseline u destiliranoj vodi (2,1 g citratne kiseline na 1 L vode) uz korekciju pH na vrijednost 6.0 (± 0.2). Za korekciju pH korišten je 2 M NaOH.

Iskuhavanje preparata odvija se u mikrovalnoj pećnici sljedećim koracima:

- zagrijavanje na 700 W do vrenja
- hlađenje otopine i preparata
- ponovni ciklus iskuhavanja i hlađenja u istim uvjetima 4 puta (zamijena pufera svaka 2 ciklusa)

▪ zagrijavanje preparata u puferu na 350 W u trajanju od 5 min

Slijedi niz ispiranja u PBS-u pripremljenom prema recepturi za 1 L 10x PBS:

▪ 80 g NaCl

▪ 2 g KCl

▪ 10,6 g Na_2HPO_4 x H_2O

▪ 2 g KH_2PO_4

▪ destilirana H_2O do 1 L

pH je potrebno dovesti na vrijednost 7,4. PBS se za ispiranje razrjeđuje na koncentraciju 1x od matične otopine. Ispiranje se vrši 2 x 2 min i 2 x kratko uranjanje.

(3) BOJANJE

Važno je da preparati niti u jednom trenutku ne ostaju suhi, stoga ih se položi na stalak s natopljenim papirom i pokriva za vrijeme produljenih inkubacija. S preparata se oprezno ukloni PBS. Tkivo se zatim tretira 3%-tnim vodikovim peroksidom (svježe pripremljenim ili stabiliziranim). Otopina se priprema miješanjem 30%-tnog H_2O_2, metilnog alkohola i destilirane vode u omjeru 3:3:1. Važno je da otopina temeljito pokrije cijelu površinu tkiva. Funkcija vodikovog peroksida je blokiranje endogenih staničnih peroksidaza. Peroksidaze nespecifično oksidiraju DAB kromogen i time daju lažno pozitivan signal. Tretman vodikovim peroksidom traje 7 min i mora se odvijati u mraku. Ovaj korak je produljen na 10 min zbog prvotne pojave nespecifičnog obojenja na negativnoj kontroli. Slijedi ispiranje 1x PBS-om 3 puta po 5 min.

Na preparatima je potrebno blokirati potencijalno nespecifično vezanje primarnog protutijela (eng. blocking background) kako bi se poboljšao omjer signala u odnosu na šum. Za blokiranje je korišten (normalan, liofiliziran) mišji serum otopljen u 1 mL sterilne vode (10%-tni serum). Otopinom se pokrije tkivo (100 µL po predmetnom stakalcu) i ostavi inkubirati 20-30 min u hladnjaku. Serum se ne ispire već se otopina samo pažljivo ukloni sa stakalca. U serumu je kasnije razrjeđivano i primarno protutijelo, te PBS za negativnu kontrolu kako bi se pojačao efekt ovog koraka.

Primarno protutijelo (anti-DVL3 ili anti-sFRP3) nakapava se na preparate u zadanoj koncentraciji, kao i na pozitivnu kontrolu, dok se negativna kontrola tretira samo PBS-om. Primarno protutijelo se razrjeđuje u otopini za blokiranje. Kako bi se postiglo razrjeđenje 1:50, 20 µL protutijela se razrjeđuje u 980 µL otopine za blokiranje za 10 preparata (100 µL otopine po preparatu). Protutijelo se može razrijediti i u PBS-u, međutim ovim postupkom se dodatno sprječava nespecifično vezanje. Inkubacija se odvija u hladnjaku na 4°C tijekom noći ili u najkraćem trajanju od 30 min. Slijedi ispiranje PBS-om 3 x 5 min.

Sekundarno protutijelo specifično se veže na primarno i na taj način se ovim korakom također umanjuje omjer šuma u odnosu na signal. Sekundarno protutijelo koje specifično veže primarno naručeno (EnVisionTM, Dako REALTM). EnVision je otopina sekundarnog protutijela visoke osjetljivosti koja osim njega sadrži i enzimatski konjugiran polimerni konstrukt koji pospješuje interakciju dviju ključnih molekula. Otopina se nakapa na prepatate i inkubira 45 min prema originalnom protokolu. Slijedi uklanjanje tekućine i ispiranje PBS-om 3 x 5 min uz potresanje posude s preparatima. Kako se na prvoj tretiranoj negativnoj kontroli ipak pojavio signal, prvi logičan korak u sprječavanju ovog nesprecifično vezanog signala bio je skraćivanje vremena inkubacije sekundarnog protutijela i produljenje vremena ispiranja. Stoga je vrijeme inkubacije sekundarnog protutijela skraćeno na 15-20 min, a vrijeme ispiranja produljeno na 4 x 7 min s potresanjem, uz poboljšanje rezultata.

Preparati se zatim tretiraju kromogenom DAB (3,3′-diaminobenzidine). DAB je organski spoj, derivat benzena, koji ima široku primjenu u bojanju nukleinskih kiselina i proteina, iako se najčešće koristi u imunohistokemiji. Daje smeđe obojenje. U neoksidiranom stanju je topiv u vodi dok oksidiran čini precipitate. Oni ne predstavljaju smetnju u postupku bojanja. DAB je kancerogena supstanca stoga zahtijeva oprezno rukovanje. Kromogena otopina se priprema iz supstratnog pufera i DAB-a proizvođača Dako u omjeru 100:2 u količini primjerenoj broju preparata (100 µL po predmetnom stakalcu se pokazalo dovoljnom količinom), jer se mora koristiti odmah po pripremi. Bočicu s kromogenom prije upotrebe je potrebno dobro protresti. Predviđena inkubacija je 30 sekundi po preparatu, međutim reakcija je vrlo nagla i dobro ju je prekinuti čim obojenje postane jasno vidljivo kako se ne bi potenciralo nespecifično bojanje. Stoga je u odnosu na originalan protokol ovaj korak također skraćen na 10 sekundi. Kako se preparate tretira zasebno, potrebno je biti precizan u trenutku prekidanja reakcije, jer u kratkom vremenu mogu nastati razlike u jačini signala. Preparate je za vrijeme bojanja dobro držati na bijeloj podlozi radi lakšeg i preciznijeg praćenja reakcije.

Reakcija se prekida uranjanjem preparata u čašu s destiliranom vodom i naknadnim ispiranjem 3 x 10 minuta.

Kako bi se olakšala vizualna detekcija detalja na tkivnim preparatima koristi se boja koja kontrastira signalu i pokriva ostale stanične strukture. U ovom je eksperimentu korišten hematoxylin koji nukleusu i citoplazmi daje plavo obojenje, s tim da nukleus boja intenzivnije. Ovim je postupkom olakšana i distinkcija pojedinačnih stanica pri brojanju u tkivnom prerezu. Hematoxylin je prirodna boja ekstrahirana iz kore kampehovog drveta. Spoj je bazičan stoga se veže s negativno nabijenom okosnicom DNA. Preparate se hematoxylinom inkubira ovisno o početnoj koncentraciji boje. Svi su preparati bili tretirani 2 min uz pretpostavku da se tijekom izvođenja eksperimenta koncentracija boje nije značajno promijenila. Boju je potrebno ispirati tekućom vodom 10 min. Preparati se pažljivo otresu/obrišu od viška vode. Na svaki preparat se doda kapljica viskozne otopine glicerola i PBS-a u omjeru 1:1 (približno 60 µL ili ovisno o veličini pokrovnog stakalca). Pokrovnice je potrebno postaviti bez zadržavanja mjehurića zraka u tkivnom prerezu. Rubovi pokrovnice zalijepe se lakom kako bi se spriječilo hlapljenje sadržaja i na taj način osigurala trajnost preparata. S obzirom na korištene boje, preparate je moguće analizirati pod svjetlosnim mikroskopom.

Nakon inicijalne pojave pozadinskog obojenja na negativnoj kontroli, standardnom protokolu je produženo tretiranje vodikovim peroksidom, skraćena inkubacija sekundarnim protutijelom i DAB kromogenom, te produženo ispiranje nakon bojanja.

2.3. Protutijela

Protutijela su proteini iz skupine imunoglobulina (Ig) i ključni su segment imunohistokemijske analize tkiva. Monoklonska protutijela specifično prepoznaju i vežu samo jedan tip epitopa. U ovom su eksperimentu korištena protutijela naručena od proizvođača Santa Cruz Biotechnology. Dvl-3 (G-7) je anti-DVL3 monoklonsko mišje protutijelo iz skupine Ig G_1. Usmjereno je prema aminokiselinama 606-665 koje se nalaze blizu C-terminusa ljudskog proteina DVL3. Molekularne je težine 90 kDa. Od proizvođača dolazi u originalnoj koncentraciji od 200 µg/mL, tj. sadrži 200 µg protutijela otopljenog u 1.0 mL PBS-a uz pomoćne tvari (<0.1 %). Uputa za korištenje za tkivne prereze u parafinu nalaže razrjeđenje u rasponu 1:50-1:500. U eksperimentu je korišteno razrjeđenje 1:50.

Anti-sFRP3 protutijelo – FRP-3 (H-170) naručeno je od istog proizvođača. To je mišje poliklonsko protutijelo usmjereno prema aminokiselinama 156-325 ljudskog proteina sFRP3, molekularne težine 36 kDa. Isporučuje se u identičnoj koncentraciji kao i prethodno opisano protutijelo, te s istim naputkom za razrjeđenje. U eksperimentu je korišteno razrjeđenje 1:50. Protutijela je potrebno čuvati u frižideru na 4°C.

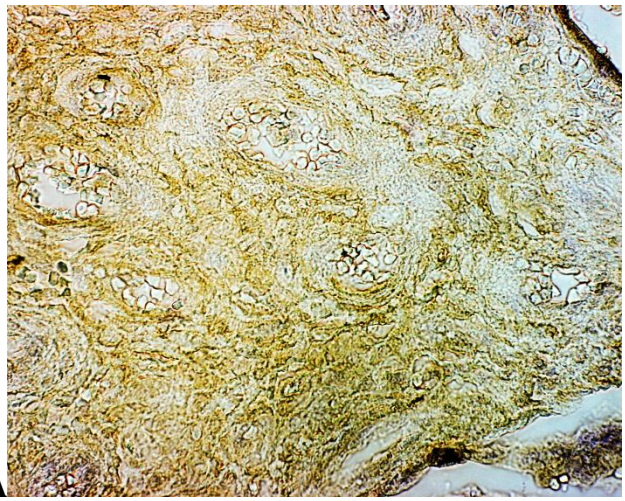
3. Rezultati

3.1. Analiza preparata

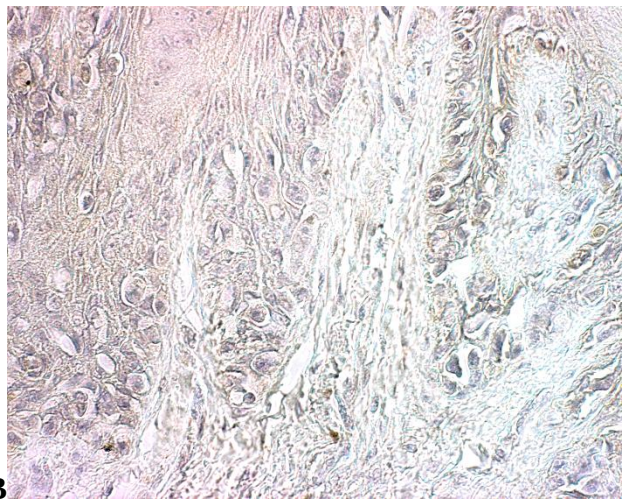
Obojeni preparati pregledani su svjetlosnim mikroskopom. Ciljni proteini daju signal smeđeg obojenja (DAB kromogen), a jezgre su hematoxylinom obojene plavo kako bi se olakšala detekcija pojedinačnih stanica. Preparati su prvotno pregledani na manjem povećanju (20x) kako bi se ustanovio opći dojam jačine signala u tkivu, detektirala moguća oštećenja i odabrao dio preparata najpogodniji za analizu tj. brojanje stanica. Na preparatima s izričito nejednolikim obojenjem dijelova tkiva odabran je dio sa signalom ukoliko postoji, a neobojeni dijelovi pripisani su pogrešci u postupku ili heterogenosti tkiva. Općenito je u diferencijalno obojenim preparatima fokus prebačen na jače obojene dijelove tkiva (engl. signal hot-spot). Na svakom su preparatu ustanovljena najmanje 3 vidna polja pogodna za analizu na povećanju 40x, te digitalno fotografirana (Olympus BH-2 microscope). Set preparata uspoređivan je sa signalima pripadajućih pozitivnih i negativnih kontrola (slika 5, slika 6), te je na pojedinom preparatu brojano po 200 stanica u 3 kategorije jačine signala (0/+, ++, +++), što redom odgovara izostanku ili slabom signalu, srednjoj jačini signala i jakom signalu u odnosu na pozitivnu kontrolu koja služi kao referenca maksimalne jačine signala. Kroz analizu je naznačena i lokalizacija signala unutar stanice s: C- lokalizacija u citoplazmi, N– lokalizacija u nukleusu, E– ekstracelularna lokalizacija, C+N– lokalizacija u oba kompartimenta, C+E+N- lokalizacija u sva tri kompartimenta. Komentarom su naznačeni netipični rezultati analize, detaljnije informacije o lokalizaciji signala i eventualna nemogućnost iščitavanja signala. Preparati s oštećenjima na tkivu nisu izbačeni iz analize ukoliko je bilo moguće detektirati dovoljan broj intaktnih stanica za analizu (200). Šifrirane uzorke su pregledala 3 nezavisna promatrača bez prethodno dostupnih kliničkih informacija.

Fotografije, snimljene u JPEG formatu, su prije analize korigirane po svjetlostnoj osnovi balansa bijele boje kako bi se minimalizirala mogućnost pogrešne interpretacije nijanse signala na preparatu, te kako bi se olakšala komparacija s pozitivnom i negativnom kontrolom. Intenzitet svjetla pri snimanju održavan je na konstantnoj razini.

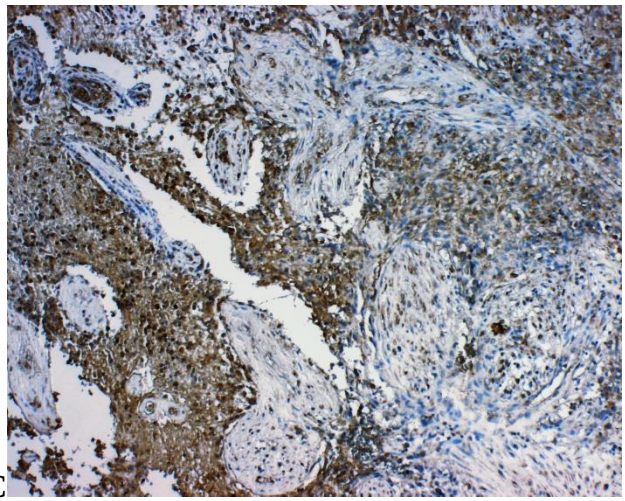
A



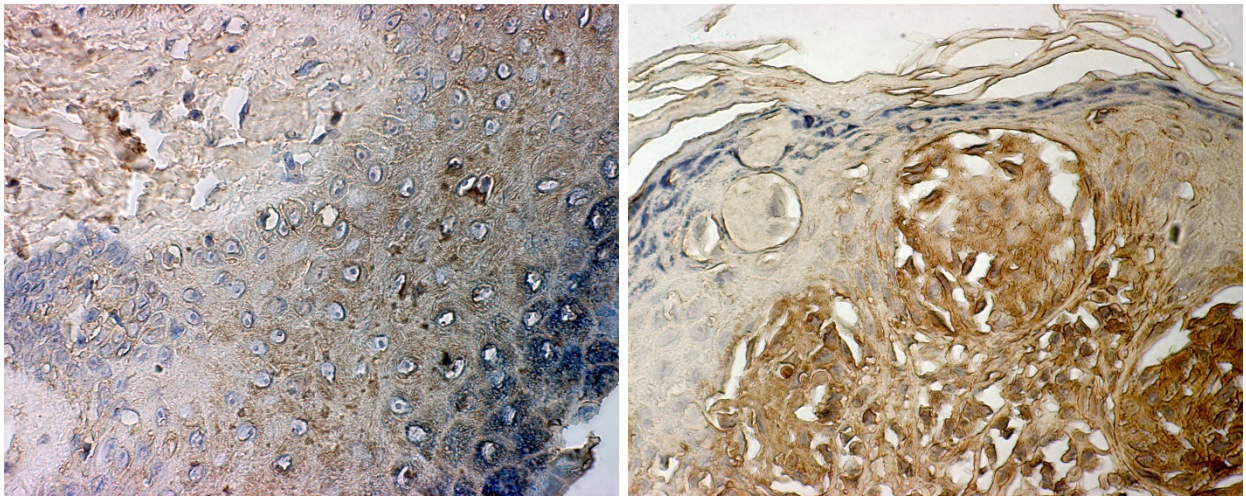
B



C

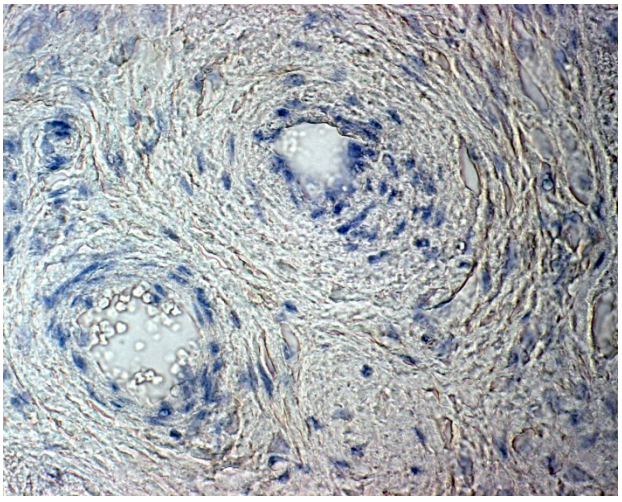


Slika 5. Fotografije uzoraka s obilježenim proteinom DVL3 pri povećanju 40x; A-pozitivna kontrola (tkivo ljudske posteljice), B-negativna kontrola (tkivo melanoma), C-uzorak glioblastoma DVL3_2760_05

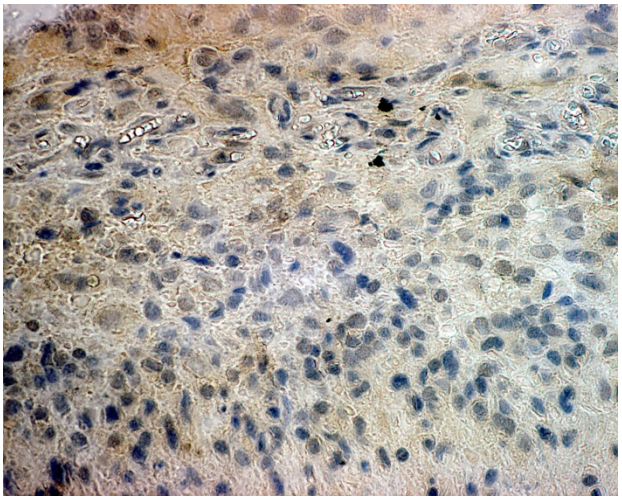


A1/A2

B



C



Slika 6. Fotografije uzoraka s obilježenim proteinom sFRP3 pri povećanju 40x; A1/A2-pozitivne kontrole (tkivo melanoma), B-negativna kontrola (tkivo ljudske posteljice), C-uzorak glioblastoma sFRP3_7587_01

Rezultati našeg istraživanja pokazali su prisutnost oba proteina u uzorcima glioblastoma čovjeka (s iznimkom uzorka DVL3_89_04 u kojem nije detektiran signal, uz valjane kontrole)(tablica 2, tablica 3). Opazili smo da najveći broj uzoraka pokazuje srednju jačinu signala na primjeru oba ciljna proteina, uz visoku podudarnost u postotku stanica koje odgovaraju ovoj jačini signala. Izraženost sFRP3 bila je slabija od izraženosti DVL3 u kategoriji slabog ili izostalog signala, a jača u kategoriji jakog signala (tablica 4, slika 7). Podudarnost u svim kategorijama jačine signala sugerira moguću korelaciju između ekspresije ova dva proteina.

Tablica 2. Analiza ekspresije proteina DVL3 i klinički parametri

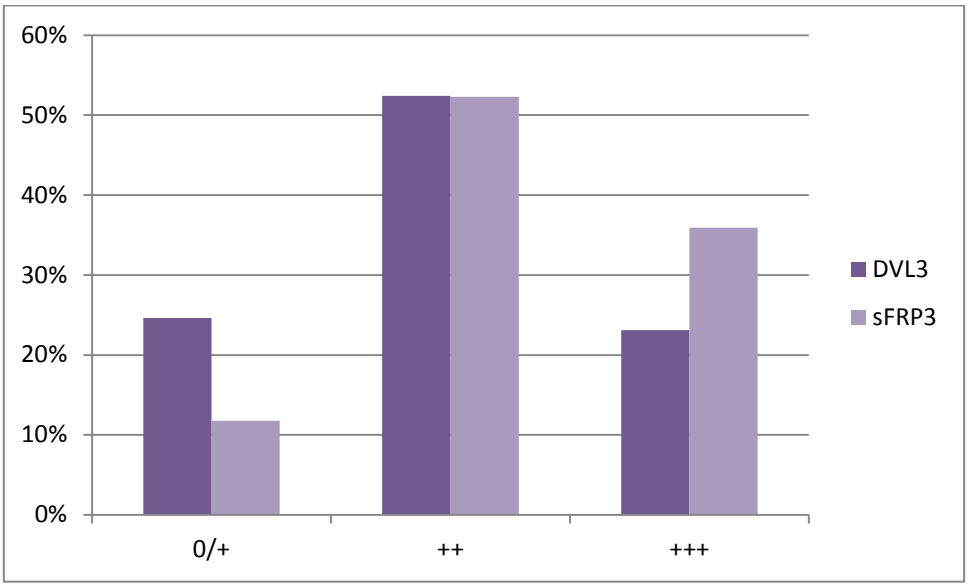
Preparat	Ekspresija proteina						
br	**0/+**	**++**	**+++**	**Dob**	**Spol**	**Komentar**	**Lokalizacija**
1	18,5%	42,5%	39,0%	61	M	signal izraženiji uz staničnu membranu, vrlo malo signala u jezgri	C+N
2	94,0%	6,0%	0,0%	34	F	izrazito slab signal u citoplazmi	C
3	100,0%	0,0%	0,0%	68	M	signal potpuno izostaje	/
4	19,5%	50,0%	30,5%	54	F	izrazito jak signal u jezgri	C+N
5	6,5%	84,5%	9,0%	77	M	signal difuzno raspoređen u citoplazmi	C
6	9,5%	65,0%	25,5%	62	F	u pojedinim stanicama signal je jači uz staničnu membranu	C
7	22,5%	50,5%	27,0%	37	F	signal difuzno u citoplazmi, u pojedinačnim st.i u jezgri te jači uz staničnu membranu	C+N
8	16,5%	70,5%	13,0%	60	M	vrlo malo signala u jezgri	C+N
9	2,5%	71,0%	26,5%	72	M	u pojedinim stanicama signal je jači uz staničnu membranu	C
10	16,0%	78,0%	6,0%	70	F	signal izraženiji uz staničnu membranu	C+N
11	9,5%	20,5%	70,0%	71	M	vrlo jak signal u cijelom tkivnom preparatu, signal učestalo prisutan u jezgri	C+N
12	29,5%	44,5%	26,0%	70	M	signal difuzno raspoređen u citoplazmi	C
13	11,0%	49,0%	40,0%	55	M	signal difuzno u citoplazmi, u pojedinačnim st.i u jezgri te jači uz staničnu membranu	C+N
14	0,0%	80,0%	20,0%	31	M	signal difuzno raspoređen u citoplazmi	C
15	3,5%	16,5%	80,0%	56	F	vrlo jak signal u cijelom tkivnom preparatu, signal učestalo prisutan u jezgri	C+N
16	14,0%	61,5%	24,5%	74	F	u pojedinim stanicama signal je jači uz staničnu membranu	C
17	18,5%	78,0%	3,5%	56	F	signal izraženiji uz staničnu membranu	C
18	6,0%	74,5%	19,5%	53	F	signal izraženiji uz staničnu membranu	C
19	5,0%	63,0%	32,0%	36	M	signal difuzno u citoplazmi, u pojedinačnim st.i u jezgri te jači uz staničnu membranu	C+N
20	7,5%	74,0%	18,5%	38	M	u pojedinim stanicama signal je jači uz staničnu membranu	C
21	19,0%	57,0%	24,0%	62	F	signal difuzno kroz citoplazmu i nešto jači uz membranu, učestalo prisutan u jezgri	C+N
22	63,5%	36,5%	0,0%	68	F	signal difuzno raspoređen u citoplazmi	C
23	61,0%	39,0%	0,0%	67	M	tkivo djeluje oštećeno, u analizu su uključene samo neoštećene stanice	C
24	22,0%	56,5%	21,5%	59	F	signal difuzno kroz citoplazmu i nešto jači uz membranu	C
25	19,5%	68,0%	12,5%	20	F	signal izraženiji uz staničnu membranu, vrlo malo signala u jezgri	C+N
26	85,5%	14,5%	0,0%	72	M	signal difuzno kroz citoplazmu i nešto jači uz membranu	C
27	77,0%	23,0%	0,0%	31	M	tkivo djeluje oštećeno, u analizu su uključene samo neoštećene stanice	C
28	33,0%	67,0%	0,0%	54	M	signal izrazito lokaliziran uz staničnu membranu	C
29	3,5%	17,5%	79,0%	70	M	izrazito jak signal u jezgri	C+N
30	20,0%	47,0%	33,0%	31	M	signal izraženiji uz staničnu membranu, vrlo malo signala u jezgri	C+N
31	4,0%	96,0%	0,0%	54	M	signal difuzno raspoređen u citoplazmi	C
32	10,5%	86,0%	3,5%	59	F	signal difuzno kroz citoplazmu i nešto jači uz membranu	C
33	1,5%	36,5%	62,0%	75	F	vrlo jak signal u cijelom tkivnom preparatu, signal učestalo prisutan u jezgri	C+N
34	2,0%	58,5%	39,5%	60	F	signal difuzno u citoplazmi, u pojedinačnim st.i u jezgri te jači uz staničnu membranu	C+N
Prosječno	**25,9%**	**52,7%**	**21,4%**	**55,7**			

Tablica 3. Analiza ekspresije proteina sFRP3 i klinički parametri

Preparat	Ekspresija proteina						
br	**0/+**	**++**	**+++**	**Dob**	**Spol**	**Komentar**	**Lokalizacija**
1	69,5%	30,5%	0,0%	61	M	slab signal, ali na sve tri lokalizacije	C+E+N
2	16,5%	44,0%	39,5%	34	F	signal difuzno u C i jače E, djelomično obojeni N	C+E+N
3	32,5%	67,5%	0,0%	68	M	signal difuzno u C i jače E	C+E
4	2,5%	63,0%	34,5%	54	F	signal difuzno u C i jače E	C+E
5	0,0%	56,0%	44,0%	77	M	dio tkiva bez signala, jače E, perinuklearno i C	C+E
6	7,5%	55,0%	37,5%	62	F	signal difuzno u C i jače E, djelomično obojeni N	C+E+N
7	11,0%	52,5%	36,5%	37	F	signal difuzno u C i jače E, djelomično obojeni N	C+E+N
8	0,0%	34,0%	66,0%	60	M	signal difuzno u C i jače E, djelomično obojeni N	C+E+N
9	0,0%	24,5%	75,5%	72	M	dio tkiva bez signala, jače E, perinuklearno i C	C+E
10	22,0%	75,0%	3,0%	70	F	signal slab u C, jači E	E
11	0,0%	40,5%	59,5%	71	M	signal difuzno u C i jače E	C+E
12	8,0%	73,0%	19,0%	70	M	signal difuzno u C i jače E, djelomično obojeni N	C+E+N
13	0,0%	43,0%	57,0%	55	M	signal difuzno u C i jače E	C+E
14	17,0%	29,5%	53,5%	31	M	jak signal difuzno u C i E	C+E
15	4,0%	58,0%	38,0%	56	F	jak signal difuzno u C i E	C+E
16	0,0%	3,5%	96,5%	74	F	jak signal difuzno u C i E	C+E
17	9,0%	71,5%	19,5%	56	F	signal difuzno u C i jače E	C+E
18	6,5%	56,5%	37,0%	53	F	signal difuzno u C i jače E, djelomično obojeni N	C+E+N
19	8,5%	68,0%	23,5%	36	M	signal difuzno u C i jače E, djelomično obojeni N	C+E+N
20	0,0%	15,5%	84,5%	38	M	signal difuzno u C i jače E, djelomično obojeni N	C+E+N
21	4,5%	58,0%	37,5%	62	F	signal difuzno u C i jače E	C+E
22	0,0%	36,5%	63,5%	68	F	signal difuzno u C i jače E, djelomično obojeni N	C+E+N
23	0,0%	96,5%	3,5%	67	M	signal difuzno u C i jače E, djelomično obojeni N	C+E+N
24	14,0%	37,5%	48,5%	59	F	signal difuzno u C i jače E, djelomično obojeni N	C+E+N
25	73,5%	26,5%	0,0%	20	F	signal samo E	E
26	0,0%	78,0%	22,0%	72	M	signal difuzno u C i jače E, djelomično obojeni N	C+E+N
27	18,5%	39,5%	42,0%	42	F	signal difuzno u C i jače E, dio bez signala	C+E
28	6,0%	78,0%	16,0%	56	M	signal difuzno u C i jače E, djelomično obojeni N	C+E+N
29	10,5%	35,5%	54,0%	70	M	jak signal difuzno u C i E	C+E
30	0,0%	74,0%	26,0%	31	M	signal difuzno u C i jače E, djelomično obojeni N	C+E+N
31	19,5%	73,5%	7,0%	54	M	signal difuzno u C i jače E, djelomično obojeni N	C+E+N
32	15,5%	79,0%	5,5%	59	F	tkivo djeluje oštećeno ili loše deparafinizirano	C+E
Prosječno	**11,8%**	**52,3%**	**35,9%**	**56,1**			

Tablica 4. Udjeli stanica prema jačini signala za DVL3 i sFRP3

Jačina signala	0/+	++	+++
Udio stanica (DVL3):	**22,0%**	**52,7%**	**25,3%**
Udio stanica (sFRP3):	**22,7%**	**54,6%**	**22,7%**



Slika 7. Grafička komparacija udjela stanica prema jačini signala za DVL3 i sFRP3

Protein DVL3 lokalizira uglavnom u citoplazmi u 97% uzoraka s tim da je kod gotovo polovice uzoraka istovremeno nađen i u jezgri tj. u 44% uzoraka, te relativno često pokazuje jači intenzitet uz staničnu membranu, točnije u 56% uzoraka. Niti jedan uzorak nema signal isključivo u nukleusu (tablica 2).

Protein sFRP3 lokalizira u ekstracelularnom prostoru u 100% uzoraka jer je sekretorni protein. Jačinu signala je teže procijeniti s obzirom na raspodjelu u vrlo tankom sloju tkivnog preparata. sFRP3 je također pokazuje signal u citplazmi u 94% uzoraka i jezgri u 50% uzoraka (tablica 3).

3.2. Korelacija signala s kliničkim parametrima

Za daljnju analizu korelacija s obzirom na podatke dostupne o pacijentima, prema preporuci Li i suradnika iz 2014., te Hirano i suradnika iz 2014., korišteno je bodovanje IRS (IRS, eng. immunoreactivity score). IRS se pokazao kao faktor koji najbolje korelira s računalnom analizom fotografija uzoraka kroz mjerenje optičke gustoće (OD). Kako je mjerenje optičke gustoće kvantitavna metoda preciznija od procjene ljudskog oka (semikvantitativna metoda), odabirom ovog koeficijenta umanjujemo pogrešku pri očitavanju rezultata. IRS se izračunava množenjem postotka stanica s pozitivnim signalom u uzorku (PP score) u 4 kategorije s intenzitetom signala (SI score) u 3 kategorije, kao i ranije:

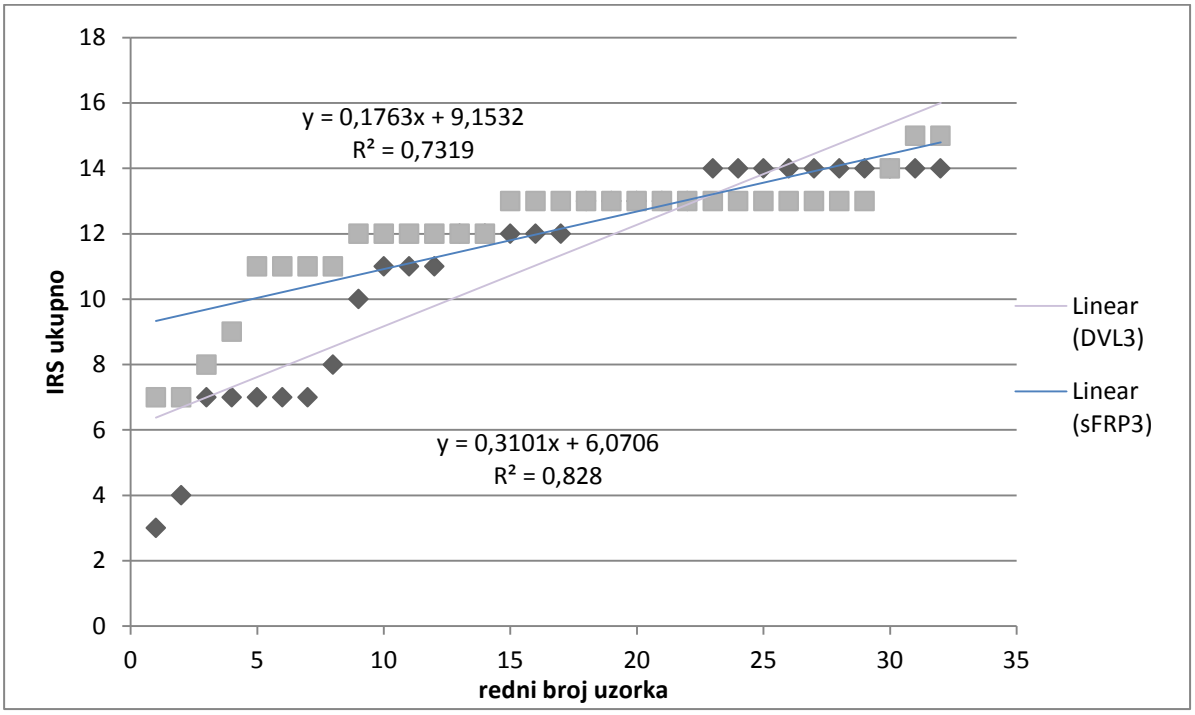
(PP) klasifikacija po postotku stanica s pozitivnim signalom (<1%= 0 bodova;1-10%= 1 bod; 10-50%= 2 boda; 50% i više= 3 boda)

(SI) klasifikacija po gustoći signala u obojenim stanicama (0/+ = 1 bod; ++ = 2 boda; +++ = 3 boda)

(IRS) klasifikacija bazirana na kombinaciji informacija (PP) i (SI), umnožak PP x SI = IRS (tj. količina obojenja)

IRS se stoga kreće u rasponu vrijednosti od 0-9. IRS za preparat (IRS ukupno) je zbroj pojedinačnih IRS vrijednosti po jačini signala i aproksimira ukupnu količinu signala na preparatu i kreće se u rasponu 0-15.

Analizirana je korelacija između ukupne količine signala po uzorku za oba proteina (slika 8).

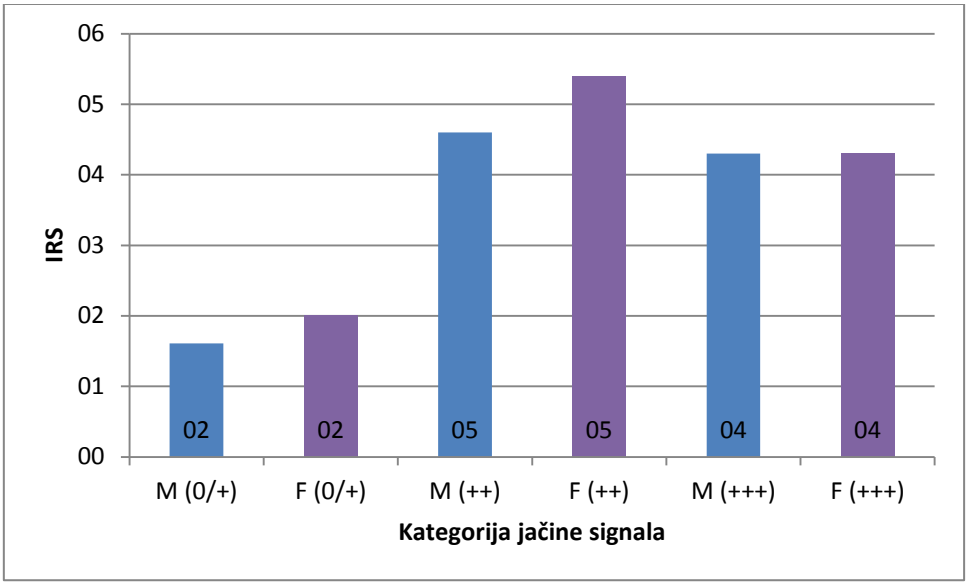


Slika 8. Grafički prikaz ukupne količine signala po uzorku za DVL3 i sFRP3

Da bi se ustanovila eventualna korelacija između ekspresije proteina DVL3 i sFRP3 na ovom je uzorku učinjen Pearsonov korelacijski test i t-student test.

Pearsonov koeficijent daje vrijednost r = 0,3111, a vrijednost t = 0,191 što odgovara p vrijednost 0,40>p>0,25. Na temelju ovih rezultata možemo reću da ne postoji statistički značajna korelacija između ekspresije proteina DVL3 i sFRP3 u glioblastomu.

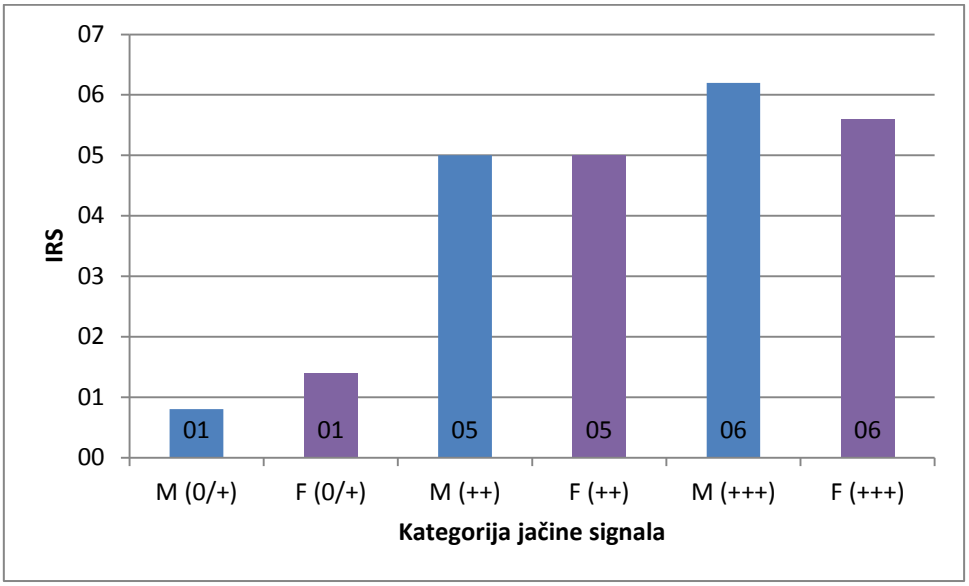
Analiziran je odnos IRS prema spolu pacijenta u 3 stupnja jačine signala za DVL3 na 18 pacijenata muškog spola i 14 pacijenata ženskog spola (slika 9).



Slika 9. Grafička komparacija udjela stanica prema jačini signala razdvojena po spolu za DVL3

Nije uočena značajna razlika u ekspresiji proteina DVL3 s obzirom na spol pacijenta.

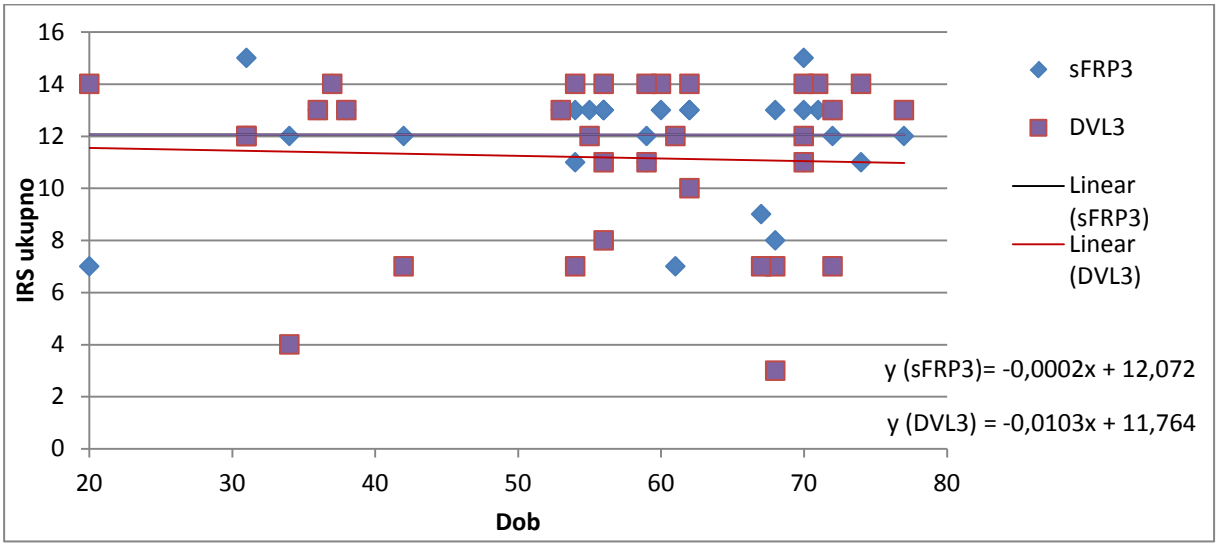
Analiziran je odnos IRS prema spolu pacijenta u 3 stupnja jačine signala za sFRP3 na 17 pacijenata muškog spola i 15 pacijenata ženskog spola (slika 10).



Slika 10. Grafička komparacija udjela stanica prema jačini signala razdvojena po spolu za sFRP3

Nije uočena značajna razlika u ekspresiji proteina sFRP3 s obzirom na spol pacijenta. Oba proteina demonstriraju ujednačenu ekspresiju u stanicama glioblastoma oba spola.

Analizirana je korelacija dobi pacijenata s ukupnom jačinom signala na preparatu za oba obilježena proteina (slika 11).



Slika 11. Grafička komparacija dobi i ukupne ekpresije proteina DVL3 i sFRP3 kod pacijenata oboljelih od glioblastoma

Nije detektirana korelacija između dobi i razine ekspresije ovih proteina u stanicama glioblastoma.

3.3. Distribucija signala s obzirom na subcelularnu lokalizaciju

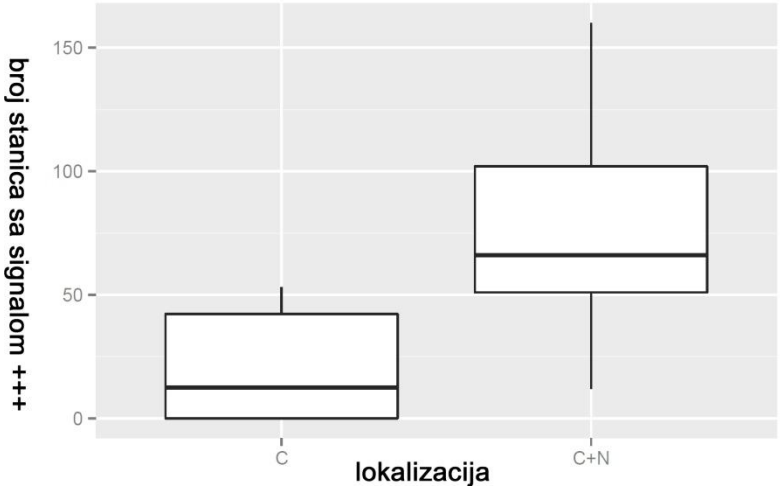
Eksperimentom dobiveni podaci naoko su sugerirali da postoji poveznica između peparata s izrazito velikim udjelom stanica s jakim signalom i pojave signala na specifičnoj subcelularnoj lokalizaciji. Za analizu distribucije signala korišten je Mann-Whitney U test poznat i pod nazivom Wilcoxon rank-sum test (WRS). To je neparametarski test null hipoteze da dvije skupine uzoraka dolaze iz iste populacije, suprotno alternativnoj hipotezi. U tom slučaju određena populacija poprima veće vrijednosti od druge. U suštini, ovaj test je dokaz distribucije koja je suprotna normalnoj distribuciji. Testirana je suma Wilcox-ovog ranga s korekcijom za kontinuitet. U slučaju testiranja za DVL3, zanimalo nas je imaju li preparati s najvećim udjelom stanica s jakim signalom (+++) ujedno lokalizaciju signala u citoplazmi i nukleusu (C+N), i obrnuto, imaju li preparati s većim udjelom stanica slabog i srednje jakog

signala (0/+ i ++) lokalizaciju isključivo u citoplazmi (C). Null hipoteza je u ovom slučaju da broj stanica s jakim signalom dolazi iz iste populacije/distribucije kao stanice C+N i C.

Korištena je varijanta testa koja specifično ispituje da li je C+N veći od C. Alternativna hipoteza je da C+N i C dolaze iz različitih populacija/distribucija.

Rezultati testa daju Wilcox-ov rank W= 241 i p-vrijednost= 6.33×10^{-5} (slika 12).

Test ukazuje da je vjerojatnost da distribucija jakog signala iz populacije C+N nije veća od iste iz populacije C izričito mala, tj. 6.33×10^{-5}. Iz ovih rezultata možemo zaključiti da će preparati s visokim udjelom stanica jakog signala gotovo sigurno imati lokalizaciju signala u nukleusu kao i u citoplazmi, te da će preparati slabijeg signala imati lokalizaciju ograničenu na citoplazmu. Pojačana ekspresija proteina DVL3 u glioblastomu potencijalno dovodi do češće translokacije ovog proteina u nukleus.

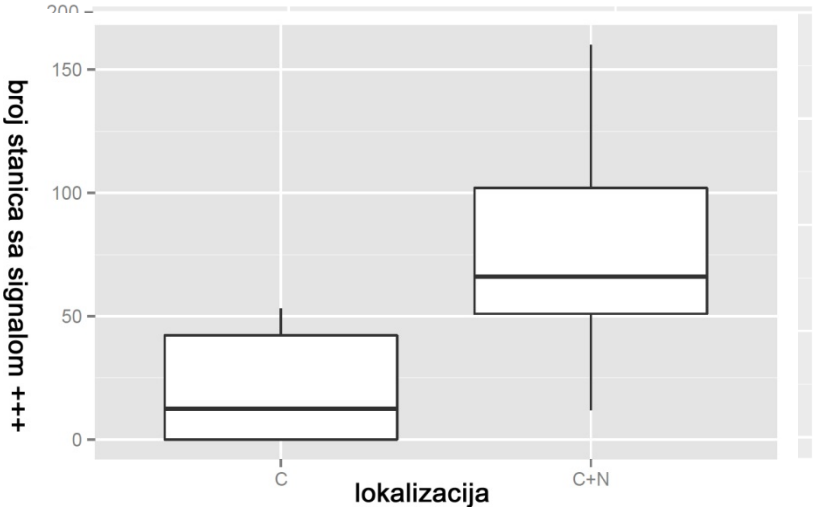


Slika 12. Dijagram distribucije stanica s jakim signalom u populacijama C i C+N; horizontalna linija je medijan

U slučaju testiranja za sFRP3, prvotno nas je zanimalo imaju li preparati s najvećim udjelom stanica s jakim signalom (+++) ujedno lokalizaciju signala u citoplazmi i ekstracelularno (C+E), i obrnuto, imaju li preparati s većim udjelom stanica slabog i srednje jakog signala (0/+ i ++) simultanu lokalizaciju u sva tri kompartimenta (C+E+N). Null hipoteza je u ovom slučaju da broj stanica s jakim signalom dolazi iz iste populacije/distribucije kao stanice C+E+N i C+E.

Rezultati testa daju Wilcox-ov rank W= 144 i p-vrijednost= 0,1903 (slika 13).

Ovi rezultati ukazuju da nema značajne razlike u distribuciji najzastupljenije jačine signala s obzirom na kombinaciju lokalizacija, tj. da stanicama sa zastupljenim jakim signalom ne izostaje lokalizacija u nukleusu.



Slika 13. Dijagram distribucije stanica s jakim signalom u populacijama C+E+N i C+E; horizontalna linija je medijan, točka predstavlja outlier

4. Rasprava

Pri kvantifikaciji signala postoje pouzdanije metode od procjene ljudskog oka (mjerenje optičke gustoće nakon odbojavanja), međutim rezultati postaju jako pouzdani kad vizualnu procjenu nezavisno radi nekoliko stručnjaka s visokom korelacijom s najpouzdanijom metodom. Kako i mjerenje optičke gustoće ima svoje nedostatke i situacije u kojima pouzdanost pada, procjena ljudskog oka i dalje može biti kvalitetan i pouzdan mjerni instrument, a podaci se definiraju kao semikvantitativni (Hirano i sur. 2014). U ovom je istraživanju za uspostavljanje korelacijskih odnosa korišten IRS faktor koji olakšava manipulaciju podacima i pokazuje visoku korelaciju s kvantitativnim metodama.

Iako se u literaturi često navodi da su *SFRP* geni u stanicama karcinoma utišani hipermetilacijom promotorske regije (kao što su to na stanicama hepatocelularnog karcinoma demonstrirali Lin i suradnici 2014), naši uzorci su pokazali ekspresiju oba proteina u stanicama uz varijacije u tkivnoj i subcelularnoj lokalizaciji. Izostanak signala u uzorku DVL3_89_04 mogao bi se pripisati pogrešci pri izvođenju metode (npr. izostanak nanošenja primarnog protutijela), ali postoji i teoretska mogućnost da je došlo do delecije samog gena koji kodira za protein ili do mutacije u regiji s kojom protutijelo stupa u interakciju, što uz nestabilnost genoma stanica karcinoma zaista nije nemoguće. Nedosljednost u lokalizaciji signala svakako bi se mogla pripisati heterogenosti malignog tkiva, kao i činjenici da oba istraživana proteina u stanici vrše višestruke funkcije i stupaju u interakciju s više desetaka proteina. Lokalizacije detektirane u stanicama glioblastoma u skladu su s dosadašnjim nalazima istih proteina u srodnim tkivima ili drugim tipovima karcinoma (Partl i sur. 2014).

Ekspresija istraživanih proteina u stanicama ne korelira što je očekivano s obzirom na njihove različite funkcije, lokalizacije, djelovanje na signalni put i mjesto koje zauzimaju u signalnoj kaskadi. Ekspresija svakog proteina zasebno ne korelira sa starošću pacijenta. Iako bi se određeni stupanj korelacije mogao očekivati s obrizom na akumilaciju staničnih oštećenja koja su dio normalnog procesa starenja, ne smijemo zaboraviti da glioblastom nema do sad dokazanu genetičku osnovu, već se pojavljuje sporadično. Prosječna dob pacijenta je 56,1 godina stoga populacija uzorka nema ravnomjerno zastupljene dobne skupine. Izostanak korelacije ekspresije svakog proteina pojedinačno s obzirom na spol pacijenta također je očekivana jer istraživani proteini ne vrše nikakvu spolno-specifičnu funkciju niti postoje

indikacije da na nastanak glioblastoma utječu spolni hormoni, iako je pojavnost glioblastoma nešto veća kod muškaraca (Thakkar i sur. 2014). Zanimljivo je da pretežno jaki signal u stanicama obilježenim s DVL3 ujedno znači i pojavu signala u nukleusu. Proteini DVL, kao što je prethodno navedeno, imaju signalizacijske signale za transport u i izvan nukleusa, a u samom nukleusu imaju funkciju transkripcijskog faktora. Moguće je da kad koncentracije citoplazmatske zalihe ovog proteina dosegnu graničnu vrijednost za potrebe odvijanja funkcija signalnih puteva, slobodni „višak“ proteina postaje dostupan za translokaciju. Pojačana ekspresija DVL3 mogla bi za posljedicu imati jačanje njegove transkripcijske uloge i posljedično još jaču aktivnost Wnt signalnog puta, no ovu bi hipotezu trebalo provjeriti. Zanimljivo je kako ova distribucija signala odgovara antagonističkom utjecaju proteina DVL3 na Wnt signalni put u citoplazmi i nukleusu. U citoplazmi on ima ulogu tumor supresora i pospješuje degradaciju β-katenina, dok u nukleusu pospješuje transkripciju TCF/β-katenin ciljnih gena. Lokalizacija proteina DVL3 u jezgri mogla bi imati lošiju prognozu progresije bolesti. Suprotno opisanoj situaciji, različite jačine signala za sFRP3 distribuirane su vrlo ujednačeno u za taj protein tipičnim kompartimentima.

Problematika klasičnog pritupa liječenja glioblastoma mogla bi se u grubo opisati kroz:

(1) postojanje uskog „prozora“ operabilnosti zbog rizika oštećenja funkcionalnih dijelova moždanog tkiva.

Zbog toga se kirurški zahvati češće koriste u palijativne nego u kurativne svrhe.

(2) postojanje krvno-moždane barijere koja otežava dopremanje ciljne molekule terapeutske svrhe do samih stanica glioblastoma.

U shvaćanju razvoja glioblastoma važno je u obzir uzeti širu sliku stanja. Iako su vrlo heterogenog porijekla i histopatološke slike, većina ih ima poremećena 4 signalna puta, simultano, zasebno ili kombinirano. Osim opisan Wnt signalnog puta, aktiviran je EGFR (engl. Epidermal growth factor receptor) signalni put, PI3K/Akt signalni put, te deaktiviran p53/Rb signalni put (Indranil i sur. 2013).

S ciljem blokiranja Wnt signalnog puta u stanicama raka, prva najlogičnija meta bila bi blokiranje kompleksa TCF-a i β-katenina, jer je nizvoda karika puta i ujedno među ključnima za konačni ishod: Nažalost, ova se ciljna molekula pokazala kao neuhvatljiva meta, vjerojatno zbog velike vezne površine koju je teško obustaviti kemijskim agensima s obzirom na

zahtjeve specifičnosti i efikasnosti. Trenutno najveću specifičnost postižu specifični niskomolekularni inhibitori koji blokiraju enzim koji promiče acilaciju proteina Wnt signalnog puta, naziva Porc (Clevers i Nusse 2012).

Mnogi su primjeri karcinoma koji unatoč izostanku mutacija u kaskadi Wnt signalnog puta posjeduju autokrinu Wnt signalizaciju za proliferaciju i preživljenje stanica. Osim konstitutivne Wnt signalizacije, epigenetički utišavaju ekspresiju sekretornih Wnt antagonista, tako da je aktivnost Wnt signalnog puta dvostruko osigurana. Kako bi se zaobišla ova problematika, ciljne terapije trebale bi se dizajnirati uzvodno od TCF/β-katenin efekta. Opcije uključuju protutijela ili sekretornu ekstracelularnu Fz domenu, koji aktivaciju Wnt signalnog puta blokiraju još izvan stanice. Efekt sličnog uspjeha mogle bi imati male molekule i peptidni ihnibitori koji ometaju interakciju Fz-DVL. Postoje male molekule koje blokiraju lipidaciju i sekreciju samog Wnt-a. Kombinacija ovih mogućnosti mogla bi biti djelotvorna protiv kompleksne signalizacije ovog puta (MacDonald i sur. 2009). Opsežne epigenetičke analize glioblastoma i ostalih astrocitoma pokazuju jaku metilaciju promotora inhibitora signalnog puta Wnt (Dkk1, sFRP1 i WIF 1), a relativne vrijednosti njihove ekspresije dovedene su u direktnu vezu s gradusima tumora (Indranil i sur. 2013). WIF 1 pokazuje karakteristike tumor supresora, zanimljiva je meta za ciljnu terapiju i njegova demetilacija promotora u glioblastomu potiče uništenje kancerogenih stanica kroz ubrzavanje procesa staničnog starenja (Lambiv i sur. 2011). Pojačavanje ekspresije sFRPa u terapijske svrhe može biti riskantno jer u nekim tkivima može potencirati aktivaciju Wnt signalnog puta s obzirom da članovi ove obitelji proteina imaju mogućnost bifaznog djelovanja (Xavier i sur. 2014).

Detaljno upoznavanje svih segmenata kaskada signalnih puteva, proteina, njihove građe i interakcija, kao i stanične epigenetike, otvorilo je novu zonu mogućnosti za razvoj neklasičnih terapija u liječenju karcinoma. Uloga signalnog puta Wnt kao regulatora „matičnosti“ stanice postala je općeprihvaćena činjenica i na sebe privlači mnogo znanstvene pažnje iz terapijske perspektive. Wnt se pokazao kao jako zahtjevna meta za dizajniranje ciljnih terapija. Ova bi se problematika mogla objasniti njegovim višesmislenim prisutstvom u cijelom spektru staničnih procesa, što značajno utječe na efikasnost i specifičnost bilo koje ciljne terapije (Surana i sur. 2014).

Održavanje stanice u nediferenciranom stanju mora biti diktirano kroz naknadnu simultanu aktivaciju nekoliko signalnih puteva. Sjecišta ovih komunikacijskih mreža pojavila

su se kao relativno nova ideja u razvoju ciljnih terapija. Brojni su primjeri proteina koji imaju višestruke uloge unutar jednog signalnog puta ili, na još kompleksnijoj razini, sudjeluju u njih nekoliko ovisno o koncentraciji u različitim kompartimentima stanice. Indranil i suradnici su 2013. godine istraživali proteinsku izmjenu informacija između Wnt i EGRF signalnog puta. Detektirane molekule postaju meta za dizajniranje protutijela, niskomolekularnih inhibitora i virusa kojoma bi se istovremeno mogla utišati aktivnost oba signalna puta. Sličan su primjer genetičke promjene u genima koji kodiraju za E-kadherin, APC i β-katenin. Osim što svi sudjeluju u signalnom putu Wnt, isti proteini imaju vane uloge kao komponente zonula adherens tj. u posredovanju međustaničnog kontakta (Nikuševa i sur. 2007). Autori ističu ovakve primjere kao najbolju strategiju za poboljšanje terapijskog učinka.

5. Zaključak

Aktivan Wnt signalni put biljeg je mnogih karcinoma, što je učestalo i u slučaju glioblastoma. U našim su uzorcima glioblastoma detektirani proteini DVL3 i sFRP3 čije razine ekspresije nismo uspjeli dovesti u vezu s raspoloživim kliničkim parametrima, međutim proučavanje njihove subcelularne lokalizacije daje naslutiti njihove višestruke uloge u nastanku/progresiji glioblastoma. Uz loše prognoze za oboljele, sudeći prema dostupnoj literaturi, napravljen je značajan pomak od klasičnih terapija prema ciljnim koje uključuju visokospecifične molekularne mete i nose manje nuspojava. Iako se ciljne terapije usmjerene prema atenuaciji signalnog puta Wnt za sad nisu pokazale efikasnima u kliničkim testiranjima, od njih zasigurno ne treba odustajati. Sva nastojanja da se o tom signalnom putu otkrije nešto novo su opravdana, jer slojevitost njegove regulacije i umreženost (eng. crosstalk) s drugim signalnim putevima nadilazi dosege recentnih znanstvenih spoznaja. Kako je glioblastom vrlo heterogenog porijekla i histopatološke slike, specifičan za pojedinačnog oboljelog, bitno je razviti metode kojima će se detektirati individualna slika stanja. Tek će potpuno poznavanje mreže signalnih puteva moći ukazati na optimalne pristupe terapijskim rješenjima ovog iznimno agresivnog tumora kod ljudi.

6. Literatura

1. Baryawno N, Sveinbjörnsson B, Eksborg S, Chen CS, Kogner P, Johnsen JI. Small-molecule inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling inhibit Wnt/beta-catenin pathway cross-talk and suppress medulloblastoma growth. Cancer Research. 2010;70(1):266-76

2. Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. Journal of Cell Science. 2008;121, 737-746

3. Burger PC, Scheithauer BW. Tumors of the Central Nervous System. AFIP Atlas of Tumor Pathology. 2007.

4. Clevers H, Nusse R. Wnt/β-catenin signaling and disease. Cell. 2012;8;149(6):1192-205

5. Cruciat CM, Niehrs C. Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2013;5(3):a015081

6. Dann CE, Hsieh JC, Ratter A, Sharma D, Nathans J, Leahy DJ. Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. Nature. 2001;412:86-90

7. Ekström EJ, Sherwood V, Andersson T. Methylation and loss of Secreted Frizzled-Related Protein 3 enhances melanoma cell migration and invasion. PLoS ONE. 2011;6(4):e18674

8. Galli LM, Barnes T, Cheng T, Acosta L, Anglade A, Willert K, Nusse R, Burrus LW. Differential inhibition of Wnt-3a by Sfrp-1, Sfrp-2, and Sfrp-3. Developmental Dynamics. 2006; 235(3): 681-690

9. Gao C, Chen Y. Dishevelled: The hub of Wnt signaling. Cellular Signaling. 22, 2010; 717-727

10. Gao X, Mi Y, Ma Y, Jin W. LEF1 regulates glioblastoma cell proliferation, migration, invasion, and cancer stem-like cell self-renewal. Tumor Biology. 2014;35(11):11505-11

11. Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. Biochimica et Biophysica Acta. 2003;1653:1-24

12. Götze S, Wolter M, Reifenberger G, Müller O, Sievers S. Frequent promoter hypermethylation of Wnt pathway inhibitor genes in malignant astrocytic gliomas. International Journal of Cancer. 2010;126(11):2584-93

13. Hirano H, Yonezawa H, Yunoue S, Habu M, Uchida H, Yoshioka T, Kishida S, Kishida M, Oyoshi T, Fujio S, Sugata S, Yamahata H, Hanaya R, Arita K. Immunoreactivity of Wnt5a, Fzd2, Fzd6, and Ryk in glioblastoma: evaluative methodology for DAB chromogenic immunostaining. Brain Tumor Pathology. 2014 ;31(2):85-93

14. Indranil P, Seemana B, Anirban C, Mrinal KG. Current understanding on EGFR and Wnt/β-Catenin signaling in glioma and their possible crosstalk. Genes & Cancer. 2013;4(11-12) 427-446

15. Jang MH, Bonaguidi MA, Kitabatake Y, Sun J, Song J, Kang E, Jun H, Zhong C, Su Y, Guo JU, Wang MX, Sailor KA, Kim JY, Gao Y, Christian KM, Ming GL, Song H. Secreted frizzled-related protein 3 regulates activity-dependent adult hippocampal neurogenesis. Cell Stem Cell. 2013;12(2):215-23

16. Jang MH, Kitabatake Y, Kang E, Jun H, Pletnikov MV, Christian KM, Hen R, Lucae S, Binder EB, Song H, Ming GI. Secreted frizzled-related protein 3 (sFRP3) regulates antidepressant responses in mice and humans. Molecular Psychiatry. 2013;18(9):957-8

17. Jones SE, Jomary C. Secreted Frizzled-related proteins:searching for relationships and patterns. Bioessays. 2002;24:811-820

18. Kafka A, Bašić-Kinda S, Pećina-Šlaus N. The cellular story of dishevelleds. Croatian Medical Journal. 2014;55:459-67

19. Kafka A, Tomas D, Beroš V, Pećina HI, Željko M, Pećina-Šlaus N. Brain metastases from lung cancer show increased expression of DVL1, DVL3 and beta-catenin and down-regulation of E-cadherin. International Journal of Molecular Sciences. 2014; 13;15(6):10635-51

20. Kamino M, Kishida M, Kibe T, Ikoma K, Iijima M, Hirano H, Tokudome M, Chen L, Koriyama C, Yamada K, Arita K, Kishida S. Wnt-5a signaling is correlated with infiltrative activity in human glioma by inducing cellular migration and MMP-2. Cancer Science. 2011;102(3):540-8

21. Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signaling pathway. Journal of Cell Science. 2003;116, 2627-2634

22. Keith A, Wharton Jr. Runnin' with the Dvl: Proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction. Developmental Biology. 2003;253, 1-17

23. Kim KH, Seol HJ, Kim EH, Rheey J, Jin HJ, Lee Y, Joo KM, Lee J, Nam DH. Wnt/β-catenin signaling is a key downstream mediator of MET signaling in glioblastoma stem cells. Neuro-Oncology. 2013;15(2):161-71

24. Kongkham PN, Northcott PA, Croul SE, Smith CA, Taylor MD, Rutka JT. The SFRP family of WNT inhibitors function as novel tumor suppressor genes epigenetically silenced in medulloblastoma. Oncogene. 2010;29(20):3017-24

25. Lambiv WL, Vassallo I, Delorenzi M, Shay T, Diserens AC, Misra A, Feuerstein B, Murat A, Migliavacca E, Hamou MF, Sciuscio D, Burger R, Domany E, Stupp R, Hegi ME. The Wnt inhibitory factor 1 (WIF1) is targeted in glioblastoma and has a tumor suppressing function potentially by induction of senescence. Neuro-Oncology. 2011;13(7):736-47

26. Li J, Guo G, Li J, Hao J, Zhang J, Guo Y, Yu H. The expression and significance of dishevelled in human glioma. Journal of surgical research. 2014;1-6

27. Lin YW, Shih YL, Lien GS, Suk FM, Hsieh CB, Yan MD. Promoter methylation of SFRP3 is frequent in hepatocellular carcinoma. Disease Markers. 2014;351863

28. Liu X, Wang L, Zhao S, Ji X, Luo Y, Ling F. β-Catenin overexpression in malignant glioma and its role in proliferation and apoptosis in glioblastma cells. Medical Oncology. 2011;28(2):608-14

29. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. Annual review of cell and developmental biology. 2004;20:781-810

30. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathologica. 2007;114(2):97-109

31. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/β-catenin signaling: components, machanisms, and diseases. Developmental Cell. 2009;17(1):9-26

32. Mii Y, Taira M. Secreted Wnt „inhibitors“ are not just inhibitors: Regulation of extracellular Wnt by secreted Frizzled-related proteins. Development, Growth and Differentiation. 2011;53, 911-923

33. Mora MC, Bassa LM, Wong KE, Tirabassi MV, Arenas RB, Schneider SS. Rhodiola crenulata inhibits Wnt/β-catenin signaling in glioblastoma. Journal of Surgical Research. 2015;197(2):247-55

34. Nikuševa-Martić T, Beroš V, Pećina-Šlaus N, Pećina HI, Bulić-Jakuš F. Genetic changes of CDH1, APC, and CTNNB1 found in human brain tumors. Pathology, Research and Practice. 2007;203(11):779-87

35. Nikuševa-Martić T, Pećina-Šlaus N, Kušec V, Kokotović T, Mušinović H, Tomas D, Zeljko M. Changes of AXIN-1 and Beta-Catenin in Neuroepithelial Brain Tumors. Pathology and Oncology Research. 2010;16; 75-79

36. Partl JZ, Fabijanović D, Škrtić A, Vranić S, Martić TN, Serman L. Immunohistochemical expression of SFRP1 and SFRP3 proteins in normal and malignant reproductive tissues of rats and humans. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology. 2014;22(9):681-7

37. Paw I, Carpenter RC, Watabe K, Debinski W, Lo HW. Mechanisms regulating glioma invasion. Cancer Letters. 2015;1:1-7

38. Pecorino L. Molecular biology of cancer. Oxford University Press, Oxford. 177-180. 2012.

39. Pećina-Šlaus N. Odabrane metode molekularne biologije - laboratorijski priručnik. Medicinska naklada d.o.o. 2009.

40. Pećina-Šlaus N. Wnt signal transduction pathway and apoptosis: a review. Cancer Cell International. 2010;10:22

41. Pećina-Šlaus N, Kafka A, Tomas D, Marković L, Okštajner PK, Sukser V, Krušlin B. Wnt signaling transcription factors TCF-1 and LEF-1 are upregulated in malignant astrocytic brain tumors. Histology and Histopathology. 2014;29:1557-64

42. Pećina-Šlaus N, Martić TN, Kokotović T, Kušec V, Tomas D, Hrašćan R. AXIN-1 protein expression and localization in glioblastoma. Collegium Antropologicum. 2011;35 Suppl 1:101-6

43. Pećina-Šlaus N, Zigmund M, Kušec V, Martić TN, Cacić M, Šlaus M. E-cadherin and beta-catenin expression patterns in malignant melanoma assessed by image analysis. Journal of Cutaneous Pathology. 2007;34(3):239-46

44. Pohl S, Scott R, Arfuso F, Perumal V, Dharmarajan A. Secreted frizzled-related protein 4 and its implications in cancer and apoptosis. Tumor Biology. 2015;36(1):143-52

45. Roth W, Wild-Bode C, Platten M, Grimmel C, Melkonyan HS, Dichgans J, Weller M. Secreted Frizzled-related proteins inhibit motility and promote growth of human malignant glioma cells. Oncogene. 2000;19,4210-4220

46. Sareddy GR, Kesanakurti D, Kirti PB, Babu PP. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs diclofenac and celecoxib attenuates Wnt/β-catenin/Tcf signaling pathway in human glioblastoma cells. Neurochemical Research. 2013;(11):2313-22

47. Sareddy GR, Panigrahi M, Challa S, Mahadevan A, Babu PP. Activation of Wnt/beta-catenin/Tcf signaling pathway in human astrocytomas. Neurochemistry International. 2009;55(5):307-17

48. Schiefer L, Visweswaran M, Perumal V, Arfuso F, Groth D, Newsholme P, Warrier S, Dharmarajan A. Epigenetic regulation of the secreted frizzled-related protein family in human glioblastoma multiforme. Cancer Gene Therapy. 2014;21,297-303

49. Skelton WP, Skelton M, Vesely DL. Cardiac hormones are potent inhibitors of secreted frizzled-related protein-3 in human cancer cells. Experimental and Therapeutic Medicine. 2013;5(2):475-478

50. Surana R, Sikka S, Cai W, Shin EM, Warrier SR, Tan HJG, Arfuso F, Fox SA, Dharmarajan AM, Kumar AP. Secreted frizzled related proteins: Implications in cancers. Biochimica et Biophysica Acta. 2014;1845:53-65

51. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, Villano JL. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. 2014;(10):1985-96

52. Wang J, Wang X, Jiang S, Lin P, Zhang J, Wu Y, Xiong Z, Ren JJ, Yang H. Partial biological characterization of cancer stem-like cell line (WJ(2)) of human glioblastoma multiforme. Cellular and Molecular Neurobiology. 2008;28(7):991-1003

53. Xavier CP, Melikova M, Chuman Y, Üren A, Baljinnyam B, Rubin JS. Secreted Frizzled-related protein potentiation versus inhibition of Wnt3a/β-catenin signaling. Cellular Signaling. 2014;26(1):94-101

54. Zeljko M, Pećina-Šlaus N, Martić TN, Kušec V, Beroš V, Tomas D. Molecular alterations of E-cadherin and beta-catenin in brain metastases. Frontiers in Bioscience. 2011;1;3:616-24

55. http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/FRZBID44457ch2q32.html

7. Životopis

Rođena sam 4. ožujka 1986. u Zagrebu. Maturirala sam 2004. godine u zagrebačkoj 1. (općoj) gimnaziji s odličnim uspjehom. Zbog naklonjenosti prema prirodnim znanostima, nakon srednje škole sam odlučila upisati studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu. Paralelno tijekom studija upisujem i Akademiju dramske umjetnosti, te u tom periodu započinjem karijeru kao profesionalni slobodni fotograf, što radim i danas. 2012. godine sam stekla zvanje prvostupnice molekularne biologije. Iste godine odlučujem nastaviti diplomski studij, te sam zbog interesa prema kancerogenezi kao temu diplomskog rada odabrala Izraženost ključnih molekula signalnog puta Wnt, sFRP3 i DVL3, u glioblastomu. Uspješno se služim engleskim i njemačkim jezikom. Posjedujem vozačku dozvolu B kategorije. Kroz život sam se kontinuirano bavila sportom s aktualnom okupacijom orijentacijskim i dugoprugaškim trčanjem.