Optimizacija metode multipleks lančane reakcije polimerazom za umnažanje mikrosatelitnog biljega gena Dishevelled 3 u meningeomima čovjeka

Skoko, Josip

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:217:540787

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

Josip Skoko

Optimizacija metode multipleks lančane reakcije polimerazom za umnažanje mikrosatelitnog biljega gena *Dishevelled 3* u meningeomima čovjeka

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj rad je izrađen 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 eksperimentalne biologije.

Želim se zahvaliti Prof. dr. sc. Nives Pećina-Šlaus za vodstvo i pruženu priliku da svoj diplomski rad izradim na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga u Laboratoriju za neuroonkologiju.

Također se želim zahvaliti Prof. dr. sc. Nadi Oršolić koja je za mene uvijek imala otvorena vrata i uvijek je bila spremna pomoći, a najviše za inspiraciju i uzor u znanosti.

Posebna zahvalu zaslužuje Dipl ing. Anja Kafka, BS, MS za blisku suradnju i veliku pomoć prilikom izvođenja i pisanja diplomskog rada uz čije društvo je vrijeme brže prolazilo.

Želim se zahvaliti svojim roditeljima i sestri jer su uvijek pružali beskrajnu podršku i imali vjeru u mene. Omogućili su mi da završim još jednu etapu u svojoj životnoj avanturi i zato im veliko hvala.

Za kraj želim se zahvaliti svojim cimerima i prijateljima na svim druženjima, probdijenim satima, veselim trenutcima i jednostavno na uspomeni koju ću uvijek pamtiti. Dragi Gepekovci (Ana, Iva, Jelena, Stipe), Branimir, Katja i Vesna hvala vam od srca.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno - matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

OPTIMIZACIJA MULTIPLEKS LANČANE REAKCIJE POLIMERAZOM ZA UMNAŽANJE MIKROSATELITNOG BILJEGA GENA *DISHEVELLED 3* U MENINGEOMIMA ČOVJEKA

Josip Skoko

Rooseveltov trg 6, 10000, Zagreb, Hrvatska

Meningeomi su spororastući, benigni, primarni intrakranijalni tumori koji nastaju iz mekih moždanih ovojnica, preciznije iz meningotelijalnih stanica arahnoideje. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (*SZO*) klasificiraju se kao benigni (I. stupnja), atipični (II. stupnja) i anaplastični ili maligni (III. stupnja). Važnu ulogu pri embrionalnom i neuralnom razvoju, staničnoj proliferaciji i diferencijaciji različitih organizama ima signalni put Wnt koji je uključen i u proces tumorigeneze. Aktivacija puta odvija se preko membranskih receptora Frizzled, a može ga aktivirati oko 20 različitih liganda Wnt-a. Prvi citoplazmatski protein koji sudjeluje u prijenosu signala je fosfoprotein Dishevelled 3. Ukoliko je signalni put Wnt aktivan dolazi do inaktivacije degradacijskog kompleksa što rezultira nakupljanjem beta-katenina u citoplazmi, a zatim i u jezgri i to dovodi do transkripcije ciljanih gena i u konačnici do procesa tumorigeneze. Multipleks lančana reakcija polimerazom metoda je koja nam omogućuje analizu genetičkih promjena i genomske nestabilnosti gena *DVL3*. Metodu smo uspješno optimizirali i specifično umnožili miskrosatelitni biljeg gena *DVL3* kao i kontrolne biljege SHGC-68373 i APEX1. Mikrosatelitni biljeg pokazao se uspješnim u otkrivanju 2 MSi (9,52%) i 5 amplifikacija (23,81%) gena *DVL3* u našem uzorku meningeoma. Daljnom analizom gena *DVL3* utvrditi ćemo njegovu ulogu u tumorigenezi meningeoma.

(45 stranica, 6 slika, 6 tablica, 51 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: Tumori, signalni put, Wnt, optimizacija
Voditelj: Dr.sc. Nives Pećina-Šlaus, red. prof., Medicinski fakultet, Zagreb
Suvoditelj: Dr.sc. Nada Oršolić, red. prof., Prirodoslovno - matematički fakultet
Ocjenitelji: Dr.sc. Nada Oršolić, red. prof., Prirodoslovno - matematički fakultet
Dr.sc. Petar Kružić, doc., Prirodoslovno - matematički fakultet
Dr.sc. Dubravko Pavoković, doc., Prirodoslovno - matematički fakultet

Rad prihvaćen: 5. veljače 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

OPTIMIZATION OF MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION METHOD FOR THE AMPLIFICATION OF MICROSATELLITE MARKER OF *DISHEVELLED 3* GENE IN HUMAN MENINGIOMAS

Josip Skoko

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Meningiomas are frequent benign tumours derived from the arachnoid cells. It has been well documented that wnt genes and other components of wnt signaling are critical for mammalian embryogenesis. Wnt signaling is essential in development because it acts as a regulator of the embryonic cell patterning, proliferation, differentiation, cell survival and apoptosis. The Wnt proteins bind to receptors of the Frizzled family on the cell surface. Through several cytoplasmic relay components, the first one being protein Dishevelled, the pathway is activated and the beta-catenin destruction complex is inhibited. The result is accumulation of beta-catenin in cytoplasm, which then enters the nucleus to activate transcription of Wnt target genes and tumorigenesis begins. Multiplex polymerase chain reaction is method used to analyze genetic changes and genomic instability of gene *DVL3*. We have achieved optimization of the method and we have specifically amplified the microsatellite marker of *Dishevelled 3* gene along with control markers SHGC-58373 i APEX1. Further research is needed to establish the role of DVL3 gene and Wnt signaling in tumorigenesis of menigioma. The marker proved useful in revealing 2 MSI (9,52%) and 5 amplifications (23,81%) of *DVL3* gene in our meningioma sample.

(45 pages, 6 figures, 6 tables, 51 references, original in: croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library
Key words: Tumor, signaling pathway, WNT, optimization
Supervisor: Dr.sc. Nives Pećina-Šlaus, Prof., Faculty of Medicine, Zagreb
Cosupervisor: Dr.sc. Nada Oršolić, Prof., Faculty of Science, Zagreb
Reviewers: Dr.sc. Nada Oršolić, Prof., Faculty of Science, Zagreb
Dr.sc. Petar Kružić, Asst. Prof., Faculty of Science, Zagreb
Dr.sc. Dubravko Pavoković, Asst. Prof., Faculty of Science, Zagreb

Thesis accepted: 5th Februrary 2015.

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Tumori 1

1.1.1. Meningeomi 2

1.2. Signalni put Wnt 5

1.2.1. Proteini porodice Dishevelled 8

1.3. Nestabilnost genoma i mikrosatelitni biljezi 10

1.4. Multipleks lančana reakcija polimerazom 11

2. Cilj istraživanja 14

3. Materijali i metode 15

3.1. Uzorci tkiva 15

3.2. Metoda izolacije DNA iz tumorskog tkiva fenolom i kloroformom 16

3.3. Izolacija DNA iz pune krvi metodom isoljavanja 17

3.4. Određivanje koncentracije i čistoće DNA 18

3.5. Optimizacija multipleks lančane reakcije polimerazom 19

3.6. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu 21

3.7. Elektroforeza DNA u Spreadex gelu 21

3.8. Bojanje gelova i vizualizacija 22

4. Rezultati 23

4.1. Uzorci tkiva 23

4.2. Mjerenje koncentracije i čistoće DNA 24

4.3. Optimalni uvjeti reakcije multipleks PCR i provjera njene uspješnosti 25

4.4. Spreadex elektroforeza 26

5. Rasprava 30

6. Zaključak 33

7. Literatura 34

8. Životopis 38

1. Uvod

1.1. Tumori

Stanice komuniciraju putem kompleksne mreže signalnih proteina kako bi održavale osnovne stanične funkcije poput rasta, proliferacije, razvoja i preživljenja (Natarajan i sur., 2006). Promjena svojstva stanice i poremećaji staničnih funkcija, kao posljedica genomskih promjena i nestabilnosti genoma stanice, uzrokuju pojavu tumora ili neoplazmi (Cui i sur., 2007). Tumori su rezultat nekontroliranog rasta klonske populacije abnormalnih stanica nekog tkiva (Rakoff-Nahoum, 2006). Tumori mogu biti benigni ili maligni. Napredovanje malignih tumora ima 6 osnovnih obilježja koja tumor postupno stječe tijekom karcinogeneze. To su održavanje proliferacije, izbjegavanje mehanizama apoptoze, otpornost na supresore rasta, induciranje angiogeneze, neograničen potencijal dijeljenja i glavno obilježje malignosti, aktivacija invazije u tkivo i metastaziranje u okolna tkiva (Hanahan i Weinberg, 2011).

Razvoj malignog tumora tj. karcinogeneza ima tri, odnosno četiri stupnja: inicijaciju, promociju i progresiju odnosno metastaziranje. Inicijacija je ireverzibilni proces u kojemu se događaju genetičke ili epigenetičke promjene signalnih proteina, protoonkogena ili tumorsupresorskih gena unutar stanice što rezultira gubitkom kontrole nad staničnim procesima i stanica postaje zloćudno preobražena (Rakoff-Nahoum, 2006). Od jedne maligne transformirane stanice razvije se klonska populacija malignih stanica (Nowell, 1976). Promocija je pak reverzibilni proces koji u manjem dijelu ovisi o djelovanju promotivnih, tj. karcinogenih čimbenika, dok u većem dijelu ovisi o količini čimbenika koji izazivaju inicijaciju. Progresija je opet ireverzibilni proces praćen uočljivim genomskim promjenama. Maligne stanice obilježava značajan rast u masi i veličini tumora, invazija tumora u tkivo i proširivanje malignih stanica po organizmu (metastaziranje).

Dva su osnovna tipa genetičkih promjena karakteristična za genom tumorskih stanica: akumulacija somatskih mutacija i zadobivanje genomske nestabilnosti. Genomske promjene mogu biti točkaste mutacije, amplifikacije gena, delecije gena ili kromosomske promjene. Ove promjene uzrokuju gubitak kontrole nad staničnim procesima posljedica čega je rast i preživljenje klonske populacije „inicijacijskih stanica“, odnosno promocija.

1.1.1. Meningeomi

Prvi koji je u modernom smislu upotrijebio termin meningeomi bio je Harvey Cushing 1922. godine. Meningeomi su primarni tumori mozga i leđne moždine. Nastaju od meningoendotelijalnih stanica arahnoidne ovojnice, ali mogu nastati od bilo koje meningealne strukture. Većinski su benigni, rastu vrlo sporo, dobro su ograničeni, učahureni (Bradač i sur., 1990). Mogu izazivati simptome poput kronične intrakranijalne hipertenzije, glavobolje, mišićne pareze/paralize, epileptičkih napadaja, ispada senzibiliteta, vidnih poremećaja, promjena intelekta i osobnosti, poremećaje moždanih i živčanih funkcija (Sabol i sur., 2006).

Meningeomi čine oko 25% svih primarnih intrakranijalnih i intraspinalnih neoplazmi (Pećina-Šlaus, 2012). Najčešće se pojavljuju kod odraslih osoba, srednje životne dobi, od 50 do 60 godina (Ragel i Jensen 2005). Meningeomi su rijetki intrakranijalni tumori u dječjoj dobi i adolescenciji, jednako zastupljeni u oba spola i čine 0,4–4,1% svih tumora kod djece (Buschmann i sur., 2005) odnosno 1–2% svih intrakranijalnih tumora (Bradač i sur., 1990; Caroli i sur., 2006). Iznimno su rijetki u djece mlađe od godinu dana, ali njihova pojava ima manje povoljnu prognozu (Bradač i sur., 1990). Godišnja učestalost meningeoma je dva puta veća kod žena nego kod muškaraca, odnosno 2 do 7 na 100.000 žena i od 1 do 5 na 100.000 muškaraca (muškarci : žene = 1,4 : 2,8) (Kleihues i sur., 2002; Monleon, 2012). Veća prevalencija meningeoma kod žena nego kod muškaraca postoji samo kod benignih meningeoma (stupanj I.), dok su agresivniji histološki tipovi meningeoma (stupanj II. I III.) učestaliji kod muškaraca (Monleon, 2012). Meningeomi su češći na lijevoj strani mozga (55,5%), a najčešća lokalizacija meningeoma je frontalna regija (36,5%). Meningeomi su učestaliji u prednjoj lubanjskoj jami (85,4%) nego u stražnjoj lubanjskoj jami (14,6%) (Kleihues i sur., 2002).

Etiologija meningeoma je nedovoljno istražena ali se kao glavni etiološki faktor najčešće spominje izloženost ionizirajućem zračenju. Povećana učestalost meningeoma kod žena upućuje na vezu između progesteronskih, estrogenskih i testosteronskih receptora i razvoja tumora. Također je zabilježena povećana pojavnost tumora kod pacijenata koji koriste hormonske terapije (kontracepcijske tablete i nadomjesni hormoni) (Michaud i sur., 2010; Monleon, 2012).

Prema klasifikaciji Svjetske Zdravstvene Organizacije (SZO) meningeomi se patološki dijele u tri stupnja (Louis i sur., 2007):

- Benigni (I. stupanj) – 92% meningeoma – meningotelijski, fibrozni, tranzicijski (mješoviti), psamomski, angiomatozi, multipli
- Atipični (II. stupanj) – 5% meningeoma – horoidni, svijetlostanični, atipični
- Maligni (III. stupanj) – 3% meningeoma – papilarni, rabdoidni, anaplastični

Pri određivanju stupnja meningeoma u obzir se uzimaju histopatološki podtipovi meningeoma kojih je do sada opisano 15 (Jain i sur., 2010), njihova vjerojatnost za recidiv, kao i biologija tumora odnosno agresivnost i vjerojatnost za invaziju tkiva i metastaziranje (Ragel i Jensen, 2005). Stupnjevanje tumora na benigne, atipične i maligne najkorisniji je histološki pokazatelj sklonosti za recidiv.

Benigne meningeome karakterizira spor, ekspanzivan rast i visok postotak izlječenja kirurškom ekscizijom (Caroli i sur., 2006). Makroskopski, benigni meningeomi su čvrsti, bjeličasti, zrnaste površine, jasno ograničeni od okolnog dijela mozga koji komprimiraju, ali ne infiltriraju (Bradač i sur., 1990). Benigni meningeomi mogu stimulirati stvaranje nove kosti (hiperostoza) u susjednom dijelu lubanje. Učestalo vrše invaziju okolne kosti, tvrde moždanice i njenih sinusa, paranazalnih sinusa i orbite (Bajtarević, 2006). Navedene karakteristike benignih meningeoma ne utječu bitno na stupanj maligniteta meningeoma, dok invazija moždanog parehnima može predstavljati znak prelaska tumora u viši stupanj maligniteta.

Tumor supresorski geni (antionkogeni) su geni čiji gubitak funkcije rezultira nekontroliranom staničnom proliferacijom i razvitkom tumora. Maligna progresija meningeoma vjerojatno je povezana i s inaktivacijom tumor supresorskih gena na kromosomima 14q11.2, 22q12.2 te 8p22-p21.3 (Ragel and Jensen, 2005). Najčešći tumor supresorski geni koji se povezuju s razvojem meningeoma su *NF2, DAL-1, TIMPs, CDKN2A, CDKN2B* (Carvalho i sur., 2007). Jedna od najčešćih genetskih promjena je delecija kromosoma 22q kojom je zahvaćen gen za neurofibromatozu tipa II (*NF2)* na poziciji 22q12 (Pećina-Šlaus i sur., 2008). Gen *NF2* je specifični tumor supresorski gen čija bialelna inaktivacija rezultira gubitkom proteina merlina i može se povezati s razvojem multiplih meningeoma i švanoma (Sabol i sur., 2006). Kod 60% meningeoma prisutna je inaktivirajuća mutacija drugog alela *NF2* gena (Pećina-Šlaus i sur.,

2008). Gubitak ekspresije proteina merlin pronađen je u svim meningeomima vezanim uz NF2 kao i u polovici sporadičnih, benginih slučajeva (Fuller and Perry, 2005). Protein merlin ima ulogu u regulaciji stanične proliferacije u ljudskim tumorskim stanicama (Sabol i sur., 2006).

Kod dvije trećine meningeoma uočeni su poremećaji tumor supresorskih gena za kontrolu staničnog ciklusa na kromosomu 9p uključujući *CDKN2A (p16^{INK4a})* , *p14^{ARF}* i *CDKN2B (p15^{INK4b})* (Boström i sur., 2001; Ono, Ueki, i sur., 1996). Zabilježeno je puno kraće vrijeme preživljenja kod pacijenata s meningeomima i delecijom tumor supresorskog gena *CDKN2A* (Halaka i sur., 1983; Gutmann i sur., 2000; Ragel and Jensen, 2005).

Veliki broj citogenetičkih promjena u meningeomima povezano je s prisustvom dicentričnih ili prstenastih kromosoma, kao i gubitkom dijela kromosoma 1p, 6q, 7, 9p, 10, 14q, 18q, 19 i 20. Također je uočena amplifikacija kromosoma 1q, 9q, 12q, 15q, 17q i 20q (Ragel and Jensen, 2005).

Rijetke genetičke promjene meningeoma su delecija gena *PTEN* (10q23), delecija gena *CDKN2C* (1p32) i amplifikacija gena *RPS 6KB1* (17q23) (Boström i sur., 2001). Na kromosomu 7 nisu nađeni tumor supresorski geni povezani s meningeomima (Ragel and Jensen, 2005). Gubitak heterozigotnosti gena *DAL-1* na kromosomu 18p11.3 pronađen je u 60% sporadičnih meningeoma (Gutmann i sur., 2000). Dokazano je da invazivni tipovi meningeoma proizvode signifikantno manje proteina TIMP-1 u usporedbi s neinvazivnim meningeomima (Halaka i sur., 1983). Kod intrakranijalnih tumora uključujući i meningeome pronađena je prisutnost rijetkih alela gena *Ha-ras i c-mos* u višoj učestalosti nego kod zdravih ispitanika. Ekspresija *TP73 i bcl-2* povezana je s višim histopatološkim stupnjem meningeoma Ostali onkogeni povezani s razvojem meningeoma su *c-myc, c-fos i STAT3* (Ragel and Jensen, 2005) Gen *DAL-1* također se povezuje s razvojem meningeoma. Tkivni inhibitori, kakav je i *DAL1*, proteini su koji pomažu u regulaciji stanične proliferacije, apoptoze i angiogeneze (Fernandez i sur., 1999). Tumor supresor gen *CDH1* je važan modulator signalnog puta Wnt i njegova netaknuta ekspresija povezana je s nižim stopama recidiva meningeoma (Mawrin and Perry, 2010). *SFRP1 i BCR* također imaju ulogu u patogenezi meningeoma (Ragel and Jensen, 2005).

1.2. Signalni put Wnt

Signalni put Wnt igra ključnu ulogu u velikom broju bioloških procesa. Djeluje kao regulator stanične proliferacije, diferencijacije, stanične adhezije, te staničnog preživljenja i apoptoze (Pećina-Šlaus, 2010) što upućuje da je jedan od glavnih puteva bitnih za ispravnu embriogenezu. Također ima višestruko važnu ulogu za razvoj središnjeg živčanog sustava gdje dolazi do rearanžmana sinapsi što zahtijeva ekspresiju molekularnih sudionika signalnog puta Wnt (Ille and Sommer, 2005). Do danas je potvrđeno da ima važnu ulogu u nastanku meduloblastoma, ali i drugih tumora kao što su karcinom maternice, jetre, želuca, kolona, dojke (Fodde and Brabletz, 2007; Gao and Chen, 2010).

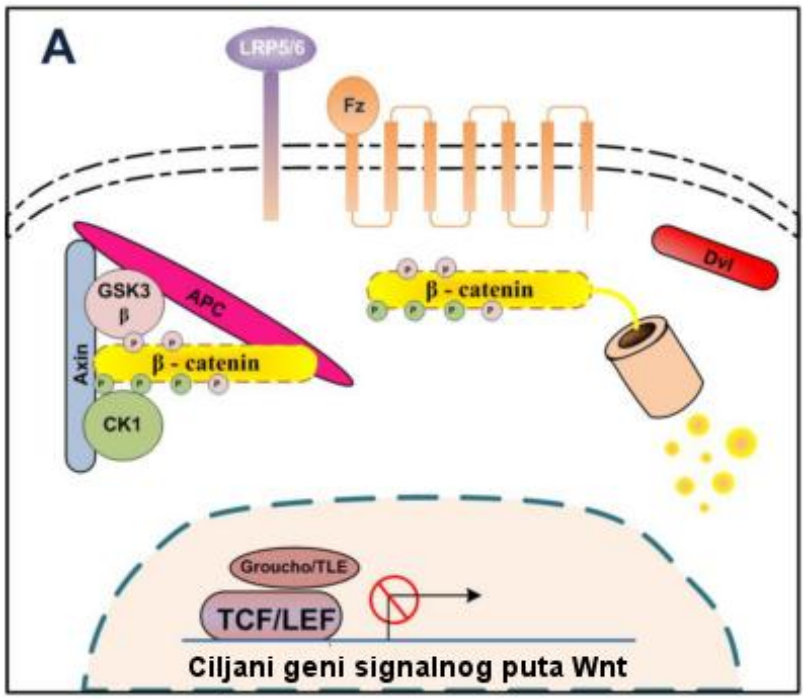
Signalni put Wnt aktivira se putem transmembranskih receptora Frizzled (Fz), a može ga aktivirati oko 20 različitih liganda Wnt-a što dovodi do aktivacije niza unutarstaničnih signala te aktivacije transkripcije ciljnih gena (Clevers, 2006). Nakon vezanja liganda za receptor postoji nekoliko puteva aktivacije daljnje kaskade događaja, a koji se mogu svrstati prema mehanizmu djelovanja u put prijenosa signala ovisan o beta-kateninu (nazvan još i kanonski put) i put prijenosa signala neovisan o beta-kateninu.

Put neovisan o beta-katenin odvija se putem aktivacije receptora osjetljivih na kalcij ili PCP (od engl. *planar cell polarity*) koji koristi alternativni put aktivacije preko unutarstaničnih proteina kao što je protein DVL čijom aktivacijom dolazi do reorganizacije citoskeleta i organela te ciljane migracije stanica kojima se potiče rast određenih tkiva i morfogeneza.

Kanonski put (beta-kateninski) najbolje je istražen, a odgovoran je za nakupljanje beta-katenina u citosolu stanice. Ukoliko dođe do međudjelovanja liganda i receptora, beta-katenin se nakuplja unutar stanice te se premješta u jezgru stanice gdje djeluje kao koaktivator transkripcijskog faktora TCF/LEF čime započinje proces transkripcije ciljanih gena (Leonard and Ettensohn, 2007).

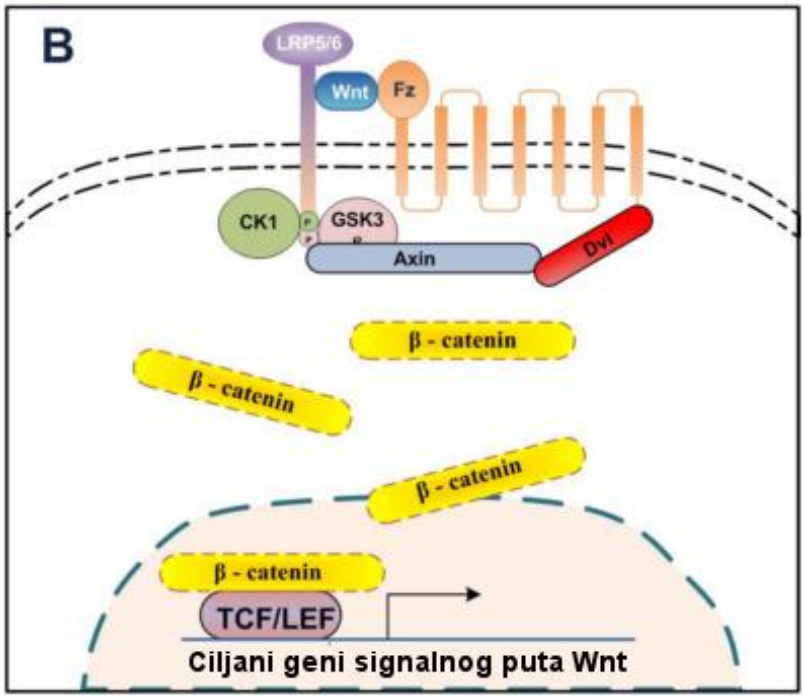
Kada je signalni put Wnt neaktivan, odnosno ukoliko ne dođe do međudjelovanja liganda i receptora, u stanici dolazi do razaranja beta-katenina i samim time se obustavlja prijenos signala do jezgre stanice i proces transkripcije gena. Degradacija beta-katenina odvija se u citosolu putem multiproteinskog degradacijskog kompleksa koji se sastoji od aksina (AXIN), APC (engl. *adenomatous polyposis coli*), CK1 (engl. *casein kinase 1*) i GSK3β kinaze (engl.

glycogen synthase kinase-3β), a čija je uloga potpomaganje dvostupanjske fosforilacije, posljedične ubikvitinacije, a u konačnici i razgradnje beta-katenina proteasomima (Slika 1).



Slika 1. Signalni put Wnt u neaktivnom stanju i njegove ključne komponente. Preuzeto i modificirano iz Kafka i sur., 2014.

Aktivirani receptor u suradnji s proteinom LRP5 (engl. *low-density lipoprotein receptor related protein 5*) aktivira citoplazmatski protein *Dishevelled* (od engl. *dishevel* = stvaranje nereda), koji u suradnji s GBP (engl. *GSK3β binding protein*) inhibira kinazu GSK3β (Doble i sur., 2003; Ilyas, 2005). Inhibicijom kinaze GSK3β dolazi do stabilizacije beta-katenina, što dovodi do njegovog nakupljanja u staničnoj jezgri, stvaranja kompleksa beta-katenina s transkripcijskim čimbenikom TCF4/LEF (engl. *T cell factor 4/lymphoid enhanced factor*) te pokretanja procesa transkripcije 20-ak različitih ciljanih gena signalnog puta Wnt koji kodiraju za protoonkogene c-myc, N-myc, c-jun, i ciklin D1 što objašnjava zašto poremećaji signalnog puta Wnt mogu uzrokovati tumore.



Slika 2. Signalni put Wnt u aktivnom stanju i njegove ključne komponente. Preuzeto i modificirano iz Kafka i sur., 2014.

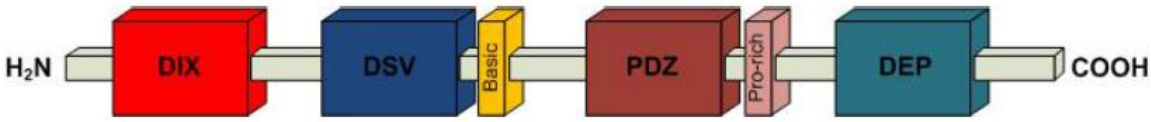
Beta-katenin pokreće transkripciju i neovisno o kompleksu beta-katenin/TCF/LEF, putem transkripcijskog čimbenika FoxO, koji regulira sintezu ARF, pozitivnog regulatora tumor supresora p53 (Shtutman i sur., 2002). Osim aktivacije transkripcije, ima ulogu i u stabilizaciji međustaničnih spojeva, služeći kao premosnica između E-kadherina i aktina. Beta-katenin direktno inhibira transkripcijski čimbenik NF-κB, čime se inhibira niz unutarstaničnih procesa uključenih u apoptozu (Deng i sur., 2002).

Aktivacija singnalnog puta Wnt događa se ukoliko su neke od kompenenata degradacijskog kompleksa mutirane i nefunkcionalne. APC ima antiapoptotičku aktivnost neovisnu o stabilizaciji beta-katenina, putem kaspaze-8 te u slučaju inaktivirajuće genetske mutacije APC dolazi i do inhibicije apoptoze (Steigerwald i sur., 2002). Iako beta-kateninski sustav može biti aktiviran i fiziološki putem analoga Wnt, mutacija APC dovodi do daleko jače ekspresije reguliranih gena te samim time i do nastanka tumora. Signalni put se inaktivira kada su razine beta-katenina niske.

1.2.1. Proteini porodice Dishevelled

Proteini porodice Dishevelled (DVL) otkriveni u vinskoj mušici *Drosophilla melanogaster*. Kod čovjeka su otkrivena tri homologna proteina Dishevelled (DVL1, DVL2 i DVL3). To su multifunkcionalni citoplazmatski fosfoproteini, komponente su kanonskog (Wnt/beta-katenin), nekanonskog (engl. *planar cell polarity*, PCP) i Wnt-Ca^{2+} signalnog puta Wnt (Wharton, 2003).

Svi proteini DVL posjeduju iste konzervirane domene: amino-terminalnu DIX (Dishevelled, Aksin), središnju PDZ (Postsynaptic density 95, Disc Large, Zonula occludens-1) i karboksi-terminalnu DEP (Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin) (Kafka i sur., 2014). Osim ove tri konzervirane domene, DVL također ima dvije konzervirane regije s pozitivno nabijenim aminokiselinama. Prva se naziva osnovnom regijom (engl. *basic*) i sastoji se od serinskih i treoninskih ostataka koji se protežu između DIX i PDZ domena, a druga je regija bogata prolinom, SH3 (*src* homology 3) vezna domena smještena nizvodno od PDZ (Slika 3).



Slika 3. Struktura proteina Dishevelled s konzerviranim domenama i regijama. Preuzeto i modificirano iz Kafka i sur., 2014.

Gen *DVL1* pozicioniran je na lokusu 1p36, njegov protein je dugačak 695 aminokiselina, gen *DVL2* nalazi se na lokusu 17q21, protein mu je dugačak 736 aminokiselina dok se gen *DVL3* nalazi na lokusu 3q27 s proteinom dugim 176 aminokiselina. Također, poznate su i dvije izoforme humanog DVL1 i dvije DVL3 stvorene alternativnim prekrajanjem, dok je kod DVL2 poznata samo jedna izoforma (Lee i sur., 2008).

Svaki protein DVL kod sisavaca može funkcionirati kooperativno kao i samostalno, što je dokazano eksperimentima u *knock-out* miševima, a to ukazuje da DVL protein kod sisavaca mogu funkcionirati kao mreža s nekim zajedničkim karakteristikama.

DVL se smatra ključnim regulatorom koji sprječava razgradnju beta-katenina u citosolu. Vezanjem signalnih molekula na membranske receptore DVL se aktivira i stupa u direktan kontakt s receptorima Frizzled. Receptori Frizzled su transmembranski receptori koji sedmerostruko prolaze kroz membranu stanice i u suradnji sa njihovim koreceptorima LRP5 i LRP6 tvore membranski receptorski kompleks. Ovaj događaj je bitan za fosforilaciju Frizzled koreceptora LRP5/6 s fosfokinazama GSK3β i CK1. Fosforilacija pak aktivira koreceptore LRP5/6 koji vežu AXIN što za posljedicu ima vezanje AXIN-a za membranu i nemogućnost da sudjeluje u degradacijkom kompleksu beta-katenina. AXIN, osim što se može vezati za koreceptore LRP5/6, također se može vezati i za DVL koji inhibira aktivnost AXIN-a u degradacijskom kompleksu beta-katenina. Wnt signal uzrokuje vezanje AXIN-a za koreceptore LRP5/6 ili za DVL vezan na Fz. U oba slučaja rezultat je nakupljanje beta-katenina u citosolu stanice i posljedično prijenos u jezgru stanice, aktiviranje transkripcijskih faktora TCF/LEF i konačno aktivacija prepisivanja ciljanih gena.

Iako uloga domena i regija DVL-a nije u potpunosti razjašnjena, poznato je da on reagira s više od 50 veznih partnera u citoplazmi i jezgri. No, unatoč tome, DVL nema poznatu enzimatsku aktivnost. Poznati mehanizam pozitivne regulacije aktivnosti DVL-a je fosforilacija proteina, dok se vrlo malo zna o utjecaju njegovih posttranslacijskih modifikacija na aktivnost, stabilnost i regulatorni mehanizam. Unatoč tome, znamo da se vezanjem Wnt molekule na receptor inducira fosforilacija u glavnim regijama DVL-a. Modificirani DVL se razgrađuje protesomalno ili lizosomalno različitim ubikvitinacijom. Protein fosfataza 2A (PP2A) je također uključena u regulaciju aktivnosti DVL, a može imati pozitivan ili negativan učinak, ovisno s kojom se subregulatornom domenom DVL-a veže (Jung i sur. 2013).

Funkcionalne posljedice ekspresije proteina iz obitelji Dishevelled u nastanku tumora još uvijek nisu u potpunosti jasne. Većina radova upućuje na prekomjernu ekspresiju i amplifikaciju, dok neki od njih čak upućuju i na delecije lokusa DVL. Od posebnog interesa kada se istražuje veza DVL-a i tumora je proces koji je odgovoran za invaziju i metastaze tumora, tzv. epitelno-mezenhimska tranzicija (EMT). Pojava ovog procesa tijekom napretka tumora je vrlo slična razvojnom procesu što donekle pojašnjava mehanizme koji upravljaju metastazama gdje neinvazivne tumorske stanice postaju pokretljive te se šire na mjesta udaljena od primarnih. Istraživanja su pokazala povezanost puta Wnt sa EMT te da su svi homolozi DVL-a uključeni u nastanak metastaza.

1.3. Nestabilnost genoma i mikrosatelitni biljezi

Nestabilnost genoma koja je karakteristična za tumorske stanice može se kategorizirati kao mikrosatelitna nestabilnost (engl. *microsatellite instability*, MSI ili MIN) i kromosomska nestabilnost (engl. *chromosomal instability*, CIN). Kromosomska nestabilnost karakteristična je po velikim kromosomskim abnormalnostima poput viška ili manjka čitavog kromosoma (aneuploidija), jednog od krakova kromosoma ili pak dijelova kromosoma. Uzrok kromosomske nestabilnosti je nepravilna segregacija i poravnanje kromosoma tijekom mitoze. Mikrosatelitna nestabilnost nastaje zbog nedostataka mehanizama za popravak grešaka molekule DNA, a koje se događaju zbog nesavršenosti enzima DNA polimeraze prilikom sinteze kratkih ponavljajućih sljedova nukelotida tijekom replikacije. Ovaj tip popravka naziva se popravak *mismatch*.

Mikrosateliti su jednostavne ponavljajući slijed nukleotida u DNA prisutne u prokariotskim i eukariotskim genomima (Tóth i sur., 2000). Osim mikrosatelita upotrebljavaju se nazivi jednostavni ponavljajući slijed (SSRs) ili kratka tandemska ponavljanja (STRs). Ponavljajući slijed mikrosatelita ima 1-6 parova baza, za razliku od minisatelita, koji broje više od 10, a manje od 100 parova baza (Bhargava and Fuentes, 2010). Mikrosateliti se nalaze razmješteni po cijelom genomu, a procjenjuje se da ima do 100 000 mikrosatelitnih ponavljanja (Koreth i sur., 1996). Najčeći mikrosatelit u zdravim ljudskim stanicama je ponavljajući dinukleotid CA, koji se ponavlja nekoliko desetaka tisuća puta kroz cijeli genom (Lever and Sheer, 2010). Vrlo su genetički nestabilni što pokazuje njihova povišena mutabilnost *in vivo* i *in vitro* kao i činjenica da se odlikuju visokim polimorfizmom i ponovljivošću u ljudskoj populaciji Zbog toga imaju efikasnu primjenu u mapiranju genoma u populacijskoj genetici, selekciji te otkrivanju genotipova kao i dokazivanju srodnosti i očinstva, a služe i kao genski biljezi. Također omogućuju utvrđivanje kvantitativnih promjena alelnih gena poput gubitka heterozigotnosti (engl. *loss of heterozygsity*, LOH), a koriste se i za utvrđivanje mikrosatelitne nestabilnosti.

Polimorfizam obično uključuje promjenu samo jednog nukleotida (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*), gubitak (deleciju) manjeg ili većeg dijela slijeda u molekuli DNA, umetanje određenog broja nukleotida ili pak ponavljanja di-, tri- ili oligonukleotida različit broj puta, a koji varira među pojedincima. SNP je polimorfizam jednog nukleotida u kojem je

jedan od četiri nukleotida (A, T, C ili G) zamijenjen drugim. SNP-ovi uzrokuju promjenu slijeda u DNA. U ljudskom genomu ima oko 15 milijuna SNP-a, od kojih 50.000 do 100.000 može promijeniti funkciju ili izražaj gena. Kako je učestalost 70% SNP-a u populaciji manja od 5%, nazivamo ih rijetkim SNP-ovima (Shastry, 2009).

Unatoč činjenici da se malo zna o biološkoj značajnosti mikrosatelita (koji obuhvaćaju oko 4% genoma sisavaca) usporedno s drugim genetičkim elementima te o njihovoj mutacijskoj dinamici, u upotrebi su već 20 godina kao važni genetički biljezi. Potreba za daljnjom analizom nameće se sama po sebi. Potrebna su daljnja saznanja o njihovoj evoluciji, prijenosu između vrsta, mogućoj ulozi i položaju unutar genoma.

1.4. Multipleks lančana reakcija polimerazom

Lančanu rekaciju polimerazom (PCR) prvi je pokazao Kary Mullis kao metodu umnažanja (amplifikacije) *in vitro* samo jedne kopije gena sisavaca koristeći DNA polimeraze iz bakterije *Escherichia coli* (Mullis i sur., 1986). Od tada je primjena PCR-a nezaobilazna metoda u molekularnoj biologiji. Koristi se kao jedna od temeljnih metoda u forenzičkoj analizi, otkrivanju osoba i utvrđivanju očinstva (Rachlin i sur., 2005), dijagnozi infektivnih i raznih drugih bolesti (Elnifro i sur., 2000).

PCR omogućuje umnažanje željenog ulomka DNA u kontroliranim *in vitro* uvjetima. Temelji se na sparivanju specifičnih oligonukleotidnih početnica (engl. *primer*) i sintezi kopija određenog ulomka DNA. Za izvođenje osnovnog PCR-a potreban je uzorak DNA čiji ulomci će biti umnoženi, 2 oligonukleotidne početnice (kratki slijedovi jednolančane DNA, svaka od početnica je komplementarna kratkom slijedu jednog od lanaca DNA čije ulomke umnažamo), slobodni nukleotidi (deoksinukleozid trifosfati, dNTP) i enzim DNA polimeraza koja katalizira sintezu novih kopija DNA dodavanjem slobodnih nukleotida pravilnim redoslijedom.

Prvobitni PCR izvodio se uz pomoć DNA polimeraze izolirane iz bakterije *E. coli* što je zahtijevalo ponovno dodavanje enzima u reakacijsku smjesu nakon svakog ciklusa. Otkriće termostabilne DNA polimeraze označilo je veliki napredak u razvoju i izvođenju metode PCR. Termostabilne DNA polimeraze izolirane su iz dvaju vrsta organizama: termofilnih i

hipertermofilnih Archaebacteria. *Thermus aquaticus* organizam je iz termofilne Archae obitelji. *Taq* (skraćeno od *T. Aquaticus*) DNA polimeraza, prva je izolirana i najbolje istražena od svih termostabilnih DNA polimeraza te se najčešće koristi u većini laboratorija. U samom PCR-u, DNA polimeraze služe za katalizu sinteze DNA ovisne o kalupu. Danas je dostupan veliki broj enzima koji mogu varirati u svojoj preciznosti, specifičnosti, učinkovitosti te sposobnosti da sintetiziraju velike ulomke DNA.

Jedna od glavnih karakteristika PCR metode je brza, precizna i automatizirana promjena temperature u željenom broju ciklusa, a koja je neophodna za izvođenje sva tri koraka PCR reakcije: denaturacija dvolančane molekule DNA kalupa, hibridizacija (ljepljenje, sparivanje) specifičnih početnica i denaturirane molekule DNA, te sinteza novih lanaca DNA koja je katalizirana enzimom DNA polimerazom (elongacija, ekstenzija).

Denaturacija je razdvajanje komplementarnih lanaca dvolančane molekule DNA kalupa koje se postiže zagrijavanjem PCR smjese, najčešće na temperaturama od 94 °C do 96 °C. Prilikom denaturacije lanci DNA se odvajaju i u otopini zauzimaju strukturu nasumičnog klupka. Hlađenjem PCR smjese na temperature od 40 °C do 60 °C dolazi do sparivanja početnica sa njihovim 5' krajem na 3' kraj denaturiranih DNA lanaca čime se definiraju granice ulomka koji se umnaža, a ujedno se i postavlja početna sekvenca nužna da bi DNA polimeraza mogla započeti svoju aktivnost. Ponovnim zagrijavanjem smjese PCR, na temperaturu od 72 °C, postiže se maksimalna aktivnost enzima polimeraze. U ovom koraku DNA polimeraza koristi slobodne nukelotide i sintetizira nove DNA lance u smjeru 3' -> 5'. Prosječna brzina ugradnje nukleotida je 35-100 sekundi. Navedeni koraci čine jedan ciklus PCR reakcije, a kako bi se dobile dovoljne količine željenih ulomaka ovaj postupak se ponavlja najčešće u 20-40 ciklusa. Prije prvog ciklusa odvija se preddenaturacija 3-5 min na temperaturi od 94 °C do 96 °C, a nakon zadnjeg ciklusa odvija se završna sinteza 5-15 min na temperaturi od 72 °C čime je PCR reakcija završena, a umnoženi produkt je spreman za analizu.

Ključni element u postavljanju PCR reakcije je odabir temperature sparivanja početnica odnosno temperature topljenja (Tm). Tm se definira kao temperatura na kojoj 50% molekula DNA disocira, pri čemu je za raskidanje veza parova baza GC potrebna viša temperatura u odnosu na parove baza AT. Temperatura i vrijeme sparivanja optimiziraju se u zavisnosti od strukture početnica tj. njihovog sastava baza, dužine i koncentracij, a direktno su

proporcionalni i utvrđuju se empirijski za svaki par početnica. Temperatura sinteze DNA ovisi o odabiru enzima i utvrđuje se empirijski.

Multipleks PCR (mPCR) modifikacija je metode PCR-a kada u istoj reakcijskoj smjesi umnažamo više gena iz razloga potrebe za kvantifikacijom ulomka od interesa. Standardni PCR je metoda koja nam služi za kvalitativnu analizu. Njome umnažamo i otkrivamo ulomak od interesa. mPCR osim kvalitativne omogućuje i kvantitativnu analizu uzorka. Umnažanjem više ulomaka te usporedbom odnosa njihovih produkata možemo analizirati i odrediti količinu svakog produkta što omogućuje određivanje genomskih promjena. Tako možemo kvantificirati je li došlo do gubitka alela ili eventualno do amplifikacije. S druge strane mPCR je ograničen brojem ulomaka DNA koje može umnožiti zbog nemogućnosti kontroliranja interakcija početnica-početnica pri korištenju većeg broja parova početnica (Pemov i sur., 2005).

2. Cilj istraživanja

Iako meningeomi čine oko četvrtinu svih intrakranijalnih tumora nedovoljno su istraženi i mehanizam njihovog nastanka nam nije dovoljno poznat. Signalni put Wnt, u kojem bitnu funkciju ima protein Dishevelled, jedan je od molekularnih puteva koji sudjeluju u staničnim procesima. Poremećaj signalnog puta Wnt za posljedicu ima gubitak kontrole nad staničnim procesima što rezultira preobražajem zdravih stanica u tumorske stanice, odnosno nastanak meningeoma. Smatramo da genetičke promjene gena *DVL3* imaju važnu ulogu u aktivaciji signalnog puta Wnt što rezultira nastankom meningeoma.

Cilj ovog diplomskog rada je eksperimentalno odrediti optimalne uvjete multipleks lančane reakcije polimerazom (mPCR) za specifično umnažanje mikrosatelitnog biljega za gen *Dishevelled 3* na uzorcima meningeomima čovjeka. Cilj je ispitati pojedine parametre neophodne za uspješno izvođenje reakcije mPCR, te analizirati umnožene ulomake na gelovima fine rezolucije u svrhu otkrivanje genskih promjena u našem prikupljenom uzorku meningeoma. Optimizacijom uvjeta i uporabom metode mPCR dobiveni rezultati koristiti će se za daljnju analizu i kvantifikaciju genetičkih promjena gena *DVL3* u svrhu boljeg razumijevanja molekularnih mehanizama signalnog puta Wnt i njegove uloge u nastanku meningeoma.

3. Materijali i metode

3.1. Uzorci tkiva

Uzorci tkiva meningeoma i periferne krvi pacijenata prikupljeni su iz Sveučilišne bolnice "Sestre milosrdnice" u Zagrebu sa Zavoda za neurokirurgiju i Zavoda za patologiju Ljudevit Jurak, te su pohranjeni u banci tumora mozga Hrvatskog instituta za istraživanje mozga. Pacijenti koji su uključeni u istraživanje nisu bili podvrgnuti određenim metodama liječenja poput zračenja ili kemoterapije koji bi mogli utjecati na rezultate genetičkih analiza. Uzorke tkiva meningeoma označili smo velikim slovom T i pripadnim brojem pacijenta iz naše banke tumora mozga, a uzorke periferne krvi označili smo velikim slovima OT i pripadnim brojem pacijenta iz naše banke tumora mozga (Tablica 1).

Tablica 1. Uzorci meningeoma i periferne krvi korišteni u istraživanju

Meningeomi	Periferna krv	Dob (godine)	Dijagnoza	Spol
T240	OT240	78	Meningeoma	Ž
T241	OT241	81	Meningeoma	Ž
T242	OT242	85	Meningeoma angiomatosum	M
T243	OT243	78	Meningeoma atypicum	M
T245	OT245	68	Meningeoma	Ž
T246	OT246	82	Meningeoma	M
T247	OT247	38	Meningeoma	M
T248	OT248	83	Meningeoma	M
T249	OT249	72	Meningeoma	Ž
T250	OT250	74	Meningeoma	Ž
T251	OT251	77	Meningeoma	Ž
T252	OT252	71	Meningeoma	Ž
T253	OT253	78	Meningeoma	M
T254	OT254	73	Meningeoma	Ž
T255	OT255	80	Meningeoma	Ž
T256	OT256	74	Meningeoma atypicum	Ž
T257	OT257	81	Meningeoma	M
T259	OT259	85	Meningeoma	Ž
T260	OT260	47	Meningeoma	M
T261	OT261	71	Meningeoma	Ž
T262	OT262	70	Meningeoma	Ž
T263	OT263	69	Meningeoma	M
T264	OT264	68	Meningeoma	Ž
T265	OT265	80	Meningeoma	Ž
T266	OT266	74	Meningeoma anaplasticum	M
T267	OT267	82	Meningeoma	Ž

Uzorci tumora pribavljeni su za vrijeme kirurškog zahvata i odmah uz dodatak fiziološke otopine pohranjeni na –70 ^{o}C. Svi tumori analizirani su od strane patologa koji je odredio dijagnozu. Uzorci krvi uzeti su prije operacije ili za vrijeme kontrolnih pregleda, a zatim pohranjeni u staklene epruvete uz antikoagulans EDTA do korištenja na –20 ^{o}C.

3.2. Metoda izolacije DNA iz tumorskog tkiva fenolom i kloroformom

Za izolaciju genomske DNA iz meningeoma koristili smo metodu izolacije DNA iz tumorskog tkiva fenolom i kloroformom (Sambrook and Russell, 2001). Nakon otapanja na sobnoj temperaturi tkivo prikupljenih uzoraka mehanički smo usitnili u što kraćem vremenu kako bi izbjegli djelovanje DNaza koje su nakon otapanja ponovno aktivne. Tijekom vaganja tumorskih tkiva uzorke mase od 150 do 450 mg stavljali smo u sterilne epruvetice (*eppendorf*) od 1,5 mL. Zatim smo dodali 1 mL pufera za lizu stanica (10 mM TrisHCl, pH 8,0; 0,5% Tween) i 15 µL proteinaze K (20 mg/mL). Pripremljene uzorke ostavili smo inkubirati preko noći u termostatiranoj vodenoj kupelji na 37 ^{o}C.

Svaku epruvetu i uzorak nakon inkubacije podjednako smo razdijelili u dvije nove epruvete i u njih dodali jednak volumen fenola. Epruvete smo zatim stavili 10 min na rotacijsku mješalicu, a potom prebacili 10 min na centrifugu na 10 000 okretaja u minuti (Centrifuge 5415D, Eppendorf, rotor 60 mm), na sobnoj temperaturi (18-20 ^{o}C). Nakon centrifugiranja iz epruvete uz pomoć pipete pažljivo smo odvojili gornju, vodenu fazu sa što manje povlačenja srednje, proteinske i donje, fenolne faze. Odvojeni gornji sloj stavili smo u novu sterilnu epruvetu *eppendorf*.

U novu epruvetu dodali smo pola voluemna fenola i pola volumena kloroforma u odnosu na dobiveni volumen odvojenog gornjeg sloja. Lagano smo protresli epruvetu i stavili na sporo rotacijsko miješanje 10 min. Nakon toga opet smo uzorke stavili na centrifugiranje, na 10 min, na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja pažljivo smo, bez da povlačimo srednji proteinski i donji organski sloj, odvojili gornji vodeni sloj u novu sterilnu epruvetu.
Na dobiveni volumen vodenog sloja dodali smo jednak volumen kloroforma. Epruvetu smo lagano protresli, izmiješali na sporoj rotaciji 10 min, centrifugirali 10 min na sobnoj temperaturi i pipetom pažljivo odvojili gornji, vodeni sloj i prebacili u novu sterilnu epruvetu.

Na dobiveni volumen dodali smo 2,5 volumena apsolutnog etanola ohlađenog na -20 ^{o}C, a zatim smo sadržaj epruvete dobro izmiješali na vorteks miješalici (Vibromix, Tehtnica) nakon čega DNA postaje dobro vidljiva u obliku malog, paučinastog, bijelog klupka. Epruvete smo preko noći pohranili na -20 ^{o}C.

Sljedećeg dana uzorke smo centrifugirali 20 min na 14 000 okretaja u minuti u prethodno ohlađenoj centrifugi na 4 ^{o}C. Na dnu epruvete vidljiv je bijeli talog, a etanol iz epruvete smo pažljivo odstranjivali uz pomoć pipete. Preostali etanol kojeg nije bilo moguće ukloniti pipetom odstranili smo sušenjem epruveta na termomikseru sve dok nije ispario. Preostali talog smo otapili dodavanjem 100 µL pufera TE (Tris-EDTA: 10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,6) i zatim smo uzorke preko noći stavili u termomikser, uz laganu trešnju na sobnoj temperaturi. Sljedećeg dana uzorci su bili spremni za određivanje koncentracije i čistoće DNA.

3.3. Izolacija DNA iz pune krvi metodom isoljavanja

Genomska DNA iz perifirne krvi izolirana je metodom isoljavanja (Miller i sur., 1988). Smrznute uzorke smo otapili na sobnoj temperaturi i odvajili volumen krvi od 5-10 mL koje smo prebacili u epruvete (*Falcon*) od 50 mL. U epruvetu smo dodali tri volumena pufera RCLB-a (engl. *red blood cell lysis buffer*) i snažno protresli, a zatim stavili na led 15 min. Nakon hlađenja epruvete smo centrifugirali 10 min, na 3 000 okretaja u minuti i na 4 ^{o}C. Nakon centrifugiranja nadtalog smo odlili i uz dodatak RCLB-a malog volumena razbili smo talog u epruveti. Dodali smo RCLB-a u volumenu otprilike isto kao i u prethodnom koraku. Uzorak smo opet centrifugirali 10 min, na 4 ^{o}C, na 3 000 okretaja u minuti i nakon centrifuge nadtalog smo dekantirali. Prethodni postupak smo ponovili još jedan put odnosno nakon drugog centrifugiranja talog koji ostaje u epruveti bi trebao biti bez eritrocita. To nam ukazuje boja taloga koja se promijenila iz crvene u bijelu. Ukoliko u talogu još uvijek ima eritrocita postupak ponavljamo sve dok talog ne postane bijele boje. Kada smo dobili bijeli talog, leukocite, nadtalog smo dekantirali i epruvetu postavili na sušenje okomitim okretanjem na papirnatu površinu.

Nakon sušenja taloga dodali smo 2 mL TE pufera, 200 µL 10% SDS.a i 10 µL proteinaze K. Resuspendirali smo talog i epruvete inkubirali 2 dana u termostatiranoj vodenoj kupelji na 37 ^{o}C. Nakon inkubacije sadržaj epruveta prebacili smo u manje epruvete od 25 mL u koje smo na jedan volumen sadržaja dodali jednu trećinu volumena 5 M NaCl (oko 720 mL). Uzorke smo snažno vorteksirali i premjestili u centrifugu na 15 min, 3 000 okretaja u minuti i na sobnu temperaturu. Nadtalog smo nakon centrifuge pažljivo izdvojili i prebacili u novu epruvetu. Postupak centrifugiranja ponavili smo dva do tri puta odnosno sve do gubitka taloga. Nakon uklanjanja taloga u epruvetu dodajemo jednak volumen 2-propanola i lagano ju okrećemo sve dok DNA ne postane vidljiva.

Uz pomoć staklene kukice, koju smo prethodno sterilizirali u etanolu i spalili, uhvatili smo klupko DNA i zatim smo ga nekoliko puta uronili u *Eppendorf* epruvetu od 1,5 mL u kojoj se nalazio hladni (-20 ^{o}C), 70%-tni etanol. Nakon spiranja prebacili smo klupko DNA u drugu epruvetuu s 500 µL TE pufera. Uzorke smo nakon toga ostavili preko noći na otapanju u termomikseru na sobnoj temperaturi.

3.4. Određivanje koncentracije i čistoće DNA

Za mjerenje koncentracije i čistoće uzoraka koristili smo mikrovolumni spektrofotometar (ND 1000, NanoDrop) koji mjeri apsorbancije uzorka na četiri valne duljine (230 nm, 260 nm, 280 nm, 320 nm). Valna duljina od 230 nm je apsorpcijski minimum nukelinskih kiselina, a apsorpcijski maksimum peptidnih veza u proteinima, fenola, EDTA. Valna duljina od 260 nm je apsorpcijski maksimum nukelinskih kiselina. Valna duljina od 280 nm je apsorbancija aromatskih aminokiselina proteina i spojeva s aromatskim prstenom, dok na valnoj duljini od 320 nm nukelinske kiseline i proteini ne apsorbiraju.

Omjer apsorbancija A260/A280 služi nam za određivanje proteinske kontaminacije. Otopine s omjerom 1,8 smatramo da sadržavaju čistu DNA dok nam vrijednosti manje od 1,8 ukazuju na kontaminaciju proteinima, a vrijednosti veće od 1,8 na kontaminaciju s RNA. Omjer apsorbancija A230/A260 ukazuje nam na kontaminaciju proteinima, polifenolima i ugljikohidratima ukoliko je vrijednost omjera veća od 0,5.

Uzorke s previsokom koncentracijom DNA razrijedili smo TE puferom i ponovili mjerenja do zadovoljavajuće koncentracije. Uzorke s niskom koncentracijom DNA postavili smo na ukoncentriravanje isparavanjem.

3.5. Optimizacija multipleks lančane reakcije polimerazom

Umnažali smo mikrosatelitni biljeg D3S1262 za gen *DVL3.* Njegov produkt umnažanja ima od 112 do 126 pb. Uz njega smo umnažali i kontrolne biljege za koje smo potvrdili da nemaju genetičke promjene u meningeomima. Drugi par početnica služi za umnažanje slijeda SHGC-68373 čiji produkt ima 222 pb (Zadeh i sur., 2007), a treći par početnica služi za umnažanje slijeda APEX1 sa produktom od 321 pb (Ono, Tamiya, i sur., 1996) (Tablica 2). Ovi geni su odabrani na osnovu literature, radi se o genima koji nemaju ulogu u meningeomima i koji su okarakterizirani kao stalno eksprimirani (engl. *Housekeeping*) geni (Kafka i sur., 2014).

Tablica 2. Parovi početnica za mPCR

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

Prilikom optimizacije mPCR-a testirali smo svaki par početnica posebno mijenjajući Tm i koncentracije početnica u PCR smjesi. Tek nakon pozitivnih rezultata umnažanja svakog para početnica zasebno zabilježili smo njihove optimalne uvjete i započeli optimizaciju mPCR-a. Progresivno smo dodavali parove i mijenjanjem Tm, koncentracije primera, $MgCl_2$ i dNTPova tražili smo optimalne uvjete za tripleks PCR. Konačna reakcijska smjesa koju smo koristili nalazi se u Tablici 3.

Tablica 3. Reakcijska smjesa za jedan uzorak

Sastojak	Volumen (µL)	
Taq pufer	5	***Master Mix***
$MgCl_2$	1,5	
dNTP	0,5	
D3S1262 – F	1	
D3S1262 – R	1	
SHGC - F	1	
SHGC - R	1	
APEX1 - F	1	
APEX1 - R	1	
Taq polimeraza	0,3	
qH_2O	9,7	
DNA	2	
Ukupno	**25**	

Reakcija umnažanja odvijala se u stroju za lančanu reakciju polimerazom (Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer), a konačni uvjeti koje smo koristili prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4. Multipleks PCR uvjeti za umnažanje mikrosatelitnog biljega *Dishevelled 3*

(pred) Denaturacija	**Denaturacija**	**Sparivanje početnica**	**Sinteza DNA**	**Završna sinteza DNA**
94 °C / 5 min	94 °C / 30 sec	57 °C / 30 sec	72 °C / 30 sec	72 °C / 10 min
	40 ciklusa			

3.6. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Za provjeru rezultata umnažanja DNA ulomaka lančane reakcije polimerazom koristili smo elektroforezu u agaroznom gelu. Gel je pripreman kao 1% agarozni gel. Otopili smo agarozu u puferu TAE zagrijavanjem, a zatim smo dodali 10 µL otopine etidij-bromida (10 mg/mL). Otopljenu agarozu prelili smo u pripremljenu kadicu za elektroforezu, a polimerizacija gela trajala je 15 min.

Uzorci su nanošeni u jažice agaroznog gela nakon prethodnog miješanja s puferom za nanošenje uzoraka (engl. *loading buffer*: 30% glicerol, 0,25% bromfenol plavilo, 0,25% ksilen cijanol FF). Za određivanje veličina razdvojenih DNA vrpci, na gel se uvijek nanosio i molekularni biljeg poznatih molekulskih masa tzv. 100 pb ljestve (Promega, SAD).

Elektroforeza se odvijala pod stalnim naponom od 100 V. Za provjeravanje uspješnosti lančane reakcije polimerazom elektroforeza je trajala 20 min zbog mogućnosti pojave dodatnih vrpci (tzv. nespecifična amplifikacija). Nakon završene elektroforeze gel je postavljen na UV-transiluminator, valna duljina 260 nm, pomoću kojeg smo vizualizirali DNA ulomake.

3.7. Elektroforeza DNA u Spreadex gelu

Za analizu gubitka heterozigotnosti (LOH, engl. *Loss of heterozygosity*) gena *Dishevelled 3* koristili smo sustav za elektroforezu SEA 2000 (Elchrom Scientific, Švicarska). Za analizu uzoraka koristili smo komercijalne Spreadex El 400 Mini gelove (Elchrom Scientific, Švicarska). Ovi gelovi su proizvedeni s karakteristikom ograničenja veličine ulomaka koje propuštaju u gel, te stoga ulomaci veći od 400 pb ne mogu ući u gel tijekom elektroforeze. Gelovi također imaju sposobnost razdvajanja uzoraka razlike 2 pb. Elektroforeza se odvijala, pri temperaturi od 55 °C, pod stalnim naponom od 120 V, 90 min. Za određivanje veličina razdvojenih DNA vrpci, na gel se uvijek nanosio i molekularni biljeg 100 pb ljestve (Promega, SAD).

3.8. Bojanje gelova i vizualizacija

Nakon završene elektroforeze gelovi su bojani 20 min Gelstar bojom za bojanje gelova (Lonza, Švicarska) dodavanjem 5 μL boje u 50 mL TAE pufera. Nakon toga slijedilo je 30 min odbojavanja gelova (0,5 mL otopine za odbojavanje (Lonza, Švicarska), 20 mL pufera TAE, 29,5 mL dH_2O). Obojane gelove vizualizirali smo pomoću UV-transiluminatora na valnoj duljini 260 nm i fotografirali s digitalnom kamerom Cannon.

Gubitak heterozigotnosti ili gubitak alela genetička je nestabilnost karakteristična za tumorska tkiva, a demonstiran je tako da tumorskoj DNA nedostaje jedan alel. Ovakav gubitak vidljiv je jedino u heterozigotnih ili tzv. informativnih osoba za ovaj polimorfizam. Na gelu LOH je vidljiv ukoliko jedna od vrpci nedostaje kada DNA iz tumorskog tkiva usporedimo s DNA umnoženom iz krvi istog bolesnika. Ukoliko je na gelu jedna od vrpca tumora puno jače vidljiva govorimo o amplifikaciji, a ukoliko postoje vrpce tumora koje nisu vidljive kod periferne krvi ili se nalaze na različitim pozicijama radi se MSI.

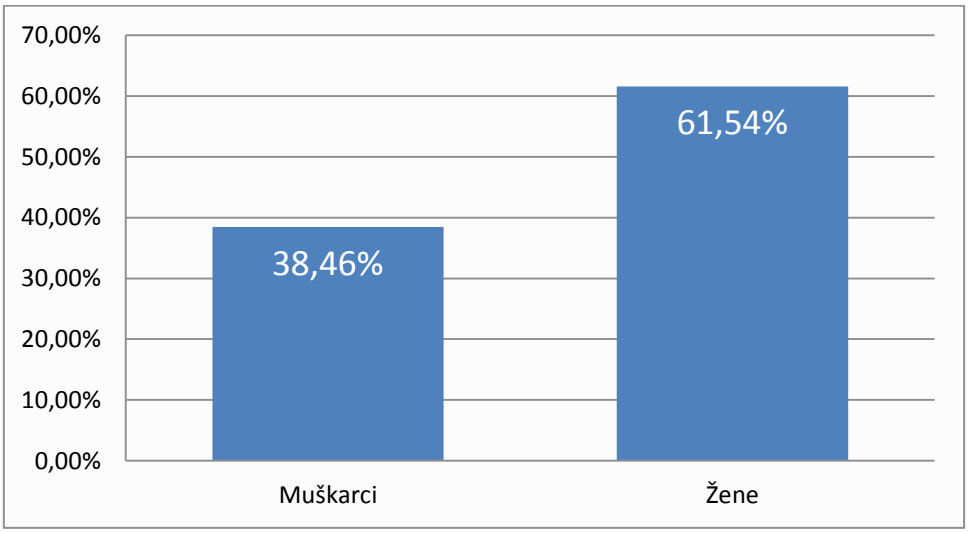
4. Rezultati

4.1. Uzorci tkiva

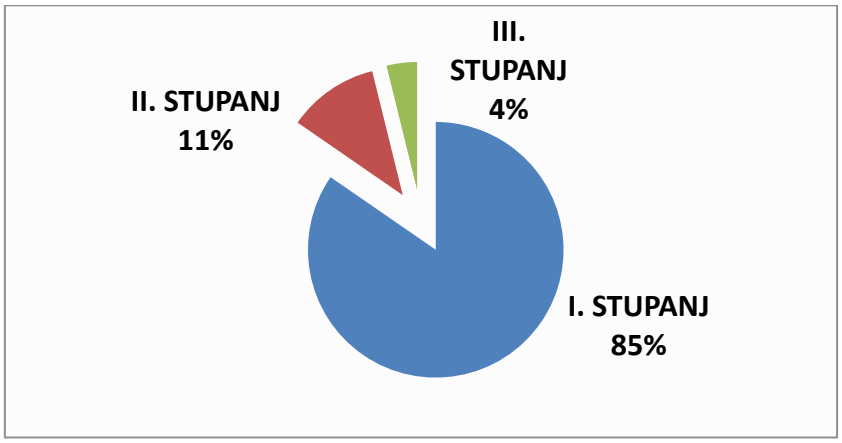
Uzorci tkiva tumora i periferne krvi prikupljeni su od 26 pacijenata. Od ukupnog broja ispitanika bilo je 10 muškaraca (38,5%) i 16 žena (61,5%) (Slika 4).

Srednja dob kod postavljanja dijagnoze bila je 74 godine. Najmlađa dob je 47 godina, a najstarija 87 godina. Srednja dob muškaraca je 71,5 godina, a srednja dob žena 76 godina.

Prema SZO klasifikaciji u našem uzorku bilo je 85% meningeoma I. stupnja, 11% meningeoma II. stupnja i 4% meningeoma III. stupnja (Slika 5).



Slika 4. Podjela zastupljenosti meningeoma po spolovima



Slika 5. Podjela meningeoma po klasifikaciji SZO

4.2. Mjerenje koncentracije i čistoće DNA

Konačne vrijednosti koje smo izmjerili na mikrovolumnom spektrofotometru Nanodrop nalaze se u Tablici 5.

Tablica 5. Vrijednosti mjerenja koncentracije i čistoće DNA

	Meningeomi (T)			**Periferna krv (OT)**		
Broj uzorka	Omjer 260/280	Omjer 260/230	Koncentracija (ng/µL)	Omjer 260/280	Omjer 260/230	Koncentracija (ng/µL)
240	1,85	1,95	340	1,73	1,48	327
241	1,74	1,35	282	1,80	1,86	239
242	1,62	1,50	310	1,71	1,23	230
243	1,85	2,05	280	1,83	1,73	270
245	1,80	1,93	263	1,69	1,23	207
246	1,83	2,01	387	1,67	1,65	334
247	1,70	1,48	397	1,80	1,87	275
248	1,53	1,69	307	1,75	1,85	294
249	1,83	2,18	306	1,73	1,07	274
250	1,78	2,10	285	1,83	1,86	350
251	1,84	2,18	350	1,77	1,76	330
252	1,78	2,13	285	1,80	1,92	276
253	1,83	2,25	282	1,87	2,09	275
254	1,84	2,16	360	1,80	1,77	328
255	1,82	2,02	320	1,74	1,66	280
256	1,78	1,31	336	1,74	1,75	324
257	1,81	1,89	-	1,87	2,32	-
259	1,85	2,18	224	1,70	1,24	229
260	1,87	2,22	335	1,87	2,03	309
261	1,86	2,16	-	1,86	2,17	-
262	1,88	2,11	319	1,88	2,11	303
263	1,85	2,05	325	1,72	1,78	330
264	1,88	2,23	410	1,79	1,40	160
265	1,90	2,23	-	1,83	1,81	-
266	1,83	1,81	415	1,85	2,14	403
267	1,86	2,17	325	1,85	2,08	311

Prilikom prilagođavanja koncentracija prioritet je bio uskladiti koncentracije tumora i periferne krvi na približno istu vrijednost, a zatim da koncentracije budu u rasponu od 100 do 400 ng/µL. Pri određivanju čistoće DNA iz omjera apsorbancija A260/A280 procijenili smo proteinsku i RNA kontaminaciju. Za uzorke koji su pokazivali vrijednosti manje od 1,8

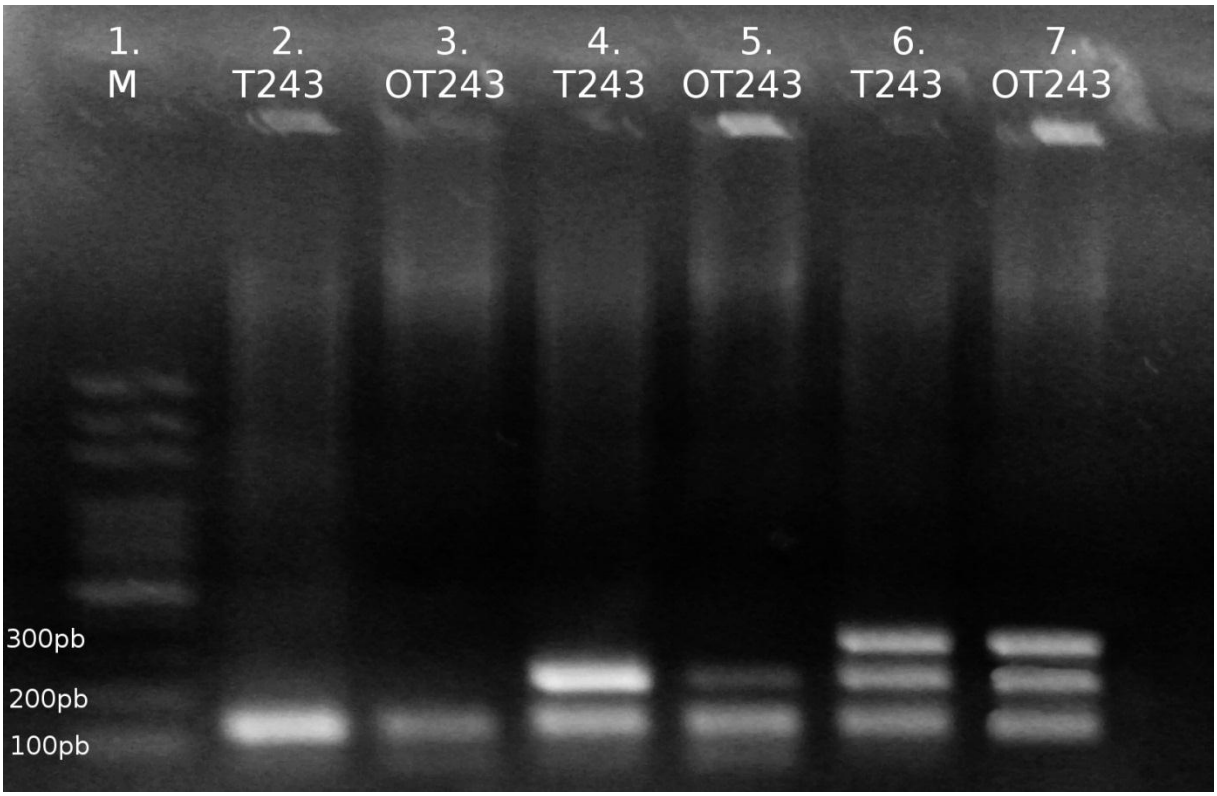
zaključili smo da sadrže kontaminaciju proteinima, a za uzorke vrijednosti veće od 1,8 da sadrže kontaminaciju s RNA. Uzorci omjera 1,8 procijenjeni su kao čista DNA. Omjer apsorbancija A230/A260 služio nam je za procjenu kontaminacije proteinima, polifenolima i ugljikohidratima. Uzorci koji su imali vrijednost omjera veću od 0,5 sadržavali su kontaminaciju. U uzorcima T/OT 257, T/OT 261 i T/OT 256 nije bilo dovoljno DNA za obaviti mjerenja.

4.3. Optimalni uvjeti reakcije multipleks PCR i provjera njene uspješnosti

Provjeru umnoženih fragmenata radili smo na 1% agaroznom gelu. U stupcima 2. i 3. umnoženi su produkti mikrosatelitnog biljega D3S1262 koji imaju od 112 do 126 pb. U stupcima 4. i 5. uz mikrosatelitni biljeg D3S1262 umnoženi su produkti kontrolnog markera SHGC-68373 čiji produkti su veličine 222 pb. U stupcima 5. i 7. umnožena su sva tri para početnica. Treći par je kontrolni biljeg Apex1 s produktom veličine 321 pb. Optimizacija je uspjela jer nema nespecifičnih vrpci (Slika 4).

Varirajući koncentraciju $MgCl_2$, koncentracije oligonukleotidnih početnica, DNA kalupa i uvjeta ciklusa PCRa za sva tri ulomka našli smo da je optimalni sastav reakcijske smjese od 25 µL: 5 µL *Taq* pufera (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3), 2mM $MgCl_2$, 2,5 mM svakog dNTPa, 5 pmol svake početnice (D3S1262 – F, D3S1262 – R, SHGC-68373 – F, SHGC-68373 – R, APEX1 – F, APEX1 – R), 1,5 U *Taq* polimeraze, qH_20 i 100 – 400 ng DNA.

Optimalni uvjeti mPCRa: preddenaturacija 5 min/94 °C; dentarucija 30 s/94 °C; sparivanje početnica 30 s/57 °C; sinteza DNA 30 s/72 °C; završna sinteza DNA 10 min/72 °C; 40 ciklusa.



Slika 4. Prikaz rezultata multipleks PCR-a na gelu agaroze.
Stupac 1: 100 pb molekularni biljeg; Stupac 2 i 3: umnožen biljeg za gen *DVL3*; Stupac 4 i 5: umoženi biljeg za gen *DVL3* i kontrolni marker *SHGC-68373*; Stupac 6 i 7: umoženi biljeg za gen *DVL3* kao i housekeeping geni *APEX1* i *SHGC-68373*.

4.4. Spreadex elektroforeza

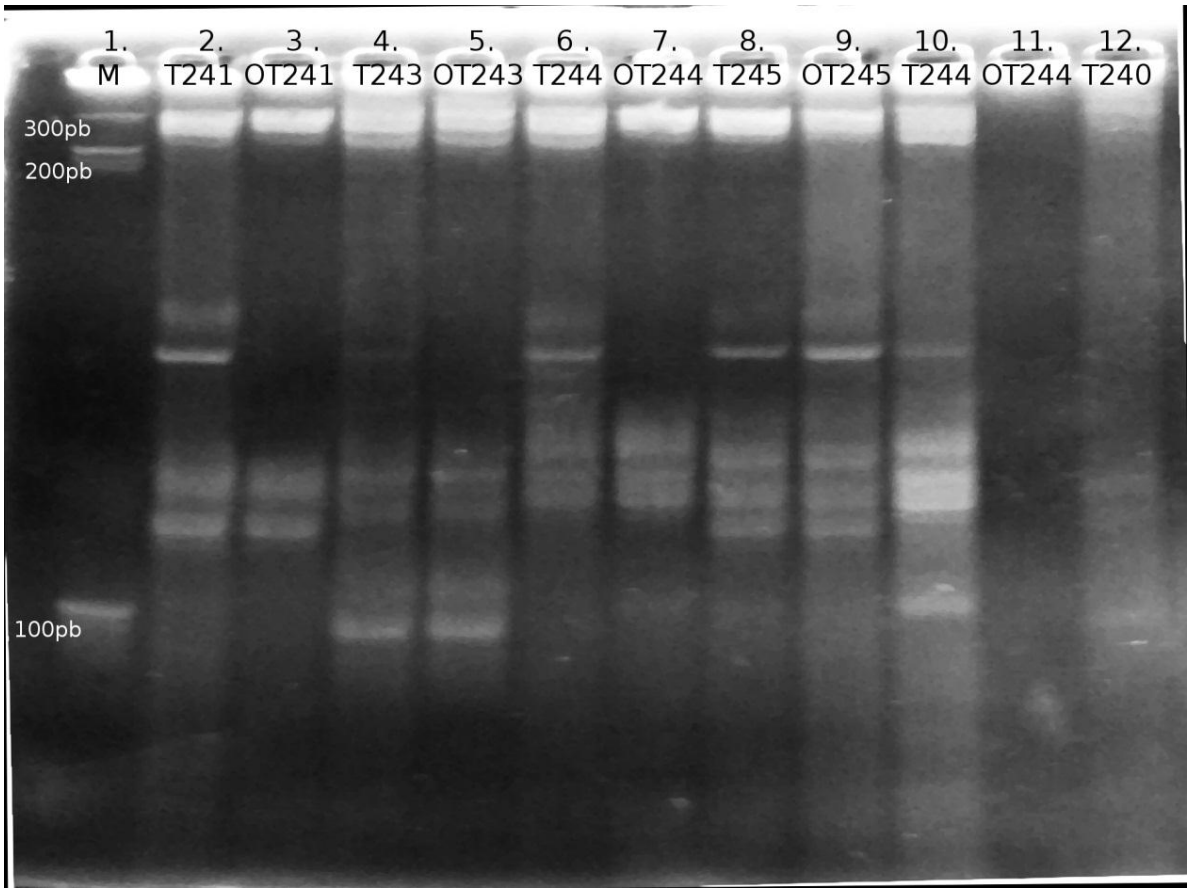
Rezultati analize na Spreadex gelovima pokazali su da je u našem uzorku bilo je 100% heterozigonih ili informativnih uzoraka, što naš biljeg čini jako pogodnim za ovaj tip analize. Od 26 prikupljenih uzoraka 80,77% (21) je bilo dostupno za analizu, a od njih je pojačani signal (amplifikaciju gena) pokazivalo 23,81% (5/21) uzoraka, dok je mikrosatelitnu nestabilnost pokazalo 9,52% (2/21) uzorka (Tablica 6). Nismo primjetili gubitak heterozigotnosti u našem ispitanom uzorku.

Tablica 6. Analiza umnoženih uzoraka na Spreadex gelu.

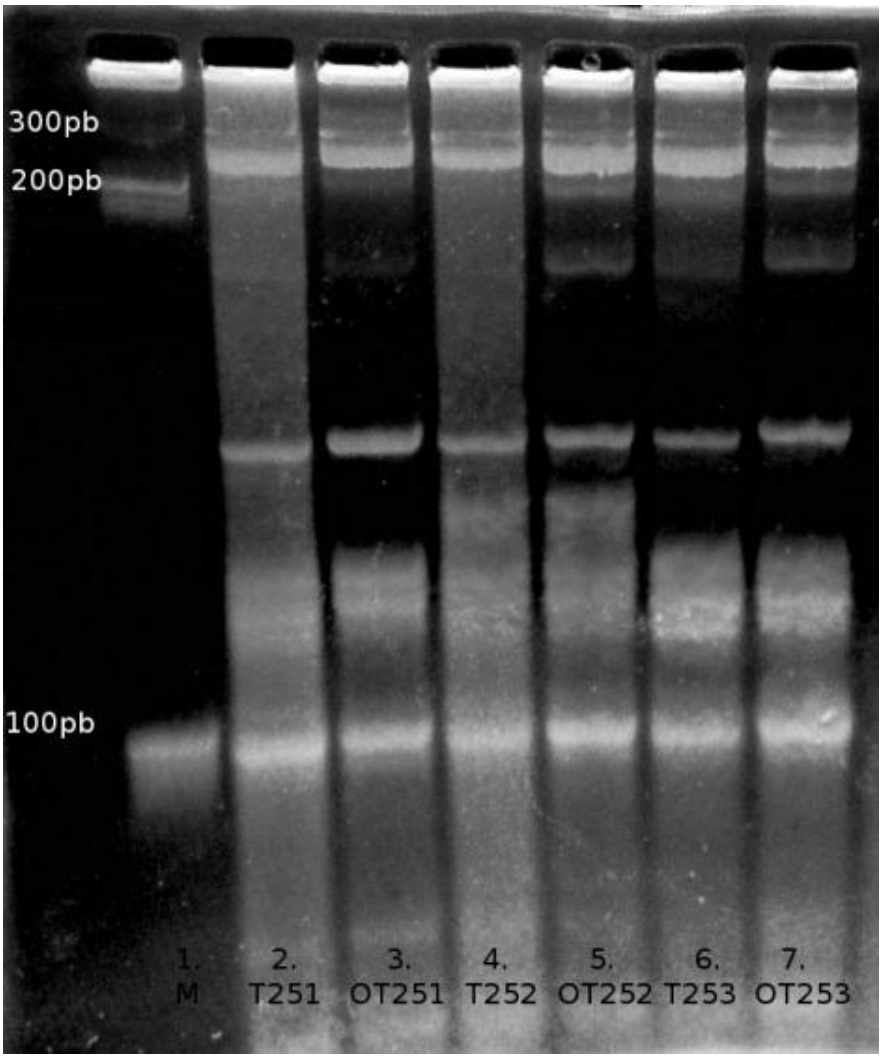
	Broj uzorka	Dob (godine)	Spol	HETERO / AMP / MSI
1.	T240	78	Ž	HETERO
2.	T241	81	Ž	AMP / MSI
3.	T242	85	M	HETERO
4.	T243	78	M	HETERO
5.	T245	68	Ž	HETERO
6.	T246	82	M	AMP / HETERO
7.	T247	38	M	AMP / HETERO
8.	T248	83	M	HETERO
9.	T249	72	Ž	HETERO
10.	T250	74	Ž	ND
11.	T251	77	Ž	HETERO
12.	T252	71	Ž	AMP / HETERO
13.	T253	78	M	HETERO
14.	T254	73	Ž	HETERO
15.	T255	80	Ž	ND
16.	T256	74	Ž	HETERO
17.	T257	81	M	ND
18.	T259	85	Ž	HETERO
19.	T260	47	M	HETERO
20.	T261	71	Ž	ND
21.	T262	70	Ž	AMP / HETERO
22.	T263	69	M	HETERO
23.	T264	68	Ž	HETERO
24.	T265	80	Ž	ND
25.	T266	74	M	MSI / HETERO
26.	T267	82	Ž	HETERO

Kratice: **HETERO** = heterozigot bez LOHa ili MSI, **AMP** = amplifikacija, **MSI** = mikrosatelitna nestabilnost, **ND** = nije definirano.

Nakon provjere uspješnosti PCR umnažanja uzorke smo analizirali na Spreadex gelovima koji mogu razlučiti 2 nukleotida. Gubitak alela u uzorku od interesa očituje se gubitkom vrpce u usporedbi s heterozigotnim zdravim tkivom (periferna krv) koje pokazuje obje vrpce. Mikrosatelitna nestabilnost se očituje kao pojava dodatnih vrpci, sličnog broja parova baza, u tumorskoj DNA. Ukoliko je vrpca tumora puno jače vidljiva govorimo o amplifikaciji gena. Vizualizacija umnoženih uzoraka prikazana je na Slikama 5 i 6.



Slika 5. Prikaz analize rezultata mPCR-a na Spreadex gelu.
Stupac 1: 100 pb molekularni biljeg; Stupac 2: tumorska DNA heterozigotnog bolesnika s amplifikacijom i MSI; Stupac 3: autologna konstitutivna DNA heterozigotnog bolesnika; Stupac 4: tumorska DNA heterozigotnog bolesnika; Stupac 5: autologna konstitutivna DNA heterozigotnog bolesnika; Stupac 8: tumorska DNA heterozigotnog; Stupac 9: autologna konstitutivna DNA heterozigotnog bolesnika. Stupac 12 :tumorska DNA heterozigotnog bolesnika
Stupac 6,7,10,11 – uzorci glioblastoma



Slika 6. Prikaz analize rezultata mPCR-a na Spreadex gelu.
Stupac 1: 100 pb molekularni biljeg; Stupac 2: tumorska DNA heterozigotnog bolesnika; Stupac 3: autologna konstitutivna DNA heterozigotnog bolesnika; Stupac 4 : tumorska DNA heterozigotnog bolesnika s amplifikacijom; Stupac 5: autologna konstitutivna DNA heterozigotnog bolesnika; Stupac 6: tumorska DNA heterozigotnog bolesnika; Stupac 7: autologna konstitutivna DNA heterozigotnog bolesnika

5. Rasprava

Lančana reakcija polimerazom nezaobilazan je alat u molekularnoj genetici ali i šire. Iako je iznimno korisna metoda za kvalitativnu potvrdu rezultata, no kvantitativna potvrda se puno teže izvodi. Također u standardnom PCRu postoji mogućnost lažno negativnih rezultata zbog neuspjele reakcije kao i lažno pozitivnih rezultata zbog kontaminacije rekacijske smjese. Prednosti multipleks PCR-a počinju sa time da je umnožene produkte lakše kvantificirati na način da se željeni ulomak usporedi s kontrolnim biljezima za koje unaprijed znamo podatke i iz njihovog odnosa procjeni se umnožena količina ulomaka. Uporaba kontrolnih biljega omogućuje nam internu kontrolu, odnosno svaka amplifikacija mPCR-a je ujedno i interna kontrola za iduću amplifikaciju. Prednost je i efikasnost po pitanju potrošenih resursa jer potrebno je trošiti manje reagensa, a moguće je u jednoj epruveti umnažati više željenih ulomaka DNA što smanjuje potrebno vrijeme za testiranje uzoraka (Bilgiç i sur., 2013). Jedna od mana mPCR je ograničenje brojem ulomaka DNA koje može umnožiti zbog nemogućnosti kontroliranja interakcija početnica-početnica pri korištenju većeg broja parova početnica (Pemov i sur., 2005). Iako je mPCR pouzdanija metoda sa širim spektrom mogućnosti nego što je to simpleks PCR, najveći izazov je njegova optimizacija. Apsolutno je nužno potvrditi rezultate mPCR-a.

Prilikom optimizacije, kroz nekoliko koraka, potrebno je prilagoditi sve elemente reakcijske smjese i uvjete umnažanja, odnosno odabrati kompatibilne početnice, odrediti vrijeme i temperature PCR ciklusa (denaturacija, sparivanje, sinteza), odrediti koncentracije $MgCl_2$ i dNTPova, količinu DNA kalupa i Taq polimeraze. Ovaj proces je emprijski i upravo zato je izazov optimizirati mPCR.

Kod odabira DNA početnica preporučuje se odabrati parove dužine 18-24 pb ili više, a sa udjelom GC baza od 35-60 %. Početnice takvih karakteristika imaju temperaturu sparivanja od 55 °C do 58 °C ili višu. S obzirom da se parovi baza GC vežu trostrukim (stabilnijim). a parovi baza AT dvostrukim (manje stabilnim) vezama, temperatura sparivanja početnica i kalupa kod početnica s višim GC udjelom je niža od one potrebne kod početnica s višim AT udjelom. Veliku pažnju treba obratiti pri odabiru početnica na moguću međureakciju između parova početnica s obzirom da se nalaze u istoj reakcijskoj smjesi. Nužno je odabrati početnice čiji produkti imaju različite dužine parova baza. Bitno je da su veličine ulomaka

koje ćemo umnožiti ovim početnicama različite kako bi ih u nastavku eksperimenta lako mogli razdvojiti i analizirati elektroforezom. Također u našem slučaju nužno je bilo i odabrati početnice za umnažanje produkata manjih od 400 pb s obzirom da je to granica Spreadeax gelova za propuštanje ulomaka DNa, a koje smo koristili za analizu ulomaka umnoženih mPCRom. Svi ulomci veći od 400 pb ne bi se mogli kretati kroz gel i ne bi ih bilo moguće vizualizirati. S obzirom na ulogu kontrolnih biljega bilo je nužno prilikom njihovog odabira iz literature potvrditi da ne dolazi do genetičkih promjena gena *APEX1* i *SHGC* u tumorima mozga (Ono i sur., 1996; Zadeh i sur., 2007). U prvim pokušajima optimizacije preporuča se sve početnice dodati u jednakim koncentracijama kako bi se jasno uočilo ponašanje pojedinih početnica i shodno tome prilagodilo koncentracije. Ukoliko su vrpce na gelovima slabo vidljive koncentracije tih početnica treba povećati. U ovom koraku odabrane početnice kao i njihove koncentracije nije bilo potrebno naknadno prilagođavati, te je koncentracija početnica 5 pmol za svaku početnicu bila optimalna.

Promjene vremena trajanja ciklusa sparivanja početnica od 20 s do 120 s nemaju značajan utjecaj na efikasnost amplifikacije (Henegariu i sur., 1997). To smo potvrdili u našem istraživanju gdje duže vrijeme sparivanja početnica nije rezultiralo boljom amplifikacijom i stoga smo koristili ciklus sparivanja (annealing) od 30 s kako bismo skratili ukupno trajanje mPCR-a. Temperatura sparivanja početnica pokazala se kao ključan čimbenik uspješnog umnažanja uzoraka. Optimalna temperatura bila je 57 °C. Bitno je odrediti temperaturu pri kojoj se svi ulomci DNA podjednako umnažaju, iako je njihova individualna temperatura sparivanja drugačija. Ukoliko umnažamo više uzoraka onaj koji se bolje umnaža na zadanoj temperaturi vjerojatno će negativno utjecati na amplifikaciju drugog uzorka koji se manje efikasno umnaža pri istoj temperaturi. Razlog je da dolazi do kompeticije, a u reakcijskoj smjesi ima ograničena količina enzima i nukleotida (Henegariu i sur., 1997).

Preporučena koncentracija $MgCl_2$ je 1,5 mM za svakih 200 μM dNTPova kako bi se postigla optimalna ravnoteža. Male koncentracije dNTPova mogu amplificirati uzorke ali su vrpce na gelovima slabo vidljive, dok velike koncentracije u potpunosti inhibiraju reakciju. Promjenama koncentracije $MgCl_2$ uočeno je da veće koncentracije mogu specifičnije umnažati, dok iznimno velike koncentracije inhibiraju rekaciju. Razlog tome može biti kompeticija Taq polimeraze i dNTPova za slobodni Mg^{2+} pa pri povećanju koncentracije dNTPova dolazi do inhibicije reakcije, a pri povećanju koncentracije $MgCl_2$ umnažanje je

specifičnije (Henegariu i sur., 1997). Koncentracije $MgCl_2$ koja se nama pokazala optimalnom bila je 2 mM.

Potrebna koncentracija DNA kalupa za uspješno umnažanje procijenjena je na 30 do 500 ng/25 µL reakcijske smjese. U našim uvjetima uzorci DNA kalupa sa koncentracijama ispod 100 ng/25 µL nisu uspješno umnoženi. Uzorke niskih koncentracija moguće je umnožiti snižavanjem temperature sparivanja (Tm), ponekad za 10-12 °C (Henegariu i sur., 1997). Preporučena koncentracija *Taq* polimeraze je 1,25 U/50 µL reakcijske smjese. Veće koncentracije mogu izazvati neravnomjernu amplifikaciju. Optimalna koncentracija u našem istraživanju pokazala se 1,5 U *Taq* polimeraze.

Provjerili smo i utjecaj promjene broja ciklusa i zaključili smo da promjene od 30 do 40 ciklusa nemaju značajnu ulogu na amplifikaciju. Minimalan broj ciklusa koji se preporuča je 20 (Henegariu i sur., 1997). Također smo provjerili utjecaj stroja za PCR i nismo primjetili nikakve značajne razlike u amplifikaciji uzoraka prilikom promjene laboratorija i tipova strojeva za PCR.

Nakon empririjskog određivanja svih parametara mPCR-a optimizacija je uspješno izvedena. Genski biljeg D3S1262, kao i dva kontrolna markera SHGC-68373 i Apex1 su se specifično umnožili.

Na vizualizaciji Spreadex gelova uočili smo u 33,33% (7/21) uzoraka genetske promjene u meningeomima za gen *DVL3*. Od toga 23,81% (5/21) uzoraka je pokazalo pojačani signal tj. amplifikaciju, a 9,52% (2/21) uzorka mikrosatelitnu nestabilnost. Očito je da se događaju genetičke promjene gena *DVL3* što potvrđuje našu pretpostavku i postavlja potrebu za daljnim istraživanjem uloge proteina Dishevelled i signalnog puta Wnt u tumorigenezi meningeoma ali i tumora općenito.

U radu smo uspjeli optimizirati metodu multipleks PCR radi ispitivanja uloge gena *DVL3* iz obitelji gena *DVL* (Dishevelled), koji se smatraju središnjim čvorištem signalnog puta Wnt. Rezultati naših istraživanja pokazali su da signalni put Wnt ima ulogu u nastanku i progresiji tumora mozga meningioma. Uključenost gena DVL3 može ponuditi nove molekularne biljege u dijagnostici ovog tipa tumora.

6. Zaključak

Molekularni mehanizmi meningeoma nisu još uvijek dovoljno poznati i svako istraživanje u tom smjeru je veliki korak naprijed. U ovom radu smo se usmjerili na optimizaciju metode za umnažanje mikrosatelitnog biljega D3S1262 za gen *Dishevelled 3* i multipleks lančana reakcija polimerazom se pokazala odličnim odabirom za taj zadatak. Multipleks PCR metoda je od izbora ukoliko želimo kvantificirati PCRske ulomke gena koji istražujemo, u našem slučaju *DVL3*. Uvjeti u kojima smo umnažali mikrostelitni biljeg D3S1262 kao i njegove kontrolne markere APEX1 i SHGC-68373 rezultirali su uspješnim i specifičnim umnažanjem svih ulomaka DNA uz odabrane parove početnica. Zaključujemo da su uvjeti sastava reakcijske smjese 5 µL *Taq* pufera (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3), 2mM $MgCl_2$, 2,5 mM svakog dNTPa, 5 pmol svake početnice, 1,5U *Taq* polimeraze i 100 – 400 ng DNA, a optimalni uvjeti mPCRa: preddenaturacija 5 min/94 °C; dentarucija 30 s/94 °C; sparivanje početnica 30 s/57 °C; sinteza DNA 30 s/72 °C; završna sinteza DNA 10 min/72 °C; 40 ciklusa, optimalni za umnažanje *DVL3* te 2 kontrolna gena.

Nije došlo do nespecifičnih amplifikacija i produkti multipleks reakcije su dovoljno snažni. Ovako dobiveni amplifikati uspješno su analizirani na gelovima visoke rezolucije elektroforezom na Spreadex gelovima. Vizualizacijom gelova jasno su vidljive vrpce svih ulomaka DNA, te su opažene genske promjene o mikrosatelitnoj nestabilnosti u 9,52% (2/21) i amplifikaciji gena DVL3 u 23,81% (5/21) navode na zaključak o uključenosti ovoga gena u nastanak i progresiju meningeoma čovjeka.

Optimizacijom ove metode i korištenjem dobivenih uvjeta moći će se specifičnije umnažati mikrosatelitni biljeg D3S1262 što će zasigurno biti doprinos boljem razumijevanju uloge Dishevelled 3 proteina u signalnom putu Wnt i tumorigenezi meningeoma. Zbog toga predlažemo daljnu analizu rezultata kako bi se detaljnije mogle odrediti i potvrditi genetske promjene gena *DVL3* i njegova uloga u nastanku meningeoma.

7. Literatura

Bajtarević, A. (2006), "Rijetke lokalizacije meningeoma-MRI dijagnostika Rare Localizations of Meningeoma-MRI Diagnosis", *Medicinski glasnik*, Vol. 3, 63–66.

Bhargava, A. i Fuentes, F.F. (2010), "Mutational dynamics of microsatellites", *Molecular Biotechnology*, Vol. 44, 250–266.

Bilgiç, H.B., Karagenç, T., Simuunza, M., Shiels, B., Tait, A., Eren, H. i Weir, W. (2013), "Development of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of Theileria annulata, Babesia bovis and Anaplasma marginale in cattle", *Experimental Parasitology*, Vol. 133, 222–229.

Boström, J., Meyer-Puttlitz, B., Wolter, M., Blaschke, B., Weber, R.G., Lichter, P., Ichimura, K., i sur. (2001), "Alterations of the tumor suppressor genes CDKN2A (p16(INK4a)), p14(ARF), CDKN2B (p15(INK4b)), and CDKN2C (p18(INK4c)) in atypical i anaplastic meningiomas.", *The American journal of pathology*, Vol. 159, 661–669.

Bradač, G.B., Ferszt, R. i Kendall, B.E. (1990), *Cranial Meningiomas*, (Bradač, G.B., Ferszt, R. i Kendall, B.E.,Eds.), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2–15.

Buschmann, U., Gers, B. i Hildebrit, G. (2005), "Uncommon case of a cystic papillary meningioma in an adolescent", *Child's Nervous System*, Vol. 21, 322–326.

Caroli, E., Russillo, M. i Ferrante, L. (2006), "Intracranial meningiomas in children: report of 27 new cases and critical analysis of 440 cases reported in the literature.", *Journal of child neurology*, Vol. 21, 31–36.

Carvalho, L.H., Smirnov, I., Baia, G.S., Modrusan, Z., Smith, J.S., Jun, P., Costello, J.F., i sur. (2007), "Molecular signatures define two main classes of meningiomas.", *Molecular cancer*, Vol. 6, 1–10.

Clevers, H. (2006), "Wnt/beta-catenin signaling in development i disease", *Cell*, Vol. 127, 469–480.

Cui, Q., Ma, Y., Jaramillo, M., Bari, H., Awan, A., Yang, S., Zhang, S., i sur. (2007), "A map of human cancer signaling.", *Molecular systems biology*, Vol. 3, p. 152.

Deng, J., Miller, S.A., Wang, H.Y., Xia, W., Wen, Y., Zhou, B.P., Li, Y., i sur. (2002), "β-catenin interacts with i inhibits NF-κB in human colon and breast cancer", *Cancer Cell*, Vol. 2, 323–334.

Elnifro, E.M., Ashshi, A.M., Cooper, R.J. i Klapper, P.E. (2000), "Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology", *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 13, 559–570.

Ferniez, H.A., Kallenbach, K., Seghezzi, G., Grossi, E., Colvin, S., Schneider, R., Mignatti, P., i sur. (1999), "Inhibition of endothelial cell migration by gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-1.", *The Journal of surgical research*, Vol. 82, 156–162.

Fodde, R. i Brabletz, T. (2007), "Wnt/β-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior", *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 19, 150–158.

Fuller, C.E. i Perry, A. (2005), "Molecular diagnostics in central nervous system tumors.", *Advances in anatomic pathology*, Vol. 12, 180–194.

Gao, C. i Chen, Y.-G. (2010), "Dishevelled: The hub of Wnt signaling.", *Cellular signalling*, Elsevier Inc., Vol. 22, 717–27.

Gutmann, D.H., Donahoe, J., Perry, A., Lemke, N., Gorse, K., Kittiniyom, K., Rempel, S.A., i sur. (2000), "Loss of DAL-1, a protein 4.1-related tumor suppressor, is an important early event in the pathogenesis of meningiomas.", *Human molecular genetics*, Vol. 9, 1495–1500.

Halaka, A.N., Bunning, R.A., Bird, C.C., Gibson, M. i Reynolds, J.J. (1983), "Production of collagenase i inhibitor (TIMP) by intracranial tumors and dura in vitro.", *Journal of neurosurgery*, Vol. 59, 461–466.

Hanahan, D. i Weinberg, R.A. (2011), "Hallmarks of cancer: The next generation", *Cell*, Vol. 144, 646–674.

Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H. i Vogt, P.H. (1997), "Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol", *BioTechniques*, Vol. 23, 504–511.

Ille, F. i Sommer, L. (2005), "Wnt signaling: multiple functions in neural development.", *Cellular i molecular life sciences : CMLS*, Vol. 62, 1100–1108.

Jain, D., Ebrahimi, K.B., Miller, N.R. i Eberhart, C.G. (2010), "Intraorbital Meningiomas", Vol. 134, 4–8.

Kafka, A., Bašić-Kinda, S. i Pećina-Šlaus, N. (2014), "The cellular story of dishevelleds", *Croatian Medical Journal*, Vol. 55, 459–467.

Kleihues, P., Louis, D.N., Scheithauer, B.W., Rorke, L.B., Reifenberger, G., Burger, P.C. i Cavenee, W.K. (2002), "The WHO classification of tumors of the nervous system.", *Journal of neuropathology and experimental neurology*, Vol. 61, 215–225; 226–229.

Koreth, J., O'Leary, J.J. i McGee, J.O.D. (1996), "Microsatellites and PCR genomic analysis", *Journal of Pathology*, Vol. 178, 239–248.

Lee, Y.N., Gao, Y. i Wang, H. yu. (2008), "Differential mediation of the Wnt canonical pathway by mammalian Dishevelleds-1, -2, i -3", *Cellular Signalling*, Vol. 20, 443–452.

Leonard, J.D. i Ettensohn, C. a. (2007), “Analysis of dishevelled localization and function in the early sea urchin embryo.”, *Developmental biology*, Vol. 306, 50–65.

Lever, E. i Sheer, D. (2010), “The role of nuclear organization in cancer.”, *The Journal of pathology*, Vol. 220, 114–125.

Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., i sur. (2007), “The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system.”, *Acta neuropathologica*, Vol. 114, 97–109.

Mawrin, C. i Perry, A. (2010), “Pathological classification and molecular genetics of meningiomas”, *Journal of Neuro-Oncology*, Vol. 99, 379–391.

Michaud, D.S., Gallo, V., Schlehofer, B., Tjønneli, A., Olsen, A., Overvad, K., Dahm, C.C., i sur. (2010), “Reproductive factors i exogenous hormone use in relation to risk of glioma i meningioma in a large European cohort study”, *Cancer Epidemiology Biomarkers i Prevention*, Vol. 19, 2562–2569.

Miller, S.A., Dykes, D.D. i Polesky, H.F. (1988), “A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells”, *Nucleic Acids Research*, Vol. 16, p. 1215.

Monleon, D. (2012), *Meningiomas - Management i Surgery*, (Monleon, D.,Ed.), InTech, 3–34.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. i Erlich, H. (1986), “Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction”, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol. 51, 263–273.

Natarajan, M., Lin, K.-M., Hsueh, R.C., Sternweis, P.C. i Ranganathan, R. (2006), “A global analysis of cross-talk in a mammalian cellular signalling network.”, *Nature cell biology*, Vol. 8, 571–580.

Nowell, P.C. (1976), “The clonal evolution of tumor cell populations.”, *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 194, 23–28.

Ono, Y., Tamiya, T., Ichikawa, T., Kunishio, K., Matsumoto, K., Furuta, T., Ohmoto, T., i sur. (1996), “Malignant astrocytomas with homozygous CDKN2/p16 gene deletions have higher Ki-67 proliferation indices.”, *Journal of neuropathology i experimental neurology*, Vol. 55, 1026–1031.

Ono, Y., Ueki, K., Joseph, J.T. i Louis, D.N. (1996), “Homozygous deletions of the CDKN2/p16 gene in dural hemangiopericytomas”, *Acta Neuropathologica*, Vol. 91, 221–225.

Pećina-Šlaus, N. (2010), “Wnt signal transduction pathway and apoptosis: a review.”, *Cancer cell international*, Vol. 10, p. 22.

Pećina-Šlaus, N. (2012), “Meningiomas: Role of Genetic Instabilities of the E-cadherin Gene”, (Hayat, M.A.,Ed.), Springer Netherlis, Dordrecht, Vol. 7, 17–28.

Pećina-Šlaus, N., Nikuševa Martić, T., Tomas, D., Beros, V., Željko, M. i Cupić, H. (2008), "Meningiomas exhibit loss of heterozygosity of the APC gene.", *Journal of neuro-oncology*, Vol. 87 No. 1, 63–70.

Pemov, A., Modi, H., Chiler, D.P. i Bavykin, S. (2005), "DNA analysis with multiplex microarray-enhanced PCR.", *Nucleic acids research*, Vol. 33 No. 2, 1–9.

Rachlin, J., Ding, C., Cantor, C. i Kasif, S. (2005), "MuPlex: Multi-objective multiplex PCR assay design", *Nucleic Acids Research*, Vol. 33, 544–547.

Ragel, B.T. i Jensen, R.L. (2005), "Molecular genetics of meningiomas.", *Neurosurgical focus*, Vol. 19, 1–8.

Rakoff-Nahoum, S. (2006), "Why cancer and inflammation?", *Yale Journal of Biology i Medicine*, Vol. 79, 123–130.

Sabol, Z., Kipke-Sabol, L., Miklić, P., Hajnšek-Propadalo, S. i Sabol, F. (2006), "Neurofibromatoza tip 2 (centralna neurofibromatoza ili bilateralni akustički neuromi, vestibularni švanomi)", *Liječnički v jesnik*, Vol. 2, 309–316.

Sambrook, J. i Russell, D.W. (2001), *Molecular Cloning - Sambrook & Russel - Volume 2*, *CSH Press*, Vol. 18.

Shastry, B.S. (2009), "SNPs: impact on gene function i phenotype.", *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, Vol. 578, 3–22.

Shtutman, M., Zhurinsky, J., Oren, M., Levina, E. i Ben-Ze'ev, A. (2002), "PML is a target gene of beta-catenin and plakoglobin, and coactivates beta-catenin-mediated transcription.", *Cancer research*, Vol. 62, 5947–5954.

Tóth, G., Gáspári, Z. i Jurka, J. (2000), "Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey i analysis.", *Genome research*, Vol. 10, 967–981.

Wharton, K.A. (2003), "Runnin' with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl i their significance to Wnt signal transduction.", *Developmental biology*, Vol. 253, 1–17.

Zadeh, M.D., Amini, R., Firoozray, M. i Derakhshieh-Peykar, P. (2007), "Frequent homozygous deletion of p16/CDKN2A gene in malignant gliomas of Iranian patients", *Pakistan Journal of Biological Sciences*, Vol. 10, 4246–4250.

8. Životopis

Josip Skoko

Datum rođenja: 18/01/1990
Adresa: Bartola Kašića 9, 32000, Vukovar, Hrvatska
Kontakt: +385 95 593 9152 skokojp@gmail.com

Obrazovanje

10/2012 – 02/2015 **Magistar Eksperimentalne biologije**

Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (Hrvatska)
Modul: Fiziologija i imunobiologija

Diplomski rad: Optimizacija metode multipleks lančane reakcije polimerazom za umnažanje mikrosatelitnog biljega gena *Dishevelled 3* u meningeomima čovjeka

09/2008 – 10/2012 **Prvostupnik biologije**

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

Znanstvene aktivnosti i usavršavanje

2015 Kafka A, Bačić M, Morić M, Skoko J, Pećina-Šlaus N (2014) Changes of central mediators of Wnt signaling DVL1 and DVL3 in human glioblastoma, GlowBRain Workshop, Visualization of molecular markers in thebrain, Zagreb, Croatia, January 29-31, 2015.

2014 Kafka A, Bačić M, Morić M, Skoko J, Gabud T (2014) The involvement of molecular components of Wnt signaling DVL1 and DVL3 in human glioblastoma. HDIR-3, Third meeting of the croatian association for cancer research, Zagreb, Croatia, November 6-7, 2014.

2013 Laboratorijska stručna praksa – Imunološki zavod, Odjel za istraživanje i razvoj, Zagreb

2009 / 2010 Noć biologije – organizacija radionice o genetici i proteinima, Odsjek za biologiju, PMF, Zagreb

2009 Ljetna Tvornica Znanosti“ – voditelj radionice „Proteini – ključ života“, MedILS, Split

Osobne vještine

Znanje jezika	• Hrvatski – materinji • Engleski – napredno • Njemački, Švedski – osnovno
Računalne vještine	• Microsoft Office™, LibreOffice, OpenOffice uredski alati • Operativni sustavi: Windows, Linux, Mac OS • GIMP, ImageJ, GIMP, Python, Joomla, Mendeley

Ostalo

Članstva	• Udruga studenata biologije - BIUS, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb • Studentska sekcija za neuroznanost, Medicinski fakultet, Zagreb
Dozvole	• Vozačka dozvola B kategorije