

Ekspresija gena za beta katenin i p53 u meningeomima

Logara, Monika

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:217:879718>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno - matematički fakultet

Biološki odsjek

Monika Logara

Ekspresija gena za beta-katenin i p53 u meningeomima

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj rad izrađen je na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga (HIIM) u Laboratoriju za neuroonkologiju pod vodstvom prof.dr.sc. Nives Pećina-Šlaus. Rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost u sklopu projekta WNT4EMT br. 6625. Rad je predan 2015. godine na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar molekularne biologije.

ZAHVALE

Želim zahvaliti prof. dr. sc. Nives Pećina-Šlaus na vodstvu, na ukazanom povjerenju i pruženoj pomoći tijekom izrade diplomskog rada na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga u Laboratoriju za neuroonkologiju.

Također želim zahvaliti prof. dr. sc. Maji Matulić koja je za mene uvijek imala otvorena vrata i uvijek je bila spremna pomoći.

Želim zahvaliti znanstvenoj novakinji Anji Kafka za blisku suradnju i veliku pomoć prilikom izvođenja diplomskog rada uz čije je društvo vrijeme brže prolazilo.

Od srca zahvaljujem svojoj obitelji i Lovri koji su me tijekom čitavog školovanja podupirali i poticali moju težnju k ostvarivanju sve viših i viših ciljeva i zato im veliko hvala.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno - matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Ekspresija gena za beta-katenin i p53 u meningeomima

Monika Logara

Rooseveltove trg 6, 10000, Zagreb, Hrvatska

Meningeomi su primarni tumori središnjeg živčanog sustava. Beta-katenin je citoplazmatski protein kodiran genom *CTNNB1*. Sudjeluje u nastanku i održavanju međustaničnih veza i signalnom putu Wnt. Signalni put Wnt ima važnu ulogu tijekom embrionalnog razvoja, posebice razvoja središnjeg živčanog sustava. Osim stoga, neispravno funkcioniranje puta prijenosa signala Wnt odgovorno je za proces tumorigeneze. Neispravna akumulacija beta-katenina karakteristična je za različite tipove tumora. Postoje dokazi da su signalni putevi Wnt i p53 povezani te da divlji tip proteina p53 djeluje inhibitory na Wnt signalizaciju. Željeli smo analizirati razinu izraženosti gena *CTNNB1* (beta-katenin) i p53 u uzorcima meningeoma čovjeka te odrediti njihovu lokalizaciju u stanicama tumora. Također smo nastojali odrediti povezanost između ovih dvaju proteina i tako pokazati jesu li signalni putevi Wnt i p53 uključeni u nastanak meningeoma. Proteinske produkte gena *CTNNB1* i p53 detektirali smo imunohistokemijom jer nam ova metoda omogućuje vizualizaciju antigena u preparatu što omogućuje samu vizualizaciju specifičnog proteina. Razinu ekspresije proteina beta-katenina i p53 odredili smo semikvantitativnom metodom tj. dodjeljivanjem znakova (+) Statističkom analizom razine ekspresije utvrdili smo da postoji inverzna korelacija izraženosti beta-katenina i p53 ($P = -0,410$; $hi\text{-}kvadrat = 0,002$), što upućuje da gubitak ekspresije p53 dovodi do povišene razine beta-katenina i aktivacije signalnog puta Wnt.

(44 stranica, 9 slika, 4 tablica, 49 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: p53, beta-katenin, signalni put Wnt, meningeomi

Voditelj: dr.sc. Nives Pećina-Šlaus, red. prof., Medicinski fakultet, Zagreb

Suvoditelj: dr.sc. Maja Matulić, izv.prof., Prirodoslovno - matematički fakultet

Ocjenitelji: dr.sc. Maja Matulić, izv. prof., Prirodoslovno - matematički fakultet

doc.dr.sc. Duje Lisičić, Prirodoslovno-matematički fakultet

doc.dr.sc. Martina Šeruga Musić, Prirodoslovno-matematički fakultet

Rad prihvaćen: 15. rujan. 2015

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

The expression of genes for beta-catenin and p53 in meningioma

Monika Logara

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Meningiomas are primary tumors of the central nervous system. Beta-catenin is a cytoplasmic protein encoded by the *CTNNB1* gene, it participates in the formation and maintenance of adherens junction and Wnt signaling pathway. Wnt signaling pathway plays an important role during embryonic development, specially in the development of the central nervous system. Disruption of Wnt signaling pathway may cause cells to favor process of tumorigenesis. Aberrant accumulation of beta-catenin is characteristic for different types of tumors. There is evidence that the Wnt signaling pathways and p53 are connected, and that wild-type p53 protein acts like inhibitor of Wnt signaling. In the present study we wanted to analyze the level of expression of beta-catenin and p53 in a sample of meningioma and determine their localization in tumor cells. We also sought to determine the association between these two proteins and explore whether Wnt signaling pathways and p53 are involved in the formation of meningiomas. Beta-catenin and p53 were detected by immunohistochemistry. The statistical analysis of expression levels showed that there is an inverse correlation between beta-catenin and p53 ($P = -0.410$; $\chi^2 = 0.002$), which indicates that loss of p53 expression leads to aberrant accumulation of beta-catenin and activation of Wnt signaling pathway.

(44 pages, 9 figures, 4 tables, 49 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: p53, beta-catenin, Wnt signaling pathway, meningioma

Supervisor: dr.sc. Nives Pećina-Šlaus, Full prof., Faculty of Medicine, Zagreb

Cosupervisor: dr.sc. Maja Matulić, Associate prof., Faculty of Science, Zagreb

Reviewers: dr.sc. Maja Matulić, Associate prof., Faculty of Science, Zagreb

doc.dr.sc. Duje Lisičić, Faculty of Science, Zagreb

doc.dr.sc. Martina Šeruga Musić, Faculty of Science, Zagreb

Thesis accepted: 15th September 2015

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Meningeomi	1
1.2.	Signalni put Wnt.....	3
1.3.	Beta-katenin	5
1.4.	p53.....	6
1.5.	Imunohistokemijska detekcija proteina.....	8
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	10
3.	MATERIJALI I METODE	11
3.1.	Uzorci tkiva	11
3.2.	Deparafinizacija i rehidracija uzoraka.....	14
3.3.	Oporavljanje epitopa	15
3.4.	Blokada endogene peroksidazne aktivnosti	15
3.5.	Blokada nespecifičnog vezanja	15
3.6.	Obilježavanje kromogenom	16
3.7.	Histološko bojanje i dehidracija	16
3.8.	Analiza imunohistokemijskog bojanja	17
4.	REZULTATI.....	18
5.	RASPRAVA	29
6.	ZAKLJUČAK	32
7.	LITERATURA	33
8.	ŽIVOTOPIS	37

1. UVOD

1.1. Meningeomi

Meningeomi su primarni tumori središnjeg živčanog sustava. Nastaju od arahnoidnih stanica moždanih ovojnica (leptomeningi) te čine otprilike 20% svih tumora središnjeg živčanog sustava. Meningeomi većinom pripadaju benignim tumorima koji rastu vrlo sporo, dobro su ograničeni i učahureni, tek mali postotak čini skupinu malignih tumora (Serena i sur., 2013). Za meningeome su karakteristični sljedeći simptomi: glavobolje, mišićna paraliza, epileptički napadaji, interkranijalna hipertenzija, promjena kognitivnih sposobnosti, neuravnotežene živčane i moždane funkcije (Grujućić i sur., 2010).

Meningeomi čine 20% svih primarnih intrakranijalnih i 25% svih intraspinalnih tumora kod odraslih osoba, srednje životne dobi, od 45 do 55 godina. Kod žena meningeomi se javljaju dvaput češće nego kod muškaraca. Godišnja incidencija meningeoma je 2 do 7 na 100.000 žena i od 1 do 5 na 100.000 muškaraca (M : Ž = 1,8 : 2,1). Veća je prevalencija benignih meningeoma kod žena nego kod muškaraca, dok su agresivniji histološki tipovi meningeoma učestaliji kod muškaraca (Grujićić i sur., 2010). Učestalost multiplih meningeoma kreće se od 2% do 8%. Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO), benigni se meningeomi svrstavaju u gradus I (oko 90%), dok drugi histološki tipovi koji za ishod imaju manje povoljnu prognozu, čine gradus II i gradus III prema SZO(2-6%) (McDermott i sur., 2002.).

Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO), meningeomi se patološki dijele u tri stupnja (Louis i sur. 2007.). Benigni (I. gradus) čine 92% meningeoma i njima pripadaju meningotelijalni fibrozni, tranzicijski (mješoviti), psamomatozni, angiomatozi i multipli. Atipični (II. gradus) koji čine 5% meningeoma i njima pripadaju horoidni, svijetlostanični, atipični. Maligni (III. gradus) koji čine 3% meningeoma i njima pripadaju papilarni, rabdoidni, anaplastični.

Egzogeni i endogeni čimbenici djeluju pojedinačno ili u kombinaciji na proces tumorigeneze. Traume glave, pušenje, povišena razina kolesterola, virusne infekcije, a prije svega ionizirajuće zračenje mozga, samo su neki egzogeni čimbenici koji sudjeluju u nastanku meningeoma. Neki od endogenih čimbenika povezanih s meningeomima su progestini, estrogen,

prolaktin, glukokortikoidi, dopamin, somatostatin, uključujući faktor rasta iz trombocita (PDGF) i epidermalni faktor rasta (EGF) (Bradač i sur., 1990).

Većina meningeoma liječi se pomoću operacija i radioterapija koje vrlo često rezultiraju uspješnim ishodom. Međutim, ove metode liječenja, operacija i radioterapija nisu uvijek ostvarive jer meningeomi mogu obavijati osjetljive neuralne ili vaskularne strukture što čini operaciju iznimno opasnom, a radioterapija je ograničena zbog svoje toksičnosti i zbog same veličine meningeoma (Choy i sur. 2011).

Meningeomi su jedna od prvih čvrstih neoplazmi u kojima su pronađene citogenetičke promjene. Monosomija kromosoma 22 jedan je od najčešćih genetskih poremećaja u meningeoma. Ova povezanost između dugog kraka kromosoma 22 (22q) i meningeoma prvi je put zabilježena kod pacijenata kojima je dijagnosticirana s *neurofibromatoza tipa II* (NF2). Gen *NF2* specifični je tumor supresorski gen čija bialelna inaktivacija rezultira gubitkom proteina merlina i može se povezati s razvojem multiplih meningeoma i švanoma (Carvalho i sur., 2007.).

Okvirno, oko 50% meningeoma pokazuje delecije regiji 22q12.2 gdje je smješten gen *NF2*. Napredovanje meningioma karakterizira tipična ili anaplastična histologija, a pridružene su mu mnoge citogenetičke promjene, uključujući prisutnost dicentričnih ili prstenastih kromosoma (Pećina-Šlaus i sur., 2008.). Zabilježeni su gubici dijelova kromosoma, 6q, 7, 9p, 10q, 14q, 18q, 19 ili 20. Također je uočena amplifikacija kromosoma 1q, 9q, 12q, 15q, 17q ili 20p (Ragel i Jensen, 2005.). Sami mehanizmi djelovanja opisanih promjena kod napredovanja meningeoma do sada su nepoznati, iako su promjene na nekoliko kromosoma i gena usko povezane s benignim, atipičnim i anaplastičnim meningeomima. Kod približno dvije trećine meningeoma uočeni su poremećaji tumor supresorskih gena koji su uključeni u kontrolu staničnog ciklusa na kromosomu 9p, uključujući *CDKN2A* (*p16INK4a*), *p14ARF* i *CDKN2B* (*p15INK4b*). Delecije gena *PTEN* (10q23), gena *CDKN2C* (1p32) i amplifikacija gena *RPS 6KB1* (17q23) također su uključeni u razvoj meningeoma (Choy i sur., 2011.).

Već je u nekoliko istraživanja ovih tumora potvrđena povećana ekspresija onkogeni, kao što su *c-sis*, *c-myc*, *Ha-ras* i *c-mos*. U drugim istraživanjima predloženo je da su onkogeni regulirani na razini transkripcije, *c-myc* i *c-fos*, iznimno aktivni. Mutacije u tumor supresorskom

genu p53 smatraju se pouzdanim markerom za maligne transformacije meningeoma i ekspresija protoonkogen *Bcl-2* također korelira s višim gradusima meningeoma (Ragel i Jensen, 2005.).

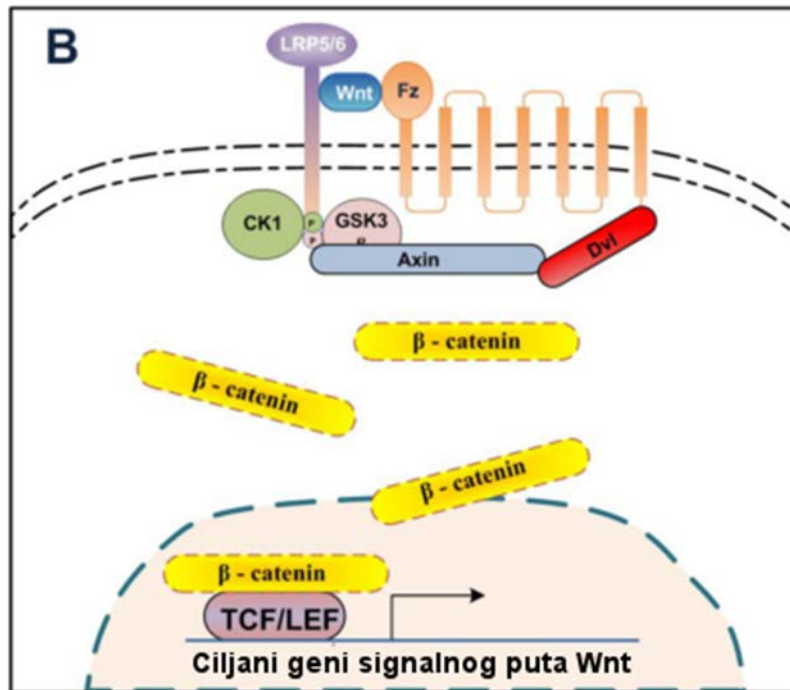
1.2. Signalni put Wnt

U današnje vrijeme kada su molekularna medicina i biologija na visokoj razini, puno se truda usmjerava u detaljno istraživanje signalnih putova i molekularnih mehanizama koji reguliraju embrionalni razvoj ali i staničnu i tkivnu homeostazu odraslog organizma. Razumijevanje svih mehanizama koji reguliraju normalni razvoj iznimno pomaže u razumijevanju i liječenju različitih bolesti jer su isti signalni putevi uključeni u oba procesa. Jedan od tih ključnih puteva je konzervirani signalni put Wnt. Naziv Wnt je rezultat spajanja imena gena eng. "*wingless*", koji je odgovoran za polarno segmentiranje kod *Drosophila* i homolognog gena *int-1* kod kralježnjaka (od eng. *integrated*) (Clevers i Nusse, 2012.).

Izvanstanična sekretorna molekula Wnt signal je koji stimulira nekoliko unutarstaničnih signalnih kaskada uključujući kanonski put koji je ovisan o beta-kateninu i nekanonski neovisan o beta-kateninu. Signalni put Wnt iznimno je značajan u nekoliko različitih bioloških procesa. Djeluje kao regulator stanične proliferacije, diferencijacije, stanične adhezije i apoptoze (Pećina-Šlaus, 2010.) što omogućuje normalni embrionalni razvoj. Također ima važnu ulogu u razvoju središnjeg živčanog sustava. Brojna istraživanja utvrdila su da signalni put Wnt ima važnu ulogu u nastanku i razvoju različitih tumora (Mikels i Nusse, 2006.).

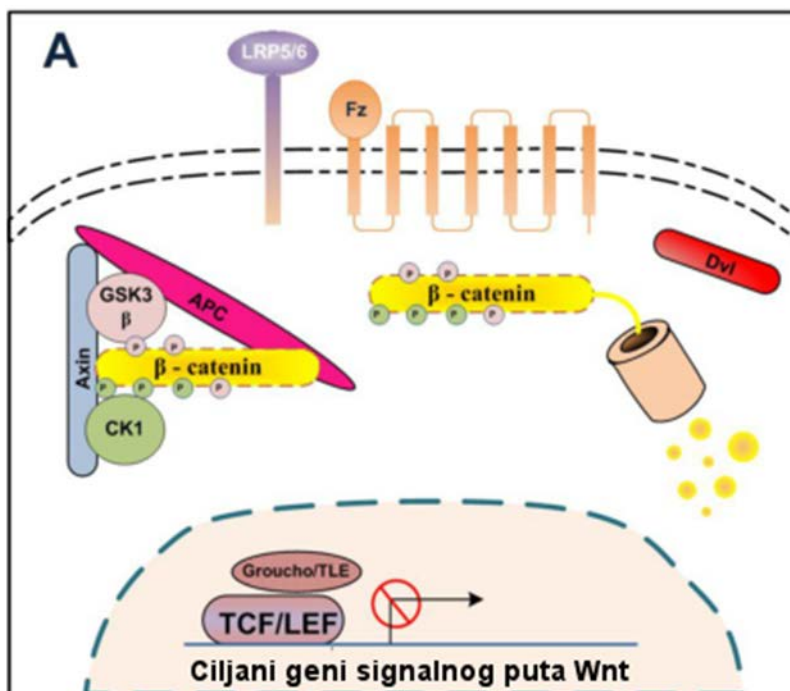
Kanonski signalni put Wnt, nazvan još i beta-kateninski, započinje interakcijom liganda Wnt i receptora Frizzled (FZD) i koreceptora LRP5/LRP6 (eng. *low-density lipoprotein receptor related protein*) koji aktiviraju citoplazmatski protein Dishevelled (DVL). Dishevelled zatim, zajedno s proteinom GBP (eng. *GSK3 β binding protein*), inhibira kinazu GSK3 β (eng. *glycogen synthase kinase-3 β*). GSK3 β kinaza sastavni je dio multiproteinskog kompleksa koji se još sastoji od aksina (AXIN), APC (eng. *adenomatous polyposis coli*), beta-katenina i kazein kinaze i omogućuje razgradnju beta-katenina putem ubikvitinsko-proteosomskog sustava. Inhibicijom GSK3 β kinaze dolazi do stabilizacije beta-katenina, što dovodi do njegovog nakupljanja u jezgri, stvaranja kompleksa beta-katenina s transkripcijskim čimbenicima TCF4/LEF (eng. *T cell factor 4/lymphoid enhanced factor*) te pokretanja procesa transkripcije različitih ciljanih gena signalnog puta Wnt. Većina tih ciljanih gena su protoonkogeni *c-myc*, *N-myc*, *c-jun*, i *ciklin D1* što

objašnjava zašto poremećaj i nestabilnost signalnog puta Wnt omogućava proces tumorigeneze (Michaelson i Leder, 2001.), (slika1.).



Slika 1. Signalni put Wnt i njegove ključne komponente u aktivnom stanju. Preuzeto i modificirano prema Kafka i sur. 2014.

U nedostatku interakcije ligand-receptor u kanonskom putu, u stanici dolazi do razgradnje beta-katenina te se zaustavlja transkripcija ciljnih gena. Degradacija beta-katenina odvija se u citosolu putem multiproteinskog degradacijskog kompleksa koji kao što sam prethodno navela sastoji od aksina, APC, kazein-kinaze 1 (eng. *casein kinase 1*, CK1) i GSK3 β kinaze te nakon fosorilacije amino-terminalne degradacijske domene i poliubikvitinacije, slijedi sama razgradnja beta-katenina pomoću proteosoma (Komiya i Habs, 2008.), (slika 2.).



Slika 2. Signalni put Wnt u neaktivnom stanju i njegove ključne komponente. Preuzeto i modificirano prema Kafka i sur. 2014.

Nekanonski ligandi signalnog puta Wnt stupaju u interakciju s receptorima FZD i koreceptorima ROR2 (eng. receptor *tyrosine kinase-like orphan receptor 2*) i RYK (eng. *Receptor-like tyrosine kinase*). Mali G proteini (RHOA, RHOU, RAC, i CDC42) i *c-jun* amino-terminalna kinaza su efektorske molekule nekanonskog puta ovisne o DVL-u, dok su kinaze slične proteinu Nemo (eng. *Nemo-like kinase, NLK*) i transkripcijski čimbenik aktivnih T–stanica (eng. *nuclear factor of activated T cells*, NFAT) efektorske molekule nekanonskog puta ovisne o Ca^{2+} ionima. Mali G proteini sudjeluju u reorganizaciji citoskeleta tijekom tumorigeneze točnije tijekom inavazije i metastaziranja. NLK fosforilira transkripcijske čimbenike, kao što je TCF/LEF, kako bi inhibirali kanonski signalni put Wnt. Transkripcijski čimbenik NFAT sudjeluje kako u ranoj fazi embrionalnog razvoja tako i u procesu metastaziranja (Katoh, 2007.; Komiya i Habs 2007.)

1.3. Beta-katenin

Beta-katenin protein je kodiran genom *CTNNB1* te se nalazi na 3. kromosomu (3p21) kod čovjeka. Beta-katenin multifunkcionalan je protein koji ima ključnu ulogu u izgradnji međustaničnih veza, a predstavlja i ključnu signalnu molekulu u signalnom putu Wnt. U

međustaničnim vezama beta-katenin sudjeluje u interakciji s citoplazmatskom domenom kadherina. Proteini koji sudjeluju u signalnom putu Wnt igraju ključnu ulogu u različitim biološkim procesima, a poremećaji signalnog puta Wnt povezani su s pojavom različitih bolesti, uključujući i tumore (Michaelson i Leder, 2001.).

Beta-katenin ima središnju domenu zvanu središnja ponavljajuća domena armadillo (eng. *central armadillo repeat domain*, ARM) koja se sastoji od 12 uzastopnih ponavljanja, a amino-terminalna regija čini vezujuću domenu, mjesto gdje dolazi do fosforilacije od strane kinaza GSK3 β i CK1. Vezujuću domenu prepoznaje ubikvitin ligaza TrCP (eng. *F-box/WD repeat-containing protein 1A*) i karboksi-terminalnu regiju koja čini transaktivirajuću domenu. Središnja domena beta-katenina konzervirana je te je jedna od glavnih uloga središnje domene interakcija s drugim vezujućim partnerima, uključujući TCF/LEF, APC, E-kadherin i alfa-katenin. Brojna istraživanjima pokazala su da mutantni proteini koji imaju deleciju amino-terminalne regije, pokazuju povećanu stabilnost zbog ostataka koji su fosforilirani pomoću CK1 i GSK3 β (Poy i sur. 2001.).

Korelacija između beta-katenina i tumorigeneze utvrđena je kroz brojna istraživanja. Mutacije i delecije u vezujućoj domeni, rezultiraju stabilizacijom beta-katenina u različitim tipovima tumora. Kao što je već spomenuto ako ne dođe do proteosomske razgradnje beta-katenina, on ulazi u jezgru te stupa u interakciju s transkripcijskim čimbenicima LEF1/TCF te dolazi do transkripcije ciljnih gena mahom s funkcijom protoonkogeni. Zbog smanjene sposobnosti da GSK3 β fosforira beta-katenin, dolazi do smanjenja sposobnosti degradacije pomoću proteosoma što vodi do njegove akumulacije u jezgri. Okidač akumulacije beta-katenina može biti povezan s mutacijama u samom genu *CTNNB1*, inaktivacijskom mutacijom gena APC ili mutacijom aksina. Zbog akumulacije beta-katenina, u jezgri dolazi do transkripcije gena koji sudjeluju u kontroli staničnog ciklusa kao što je ciklin *D1*, produkti gena koji omogućuju interakciju stanica i izvanstaničnog matriksa kao što je matrilizin, fibronektin i mnogi drugi (Xu i Kimelman 2007.).

1.4. p53

Gen *TP53* nalazi se na 17. kromosomu (17q13), sadrži 10 egzona i eksprimiran je u svim somatskim stanicama. Produkti gena *p53* su tumor supresori te njihova aktivnost sprječava

nastajanje tumora. Šest neovisnih grupa istraživača je 1979. godine objavilo otkriće proteina veličine 53 kDa koji je prisutan u somatskim stanicama (DeLeo i sur., 1979.; Kress i sur., 1979.; Lane i Crawford, 1979.; Linzer i Levine 1979.; Melero i sur.;1979., Smith i sur., 1979.). U većini ovih istraživanja protein je otkriven u stanicama koji su bile inficirane SV40 virusom budući da se protein se vezao na veliki T-antigen pa su ga zbog ove karakteristike mogli izolirati ko-imunoprecipitacijom (Vogelstein, 2010.).

Ključna otkrića (Eliyah i sur., 1989.; Finlay i sur., 1989.) važna za razumijevanje mehanizma supresije tumorigeneze putem p53, vezana su uz istraživanja na kulturama stanica *in vitro*. Kroz ta istraživanja otkriveno je da visoka razina ekspresije divljeg tipa p53 može zaustaviti rast stanica. Godine 1991. istraživanje na stanicama leukemije je pokazalo da ekspresija divljeg tipa p53 dovodi do apoptoze. Ovo veliko otkriće u području apoptoze pokazalo je kako tumor supresorski geni igraju važnu ulogu u regulaciji apoptoze. Danas znamo da divlji tip p53 regulira stanični rast, inhibiciju staničnog ciklusa i promociju apoptoze (Yonish-Rouach i sur., 1991.).

Godine 1990. dogodila su se nova otkrića vezana uz p53. Otkriveno je da transaktivacijska domena ovog proteina stupa u interakciju sa specifičnim sljedovima nukleotida u DNA (Bargonetti i sur., 1991.; Kern i sur., 1991.). Analizom strukture proteina p53 otkriveni su aminokiselinski ostaci u središnjoj domeni proteina koji stupaju u interakciju s DNA. Ovo otkriće omogućilo nam je razumijevanje djelovanja mutacija koje onemogućuju tu interakciju. Brojna istraživanja otkrila su velik broj gena koje transkripcijski aktivira p53, Takvi su npr. inhibitor staničnog ciklusa i pro-apoptotski proteini kao što su PUMA i NOXA (Nakano i Vousden 2001., Oda i sur., 2000).

Još od samih početaka istraživanja proteina p53, znamo da zdrave stanice održavaju normalnu razinu p53, točnije u ravnoteži je njegova sinteza i degradacija. Otkriće Mdm2 (eng. *Mouse double minute 2 homolog*) bilo je od velikog značaja jer je ustanovljeno da on ima veliku ulogu u regulaciji p53. Danas znamo da Mdm2 negativno regulira p53. Ustanovljeno je da je Mdm2 E3 ubikvitin ligaza koja stimulira proteosomsku degradaciju p53 (Kobet i sur., 2000.; Oliner i sur.,1992.; Haupt i sur., 1997., Honda i sur., 1997., Kubbutat i sur., 1997.).

Nastanak mutanata p53 najčešće je zbog točkastih besmislenih mutacija u domeni p53 koja veže DNA. Visoka razina mutančnih p53 prisutna je u histološki različitim tumorima pluća, crijeva i dojki. Specifična karakteristika mutančnih p53 je produženi poluživot. Produženi poluživot mutančnih proteina p53 varira u različitim vrstama tumora. Različito vrijeme degradacije p53 može biti rezultat nemogućnosti degradacije od strane Mdm2, koji je pod direktnom transkripcijskom aktivnošću divljeg tipa p53, čija je aktivnost smanjena u stanicama u kojima se nalazi mutantni p53 (Muller i Vousden, 2014.).

1.5. Imunohistokemijska detekcija proteina

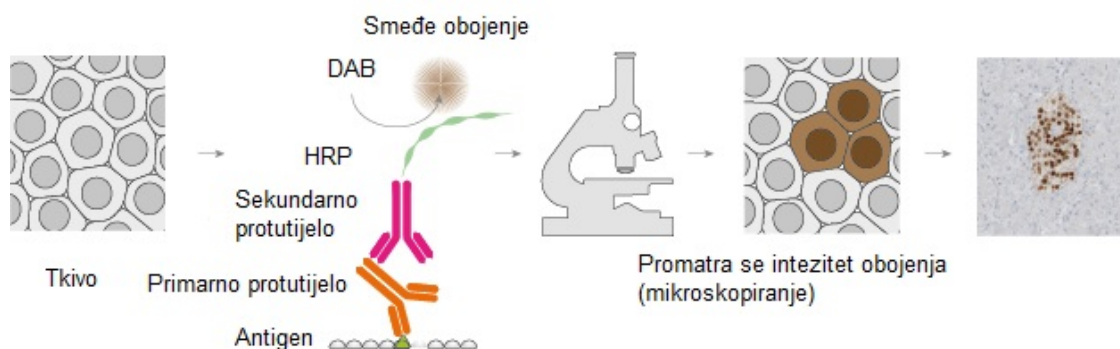
Imunohistokemijsko bojanje je metoda u molekularnoj biologiji koja je omogućila veliki uspjeh u dijagnostici i istraživanju tumora. Imunohistokemijsko bojanje omogućuje vizualizaciju antigena u preparatu. Antigen je tvar koja u organizmu potiče stvaranje protutijela (Glavina-Durdov, 2011.), a u slučaju imunohistokemijske detekcije to je stanični protein od interesa.

Direktno imunohistokemijsko bojanje je metoda u kojoj je protutijelo koje reagira s antigenom izravno obilježeno vizualizacijskim sredstvom – fluorescentnom ili radioaktivnom tvari. Kod imunoflorescencije specifična su protutijela obilježena fluorescentnom bojom, npr. fluorizotocijanatom ili rodaminom koji emitiraju svjetlo veće valne dužine. Zato su analizi takvih bojenja potrebni fluorescentni mikroskop sa živinom lampom i odgovarajući filteri.

Indirektno imunohistokemijsko bojanje omogućava nam veću osjetljivost detekcije. Primarno protutijelo je neobilježeno i proizvodi se u jednoj vrsti životinje protiv antigena kojeg želimo detektirati. Biljeg se nalazi na sekundarnim protutijelima, koja su proizvedena protiv primarnih protutijela u životinji različite vrste od one u kojoj su proizvedena primarna protutijela. Tako se na preparat tkiva prvo stavljaju primarna protutijela, ona specifično reagiraju s antigenom u tkivu; zatim se dodaju obilježena sekundarna protutijela, koja se specifično vežu na primarna protutijela, a položaj se može precizno odrediti zahvaljujući biljegu. Biljezi se kovalentno vežu za protutijelo, većinom su to radioaktivni izotopi, teški metali, fluorescirajuće molekule. Uz ove biljege najčešće se koristi obilježavanje protutijela enzimima, kojima se onda dodaje odgovarajući supstrat da nastane reakcija: rezultat je veliki broj vidljivih, netopljivih produkata po jednoj molekuli enzima, čime se osjetljivost višestruko povećava. Najčešće se koristi peroksidaza hrena (HRP), koja katalizira oksidaciju određenih supstrata, uz prijenos

vodikovih iona na vodikov peroksid i nastajanje molekula vode. Budući da se peroksidaze relativno rijetko nalaze u tkivima životinja, ovaj metaloenzim vrlo povoljan za imunohistokemijske metode jer se smanjuje vjerojatnost nespecifičnih reakcija. Postoje i nove modifikacije imunohistokemijske metode koje nam omogućuju vizualizaciju s visokom osjetljivošću.

U skupinu modificiranih imunohistokemijskih metoda pripadju *ImmPRESS*, *CSA* i *En Vision*. *En Vision* (Dako REAL™ *En Vision*™, Dako Glostrup Denmark) je metoda koju smo koristili tijekom istraživanja. Osnova *En Vision* specifični je enzim HRP (eng. horseredish peroxydase) koji konjugiran s polimerskim kosturom koji nosi sekundarno protutijelo i reagira sa supstratima vodikovim peroksidom i bojom 3,3'-diaminoazobenzidinom (DAB), od kojih se DAB oksidira te nastaje tamno-smeđi netopljivi produkt na mjestu gdje se nalazi enzim vezan za protutijelo. Mjesto na kojem je došlo do reakcije se može, zbog obojanosti, promatrati pod svjetlosnim ili neki drugim mikroskopom (slika 3.).



Slika 3. Shematski prikaz imunohistokemijske metode, preuzeto i modificirano The human protein atlas (Proteinatlas.org (2014) <http://www.proteinatlas.org/>)

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada je analizirati razinu izraženosti proteina beta-katenin i p53 u 59 uzoraka meningeoma čovjeka te odrediti njihovu lokalizaciju u stanicama tumora. Također ćemo nastojati odrediti povezanost između ovih dvaju proteina te utvrditi obrazac izraženosti u meningeomima. Tako ćemo uz pomoć statističkih analiza pokazati jesu li signalni putevi Wnt i p53 povezani s razvojem meningeoma i koja je njihova korelacija.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci tkiva

Pedeset devet uzorka meningeoma prikupljeno je u Zavodu za neurokirurgiju i Zavodu za patologiju "Ljudevit Jurak" Kliničkog bolničkog centra "Sestre milosrdnice" u Zagrebu. Pacijenti koji su uključeni u istraživanje nisu bili podvrgnuti liječenju zračenjem ili kemoterapijom koje bi mogle utjecati na rezultate analize. Uzorci meningeoma su uzeti za vrijeme kirurškog zahvata pri odstranjivanju i uklopljeni u parafin. Svi uzorci su po primitku u laboratorij šifrirani dodjeljivanjem broja iza slova T; npr. T100. Uz šifru je upisana dijagnoza koja je određena patohistološkom analizom i broj biopsije te dob i spol pacijenta (Tablica 1.).

Tablica 1. Podaci o uzorcima meningeoma korištenih u istraživanju

	Dob	Dijagnoza	Spol
1.	72	Meningotelijalni	M
2.	68	Meningotelijalni	M
3.	70	Meningotelijalni	Ž
4.	62	Meningotelijalni	Ž
5.	64	Meningotelijalni	M
6.	65	Meningotelijalni	M
7.	35	Meningotelijalni	M
8.	55	Meningotelijalni	Ž
9.	47	Meningotelijalni	Ž

Tablica 1. - nastavak

10.	70	Meningotelijalni	M
11.	54	Meningotelijalni	M
12.	69	Meningotelijalni	Ž
13.	52	Meningotelijalni	M
14.	70	Meningotelijalni	Ž
15.	62	Meningotelijalni	Ž
16.	71	Meningotelijalni	M
17.	40	Meningotelijalni	M
18.	63	Meningotelijalni	Ž
19.	62	Meningotelijalni	M
20.	75	Meningotelijalni	Ž
21.	54	Fibrozni	M
22.	63	Fibrozni	Ž
23.	63	Fibrozni	Ž
24.	45	Fibrozni	M
25.	51	Fibrozni	Ž
26.	73	Fibrozni	Ž
27.	66	Fibrozni	Ž

Tablica 1. - nastavak

28.	64	Fibrozni	Ž
29.	74	Fibrozni	Ž
30.	56	Tranzicijski	Ž
31.	61	Tranzicijski	M
32.	45	Tranzicijski	M
33.	50	Tranzicijski	Ž
34.	72	Tranzicijski	Ž
35.	74	Tranzicijski	Ž
36.	75	Tranzicijski	M
37.	32	Tranzicijski	M
38.	77	Tranzicijski	M
39.	71	Tranzicijski	Ž
40.	64	Tranzicijski	Ž
41.	66	Tranzicijski	Ž
42.	73	Tranzicijski	Ž
43.	67	Tranzicijski	Ž
44.	73	Tranzicijski	M
45.	79	Tranzicijski	Ž

Tablica 1. - nastavak

46.	61	Tranzicijski	Ž
47.	60	Psamomatozni	Ž
48.	66	Angiomatozni	M
49.	39	Angiomatozni	M
50.	70	Angiomatozni	Ž
51.	73	Angiomatozni	Ž
52.	78	Angiomatozni	M
53.	76	Atipični	M
54.	56	Atipični	M
55.	73	Atipični	M
56.	71	Anaplastični	Ž
57.	69	Anaplastični	Ž
58.	68	Anaplastični	M
59.	68	Anaplastični	Ž

3.2. Deparafinizacija i rehidracija uzoraka

Postupak imunohistokemijske detekcije proteina započeli smo s deparafinizacijom i rehidracijom uzoraka tkiva debljine 4 μm . Prvi korak deparafinizacije je bila dvostruka inkubacija sa ksilenom (Kemika, Zagreb, Hrvatska) kroz 5 minuta, zatim je slijedila dvostruka inkubacija uzoraka apsolutnim etanolom (Kemika, Zagreb, Hrvatska) kroz 3 minute, te 95% etanolom (Kemika, Zagreb, Hrvatska) također 3 minute. Završni korak deparafinizacije i

rehidracije bilo je ispiranje u destiliranoj vodi 30 sekundi kako bismo odstranili viška organskih otapala i zbog dodatne hidratacije.

3.3. Oporavljanje epitopa

Budući da se u formalinskoj fiksaciji stvaraju aldehidne veze između formaldehidskih i proteinskih molekula koje maskiraju antigen, postupak oporavljanje epitopa omogućuje obnovu epitopa. Tkivni presjeci su se inkubirali u citratnom puferu (10mM, pH=6,0) i višestruko zagrijavali u mikrovalnoj pećnici. Zagrijali smo uzorke na 700 W dva put tijekom 3 minute, a treći smo put zagrijali uzorke na 350 W 4 minute, pazeći da nam prerezi ne skliznu s predmetnog stakalca. Nakon zadnjeg zagrijavanja, pustili smo uzorke da se ohlade na sobnu temperaturu, a zatim ispirali tri puta u otopinu fosfatnog pufera (eng. *Phosphate-Buffered Saline*, PBS; 1 x koncentriranog), pH=7,2 čime smo odstranili višak citratnog pufera.

3.4. Blokada endogene peroksidazne aktivnosti

Od ovog koraka pa nadalje, uzorke držimo u vlažnoj komori kako ne bi došlo do isušivanja, tj. uništenja.

Neke stanice u tijelu imaju mnogo enzima peroksidaze, koja u dodiru s vodikovim peroksidom i DAB-om daju lažno pozitivni signal, tj. dolazi do nespecifičnog obojenja tkiva. Aktivnost endogene peroksidaze se zato treba blokirati prije imunohistokemijskog postupka. Zato smo u ovom koraku uzorke tretirali s 3% otopinom vodikovog peroksida koja je uvijek morala biti svježije pripremljena (75 ml metanola, 75 µl 30% vodikovog peroksida u 25 ml destilirane vode), pripremljenu otopinu smo nakapali na uzorke (100 µl po preparatu). Zatim je slijedila inkubacija u marku od 15 minuta. Nakon inkubacije ispirali smo uzorke u otopini PBS 3 puta po 5 minuta, te nakon toga smo lagano i pažljivo obrisali višak pufera.

3.5. Blokada nespecifičnog vezanja

Primarno protutijelo i vezno protutijelo mogu adherirati na kolagen i druge proteine u tkivu što izaziva nespecifično bojenje pozadine. Mi smo koristili već pripremljenu otopinu za blokiranje (*Protein block serum-free-ready-to-use*, DAKO N.America Inc., Carpinteria CA 93013), te smo pripremljenu otopinu za blokiranje nakapali na uzorke kako bi se napravio sloj

koji sprječava nespecifično vezanje protutijela. Inkubacija s otopinom za blokiranje trajala je od 20 do 30 minuta, nakon toga je samo bilo potrebno ukloniti višak otopine.

Sljedeći je korak bila inkubacija s primarnim protutijelom. Mi smo koristili protutijelo beta-catenin-1, DAKO, Glostrup, Denmark za beta-katenin u razrjeđenju 1:200 i protutijelo DO-7; DAKO, Glostrup Denmark za p53 u razrjeđenju 1:25 koji detektira divlji tip i mutantni p53. Inkubacija uzoraka s primarnim protutijelom za beta-katenin i p53 trajala je preko noći na +4°C. Nakon toga slijedila su tri ispiranja u puferu PBS po 5 minuta. Zatim je slijedila inkubacija sa sekundarnim protutijelom, mi smo koristili već pripremljenu otopinu koja nam omogućuje vizualizaciju s visokom osjetljivošću *En Vision* (Dako REAL™ *En Vision*™, Dako Glostrup Denmark). Osnova *En Vision* je specifični enzim koji konjugiran s protutijelom. Inkubacija je trajala 20 min. Zatim smo ispirali uzorke 4 puta po 5 minuta u PBS puferu.

3.6. Obilježavanje kromogenom

Kako bismo mogli vidjeti vezanje protutijela uz antigen, inkubirali smo uzorke s kromogenom DAB. Koristili smo 1000 µl pufera *Dako REAL™ Substrate Buffer* i 20 µl DAB. Inkubacija je trajala 30 sekundi. Kao što je već spomenuto, oksidacijom DAB –a nastaje smeđi produkt koji se taloži te nam omogućuje vizualizaciju. Nakon inkubacije isprali smo kromogen tri puta destiliranom vodom po 10 minuta. Treba napomenuti da je DAB kancerogen te smo koristili zaštitu.

3.7. Histološko bojanje i dehidracija

Uzorke smo obojili pomoću hemalauna kako bismo bolje interpretirali lokalizaciju proteina u stanici, točnije jesu li prisutni u jezgri, citoplazmi i membrani. Ova boja specifično boji jezgre stanica plavo. Inkubacija u hemalaunu trajala je najviše 3 minute, te nakon inkubacije uzorke smo isprali tekućom vodom. Sljedeći korak je bio dehidracija preparata. Uzorci su prvo umočeni u 95 % etanol, dva puta u trajanju od 3 minute, zatim u apsolutni etanol dva puta u trajanju od 3 minute, te u ksilen dva puta u trajanju od 5 minuta. Potom smo na uzorke stavili kap otopine Histomounta (Agar Scientific a brand of Elektron Technology UK Ltd.) i potkrovnicu kako bismo mogli nesmetano mikroskopirati. Nakon što smo stavili Histomount ostavili smo uzorke da se osuše preko noći.

3.8. Analiza imunohistokemijskog bojanja

Imunohistokemijski obilježeni preparati analiziraju se pomoću svjetlosnog mikroskopa. Karakteristični dijelovi (koji odražavaju stanje cijelog preparata) fotografiraju se s kamerom na mikroskopu pomoću odgovarajućeg programa na računalu. Analizu imunohistokemijskog bojanja radi se u suradnji s dva neovisna promatrača. Analiza korelacije svih prikupljenih parametara radi se s adekvatnim statističkim metodama. Uzorci analizirani prema sljedećim karakteristikama: patohistološkoj dijagnozi, gradusu, spolu, dobi i razini ekspresije proteina određenoj semikvantitativnom metodom tj. dodjeljivanjem znakova (+). Jače obojena mjesta označavaju snažniju ekspresiju proteina te su im dodjeljenja +++, srednja ekspresija je označena s ++, a slaba ekspresija s +, dok je uzorcima koji ne pokazuju gubitak ekspresije dodjeljena nula. Stupanj ekspresije promatran je u jezgri (N), citoplazmi (C) i membrani (M). Nakon bojanja preparati se analiziraju na svjetlosnom mikroskopu pod povećanjem 40x i 20x. Dobiveni podaci se analiziraju pomoću hi-kvadrat (χ^2) testa i Pearsonovog koficijenta korelacije kako bismo ustanovili postoji li povezanost između zadanih parametara.

4. REZULTATI

Ukupno 59 uzoraka meningeoma je sakupljeno nakon operacije pacijenata i klasificirano prema kriterijama SZO, fiksirani su u formalinu i uklopljeni u parafin. Na tkivnim presjecima napravljeno je imunohistokemijsko bojanje s primarnim protutijelom na proteine beta-katenin i p53 i sa sekundarnim protutijelom obilježenim enzimom HRP. Nakon postupka imunohistokemijskog bojanja te kontrastnog bojanja s hemalaunom, proteini beta-katenin i p53 detektirani su u jezgrama, citoplazmi i membrani, što možemo vidjeti na primjerima različitih kategorija uzoraka na slici 5. Imunohistokemijski obilježeni preparati analizirani su pomoću svjetlosnog mikroskopa Olympus Provis Ax 70, Hrvatskog instituta za istraživanje mozga. Karakteristični dijelovi (koji su odražavali stanje cijelog preparata) fotografirani su kamerom na mikroskopu pomoću odgovarajućeg programa na računalu (Nikon Act1, USA). Kao negativnu kontrolu koristili smo uzorak kore zdravog mozga, a kao pozitivnu kontrolu preparat karcinoma mjehura. Analizu imunohistokemijskog bojanja napravili smo u suradnji s dva neovisna promatrača. Uzorci su analizirani prema sljedećim karakteristikama: patohistološkoj dijagnozi, gradusu, spolu, dobi i razini ekspresije proteina beta-katenina i p53 određenoj semikvantitativnom metodom tj. dodjeljivanjem znakova (+). Dobivene podatke analizirali samo pomoću hi-kvadrat (χ^2) testa i Pearsonovog koeficijenta korelacije kako bismo vidjeli postoji li povezanost između zadanih parametara. Statistička značajnost iznosi $p < 0.05$. Statističke analize rađene su u statističkom program SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Tablica 2. Kriterij za razvrstavanje razine ekspresije beta-katenina u kategorije

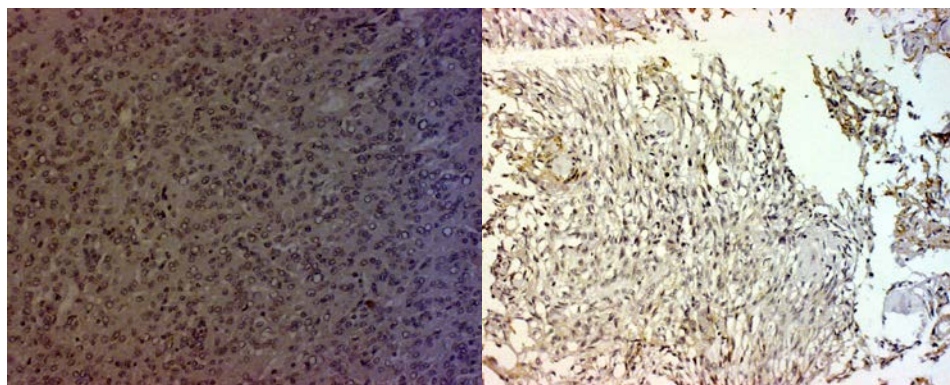
Gubitak ekspresije ili slaba ekspresija	0, +M, +C, +MC
Umjerena ekspresija	++C, ++MC
Jaka ekspresija ili transfer u jezgu	+N, +CN, ++CN, +++CN, +++C, +++N

Lokalizacija: membrana (M), citoplazma (C), jezgra (N), istovremeno u membrani i citoplazmi (MC), istovremeno u citoplazmi i jezgri (CN); razina ekspresije: gubitak ili slaba (0,+), umjerena (++), jaka (+++)

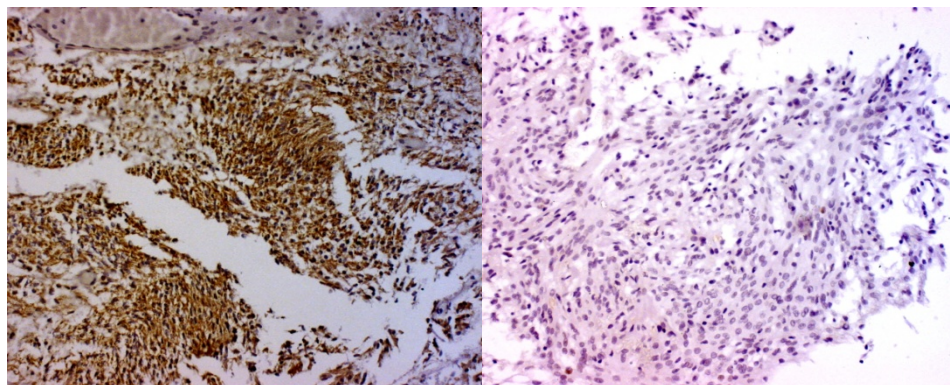
Tablica 3. Kriterij za razvrstavanje razine ekspresije p53 u kategorije

Gubitak ekspresije ili slaba ekspresija	0
Umjerena ekspresija	+N, +C, +CN
Jaka ekspresija	++N, +++N

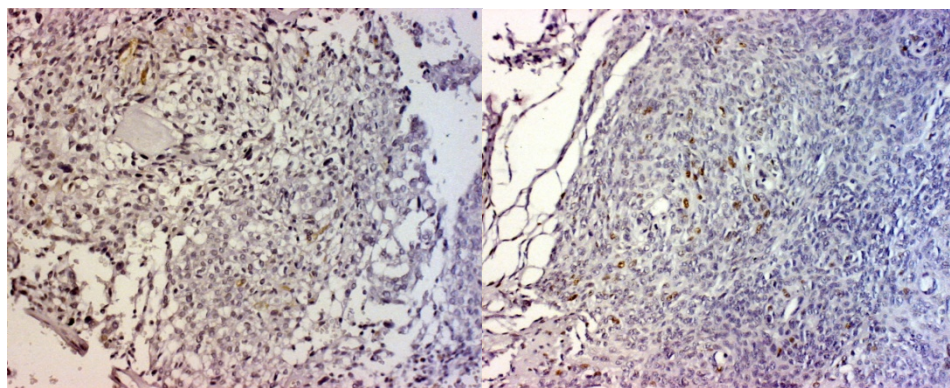
Lokalizacija: citoplazma (C), jezgra (N), istovremeno u citoplazmi i jezgri (CN); razina ekspresije: gubitak ili slaba (0), umjerena (+), jaka (++, +++)



A) B)



C) D)



E) F)

Slika 4. Prikaz rezultata nakon imunohistokemijskog bojanja (dodijeljena razina ekspresije, +-+++ na 20 x povećanju, A) beta-katenin (+, slaba ekspresija u citoplazmi), B) beta-katenin (++ , umjerena ekspresija u citoplazmi), C) beta-katenin (+++, jaka ekspresija u citoplazmi i jezgrama) D) p53 (+, slaba ekspresija u jezgrama), E) p53 (++ , umjerena ekspresija u jezgrama), F) p53 (+++, jaka ekspresija u jezgrama)

Tablica 4. Analiza imunohistokemijskog bojanja uzoraka

	Dob	Dijagnoza	Spol	Ekspresija p53	Ekspresija beta-katenina	Gradus
1.	72	Meningotelijalni	M	+N	0	I.
2.	68	Meningotelijalni	M	+N	+M	I.
3.	70	Meningotelijalni	Ž	+CN	+M	I.
4.	62	Meningotelijalni	Ž	+N	+M	I.
5.	64	Meningotelijalni	M	+N	+CN	I.
6.	65	Meningotelijalni	M	+C	+++CN	I.
7.	35	Meningotelijalni	M	+N	+M	I.

Tablica 4. - nastavak

8.	55	Meningotelijalni	Ž	+N	+MC	I.
9.	47	Meningotelijalni	Ž	0	0	I.
10.	70	Meningotelijalni	M	+N	+++CN	I.
11.	54	Meningotelijalni	M	0	++C	I.
12.	69	Meningotelijalni	Ž	+N	+++CN	I.
13.	52	Meningotelijalni	M	0	++N	I.
14.	70	Meningotelijalni	Ž	0	+++N	I.
15.	62	Meningotelijalni	Ž	0	++C	I.
16.	71	Meningotelijalni	M	0	++CN	I.
17.	40	Meningotelijalni	M	++N	+C	I.
18.	63	Meningotelijalni	Ž	0	+++CN	I.
19.	62	Meningotelijalni	M	++N	++C	I.
20.	75	Meningotelijalni	Ž	0	+++CN	I.
21.	54	Fibrozni	M	+N	0	I.
22.	63	Fibrozni	Ž	0	+N	I.
23.	63	Fibrozni	Ž	0	0	I.
24.	45	Fibrozni	M	0	0	I.
25.	51	Fibrozni	Ž	0	+++N	I.

Tablica 4. - nastavak

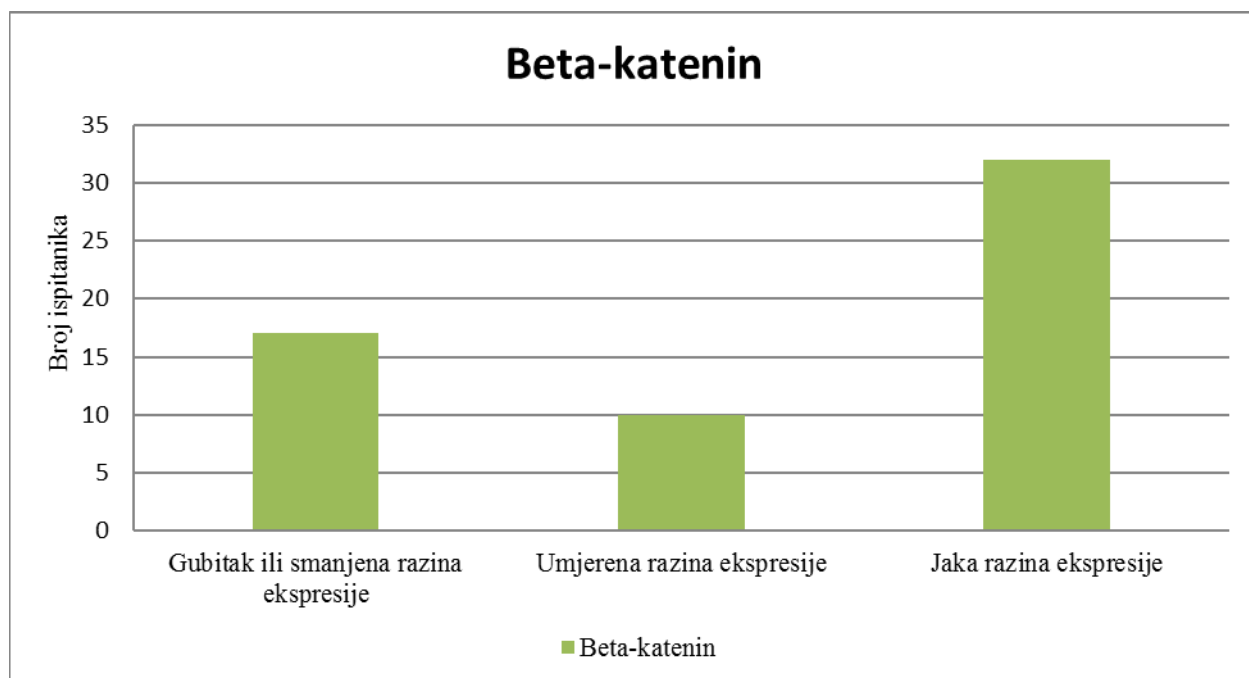
26.	73	Fibrozni	Ž	+CN	+++CN	I.
27.	66	Fibrozni	Ž	0	++C	I.
28.	64	Fibrozni	Ž	0	++CN	I.
29.	74	Fibrozni	Ž	0	++C	I.
30.	56	Tranzicijski	Ž	+N	+++CN	I.
31.	61	Tranzicijski	M	+N	++N	I.
32.	45	Tranzicijski	M	+N	++C	I.
33.	50	Tranzicijski	Ž	+N	+MC	I.
34.	72	Tranzicijski	Ž	0	+++CN	I.
35.	74	Tranzicijski	Ž	0	+CN	I.
36.	75	Tranzicijski	M	0	++C	I.
37.	32	Tranzicijski	M	0	++CN	I.
38.	77	Tranzicijski	M	0	+++CN	I.
39.	71	Tranzicijski	Ž	0	++CN	I.
40.	64	Tranzicijski	Ž	0	++C	I.
41.	66	Tranzicijski	Ž	0	+++CN	I.
42.	73	Tranzicijski	Ž	0	++CN	I.
43.	67	Tranzicijski	Ž	0	+CN	I.

Tablica 4. - nastavak

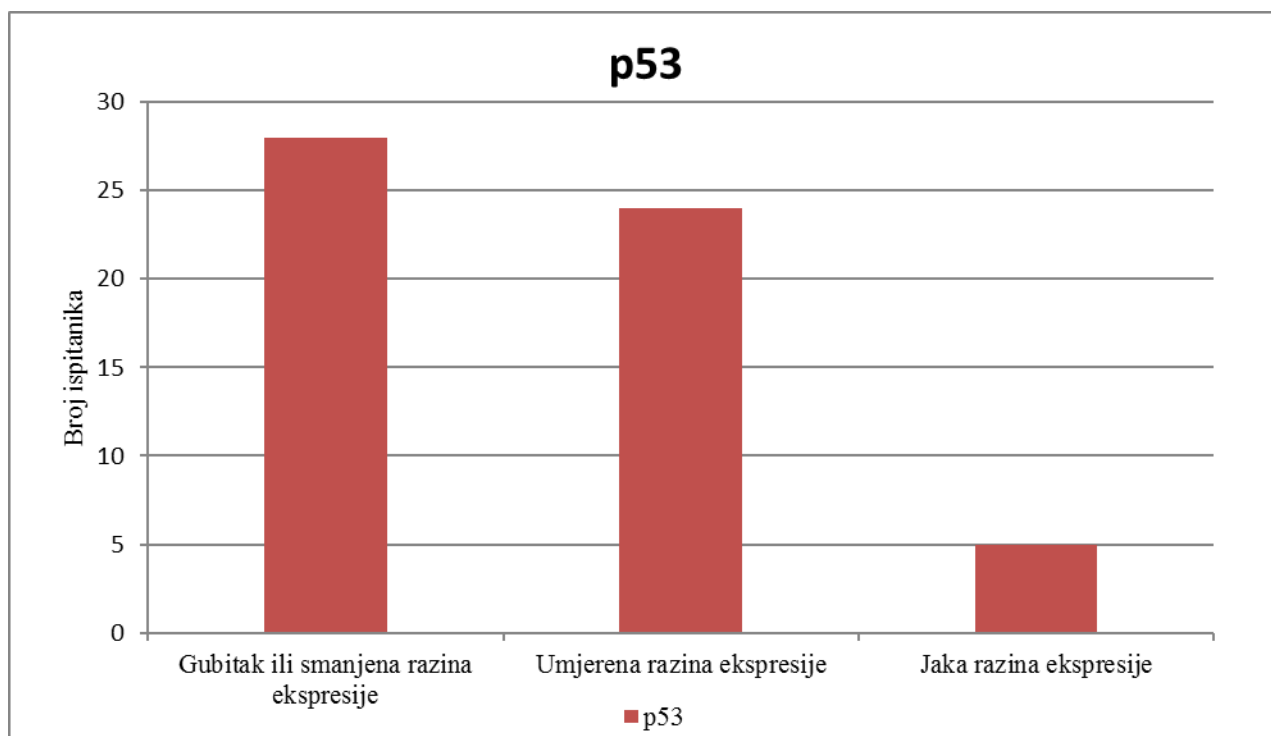
44.	73	Tranzicijski	M	+N	+MC	I.
45.	79	Tranzicijski	Ž	0	++ CN	I.
46.	61	Tranzicijski	Ž	0	+++C	I.
47.	60	Psamomatozni	Ž	+N	++N	I.
48.	66	Angiomatozni	M	+C	++CN	I.
49.	39	Angiomatozni	M	+N	0	I.
50.	70	Angiomatozni	Ž	0	+N	I.
51.	73	Angiomatozni	Ž	+N	++CN	I.
52.	78	Angiomatozni	M	+N	++CN	I.
53.	76	Atipični	M	++N	+M	II.
54.	56	Atipični	M	+N	++MC	II.
55.	73	Atipični	M	+N	++MC	II.
56.	71	Anaplastični	Ž	+++N	+C	III.
57.	69	Anaplastični	Ž	++N	+MC	III.
58.	68	Anaplastični	M	ND	++CN	III.
59.	68	Anaplastični	Ž	ND	++N	III.

ND = neodređen; 0 = gubitak ekspresije; + = slaba ekspresija, ++ = umjerena ekspresija, +++ = jaka ekspresija; lokalizacija: M = membrana; C= citoplazma; N = jezgra.

U našem smo istraživanju dokazali prisutnost ekspresije dvaju proteina, beta-katenina i p53 u meningeomima čovjeka. Istraživanje je obuhvatilo 59 ispitanika (33 ženskog i 26 muškog spola) u dobi od 32 do 78 godina. Srednja životna dob ispitanika iznosila je 63,4. Vodeći se oznakama za razinu ekspresije proteina beta-katenina navedenim u tablici 2., pokazali smo da od 59 ispitanika 17 (28,8%) pokazuje gubitak ekspresije ili slabu ekspresiju, 10 (16,9%) umjerenu ekspresiju, a 32 (54,2%) jaku ekspresiju beta-katenina (slika 5.). Ovi rezultati znače da ukupno 71,1% uzoraka bilježi akumulaciju beta-katenina. Iz oznaka za razinu ekspresije proteina p53 iz tablice 3. od 57 ispitanika, budući da su dva uzorka neodređena, 28 (49,1%) pokazuje gubitak ili slabu ekspresiju, 24 (6,77%) umjerenu ekspresiju i 5 (8,7%) jaku ekspresiju p53 (slika 6.).

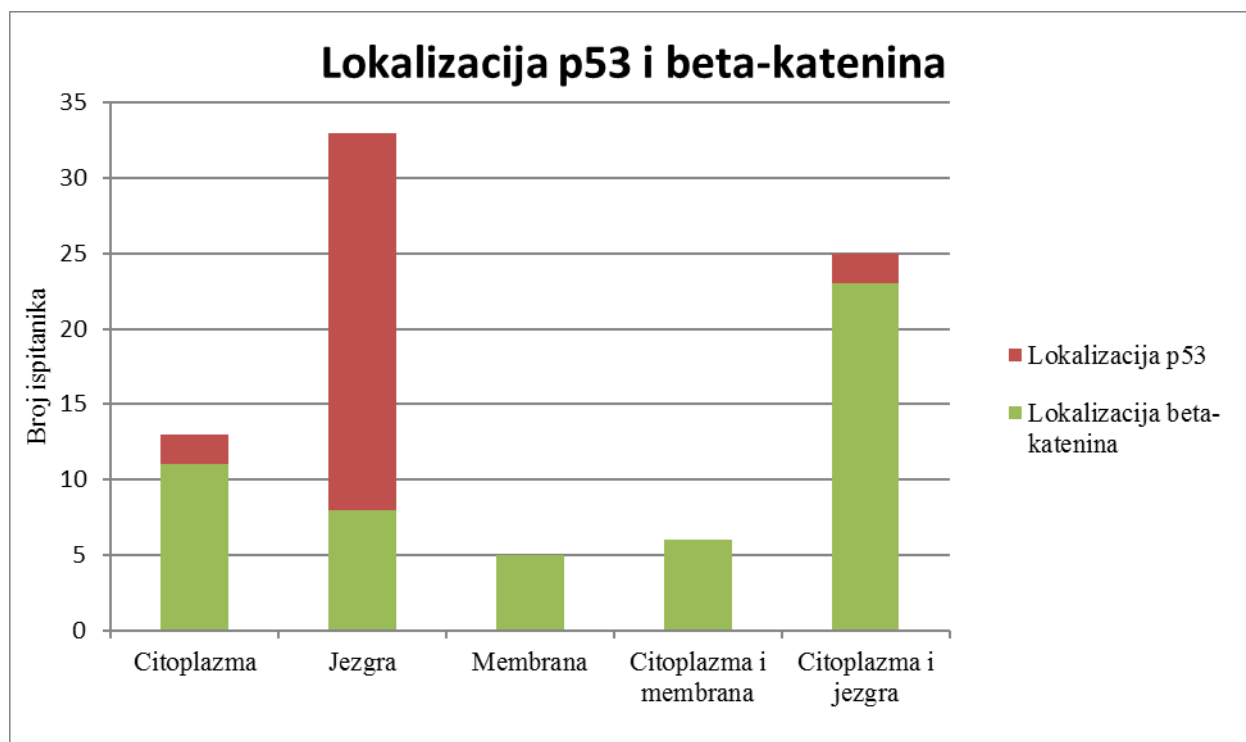


Slika 5. Razina ekspresije beta katenina u uzorcima meningeoma



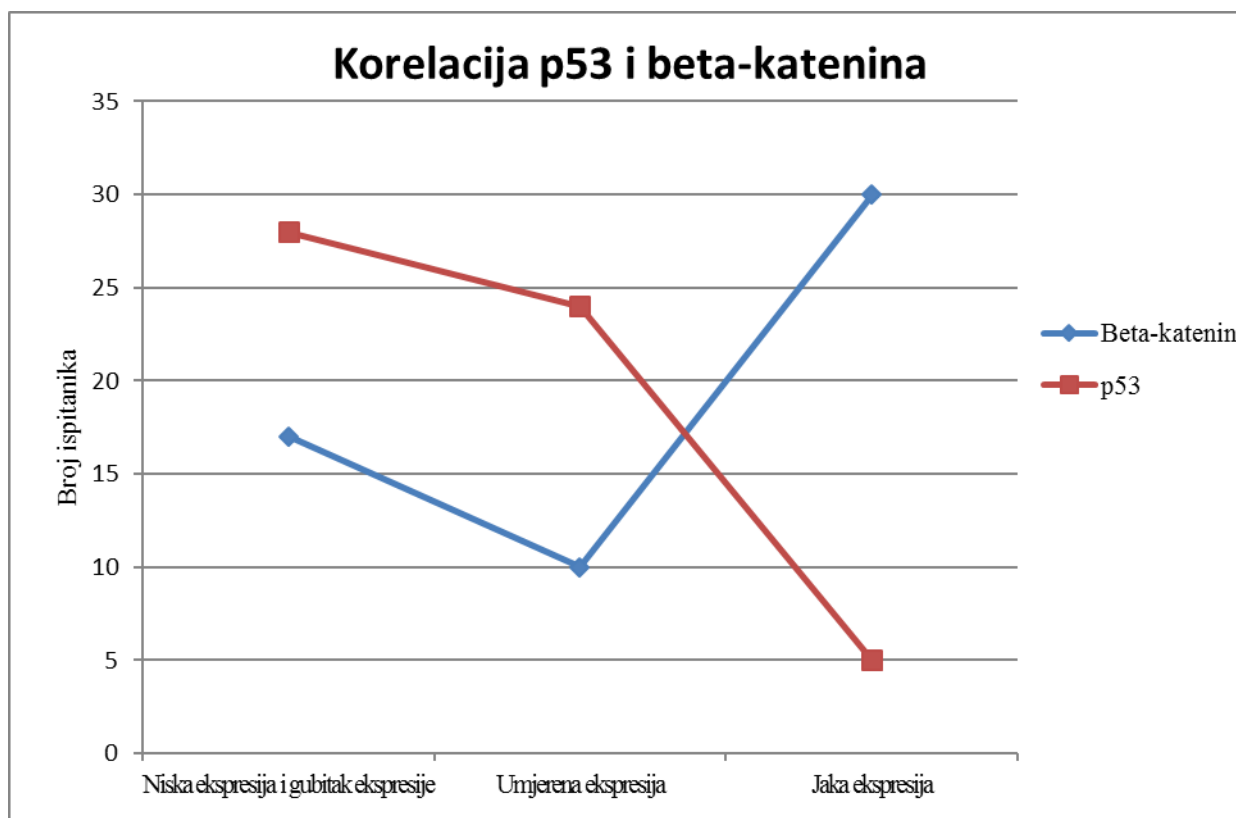
Slika 6. Razina ekspresije p53 u uzorcima meningeoma

Rezultati izraženosti ispitivanih proteina pokazuju da u analiziranim meningeomima postoji različit uzorak ekspresije s obzirom na lokalizaciju. Beta-katenin je najčešće lokaliziran istovremeno u citoplazmi i jezgri u 39% uzoraka, zatim samo u citoplazmi u 18,6% uzoraka. Lokalizacija beta-katenina u jezgri opažena je u 13,5% uzoraka, a najrjeđe je lokaliziran u membrani kod 8,5% ispitanih uzoraka. Istovremena lokalizacija beta-katenina u membrani i citoplazmi opažena je kod 10,2% ispitanih pacijenata. Protein p53 najčešće je lokaliziran u jezgri u 43,9% uzoraka dok istovremena lokalizacija u jezgri i citoplazmi nađena kod 3,5% uzoraka. p53 je bio isključivo u citoplazmi kod 3,5% preparata (slika 7.).



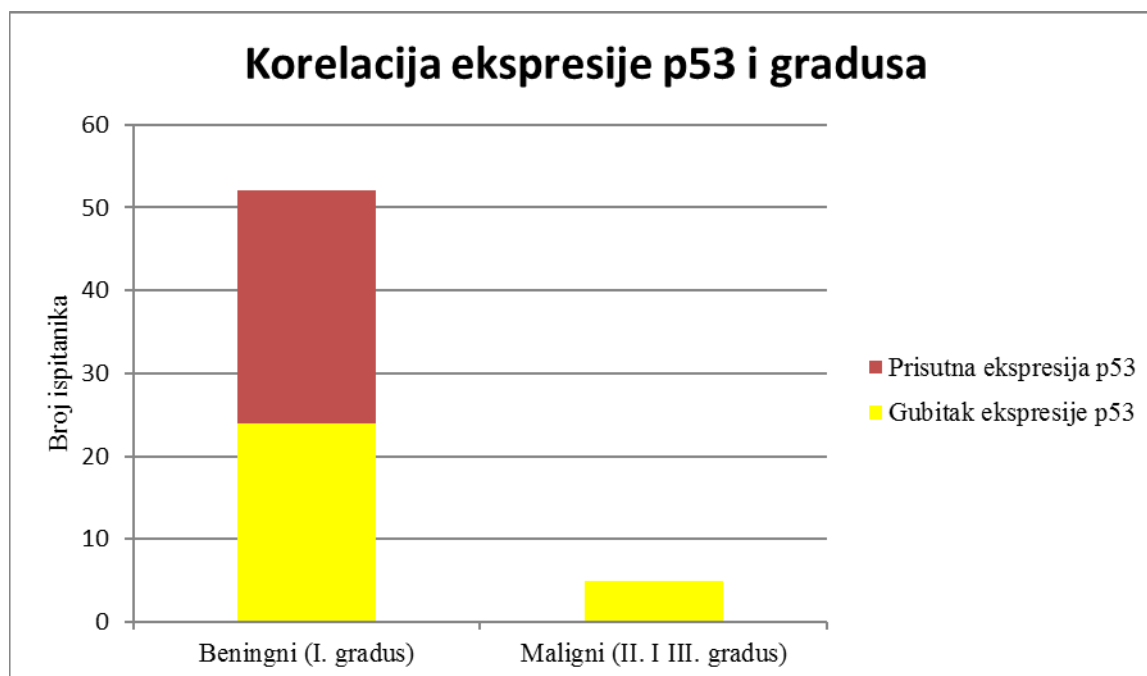
Slika 7. Analiza lokalizacije p53 i beta-katenina u meningeomima

Pomoću Personovog koeficijenta korelacije ($P=-0,410$; hi-kvadrat=0,002) ustanovljena je statistički značajna korelacija između intenziteta razine ekspresije između dva proteina. Razina ekspresije p53 i beta-katenina pokazuje značajnu inverznu povezanost unutar uzoraka. Budući da je analiza ekspresije beta-katenina i p53 rađena na istim pacijentima, rezultati ukazuju na moguću povezanost ova dva signalna puta (slika 8.).



Slika 8. Prikaz korelacije beta-katenina i p53. Vrijednosti ekspresije pojedinih proteina statistički su analizirani metodom Personovog koficijenta korelacije i hi-kvadrat testa

Naš sljedeći korak bio je ispitati imaju li razine i lokalizacije izraženosti dva proteina vezu s gradusom tumora. Histološki gradus tumora označava stupanj diferencijacije i broj mitotičkih stanica i u skladu je s agresivnošću tumora. Uzorci meningeoma kategorizirani su s obzirom na graduse - gradus I (meningotelijalni, fibrozni, tranzicijski, psamomatozni, angiomasozni) smatrani su benignima dok gradus II i III (atipični i anaplastični) malignima. Statistički rezultati analize podataka prema gradusu meningeoma i razinama ekspresije pokazuju da su gradusi II i III povezani s povišenom razinom ekspresije p53 (hi-kvadrat=40,417; $p=0,021$). Beta-katenin nije pokazao nikakvu korelaciju s višim gradusima meningeoma (slika 9.).



Slika 9. Prikaz korelacije ekspresije p53 i malignosti tumora. Statistička analiza napravljena metodom hi-kvadrat testa

Napravljena je analiza korelacije između veličine ekspresije p53 i beta katenina sa spolom i dobi ispitanika. U našem skupu uzorka meningeoma uočeno da je veća prevalencija kod žena nego muškaraca. Gubitak ekspresije proteina p53 zabilježen je u 65,6% ženskih pacijenata, a u 28% muških pacijenata. Ova razlika statistički je značajna. Kod žena je zabilježen češći gubitak ekspresije p53 u odnosu na muškarce (hi-kvadrat=7,950; sig=0,005). Beta-kenin je podjednako eksprimiran kod oba spola. Kod žena je u 75,7% ispitanika zabilježena povišena razina ekspresije, a kod muškaraca u 65,4%.

5. RASPRAVA

Kao što je već spomenuto u uvodu ovog rada, beta-katenin je multifunkcionalna molekula koja ima važnu strukturalnu ulogu, ali i ulogu u signalnom putu Wnt. U međustaničnim vezama beta- katenin uz alfa-katenin služi kao veza između kadherina i aktina. Kao signalna molekula stvara kompleks s kinazom GSK3, APC i aksinom, i ovisno o signalnim putevima, razgrađuje se ili ulazi u jezgru gdje stupa u interakciju s transkripcijskim čimbenicima LEF1/TCF što vodi do transkripcije ciljnih gena. Aktivacijom signalnog puta Wnt dolazi do inhibicije degradacije i akumulacije beta-katenina u jezgri stanice (Sadot i sur., 2001.). U našem smo radu pokazali da je beta-katenin prekomjerno izražen u meningeomima. Povišena razina ekspresije beta-katenina prisutna je u 71,2% od ukupnog broja uzoraka. Najčešće mjesto lokalizacije beta-katenina bila je jezgra i citoplazma u 54,2% od ukupnog broja uzoraka.

Brojna istraživanja pokazala su da je beta-katenin moćan onkogen te njegova akumulacija pridonosi procesu tumorigeneze u različitim vrstama tumora. Okidač akumulacije beta-katenina može biti povezan s mutacijama njegovog gena, zbog čega se mijenja mjesto fosforilacije. Zbog akumulacije odlazi u jezgru te dolazi do transkripcije gena koji sudjeluju u kontroli staničnog ciklusa kao što je ciklin D1 ili gena koji sudjeluju interakciji stanica i izvanstaničnog matriksa kao što su matrilizin, fibronektin i mnogi drugi (Sadot i sur.,2001., Clevers i Nusse, 2012.), te onkogene *c-myc*, *c-fos* itd.

Drugi protein koji smo istraživali, a čije mutacije su uključene u proces tumorigeneze je p53. Mutacije u genu za protein p53 javljaju se u otprilike 50% tumora (Sadot i sur., 2001.). U normalnim uvjetima protein p53 je latentan te kontrolira svoju ubrzanu ubikvitinsko-proteosomsku razgradnju. Mdm2 je E3 ubikvitin ligaza koja igra veliku ulogu u degradaciji proteina p53. Različita stanja kao što je oštećenje DNA, hipoksija, toplinski šok te izlaganje različitim mutagenima, dovode do ubrzane stabilizacije i aktivacije proteina p53. Aktivirani protein p53 u obliku transkripcijskog faktora utječe na stanični ciklus, poliferaciju, diferencijaciju, popravak DNA i starenje. Analizom ekspresije p53 u meningeomima utvrđeno je da 49,1% bolesnika pokazuje gubitak ekspresije proteina p53. Također je utvrđeno da je najčešća lokalizacija proteina p53 u jezgri . Slaba razina ekspresije p53 u jezgri i citoplazmi iznosila je 42,1% dok je umjerena i jaka razina ekspresije p53 lokalizirana u jezgrama iznosila 8,7%.

TP53 je gen koji je najčešće mutiran od svih poznatih gena uključenih u proces tumorigeneze. Oko 20-25% karcinoma dojke te više od 50% karcinoma mokraćnog mjehura, debelog crijeva i karcinoma pluća imaju mutacije gena *TP53*. Iako su mutacije pronađene u različitim kodonima, većina ih se nalazi u visoko konzerviranom mutacijskom klasteru unutar regije gena koja obuhvaća egzone 5 do 10.

Jedna od značajki tumora je sposobnost izbjegavanja apoptoze, a glavni čimbenik u aktivaciji apoptoze jest upravo *TP53* te je p53 poznat je kao "čuvar genoma". Protein p53 multimerni je kompleks i djeluje kao kontrolni mehanizam u kontrolnoj točki staničnog ciklusa u trenutku kada on prelazi iz faze G1 u fazu S. Ova interakcija zaustavlja stanični ciklus i sprječava DNA oštećenu da se replicira. Mutantni monomeri proteina p53 stabilniji su od normalnog nemutiranog p53 i mogu činiti komplekse s normalnim TP53 proteinom divljeg tipa.

Poznato je da je u tumorskim stanicama povišena razina mutantnih p53 te da je mutirani oblik puno stabilniji nego divlji tip p53. Zbog ovih činjenica možemo pretpostaviti da je pozitivno obojenje koje smo otkrili, a koje se javlja tijekom imunohistokemijske detekcije, zapravo detekcija prisutnosti mutantnih proteina p53 (Muller and Vousden, 2013.). Zadnjih godina često se istražuje aberantna akumulacija beta-kenina u tumorima, a postoje i studije koje govore o vezi signalnog puta Wnt i p53 signalizacije posebno tijekom razvoja kolorektalnog tumora (Levina i sur., 2004.; Li i sur., 2015.). Sadot i sur. (2001) smatraju da rana onkogenska aktivacija beta-kenina zbog različitih mutacija vezana uz povećanu frekvenciju mutacija na genu za p53.

Sadot i sur. (2001) su pokazali da prekomjerna aktivnost beta katenina može zaustaviti ciklus aktivacijom p53, čime bi se spriječio proces tumorigeneze. Iako novija istraživanja pokazuju da postoji određena interakcija između p53 i signalnog puta Wnt (Sadot i sur., 2001.; Levina i sur., 2004.; Kim i sur., 2011.; Okayama i sur., 2014.), sami mehanizam do danas nije jasan. Naši rezultati o obrnutoj razini ekspresije ova dva proteina u skladu su s nalazima o međusobnom djelovanju ova dva signalna puta. Statističkom analizom razine ekspresije vidljivo je da postoji inverzna, točnije negativna korelacija između beta-kenina i p53 ($P=-0,410$; $hi-kvadrat=0,002$), što ukazuje na moguću hipotezu da gubitak ekspresije p53 dovodi do povišene razine beta-kenina i aktivacije signalnog puta Wnt.

U različitim istraživanjima uočeno je da postoji moguća komunikacija između signalnog puta Wnt i p53 ostvarena preko različitih proteina, gena i signalnih putova. Istraživanja su također zabilježila mogućnost da p53 inhibira signalni put Wnt. p53 može utjecati na samu dinamiku Aksina 2 i GSK-3 kinazu. GSK-3 je serin/treonin kinaza uključena u različite stanične procese od metabolizma glikogena do regulacije staničnog ciklusa i proliferacije. GSK-3 također može potaknuti apoptozu ovisnu o p53. Sami detalji mehanizma GSK-3 kao posrednika između p53 i signalnog puta Wnt nisu u potpunosti razjašnjeni (Dobel i sur., 2003.).

Naši rezultati ukazuju na korelaciju između proteina beta-katenina i p53 i njihovih putova u meningeomima. U nedavnom istraživanju Okayama i sur. (2014) primijetili su da utišavanjem gena za p53 u stanicama kolorektalnog tumora dolazi do povećanja transkripcijske aktivacije putem beta-katenina i TCF/LEF, čime se i poveća razina samih produkata signalnog puta Wnt, dok ponovna aktivacija p53 u stanicama koje su prvotno bile utišane vodi smanjenju transkripcijske aktivnosti beta-katenina i TCF/LEF. Također, inverzna korelacija ovih proteina utvrđena je u istraživanjima Sadot i sur. (2001) na stanicama H1299 (eng. *human non-small cell lung carcinoma cell line*), gdje je pokazano da visoka razina funkcionalnog p53 može smanjiti razinu beta-katenina te ujedno njegovu mogućnost transkripcijske aktivnosti. Inaktivacija ili povećana frekvencija mutacija gena p53 često je zabilježena u raku dojke, pluća, grlića maternice koji također pokazuju visoku ekspresiju i akumulaciju beta-katenina (Cagaty i Ozturk, 2002.).

Nekoliko istraživanja pokazalo je korelaciju između razine ekspresije p53 i gradusa meningeoma. Ustanovljeno je da je gubitak ekspresije p53 često povezan s benignim meningeomima (gradus I.) dok je akumulacija p53 povezana s malignim meningeomima (gradus II. i III.) (Wang i sur., 1995.), što je potvrđeno i u našem radu gdje smo statističkom analizom pokazali da je p53 u korelaciji s višim gradusima meningeoma ($hi\text{-}kvadrat=5,292$; $sign=0,021$). Beta-katenin nije pokazao statistički značajnu korelaciju s gradusom tumora.

Prepoznavanje promjena u molekulama koje su odgovorne za nastanak i progresiju meningeoma te osvijetljavanje mehanizama povezanosti signalnih puteva u tumorskim stanicama mozga, od velikog je značaja jer tako možemo ponuditi potencijalne dijagnostičke biljege i otvoriti nove molekularne mete za terapijske intervencije.

6. ZAKLJUČAK

U ovom radu istražena je razina ekspresije proteina beta-katenina i p53 u meningeomima pomoću imunohistokemijske metode. Analizom 59 uzoraka meningeoma rezultata utvrđena je povišena razina ekspresije beta-katenina u 71,2% od ukupnog broja uzoraka, a njegovo najčešće mjesto lokalizacije bila je jezgra i citoplazma u 54,2% od ukupnog broja uzoraka. Analizom ekspresije p53 utvrđeno je da 47,5% meningeoma pokazuje gubitak ekspresije proteina p53. Najčešća lokalizacija proteina p53 u uzorcima koji ga ekspimiraju je u jezgri. Slaba razina ekspresije p53 zabilježena je u jezgrama i citoplazmi te iznosi 42,1% dok umjerena i jaka razina ekspresije p53 lokalizirana samo u jezgrama iznosi 8,7%. Statističkom analizom razine ekspresije vidljivo je da postoji obrnuta korelacija između beta-katenina i p53 ($P=-0,410$; $\text{hi-kvadrat}=0,002$). Ovaj rezultat ukazuje na mogućnost da gubitak ekspresije p53 dovodi do povišene razine beta-katenina i aktivacije signalnog puta Wnt. Također pokazuje moguću povezanost signalnih putova Wnt i p53.

Rezultati ukazuju na mogućnost da povišena razina ekspresija protein beta-katenina u jezgrama meningeoma može biti rezultat gubitka ekspresije proteina p53. Ova spoznaja bi mogla otvoriti vrata razvoju novih lijekova u borbi protiv tumora.

7. LITERATURA

Bradač, GB., Ferszt, R, Kendall, BE. (1990): Cranial Meningiomas Diagnosis-Biology-Therapy, iz Springer Berlin Heidelberg, 2-15.

Bargonetti J, Friedman PN, Kern SE, Vogelstein B, Prives C. (1991): Wild-type but not mutant p53 immunopurified proteins bind to sequences adjacent to the SV40 origin of replication. *Cell* 65: 1083–1091.

Cagatay T, Ozturk M. (2002): p53 mutation as a source of aberrant β -catenin accumulation in cancer cells. *Oncogene* 21: 7971 – 7980.

Carvalho LH., Smirnov I, Baia GS., Modrusan Z, Smith JS., Jun P, Costello JF., McDermott MW., VandenBerg SR., Lal A. (2007): Molecular signatures define two main classes of meningiomas. *Molecular Cancer* 6: 64-74.

Choy W, Kim W, Nnagasawa D, Stramotas S, Yew A, Gopen Q, Parsa AT, Yang I. (2011): The molecular genetics and tumor pathogenesis of meningiomas and the future directions of meningioma treatments. *Neurosurgical Focus* 30: 1-7.

Clevers H, Nusse R. (2012): Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease. *Cell* 149: 1192-1205.

Eliyahu D, Michalovitz D, Eliyahu S, Pinhasi-Kimhi O, Oren M. (1989): Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proceedings of the National Academy of Science* 86: 8763–8767.

Finlay CA, Hinds, PW, Levine, AJ (1989): The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57: 1083–1093.

DeLeo, AB, Jay, G. (1979): Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proceedings of the National Academy of Science* 76: 2420–2424.

Doble BW i Woodgett JR. (2003): GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of Cell Science* 116: 1175-1186.

Glavina-Durdov M. (2011): Imunohistokemija u istraživanju novotvorina. *Biologija novotvorina* 1: 1-11.

Grujičić M, Vučković N, Vuleković P. (2010): Osnovne morfološke karakteristike meningeoma. *Medicinski pregled* 63: 237-240.

Haupt Y, Maya, R, Kazaz A, Oren M. (1997): Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387: 296–299.

Honda R, Tanaka H. (1997): Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 420: 25–27.

Kafka A, Bašid-Kinda S, Pećina-Šlaus, N. (2014): “The cellular story of dishevelleds”, *Croatian Medical Journal* 55: 459–467.

Kato M, Katoh M. (2007): WNT Signaling Pathway and Stem Cell Signaling Network. *Clinical Cancer Research* 13: 4042–4045.

Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B (1991): Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 252: 1708–1711.

Kim NH, Kim HS, Kim NG, Lee I, Choi HS, Li XY, Kang SE, Cha SY, Ryu JK, Na JM, Park C, Kim K, Lee S, Gumbiner BM., Yook JI, Weiss SJ. (2011): p53 and microRNA-34 are suppressors of canonical Wnt signaling. *Science Signaling* 4: 1-29.

Kobet E, Zeng X, Zhu Y, Keller D, Lu H. (2000): MDM2 inhibits p300-mediated p53 acetylation and activation by forming a ternary complex with the two proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 12547–12552.

Komiya Y, Habas R. (2008) Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4: 68–75.

Kress M, May E, Cassingena R, May P. (1979): Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *Journal of Virology* 31: 472–483.

Kubbutat, MH, Jones, SN i Vousden KH (1997): Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387: 299–303.

Lane, DP i Crawford, LV (1979): T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278: 261–263.

Levina E, Oren M, Ben-Ze’ev A. (2004): Down-regulation of beta-catenin by p53 involves changes in the rate of beta-catenin phosphorylation and Axin dynamics. *Oncogene* 23: 4444–4453.

Li XL, Zhou J, Chen ZR, Chng WJ. (2015): p53 mutation in colorectal cancer-molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World Journal of Gastroenterology* 21: 84–93.

Linzer, DI i Levine, AJ. (1979): Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17: 43–52.

Louis, DN, Ohgaki, H, Wiestler, OD, Cavenee, WK., Burger, PC., Jouvett, A., Scheithauer, B.W., i sur. (2007): The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica* 114: 97–109.

McDermott MW, Quinones-Hinosa A, Fuller GN i Wilson CB. (2002): *Cancer in the Central Nervous System* iz Oxford University Press 2: 69–299.

Melero, JA, Stitt DT, Mangel, WF i Carroll RB. (1979): Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in SV40-infected and -transformed cells. *Virology* 93: 466–480.

Michaelson JS i Leder P. (2001) β -catenin is a downstream effector of Wnt-mediated tumorigenesis in the mammary gland. *Oncogene* 20: 5093 – 5099

Mikels AJ i Nusse R. (2006): Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* 25: 7461–7468.

Muller PA I Vousden KH. (2014): Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* 25: 304-317.

Nakano K, Vousden, KH. (2001): PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular Cell* 7: 683–694.

Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T. (2000): Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288: 1053–1058.

Okayama S, Kopelovich L, Balmus G, Weiss RS, Herbert BS, Dannenberg AJ, Subbaramaiah K. (2014): p53 protein regulates Hsp90 ATPase activity and thereby Wnt signaling by modulating Aha1 expression. *The Journal of Biological Chemistry* 289: 6513-6525.

Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. (1992): Amplification of a gene en-coding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 358: 80-83.

Pećina-Šlaus, N. (2010): Wnt signal transduction pathway and apoptosis. *Cancer cell international* 10: 1-22.

Pećina-Šlaus, N, Nikuševa Martid T, Tomas D, Beros V, Željko M, Cupić, H. (2008): Meningiomas exhibit loss of heterozygosity of the APC gene. *Journal of neuro-oncology* 87: 63–70.

Ragel, BT i Jensen RL. (2005): Molecular genetics of meningiomas. *Neurosurgical focus* 19: 1–8.

Poy F i Lepourcelet M, Shivdasani RA i Eck MJ. (2001): Structure of a human Tcf4– β -catenin complex. *Nature structural biology* 8: 1053-1057.

Sabol Z, Kipke-Sabol LJ, Miklić P, Hajnšek-Propadalo S, Sabol F. (2006): Neurofibromatoza tip 2 (Centralna neurofibromatoza ili bilateralni akustički neuromi, vestibularni švanomi): od fenotipa do gena. *Liječnički vjesnik* 128: 309-316.

Sadot E, Geiger B, Oren M, Ben-Ze'ev A. (2001): Down-regulation of beta-catenin by activated p53. *Molecular and Cellular Biology* 21: 6768–6781.

Schwartzbaum J, Fisher JL, Aldape KD i Wrensch M. (2006): Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nature clinical practice neurology* 2: 494-503.

Serna E, Morales JM, Mata M, Gonzalez-Darder J, San Miguel T, Gil-Benso R, Lopez-Gines C, Cerda-Nicolas M, Monleon D. (2013): Gene Expression Profiles of Metabolic Aggressiveness and Tumor Recurrence in Benign Meningioma. *Public Library of Science ONE* 8: 67291-67302.

Strano S, Dell'Orso S, Di Agostino S, Fontemaggi G, Sacchi A, Blandino G. (2007): Mutant p53: an oncogenic transcription factor. *Oncogene*, 26: 2212–2219.

Vogelstein, B., Sur, S i Prives, C. (2010): p53: The Most Frequently Altered Gene in Human Cancers. *Nature Education* 3: 1-6.

Xu W i Kimelman D. (2007): Mechanistic insights from structural studies of β -catenin and its binding partners. *Journal of Cell Science* 120: 3337-3344.

Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. (1991): Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352: 345–347.

Wang JL, Zhang ZJ, Hartman M, Smits A, Westermarck B, Muhr C, Nistér M. (1995): Detection of TP53 gene mutation in human meningiomas: a study using immunohistochemistry, polymerase chain reaction/single-strand conformation polymorphism and DNA sequencing techniques on paraffin-embedded samples. *International Journal of Cancer* 64: 223-228.

8. ŽIVOTOPIS

Monika Logara

Datum rođenja: 29.11.1990.

Adresa: Tvrdavica 3a, 31 000 Osijek

Kontakt: 0038591 723 87 85, monika.logara@gmail.com

Obrazovanje

09/2013 - 09/2015 Magistar molekularne biologije (u procesu)

Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
(Hrvatska)

Modul: Molekularna biologija

Diplomski rad: Ekspresija gena za beta-katenin i p53 u
meningeomima

09/2009 – 09/2013 Prvostupnik biologije

Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
(Hrvatska)

Modul: Eksperimentalna biologija

Završni rad: Endosimbiotski postanak plastida

Znanstvene aktivnosti i usavršavanje

2015 Pećina-Šlaus N, Kafka A, Vladušić T, Logara M, Tomas D, Hrašćan R. Important developmental pathways - p53 and Wnt are implicated in meningioma etiology. GlowBrain Final Conference., Zagreb,

2014 The IntegraLife Workshop on Scientific publishing and intellectual property protection in life sciences, Zagreb-

2014 Znanstveni piknik, Zagreb

2013 Laboratorijska stručna praksa, Klinički bolnički centar Zagreb, Rebro, Laboratorij za dijagnostiku

2011 Festival znanosti: Biološki sat, Osijek

Osobne vještine

Znanje jezika

- Hrvatski – materinji
- Engleski – napredno

Računalne vještine

- Microsoft Office™, OpenOffice uredski alati
- Operativni sustavi: Windows, Systems, Applications & Products in Data Processing