

# Wnt signalni put u glioblastomima

---

Čorak, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:002119>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Iva Čorak**

6680/BT

**WNT signalni put u glioblastomima**

**ZAVRŠNI RAD**

**Modul: Biologija**

**Mentor: Izv. prof. dr.sc. Reno Hrašćan**

**Zagreb, 2016.**

# DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

## Wnt signalni put u glioblastomima

Iva Čorak, 6680/BT

**Sažetak:** U ovom će radu biti prikazane uloge WNT signalnog puta u glioblastomima (GBM) te trenutačni napredak u otkrivanju tj. ciljanju WNT signalnog puta prvenstveno kao antikancerogeni pristup. Bit će iznesena trenutna istraživanja na genskoj i epigenetskoj razini, povezanost s kontrolom GBM matičnih stanica i njihovom invazijom te međudjelovanje komponenti (cross-talk) WNT signalnog puta s ostalim signalnim putevima u GBM-u. Također će biti prikazana otkrića agenasa kao potencijalnih inhibitora WNT signalnog puta.

**Ključne riječi:** tumor, glioblastom, WNT signalni put

**Rad sadrži:** 45 stranica, 5 slika, 4 tablice, 151 literaturni navod, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** Izv. prof.dr.sc. Reno Hrašćan

**Rad predan:** kolovoz, 2016.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Final work**

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Undergraduate studies Biotechnology**  
**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for Biology and Microbial Genetics**

### **Wnt signal pathway in glioblastoma**

**Iva Čorak, 6680/BT**

**Abstract:** In this review will be discussed the roles of WNT signaling in glioblastoma (GBM), and also current headway in locating WNT signaling in anti-cancer approach. Here will be shown and explained the results of the most recent researches, done in genetic and epigenetic field. Also, it will be talked about the connection of those results with the control of GBM stem cells, their invasion and WNT cross-talk with other GBM signaling. The agenses that are discovered as potential inhibitors of the Wnt signaling will be also represented.

**Keywords:** tumor, glioblastoma, WNT signal pathway

**Thesis contains:** 45 paiges, 5 figures, 4 tables, 151 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

**Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** Dr.sc. Reno Hrašćan, Assoc.Prof.

**Thesis delivered:** August, 2016

## SADRŽAJ:

1. UVOD .....	1
2. TUMOR.....	2
3. KARCINOGENEZA.....	2
4. NASTANAK TUMORSKE STANICE.....	3
5. DEFINICIJA TUMORA MOZGA.....	4
5.1. VRSTE TUMORA MOZGA.....	4
5.1.1. GLIJALNI TUMORI.....	5
5.1.1.1.OSOBITOSTI GLIJALNIH TUMORA.....	7
5.1.2. GLIOBLASTOMA MULTIFORME (GBM) .....	7
6. WNT SIGNALNI PUT.....	10
6.1.KANONSKI OBLIK.....	12
6.2.NEKANOSNKI OBLIK.....	12
6.3.POVEZNICA WNT SIGNALNOG PUTA S KARCINOMOM.....	13
6.4.GENSKE/EPIGENSKE PROMJENE WNT SIGNALNIH KOMPONENTI.....	16
7. WNT SIGNALIZACIJA U GBM SPOSOBNIM ZA DIFERENCIJACIJU.....	17
7.1.WNT SIGNALIZACIJA U MATIČNIM STANICAMA.....	17
7.2.WNT SIGNALIZACIJA U GBM MATIČNIM STANICAMA (GSCs).....	18
7.3.WNT SIGNALNI PUT U GBM INVAZIJI.....	19
7.4.WNT SIGNALNI PUT U TERAPEUTSKOJ REZISTENCIJI.....	21
7.5.CROSS-TALK IZMEĐU WNT I OSTALIH SIGNALNIH PUTEVA U GBM..	22
7.6.1. CROSS-TALK S EGFR SIGNALNIM PUTEM.....	23
7.6.2. CROSS-TALK S MET SIGNALNIM PUTEM.....	24
7.6.3. CROSS-TALK WITH SONIC HEDGEHOG (SHH) SIGNALNIM PUTEM.	25
8. LOCIRANJE WNT SIGNALNIH PUTEVA GBM-a.....	25
9. ZAKLJUČAK.....	32
10. LITERATURA.....	34

## 1. UVOD

Zloćudne odnosno maligne bolesti su, uz bolesti srca i krvnih žila, jedan od najvećih zdravstvenih problema današnjice. Iako su postignuta značajna unaprjeđenja u postavljanju dijagnoze te samim time i pružanju što bolje i adekvatnije terapije, rak je i dalje jedan od vodećih uzroka smrti u svijetu. Navedenu bolest prati visoka stopa smrtnosti, no unatoč tome, to je i bolest s kojom se može dugo i kvalitetno živjeti te je u konačnici i potpuno izlječiti. Za takav je ishod potrebna pravovremena, odnosno što je moguće ranija dijagnoza, popraćena odgovarajućom terapijom. Kako bi terapija bila što uspješnija, potrebno je poznavati mehanizme nastanka i komunikacije između pojedinih stanica nastalog tumora što je još uvijek veliki problem. Znanstvena istraživanja svakim danom sve više napreduju i do sada su već shvaćeni mnogi mehanizmi nastanka, komunikacije te suzbijanja i potpune eliminacije tumora.

S obzirom na veliki broj raznih vrsta tumora, niže u tekstu bit će navedene i objašnjene pojedine grupe te će se opisati jedan od tumora mozga, glioblastom. Riječ je o najčešćem i najzloćudnijem tumoru čije je izlječenje gotovo nemoguće, a nastaje iz glija stanica ili njezinih prekursora. Novije spoznaje pokazuju da važnu ulogu u nastanku i ponašanju glioblastoma ima enzim IDH1 (izocitrat dehidrogenaza 1) te se danas koristi kao marker u klasifikaciji glioblastoma. Kod glioblastoma su prisutne aplastične stanice oko nekrotizirajućega tkiva kao i hiperplazija krvnih žila. Glioblastom čini 52% svih tumora funkcionalnih tkiva mozga i 20% svih intrakranijalnih tumora (Burger i Scheithauer, 2007). Smatra se da je njegova pojava sporadična, jer su primjeri s potencijalnom genskom predispozicijom malobrojni. Tkiva glioblastoma izrazito su heterogena na staničnoj i molekularnoj razini. Trenutno dostupni tretmani, uz kirurški zahvat i radioterapiju, uključuju ciljanu terapiju farmakološkim inhibitorima ključnih molekula aberantnih signalnih puteva te genotoksične agense poput temozolomida (Indranil i sur. 2013).

Jedan od načina komunikacije tumorskih stanica je WNT signalni put, čiji efektori reguliraju proliferaciju, smrt, migraciju i u konačnici samu sudbinu stanica. Zbog toga je potrebno prikazati neke od važnih uloga WNTsignalnog puta kod glioblastoma i dosadašnji napredak u lokalizaciji i ciljanju WNT puta u antikancerogenom pristupu te otkrića potencijalnih agenasa koji bi mogli inhibirati WNT signalni put.

## 2. TUMOR

Novotvorina, neoplazma (grč. *neos-* nov, *plasia-* rast) ili tumor (lat. *tumor-* otekлина) patološka je tvorba nastala kao posljedica prekomjernog umnažavanja abnormalnih stanica. Rast novotvorine nadmašuje rast normalnih tkiva, biološki je nesvrhovit, nepravilan i neorganiziran. U osnovi, novotvorine nastaju kad se izgubi normalna fiziološka regulacija kontrolnih mehanizama rasta stanice. Novonastale stanice se od polaznih stanica razlikuju i strukturno i funkcionalno, ali se u većini slučajeva može prepoznati od koje vrste stanica ili tkiva je nastao tumor. Tumorske bolesti imaju ozbiljnu prognozu, a neke su opasne po život. Znanost koja se bavi proučavanjem novotvorina naziva se onkologija. Tumori mogu biti zloćudni (maligni) i dobroćudni (benigni). Razlika između njih je u agresivnosti rasta te u tome što kod malignih nastaju metastaze i šire se u okolinu, infiltrirajući se u okolno tkivo, dok kod benignih tumora ne nastaju metastaze, već rastu ekspanzivno.

Metastaze su sekundarno nastale promjene, presadnice koje nisu u dodiru s primarnim tumorom i nalaze se u udaljenim tkivima. Metastaziranje je jedan od najvažnijih karakteristika zloćudnosti, iako svi zloćudni tumori ne metastaziraju. Metastazirajuće stanice su pojedinačne stanice koje se udaljavaju od tumora i ulaze u krv, te se šire tijelom. Zloćudni oblik tumora naziva se rak (lat. *cancer* – rak, rana, neizlječiva rana). Zloćudnost ili malignost nekog tumora odnosi se na svojstvo tog tumora da invadira i razara okolno tkivo i da stvara udaljene metastaze u organizmu te kao posljedica nastupa smrt. Međutim, dijagnoza zloćudnog tumora ne podrazumijeva uvijek smrt, odnosno, pravodobnom dijagnozom i dobrim odabirom terapije kod nekih malignih tumora je moguće izlječenje.

## 3. KARCINOGENEZA

Uzrok najvećeg broja tumora nije poznat. Ipak, za određene faktore se danas pouzdano zna da su uzročnici stvaranja tumora, a to su: pušenje, UV zračenje, određeni virusi i sl. Sam proces nastanka tumora događa se već na molekularnoj razini, tj. poremećaji kontrolnih proteina kao posljedice poremećenih gena koji te proteine i stvaraju. Oštećenje gena može nastati na dva načina:

1. kao posljedica vanjskih kancerogenih faktora (kemijski, fizikalni, mehanički, virusni agensi)

2. kao posljedica spontanih mutacija u organizmu.

Nastanak tumora se ne događa u jednom točno određenom trenutku ili u kratkom vremenskom razdoblju. To je proces koji se sastoji od niza promjena na genotipskoj i na fenotipskoj razini. Taj niz promjena koji vodi od zdravog stanja stanice do pojave tumora najčešće traje mjesecima i godinama.

#### **4. NASTANAK TUMORSKE STANICE**

Tumor potječe od jedne jedine stanice, u kojoj su se godinama nagomilavale razne mutacije gena odgovornih za diobu i regulaciju rasta same stanice. Skupine odgovornih gena za regulaciju rasta su:

- onkogeni
- tumorski supresorski geni
- geni za provjeravanje i popravakDNA

Tumor je dinamična i vrlo heterogena populacija stanica zbog neprestanog dijeljenja, nestabilnosti genoma tumorskih stanica i selekcijskih uvjeta okoliša. S obzirom na to, tumor će nastati kada tijelo ne uspije prepoznati i uništiti stanice koje se nedijele normalno. Zašto do toga dolazi jasno govori podatak da se kod prosječnog čovjeka svakodnevno podijeli oko 100000000 stanica, što je broj koji sam po sebi podrazumijeva da će se neke od njih podijeliti s greškom. Upravo zbog toga, veliku ulogu otkrivanja i uništavanja takvih stanica ima imunostani sustav koji ako u toj zadaći zakaže, ostavlja slobodan put nastanku tumora. Prema tome, tumor je prije svega bolest disfunkcije imuniteta.

Da bi došlo do pojave zloćudnog tumora, moraju se dogoditi tri stvari:

1. Početak procesa predstavlja greška u diobi stanice. Postoje brojni uzroci povećanja broja takvih grešaka, a najčešće su to kemikalije (karcinogeni), virusi i naravno, životna dob. S deset godina starosti većina ljudi ima jako malo grešaka pri diobi stanica, manje od tisuću dnevno na ukupan broj od sto milijuna dioba. Po nekim teorijama, do svoje šezdesete godine imamo bar sto tisuća stanica koje se ne dijele normalno. Kao posljedica toga, tumor se češće sreće kod šezdesetogodišnjaka nego kod djeteta od deset godina.



2. Druga stvar koja se mora dogoditi je da imunski sustav ne prepozna abnormalnu stanicu kada se ona formira. Ako takva stanica prođe neprimijećeno i opet se podijeli, onda često dolazi do trećeg koraka.

3. Imunski sustav ne reagira (ili bar ne reagira idealno) i dopušta da tumor nastavlja rasti. U većini slučajeva organizam će savladati tumor tokom nekoliko dana/tjedana/mjeseci njegovog postojanja. Međutim, tumor ponekad izbjegne otkrivanje i raste dok ne postane toliko velik da sadrži na stotine milijuna stanica. Događa se da taj proces traje i do deset godina, a tada je imunskom sustavu teško organizirati potrebnu, a i samim time i učinkovitu obranu protiv „napadača“.

## **5. DEFINICIJA TUMORA MOZGA**

Tumori mozga pojavljuju se u 5-15 slučajeva na 100000 ljudi. Osnovna podjela tumora je na primarne i sekundarne. Primarni tumori su oni tumori koji su nastali od samog moždanog parenhima ili u lubanji, a sekundarni tumori su metastaze, gdje maligne stanice putem krvi dođu u lubanjsku šupljinu ili mozak. Najčešći tumori koji metastaziraju u mozak su tumori dojke i bronha.

Primarni tumori se dijele na benigne (dobroćudne) i maligne (zloćudne). Kod benignih tumora pojavljuje se problem njihovog nastanka i rasta, jer svojim obujmom vrše pritisak na okolne strukture. Drugi problem je i njihov smještaj. Ako je benigni tumor lociran u dubini moždanog parenhima ili je u kontaktu sa strukturama vitalnima za život, onda to predstavlja veliku zapreku u rješavanju problema.

### **5.1. VRSTE TUMORA MOZGA**

Svaki tip stanica živčanog sustava daje osnovu za svoj poseban tip tumora. Prema ovoj klasifikaciji postoji veliki broj različitih tipova primarnih tumora. Najčešći su:

- meningeom (tumor nastao iz moždanih ovojnica)
- neurinom (tumor nastao od tkiva živca)
- glioblastomi, astrocitomi, ganglioneuromi.

### 5.1.1. GLIJALNI TUMORI

Glijalni tumori najčešći su tumori mozga. Ova skupina obuhvaća cijeli raspon tumora, od najdobročudnijih, kao što su to pilocitni astrocitomi, do najzloćudnijih tumora u čovjeka, kao što su glioblastomi. Glijalni tumori ponekad predstavljaju pravi dijagnostički izazov, ne samo neurolozima, neuroradiolozima i neurokirurzima, već i neuropatolozima. Glijalne tumore središnjeg živčanog sustava (CNS) klasificiramo prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) iz 2007. godine (Tablica 1). Ova je klasifikacija, kao i sve slične, histogenetska, što znači da se temelji na morfološkoj sličnosti tumorskih stanica sa stanicama iz kojih tumor, pretpostavlja se, nastaje. Što su tumorske stanice bolje diferencirane, to su sličnije svojim normalnim staničnim prethodnicima. Međutim, s progresijom anaplastičnih promjena i gubitkom diferenciranosti tumorskih stanica, navedena sličnost postaje sve manja te se na kraju u potpunosti gubi. Zbog toga anaplastični tumori više sličje jedan drugome nego tkivu/stanicama iz kojih nastaju. Klasifikacija WHO-a razlikuje četiri stupnja diferencijacije tumora CNS-a, pri čemu dobro diferencirani, dobroćudni tumori imaju stupanj diferencijacije (gradus) I, dok najzloćudniji i najslabije diferencirani tumori imaju stupanj diferencijacije IV. Prema tome, da bi se bilo koji tumor klasificirao, potrebno je odrediti njegovu histogenezu i stupanj diferencijacije na temelju rezultata histološke, histokemijske i imunohistokemijske analize. Histološka i histokemijska analiza omogućuju prepoznavanje morfoloških osobitosti pojedinih tumora koje odražavaju njihovu histogenezu i diferenciranost. No, kada tih morfoloških osobitosti nema ili kada nisu dovoljno specifične, što je čest slučaj kod anaplastičnih tumora, tada je za određivanje histogeneze tumora potrebna imunohistokemijska i/ili molekularno-genetička analiza. Dok se imunohistokemijskom analizom pokušava utvrditi sadrže li stanice pojedine, manje ili više specifične, proteinske ili druge molekule, molekularno-genetičkom analizom nastoji se utvrditi postojanje isto tako manje ili više specifičnih genetičkih promjena. Točnost neuropatološke dijagnoze tumora mozga uvelike ovisi o veličini bioptičkog uzorka i/ili njegovoj reprezentativnosti. Mnogi glijalni tumori imaju vrlo raznoliku histološku sliku ili mogu imati anaplastična promijenjena žarišta. Što je uzorak veći, veća je i vjerojatnost da će sadržavati sva dijagnostički značajna morfološka obilježja, a time biti i dijagnostički reprezentativan.

**Tablica 1.** Klasifikacija glijalnih tumora SŽS-a Svjetske zdravstvene organizacije iz 2007. godine

**Table 1.** WHO classification of glial brain tumors from 2007

**Astrocitni tumori**

- **Pilocitni astrocitom**

Pilomiksoidni astrocitom

**Subependimalni tumor orijaških stanica (SEGA)**

- **Pleomorfni ksantoastrocitoma**
- **Difuzni astrocitom**

Fibrilarni astrocitom

Gemistocitni astrocitom

Protoplazmatski astrocitom

**Anaplastični astrocitom**

- **Glioblastom**

Glioblastom orijaških stanica

Gliosarkoma

**Oligodendroglijalni tumori**

- **Oligodendrogliom**
- **Anaplastički oligodendrogliom**

**Oligoastrocitni tumori**

- **Oligoastrocitom**
- **Anaplastički oligoastrocitom**

**Ependimski tumori**

- **Subependimom**
- **Miksopapilarni ependimom**
- **Ependimom**

Celularni ependimom

Papilarni ependimom

Ependimom svijetlih stanica

Tanicitni ependimom

### **5.1.1.1.OSOBITOSTI GLIJALNIH TUMORA**

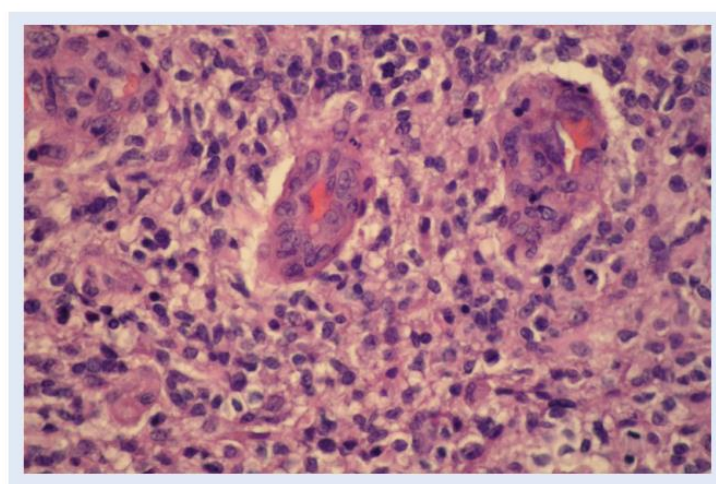
Glijalni tumori, kao i svi ostali tumori CNS-a, imaju više jedinstvenih obilježja koja ih razlikuju od svih drugih novotvorina. Tako, primjerice, prognoza ovih tumora ne ovisi samo o njihovom biološkom potencijalu rasta, širenja i rasapa, nego je uvelike određena njihovim smještajem. Zbog smještaja unutar čvrstog koštanog oklopa lubanje svi intrakranijski tumori u određenoj fazi svoga rasta mogu dovesti do pomaka moždanog tkiva, što može imati smrtonosne posljedice. Pri tome značajnu ulogu može imati i tumoru pridruženi edem koji uvelike pridonosi prostornokompresivnom učinku samoga tumora. Nadalje, zbog anatomske i funkcionalne specifičnosti različitih područja CNS-a, simptomi ovih tumora, mogućnosti njihovog kirurškog odstranjenja te prognoza ne ovise samo o njihovom biološkom potencijalu, nego i o njihovom sijelu unutar CNS-a. Tako se, primjerice, biološki dobroćudni tumori mogu pojaviti na mjestima s kojih se ne mogu u cijelosti kirurški odstraniti (tzv. zloćudna lokalizacija tumora), zbog čega imaju i lošu prognozu. Glijalni tumori CNS-a imaju neka zajednička obilježja. Svi oni su infiltrativni tumori koji se međusobno razlikuju samo u širini zone infiltracije. Dobroćudni tumori, poput pilocitnog astrocitoma, imaju usku zonu infiltracije zbog čega je njihova granica prema okolnoj mozgovini dobro definirana, što je osnovna pretpostavka za njihovo potpuno kirurško odstranjenje. Slabije diferencirani gliomi imaju širu zonu infiltracije, zbog čega im je granica morfološki nedefinirana i to otežava njihovu potpunu resekciju. Svi glijalni tumori imaju i sposobnost zloćudne preobrazbe, ali je ona kod nekih, primjerice pilocitnih astrocitoma, iznimno rijetka, dok je kod drugih, primjerice difuznih astrocitoma, gotovo neizbježna.

### **5.1.2. GLIOBLASTOMA MULTIFORME(GBM)**

Glioblastom (WHO, gradus IV) najčešći je i najzloćudniji primarni tumor mozga. Na njega otpada 12 do 15% svih intrakranijskih neoplazmi te 60 – 75% svih glijalnih tumora. U Sjedinjenim Američkim Državama od ovog tumora svake godine oboli 18 000, a umre 13 000 ljudi. U zemljama Europske unije svake godine oboli 1 od 20 000 stanovnika. Glioblastom se može pojaviti u bilo kojoj životnoj dobi, ali se najčešće javlja između četrdesete i sedamdesete godine života i nešto je češći u muškaraca nego u žena. Etiopatogeneza glioblastoma nije nam poznata, ali danas znamo da ovi tumori mogu nastati na najmanje dva načina koji se klinički i molekularno-genetički razlikuju. Jednu skupinu čine glioblastomi koji nastaju iz bolje diferenciranih astrogljalnih tumora. Ove glioblastome, koji čine 10 % svih

glioblastoma, nazivamo sekundarnim, a molekularno-genetički ih najčešće obilježavaju mutacije *TP53* gena. Drugu, znatno veću (90%) skupinu čine glioblastomi koji nastaju *denovo*. Njih nazivamo primarnim glioblastomima, a molekularno-genetički najčešće ih obilježava amplifikacija gena *EGFR*-a (engl. epidermal growth factor receptor). Molekularno-genetički ove dvije skupine glioblastoma razlikuju se i po mutacijama enzima izocitratdehidrogenaze 1 (IDH1) koje su rana i česta (> 80%) genetička promjena u sekundarnih, ali ne i primarnih glioblastoma. Glioblastom se obično javlja u subkortikalnoj bijeloj tvari moždanih hemisfera i to najčešće u temporalnom (31%), potom parijetalnom (24%) i frontalnom (23%) režnju. Osobito je tipična frontotemporalna lokalizacija tumora. Tumor se često širi preko žuljevitog tijela na kontralateralnu stranu što mu, makroskopski, na frontalnim presjecima daje izgled leptira. Glioblastomi moždanog debela su rijetki i obično se javljaju u djece. Mali mozak i kralježnička moždina također su rijetka sjela ovoga tumora. Sam naziv glioblastoma multiforme govori da ovaj tumor može biti iznimno šarolik i makroskopski i mikroskopski. Neka područja mogu biti sivkasta i tvrđa, druga žuta i mekana, a često se vide i područja nekroze, cista i krvarenja. Glioblastomi često imaju veliku središnju nekrozu koja može zahvatiti i više od 80% ukupnog volumena tumora. Oko ove središnje zone nalazi se hipervaskularizirani dio tumora koji neuroradiološki prima kontrast što mu daje izgled prstenaste tvorevine. Makroskopske ciste, kada su prisutne, sadrže mutnu tekućinu koja predstavlja kolikvirani nekrotični sadržaj. Mikroskopski su glioblastomi obilježeni staničnim polimorfizmom, nekrozama, mikrovaskularnom proliferacijskom i mitotskom aktivnošću. Prominentna mikrovaskularna proliferacija i nekroze dijagnostički su najvažnija obilježja ovog tumora. Pojedini tumori pokazuju iznimni histološki i citološki polimorfizam s brojnim multinuklearnim gigantskim stanicama, dok su drugi izrazito celularni, ali unimorfni. Upravo ta regionalna heterogenost histološke slike kod stereotaksijske biopsije predstavlja dijagnostički problem. Migracijska sposobnost tumorskih stanica najbolje se uočava kada one naiđu na prepreku svome širenju zbog čega stvaraju, već spomenute, subpialne (tzv. subpialne bradavice), perineuronske (tzv. pseudosatelitoza) i perivaskularne sekundarne tvorevine. Prosječni proliferacijski indeks jest 15 – 20%. Sitnostanični, slabije diferencirani glioblastomi obično su proliferacijski aktivniji od bolje diferenciranih, pretežito gemistocitnih tumora. Glioblastomi spadaju među najbolje vaskularizirane tumore u čovjeka, a neovaskularizacija, u obliku mikrovaskularne proliferacije i stvaranja glomeruloidnih tjelešaca (Slika 1.), ujedno je i dijagnostičko obilježje ovih tumora po kojem se razlikuju od drugih infiltrativnih astrocitnih tumora. Nekroza tumora još je jedno ključno obilježje glioblastoma, pri čemu su osobito karakteristične trakaste nekroze okružene palisadno

poredanim jezgrama tumorskih stanica (tzv. palisadirajuće nekroze). Glioblastom je najzloćudniji tumor u čovjeka. Prosječno je preživljenje približno 12 mjeseci i ne ovisi o primijenjenom liječenju. Manje od 20% bolesnika preživi godinu dana, a manje od 3 % tri godine. Bolesnici sa sekundarnim glioblastomima prežive značajno duže (prosječno preživljenje je 7,8 mjeseci) nego bolesnici s primarnim glioblastomima (prosječno preživljenje je 4,7 mjeseci) što je možda posljedica činjenice da se oni javljaju u mlađih osoba nego primarni glioblastomi. Najvažniji prognostički čimbenik jest dob bolesnika, pa tako mlađi bolesnici duže prežive. Glioblastomi invazivnih stanica od klasičnih glioblastoma razlikuju se po tome što su građeni od brojnih multinuklearnih gigantskih stanica, često bizarnih oblika uz prisutnost obilne retikulinske stromalne mreže zbog koje su čvršći i bolje ograničen od okolne mozgovine od klasičnih glioblastoma. Gliosarkomi su bifazni tumori građeni od dviju zloćudnih sastavnica: glijalne i mezenhimske. Zbog velike količine veziva čvrsti su i dobro izolirani od okoline te se mogu zamijeniti za metastaze ili kada su priljubljeni uz duru, za meningeome. Mikroskopski, zloćudna glijalna sastavnica ima sve odlike glioblastoma, dok sarkomska sastavnica najčešće ima obilježja fibrosarkoma ili malignog fibroznog histiocitoma. Prognoza mu je istovjetna onoj glioblastoma.

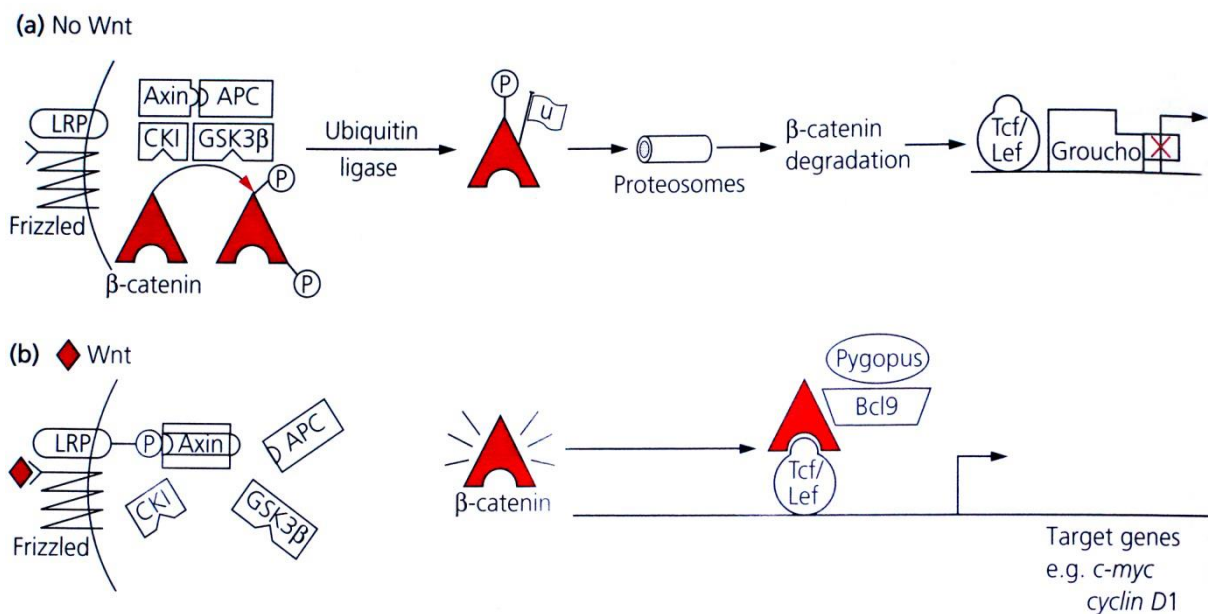


**Slika 1.** Glioblastom – mikrovaskularna proliferacija (H&E, 400x).

## 6. WNT SIGNALNI PUT

WNT proteini čine veliku obitelj palmitoiliranih signalnih sekretornih glikoproteina (Bovolenta i sur. 2008). Razvili su se tijekom pojave Metazoa, nakon divergencije hoanoflagelata. Kako već spužve posjeduju nekoliko WNT proteina, a kod jednostaničnih organizama ne nalazimo niti jedan, pretpostavlja se da je njihova pojava imala značajnu evolucijsku ulogu u nastanku višestaničnih organizama (Clevers i Nusse 2012). U genomu sisavaca, uključujući i ljudski, detektirano je 19 WNT gena, koji su raspoređeni u 12 očuvanih WNT podobitelji. Ova skupina proteina je bogata cisteinom. U prosjeku sadrže 350-400 aminokiselina i posjeduju N-terminalni signalni slijed za sekreciju (MacDonald i sur. 2009). WNT proteini odgovaraju klasičnoj definiciji morfogena što znači da signalizaciju vrše stvaranjem gradijenta kroz manje udaljenosti u nekom tkivu. Ovisno o lokalnoj koncentraciji određuju sudbinu stanica (Clevers i Nusse 2012). WNT signalni put jedan je od najistraživanijih kod životinja (Mii i Taira 2011). Regulira čitav niz staničnih procesa za vrijeme embrionalnog razvoja, ali i u odraslim stanicama. Utječe na diobu stanica, staničnu polarnost i determinaciju stanične sudbine za vrijeme embrionalnog razvoja (npr. formiranje dorzoventralne osi, apoptozu) te kroz spomenute procese održava tkivnu homeostazu (Logan i Nusse 2004). U njegovoj regulaciji sudjeluje velik broj sekretornih glikoproteina. Sekretorni proteini djeluju kao ligandi ili okidači specifične kaskade signalnog puta. WNT signalni put može u stanici biti u aktivnom ili neaktivnom stanju, ovisno o prisutnosti Wnt liganda s ekstracelularne strane membrane. Kad je WNT odsutan nekoliko proteina s citoplazmatske strane formira degradacijski kompleks. On se sastoji od aksina, adenomatous polyposis coli proteina (APC), glikogen sintaze kinaze (GSK3 $\beta$ ) i kazein kinaze I (CKI). Spomenute kinaze spadaju u skupinu serin/treonin kinaza, a druga dva proteina čine strukturnu jezgru kompleksa. Svrha ovog kompleksa je modifikacija transkripcijskog kofaktora  $\beta$ -katenina. CKI fosforilira serin 45 i treonin 41, a GSK3 $\beta$  serine na pozicijama 33 i 37 (svi su na amino terminalnoj regiji). Upravo ove aminokiseline često su mutirane kod karcinoma. Slijedi ubikvitinizacija pomoću E3 podjedinice ubikvitin ligaze-  $\beta$ -transducin repeat containing protein ( $\beta$ -TrCP) čiji Fbox/WD ponavljajući motiv prepoznaje fosforilirano mjesto (MacDonald i sur. 2009). Ubikvitinizacija je oznaka koja  $\beta$ -katenin šalje u degradaciju 26S proteasomom. Posljedično, on ne ulazi u nukleus i izostaje aktivacija obitelji transkripcijskih faktora T-cell factor/lymphoid enhancing factor (TCF/LEF) tj. održava se stanje represije. TCF se u ovom stanju veže za transkripcijski represor Groucho. WNT ligand se s vanjske strane stanične membrane veže za sedmerostruki transmembranski receptor Frizzled (Fz) i

njegov koreceptor low-density lipoprotein receptor related protein (LRP6 ili srodni protein LRP5). Citoplazmatski rep LRP-a fosforiliran je kompleksom WNT-Fz-LRP6 (vjerojatno uz simultanu regrutaciju proteina DVL) i s tom modifikacijom regrutira aksin. AXIN više nije dostupan kao slobodan u citoplazmi i stoga onemogućuje formiranje degradacijskog kompleksa. Koncentracija  $\beta$ -katenina u citoplazmi raste i  $\beta$ -katenin je transportiran u nukleus gdje aktivira transkripcijske faktore obitelji TCF/LEF i njihove ciljne gene. Nuklearni proteini Bcl9 i Pygopus također sudjeluju u aktivaciji ciljnih gena (Pecorino 2012) (Slika 2.). Vežanje WNT na Fz receptor uzrokuje hiperfosforilaciju proteina dishevelled (DVL) koji time postaje aktivan i djeluje kao inhibitor GSK3 $\beta$ . DVL djeluje na sjecištu na kojem se Wnt signalni put grana na dva segmenta (Giles i sur. 2003).



**Slika 2.** Pojednostavljeni prikaz signalnog puta WNT u neaktivnom i aktivnom stanju. (P) označava fosforilaciju, (u) označava ubikvitinizaciju. (Pecorino 2012).



### **6.1.KANONSKI OBLIK( $\beta$ -katenin ovisan)**

Kanonski segment kao negativni efekt ima aktivaciju  $\beta$ -katenina. Ovaj oblik WNT signalne kaskade je ključna regulaciju kod embrionskih i odraslih matičnih stanica. Iniciran je vezanjem WNT liganda na cisteinom bogate regije receptora FZD i LRP obitelji na površini stanice. Aktivacija ovih receptora dovodi do disocijacije kompleksa kojega čine AXIN, adenomatus polyposis coli (ACP) i GSK3 $\beta$  stabiliziranih  $\beta$ -kateninom. Posljedično,  $\beta$ -katenin je translociran iz citoplazme u jezgru stanice gdje stvara kompleks sa T-cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF) i djeluje kao promotor transkripcije višestruko kodiranih gena uključujući *C-MYC* i *ciklin D1* (Sareddy i sur. 2009, Liu i sur. 2011). Najnovija istraživanja pokazuju da FOXM1 djeluje kao promotor nuklearne translokacije i stabilizacije  $\beta$ -katenina u GBM povezujući se sa citoplazmatskim  $\beta$ -kateninom, sugerirajući pritom da FOXM1 može aktivirati kanonski Wnt signalni put na ligand-neovisni način.

### **6.2.NEKANONSKI OBLIK( $\beta$ -katenin neovisan)**

Nekanonski segment grana se na još dva moguća nizvodna efekta. Wnt signal se prenosi na c-JunN-terminalnu kinazu (JNK signalni put) ili na Ca<sup>2+</sup>-otpuštajući put preko Frizzled receptora. JNK signalni put upravlja polarnošću planarne stanice u gastrulaciji (ima ključnu ulogu u morfogenezi). Wnt/Ca<sup>2+</sup> grana puta blokira Wnt/ $\beta$ -katenin put preko fosforilacije DVL. Iako je mnogo čimbenika koji mogu poremetiti Wnt signalni put, krajnji rezultat se uvijek očituje na koncentraciji  $\beta$ -katenina. Kako je Wnt/Ca<sup>2+</sup> grana puta povezana s  $\beta$ -kateninom, logično je da postoji implikacija u karcinogenezi (Giles i sur. 2003).

### 6.3. POVEZNICA WNT SIGNALNOG PUTA S KARCINOMOM

Signalni putevi čije promjene utječu na preživljenje stanica, proliferaciju i migraciju fundamentalni su u tumorogenezi. *WNT1* je jedan od prvih otkrivenih protoonkogeni, poznat još od 1982. godine (pod izvornim nazivom Int-1), čiji je gen bio aktiviran viralnom integracijom DNA i kao takav uzrokovao karcinom mliječnih žlijezda kod miševa (Clevers i Nusse 2012). Aktivan WNT signalni put može nadvladati apoptozu i potiče proliferaciju (Pećina-Šlaus 2010). Brojni su tipovi karcinoma koji nose konstitutivnu aktivaciju WNT signalnog puta kao posljedicu mutacije nekog od segmenata kaskade (npr. aktivan je kod 90% slučajeva kolorektalnog karcinoma). Ovo je stanje najčešće uočljivo kod tkiva koja i u odrasloj dobi nužno održavaju WNT signalni put aktivnim zbog potrebe za samoobnavljanjem ili popravkom (Clevers i Nusse 2012). Najčešće su mutacije koje inaktiviraju APC (gen *APC* ima ulogu tumor supresora) ili aktiviraju  $\beta$ -katenin, manje su učestale promjene u genu *CTNNB1* koji kodira za  $\beta$ -katenin ili *AXIN* genu (Giles i sur. 2003), dok su promjene na samom ligandu WNT izuzetno rijetke (Pecorino 2012). AXIN1 je tumor supresor protein i njegova je ekspresija u glioblastomima često utišana (31% uzoraka tkiva) u odnosu na zdravo moždano tkivo, no više je primjera pojačane ekspresije (38.1% uzoraka tkiva) (Pećina-Šlaus i sur. 2011). Mutacije u WNT signalnoj kaskadi potiču razvoj različitih tipova tumora (Tablica 2). Primjeri mutacija dovode do zaključka da mnogi segmenti kaskade mogu reaktivirati put samoobnavljanja stanica. Stanice ovih karakteristika nazivamo *de novo* matičnim stanicama pri čemu se podrazumjevaju stanice koje su ove karakteristike zadobile mutacijom, a ne diobom iz „zdrave“ samoobnavljajuće stanice ili matične stanice. Matične stanice raka uzrok su inicijacije ove skupine bolesti kao i razlog njenog recidiva te pokazuju visoki stupanj otpornosti na radijaciju i kemoterapiju (Surana i sur. 2014).

**Tablica 2.** Pregled mutacija WNT signalnog puta u odabranim karcinomima kod ljudi (Giles i sur. 2003)

Cell or tissue	Method	Genes	Regulation	Reference
1 PLAGL2-overexpressing astrocyte and GBM cells with PLAGL2 amplification	RT-PCR	<i>WNT6</i> <i>FZD9</i> <i>FZD2</i>	Upregulation	75
2 NHA with ASCL1 overexpression, compared with NT	RT-PCR	<i>TLE1</i> <i>AXIN2</i> <i>DKK1</i> <i>FZD5</i> <i>LRG5</i> <i>TCF7</i> <i>TF7L1</i>	Upregulation  Downregulation	79
GBM cells, compared with NHA	Microarray	<i>ASCL1</i> <i>DKK1</i>	Upregulation Downregulation	
3 Highly invasive GBM cells (U87R4), compared with non-invasive GBM cells (U87L4)	Microarray	<i>RANK1</i> <i>DISC1</i> <i>CD44</i> <i>FZD4</i> <i>Caspase3</i> <i>SMAD6</i> <i>MAML3</i> <i>PDCC4</i>	Upregulation   Downregulation	68
4 GBM cells and U87MG with constitutive $\beta$ -catenin S33Y	RT-PCR	<i>ZEB1</i> <i>TWIST</i> <i>N-cadherin</i> <i>SNAIL</i>	Upregulation	14
5 Radioresistant U373, compared with NT	Microarray	<i>WSP1</i> <i>FZD1</i> <i>APC</i> <i>LEF1</i> <i>TCF4</i> <i>CTNBP1</i> <i>WNT9B</i> <i>AXIN2</i>	Upregulation    Downregulation	110
6 U87 and LN229 cells with $\beta$ -catenin downregulation	STRING analysis and RT-PCR	<i>AKT1</i> <i>CTNND1</i> <i>JUN</i> <i>VEGFA</i>	Downregulation	95
LN229 xenograft tumor from $\beta$ -catenin siRNA-treated mice	IHC	<i>EGFR</i> <i>AKT</i> (phospho-, total) <i>STAT3</i> <i>MMP2</i> <i>MMP9</i>	Downregulation	
7 Patient-derived GBM cells with high MET expression, compared with MET low population	Microarray	<i>CD44</i>  <i>CCND1</i> <i>TCF7</i> <i>MYC</i> <i>LEF1</i>	Upregulation	123

Gene expressions by regulating EMT, stemness and WNT-related genes are altered as follows.

Nuklearni  $\beta$ -katenin vrši transaktivaciju TCF/LEF ciljnih gena, što za posljedicu ima poticanje staničnog rasta i represiju programa diferencijacije. Među ciljnim genima su *c-MYC*, *N-MYC*, *c-JUN*, *ciklin D1* koji sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa tj. diobe, geni *EPH* obitelji gena odgovorne za kodiranje adhezijskih molekula te geni za Survivin, *VEGF*, *IL-8*, *EGFR*. Time veza između aktivnog WNT signalnog puta i karcinoma postaje jasnija (Indranil i sur. 2013). Pojačana ekspresija proteina TCF-1 detektirana je u 51.6% uzoraka glioblastoma, a proteina LEF-1 u 71% uzoraka. Pojačana ekspresija LEF-1 sama po sebi može biti biljeg za razlikovanje astrocitoma gradusa II i III od glioblastoma. LEF-1 stoga može poslužiti kao marker malignosti kod tumora mozga (Pećina-Šlaus i sur. 2014). Detekcija  $\beta$ -katenina u nukleusu biljeg je aktivnog WNT signalnog puta (Li i sur. 2014), jer je kontrola njegove stabilnosti konačni produkt svih agonističkih i antagonističkih regulatora.

Aberantna aktivacija WNT signalnog puta ne doprinosi samo umnažanju stanica raka, nego pojačava njihovu otpornost na radijaciju i kemoterapiju, te može utjecati na represiju diferencijacije i mogućnost stanice da migrira. Od najvećeg je interesa u kontekstu kancerogeneze sposobnost aktivnog WNT puta da održava stanice u funkciji matičnih stanica. Matične stanice sadrže intrinzičnu uputu za diferencijaciju, stoga je pretpostavka da aktivacija Wnt signalnog puta može zaobići diferencijaciju blokirajući ili suprimirajući za to specifičan set gena (Clevers i Nusse 2012). Aberantne ekspresije ili mutacije proteina APC i  $\beta$ -katenina mijenjaju staničnu migratornu sposobnost.  $\beta$ -katenin osim uloge u Wnt signalnom putu u epitelnim stanicama utječe na još jedan proces. Esencijalan je vezujući protein u interakciji s citoplazmatskim dijelom skupine kadherina. Tipičan primjer je E-kadherin u zonulama adherens između stanica. Obavljajući ovu funkciju  $\beta$ -katenin je izričito stabilan u usporedbi s citoplazmatskim čiji se signalizacijski poluživot broji u minutama (Clevers i Nusse 2012). U normalnim uvjetima, ovi proteini stupaju u interakciju s aktinom i mikrotubularnim citoskeletnim sustavom. Mutirani  $\beta$ -katenin slabije veže E-kadherin na što upućuju studije s delecijama dijelova *CTNNB1* gena kod stanica karcinoma želuca (Giles i sur. 2003). Precizno uspostavljena ravnoteža između koncentracije citoplazmatskog i nuklearnog  $\beta$ -katenina određuje ishode WNT signalnog puta preciznije od iznosa apsolutnih koncentracija (Schiefer i sur. 2014).

#### 6.4.GENSKE/EPIGENSKE PROMJENE WNT SIGNALNIH KOMPONENTI

Aberantna WNT aktivacija pronađena je kod različitih tipova raka, uključujući i GBM. Mutacije u WNT signalnim komponentama (APC,  $\beta$ -katenin, AXIN, WTX, TCF4) mogu biti uzrok aktivacije Wnt signalnog puta u GBM tumorima (Kikuchi i sur. 2003, Austinat i sur. 2008, Kim i sur.2008, Fattet i sur. 2009, Anastas i sur. 2013). Kod raka debelog crijeva, mutacije u WNT signalnim komponentama bile su izrazito naglašene. Otprilike 85% tumoradebelog crijeva imaju mutacije na APC-u, uzevši u obzir da su aktivirane mutacije kod  $\beta$ -katenina bile proučavane u 50% slučajeva tumoradebelog crijeva kod kojih je nedostajala APC mutacija (Sparks i sur. 1998, Aust i sur. 2002, Sieber i sur.2002). APC je negativni regulator aktivacije WNT signalnog puta. Prema tome, većina APC mutacija su zapravo „loss-of-function“ mutacije. Slično kao kod tumora debelog crijeva, mutacije u Wnt signalnim komponentama ( $\beta$ -katenin, APC i AXIN1) detektirane su na meduloblastomima (tumor na mozgu koji primarno nastaje u malom mozgu) (Zurawel i sur. 1998, Eberhart i sur. 2000, Yokota i sur. 2002, Baeza i sur. 2003, Silva i sur.2013). Posljednja opsežno provedena istraživanja pokazala su da mutacije na egzonu 3  $\beta$ -katenina, odgovaraju njegovoj fosforiliranoj regiji koja je pronađena u 18-22% slučajeva kod meduloblastoma (Yokota i sur. 2002, Baeza i sur. 2003). Nadalje, 5% imalo je mutacije na APC ili AXIN1 (Baeza i sur. 2003, Silva i sur. 2003). Mutacije  $\beta$ -katenina detektirane kod oboljelih od raka jetre i meduloblastoma, dovele su do poremećaja fosforilacije i degradacije  $\beta$ -katenina što je rezultiralo hiperaktivacijom WNT signalnog puta (Austinat i sur. 2008, Fattet i sur. 2009, Kim i sur. 2013). Prema tome, mutacijski status WNT signalnih komponenti je indikator WNT aktivacije kod tumora. Kao krajnja suprotnost tumoru debelog crijeva i meduloblastomima, genske mutacije kod  $\beta$ -katenina i APC-a u GBM nisu pronađene (Logan i sur. 2004, Reya i sur.2005). Identificirana je homozigotna delecija FAT Atypical Cadherin 1 (FAT1), negativni efektor WNT signalnog puta u GBM.

Kopija izgubljenog FAT1 pronađena je u približno 20% od istraživanih GBM-a; WNT signalno povezani geni bili su pojačani, sugerirajući pritom da je gubitak FAT1 kritični molekularni događaj za WNT aktivaciju u GBM-u. U skladu sa TCGA(The Cancer Genome Atlas) anaboličkom bazompodataka, učestalost inaktivacije mutacije FAT1 u GBM-u je oko 1%. Epigenetsko smanjenje negativnog utjecaja Wnt signalnog puta može aktivirati WNT signaliziranje i pridonjeti malignom ponašanju GBM-a. Frizzled-povezani proteini (FRPs) su topljivi proteini koji se vežu na WNT i interferiraju s WNTsignalnim putem. Dickkopf (DKK) se ponaša kao antagonist WNT signaliziranja putem povezivanja na njegov CO-receptor LRP

(Shou i sur. 2002). Uistinu, epigenetsko smanjenje negativnog utjecaja inhibitornih gena WNT signalnog puta često se događa u gliomima, uključujući i hipermetilaciju promotora sFRP-a (sFRP1, sFRP2, sFRP4, sFRP5), Dickkopf-a (DKK1, DKK3) i Naked-a (NKD1, NKD2). Hipermetilacija promotora sFRP1, sFRP2 i NKD2 u GBM-u, pojavljuje se u više od 40% primarnih GBM uzoraka. Roth i sur. (2000) izvijestio je o ulozi sFRP-a u proliferaciji i migraciji gliomskih stanica (Roth i sur. 2000). U toj studiji ektopična ekspresija sFRP-a reducira gliomsku pokretljivost stanica povećanjem MMP2 (matriks metaloproteinaza 2). Hipermetilirani DKK1 promotor identificiran je u 50% sekundarnih GBM (Foltz i sur. 2010, Schiefer i sur. 2014). Sumarno, ove studije upućuju na to da epigenetske promjene WNT signalnih komponenti, imaju odlučujuću ulogu u WNT aktivaciji u GBM.

## **7. WNT SIGNALIZACIJA U GBM SPOSOBNIM ZA DIFERENCIJACIJU**

### **7.1. WNT SIGNALIZACIJA U MATIČNIM STANICAMA**

Već je ustanovljeno da WNT signalizacija regulira diferencijaciju matičnih stanica i niše (niša matičnih stanica je ograničeno i specijalizirano područje gdje obitavaju matične stanice, Gabrijela Korica, University of Technology, Graz, Austrija, 2015) matičnih stanica u normalne stanice. Npr. intestinalne matične stanice koje su imale TCF4 mutaciju, nisu uspjele podnijeti samoobnovu matičnih stanica koja je potom rezultirala regresijom intestinalnog tkiva (Korinek i sur. 1998). U sustavu folikula dlake, ektopična ekspresija DKK uzrokovala je deficit folikula dlake i žlijezde dojke, indicirajući tako ulogu WNT signalizacije u niši matičnih stanica (Andl i sur. 2002). Suprotno tome, aktivacija WNT signalnog puta pod pritiskom od strane mutiranog  $\beta$ -katenina, povećala je razinu matičnih stanica u folikulu dlake (Gat i sur. 1998).

Model tumorskih matičnih stanica (cancer stem cells – CSCs) pretpostavlja staničnu hijerarhiju u kojoj CSCs uglavnom dovodi do nastanka tumora i njegovog razvitka. (Facchino i sur. 2011, Suva i sur. 2014). Karakteristike koje su često povezane sa CSCs uključuju sposobnost samoobnove, sličnost s normalnim matičnim stanicama i tumorogenezu *in vitro/vivo* (Gursel i sur. 2011). Neke su studije pokazale da je inhibicija WNT signalizacije putem modulacije  $\beta$ -katenina, LEF i TCF spriječila klonogeni rast raznih vrsta tumorskih stanica (Fodde i sur. 2007, Vermeulen i sur. 2010, Kanwar i sur. 2010, Jin i sur. 2011,

Ramachandran i sur. 2014). Uz to, WNT inhibirajući faktor 1 (WIF1) inducirao je stanično starenje, sprječavajući uslijed toga matičnost i rast tumora (Ramachandran i sur. 2014).

## 7.2. WNT SIGNALIZACIJA U GBM MATIČNIM STANICAMA (GSCs)

Unatoč kontroverzama vezanih za pojedine tumorske modele, mnogobrojne studije podupiru teoriju o GSCs kao kritičnoj staničnoj populaciji koja pridonosi GBM malignosti, terapijskoj rezistenciji te ponovnom pojavljivanju tj. povratku tumora (Das i sur. 2008, Wang i sur. 2013, Ortensi i sur. 2013). Povezanost između WNT signalizacije i GSCs razjašnjena je u narednim istraživanjima. Studija Depinho grupe (Zheng i sur. 2010) pokazala je da je *PLAGL2* na kromosomu 20q11.21 pojačan u primarnim GBM uzorcima i GBM staničnim linijama (Zheng i sur. 2010). *PLAGL2* podržava samoobnavljajuću sposobnost GBM stanica, dok s druge strane ograničava NSC diferencijaciju. Pretjerana ekspresija *PLAGL2* u astrocitama i GBM stanicama dovodi do pozitivne regulacije WNT signalizirajućih komponenti, uključujući WNT6, FZD9 i FZD2. K tome, *PLAGL2* pokazao se bitnim za održavanje matičnih stanica i gliomagenezu putem aktivacije kanonske WNT signalizacije (Zheng i sur. 2010, Sekiya i sur. 2014). Još jedna studija pokazala je utjecaj WNT signalizacije u GSCs putem FoxM1 (Zhang i sur. 2011). Njeni su autori pokazali da FoxM1 djeluje kao promotor nuklearne translokacije  $\beta$ -katenina direktno se vežući na  $\beta$ -katenin, sukladno ekspresijskom nivou nuklearnog FoxM1 u suradnji s  $\beta$ -kateninom u uzorcima GBM-a. FoxM1 je fosforiliran MELK-om, kinazom obogaćenom GSC-om. FoxM1 također pospješuje samoobnovu i otpornost na zračenje u GBM stanicama (Joshi i sur. 2013). Shodno tome, FoxM1 selektivno se veže na promotor Sox2, glavni regulator samoobnavljajućeg GSC i na taj način potiče transkripciju matičnih stanica (Lee i sur. 2015).

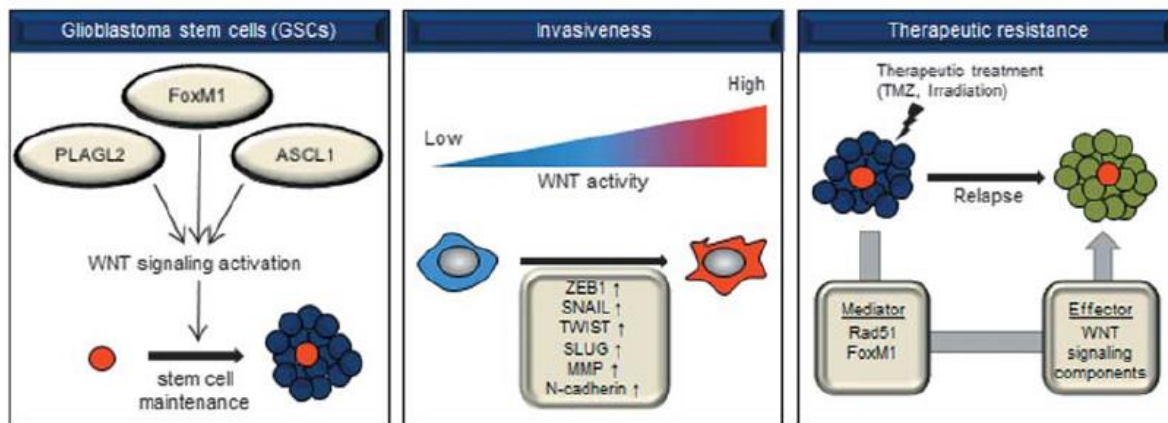
Rheinbay i sur. (2013) napravili su komparativnu analizu kromatina u GSCs usporedivši ga sa cijelim tumorom te su, na taj način, uspjeli identificirati dio razvojnogtranskripcijskog faktora, jedinstvenog za GSCs. Otkrili su da ljudski homolog gena (*ASCL1*) aktivira WNT signalizaciju u GSCs tako da inhibira negativni regulator DKK1 (Rheinbay i sur. 2013). S obzirom da je aberantna WNT aktivacija u GBM potpomognuta epigenetskom regulacijom, a ne genskim mutacijama, epigenetski profili cijelog genoma će najvjerojatnije rasvijetliti mehanizme u matičnim stanicama koje su pod kontrolom WNT signalnog puta u GSCs. Uz to Bartscherer i sur. (2006) otkrili su da je očuvani seven-pass transmembranski protein, Evi, uključen u sekreciju WNT liganada u *Drosophila*-i i humanim

stanicama utječući tako na (kanonski) WNT signalni put (Goodman i sur. 2006, Bartscherer i sur. 2006, Augustin i sur. 2012). Uz to, otkrili su da je Evisnažno eksprimiran u gliomima i dadjelovanje Evi-ja u glioblastomima otežava proliferaciju, klonogeni razvoj i invaziju (pod invazijom se ovdje misli na širenje tumorskih stanica u okolna tkiva) (Augustin i sur. 2012). Druga su istraživanja pokazala da su WNT signalne komponente kao Frizzled i Dishevelled 2 (Dvl2) prekomjerno eksprimirane u GBM i da ti geni djeluju kao promotori klonogenog rasta. (Holland i sur. 2001, Jin i sur. 2011).

### **7.3. WNT SIGNALNI PUT U GBM INVAZIJI**

Metastaziranje tumora je glavni faktor koji doprinosi smrtnosti uzrokovane tumorima. Epitelno-mezenhimska tranzicija (EMT) je ključni proces koji omogućuje stanicama raka epitelnog podrijetla da metastaziraju u udaljene organe. WNT signalni put je uključen i u tumorsku invaziju i u EMT. Neke su studije pokazale da aktivacija WNT signalnog puta povećava pokretljivost stanica raka odgovornih za rak mjehura, dojki i gušterače (Xue i sur. 2011, Smit i sur. 2011). Povećana koncentracija pozitivnih WNT signalnih regulatora, povećava ekspresiju EMT povezanih gena kao npr. *ZEB1*, *SNAIL*, *TWIST*, *SLUG* i *N-kadherina*, ukazujući pritom na ulogu WNT signalnog puta u EMT-u (Howe i sur. 2003, Kemler i sur. 2004, Wellner i sur. 2009, Mikheeva i sur. 2010, Yang i sur. 2010, Han i sur. 2011, Scheel i sur. 2011) (Slika 3.).





**Slika 3.** Višestruke uloge WNT signalnog puta u GBM: 1. Održavanje matičnih stanica glioblastoma, 2. Povećana migracija i invazivnost, 3. Povećana rezistentnost na lijekove. WNT regulatori signalizacije (npr. PLAGL2, FoxM1, Evi/Gpr177 i ASCL1) dovode do aktivacije WNT signalnog puta i time povećavaju mogućnost samoobnavljanja GBM stanica. WNT signalna aktivacija pozitivno regulira ekspresiju EMT-povezanih gena (npr. ZEB1, SNAIL, TWIST, SLUG, MMP i N-cadherin), dovodeći do povećanja migracije i invazivnosti GBM stanica. Usprkos kemo i radioterapiji, pozitivna regulacija WNT signalizacije pomoću gena za popravak DNA pomaže ponovnom razvoju tumora i mogućem recidivu.

Ektopična ekspresija aktivnog  $\beta$ -katenina potiče ekspresiju ZEB1 u GBM stanicama i povećava staničnu pokretljivost (Kahlert i sur. 2012). S druge pak strane, inhibicija  $\beta$ -katenina koči staničnu invaziju u 487MG i LN229 GBM stanicama (Yue i sur. 2010). Uz to, pokazalo se da WNT5H uzrokuje migraciju u GBM stanicama aktivirajući  $\beta$ -katenin neovisni put. Smanjenje WNT5A u GBM stanicama znatno inhibira mogućnost migracije tih stanica bez da utječe na kinetiku proliferacije (Kamino i sur. 2011). Sukladno tome, ekspresija rekombinantnog WNT5H proteina omogućila je migraciju u GBM stanicama povećavajući aktivnost MMPL (Kamino i sur. 2011). Slični zaključci proizašli su korištenjem WNT regulatora kao npr. WNT2 i FZD2 (Pu i sur. 2009, Kamino i sur. 2011).

Uključenost WNT signalne aktivacije u GBM invazivnosti vidljiva je u radu (Jin i sur.2011). Autori su obogatili, izrazito invazivne GBM populacije stanica, kroz seriju *in vivo* transplantacija, analizirajući pritom mRNA ekspresiju tih populacija. FZD4, pozitivni WNT regulator identificiran je kao uzročni efektor invazivnih fenotipa GBM stanica (Jin i

sur.2011). Zaključno, WNT signalni put ima ključnu ulogu u GBM invaziji stoga je opravdana lokalizacija nastanka WNT signala zbog potencijalne terapijske primjene.

#### **7.4. WNT SIGNALNI PUT U TERAPEUTSKOJ REZISTENCIJI**

Većina tumora razvija otpornost na radioterapiju i kemoterapiju. Neke su studije pokazale da aktivacija WNT signalnog puta uzrokuje rezistenciju na lijekove kod mnogih tumora, uključujući tumore jajnika, debelog crijeva i gušterače (Varma i sur. 2005, Peng i sur. 2011, Anastas i sur. 2014)(Slika 3.). Npr. WNT5A bio je pojačano reguliran kod stanične linije karcinoma jajnika koja je bila otporna na Oxaliplatin (Varma i sur. 2005). Dislocirana ekspresija WNT5A omogućila je veću rezistenciju tumorskih stanica jajnika na lijekove poput Paclitaxela, 5-fluorouracila, Epimbicina i Etoposida (Bao i sur.2011). WNT5A je aktivirao Abt signalni put i na taj način osigurao rezistenciju stanica debelog crijeva na inhibitore histon-deacetilaze (Bordonaro i sur.2011). Shodno tome, inhibicija WNT5A dovela je do lijekovima izazvane apoptoze kod raka gušterače (Griesmann i sur.2013). U GBM Auger i sur. (2006) pokazali su da WNT signalni put djeluje kao promotor rezistencije na Temozolomide, standardni kemoterapeutik za pacijente koji imaju GBM.

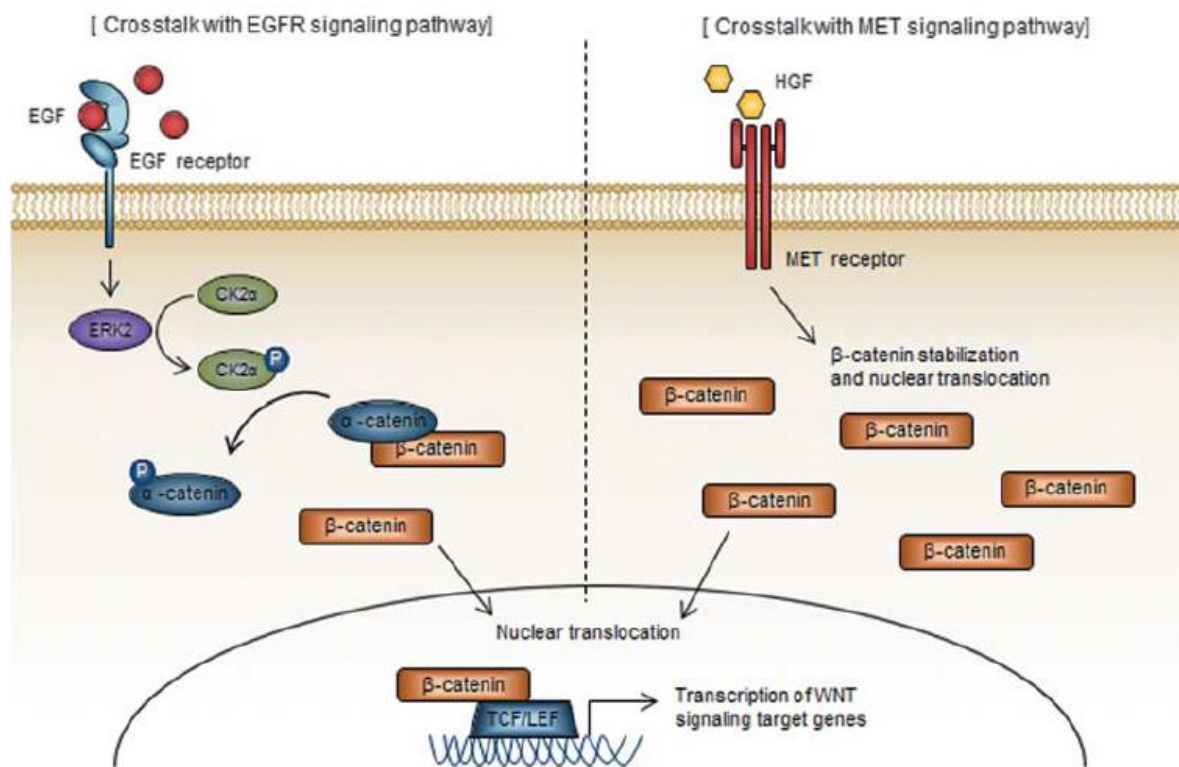
WNT signalni put također doprinosi radiorezistenciji tumorskih stanica (Chen i sur. 2007, Woodward i sur. 2007, Zhang i sur. 2010). Kod modela stanica dojki stabilizirani  $\beta$ -katenin selektivno rezistentna tvorevina na dojci i povećana rezistencija na zračenje u Sca1<sup>+</sup> podpopulaciji u usporedbi s odgovarajućim Sca1<sup>-</sup> stanicama (Woodward i sur. 2007, Zhang i sur. 2010). TCF4 također se pokazao odgovornim za radiorezistenciju tumorskih staničnih linija debelog crijeva (Kendziorra i sur. 2011). U GBM, Bao i sur. (2006)su otkrili da su CD133<sup>+</sup> stanice obogaćene sa GSC(izložene matičnim stanicama glioblastoma) bile otpornije na zračenje od CD133<sup>-</sup> stanica. Uzrok tomu bio je povećan kapacitet popravaka DNA u CD133<sup>+</sup> stanica (Bao i sur. 2006). Ti rezultati ukazuju na to da CD133<sup>+</sup> populacija tumorskih stanica pridonosi radiorezistencijikod GBM-a i što je više vjerojatno doprinosi vraćanju GBM-a. Slično tomu, Zhang i sur.(2012) došli su do podataka da FoxM1 djeluje kao promotor GBM rezistencije putem regulacije Rad51, ključne komponente prilikom procesa popravka DNA (Zhang i sur.2012).

Koristeći *in vivo* Orthotopic Xenograft tumorski model kombiniran s *in vivo* radijacijom, Kim i sur.(2012) uspjeli su dobiti genske potpise koji su obogaćeni što se tiče

radiorezistencije GBM stanica u usporedbi s ishodišnim tumorskim stanicama(Kim i sur.2012). Radiorezistentne GBM stanice ekspimiraju visoku razinu WNT signalno povezanih gena poput *WISPI*, *FZD1*, *LEF1*, *TCF4*, *WNT9B* i *AXIN2*. Inhibicija WNT signalnog puta putem XAV93S, WNT signalnog inhibitora, izaziva povećanje senzitivnosti GBM stanica na radijaciju.

## **7.5. CROSS-TALKIZMEĐU WNT I OSTALIH SIGNALNIH PUTEVA U GBM**

Cross-talk se odnosi na međudjelovanje dviju ili više komponenti signalnog puta, najčešće između proteina u signalnoj kaskadi. RTK (Receptor Tirozin Kinaza) djeluje kao promotor preživljavanja, proliferacije i invazije kod GBM. Hiperaktivacija RTK signalizacije uzrokovane genomskom amplifikacijom i/ili aktivacijom RTKs mutacije u više od 90% slučajeva uzrokuje GBM(Verhaak i sur. 2010, Noushmehr i sur. 2010). Amplifikacije ili somatske mutacije na EGFR, PDGF, FGFR i ME1 često djeluju na GBM pojačavajući ekspresiju tumora. (Verhaak i sur.2010). Zbog toga će se u narednom dijelu rada govoriti o potencijalnoj vezi između WNT i RTK signalnih puteva(Slika 4.).



**Slika 4.** Cross-talk s drugim signalnim putevima. Na slici je prikazan cross-talk između EGFR i MET. Aktivacija EGFR omogućuje fosforilaciju CK2 $\alpha$  što dovodi do razdvajanja kompleksa  $\alpha$ -katenin/ $\beta$ -katenin (lijevo). Iako detaljni mehanizam nije razjašnjen do kraja, poznato je da MET aktivacija povećava stabilnost  $\beta$ -katenina. Slobodan citoplazmatski  $\beta$ -katenin stabiliziran je i dislociran u jezgru.  $\beta$ -katenin u jezgri povezuje TCF/LEF transkripcijski faktor koji inducira ekspresiju gena WNT signalnog puta.

### 7.6.1. CROSS-TALK S EGFR SIGNALNIM PUTEM

EGFR amplifikacija i hiperaktivacija pronađeni su kod 60 % pacijenata, oboljelih od GBM (Ekstrand i sur. 1992, Watanabe i sur. 1996, Ohgaki i sur. 2004, Huang i sur. 2009). Aktivacija EGFR inducira negativnu mitogenu signalizaciju, kao i mitogen-aktivirajuću protein-kinazu, fosfatidil-inozitol 3-kinazu/Akt te transducere i aktivatore transkripcijskih (STAT) puteva (Huang i sur. 2009, Karpel-Massler i sur. 2009). Bioinformatička analiza koristeći program za analizu gena u interakciji (STRING), pokazala je da je  $\beta$ -katenin povezan s nekoliko gena, uključujući *Akt1*, *CCND1*, *JUN*, *P53* te *VEGFA* (Yue i sur. 2010).

Shodno tome, nekoliko je studija pokušalo naći poveznicu između EGFR i WNT signalnih puteva, a jedna je pokazala da inhibicija  $\beta$ -katenina u GBM staničnim linijama (U87MG i LN229) dovodi do negativne regulacije *EGFR*, *STAT3*, *Akt1*, *MMP2* i *MMP9*, *FRA-1* te *c-MYC*. Druga je pak studija pokazala da negativna regulacija TCF4 reducira *Akt1* ekspresiju vezanjem na Akt1 promotor, stvarajući tako poveznicu između AKT i WNT signalnog puta (Cheng i sur.2011). Neki radovi ukazuju na to da je EGF signalizacijapozitivni regulator WNT signalnog puta (Lu i sur. 2003, Ji i sur. 2009). EGF-inducirana ERK2 uzvodna regulacija rezultira fosforilacijom CK2a, a potom i CK2 $\alpha$  te konačno pojedinačnom fosforilacijom  $\beta$ -katenina na S641 (Ji i sur.2009). CK2 $\alpha$ -posredovana fosforilacija  $\alpha$ -katenina uzrokuje disocijaciju kompleksa  $\alpha$ -katenin/ $\beta$ -katenin te posljedično, prelaska  $\beta$ -katenina u jezgru, gdje formira kompleks  $\beta$ -katenin/TCF/LEF. Uz to, dugotrajno liječenje EGF-om rezultiralo je nizvodnom regulacijom transkripcije kaveolina-1 i E-kaderina (Lu i sur.2003). Nedostatak kaveolina-1 inducira je transaktivaciju  $\beta$ -katenina, zbog čega je nedostatak E-kaderina izazvao stanica-stanica (cell-cell) poveznicu i inducira EMT.

### 7.6.2. CROSS-TALK S MET SIGNALNIM PUTEM

Receptor faktora rasta kod hepatocita (MET) ima ključnu ulogu u rastu tumora, održavanju matičnih stanica i metastaziranja (Kong i sur. 2009, Joo i sur. 2012). Kod GBM, razina ekspresije MET-a koreliraju niskom stopom preživljavanja pacijenata i malignošću (Nabeshima i sur. 1997, Louis i sur. 2006). Uz to, kliničke analize GBM uzoraka otkrile su pozitivnu poveznicu između MET ekspresije i neinvazivno povezanih gena (*MMP2* i *MMP9*) te proto-onkogeni (c-MYC, KRAS, JUN) (Louis i sur. 2006).

Postoji nekoliko dokaza koji upućuju na to da je MET signalni put povezan sa WNT-om kod raka, iako ta poveznica u GBM još nije u potpunosti razjašnjena. Kim i sur. (2013) pokazali su da se MET signalni putaktivira uz dodatak HGF-inducirane nuklearne translokacije  $\beta$ -katenina. Štoviše, MET inhibicija dovela je do blokade nuklearne translokacije  $\beta$ -katenina i aktivnosti TCF/LEF promotora, (Kim i sur.2013) sugerirajući pritom mogućnost da je MET signalni put pozitivni regulator WNT signalnog puta.

### **7.6.3.CROSS-TALK WITH SONIC HEDGEHOG (SHH) SIGNALNIM PUTEM**

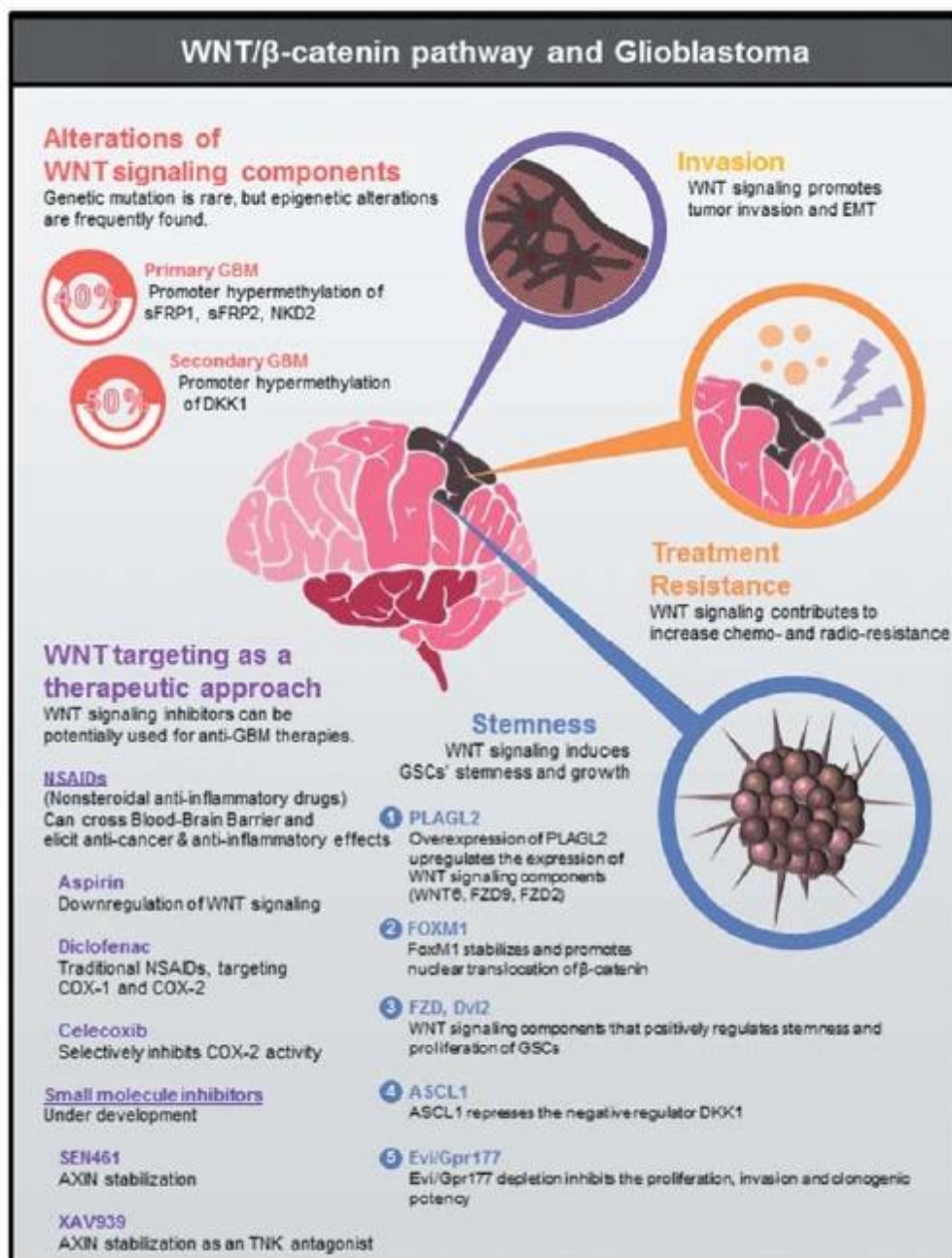
SHH signalni put je ključni put za staničnu proliferaciju i tumorogenezu (Dahmane i sur. 2001, Pasca di Magliano i sur. 2003, Takezaki i sur. 2011). Studije na meduloblastomu otkrile su da su SHH i WNT istaknuti signalni putevi koji omogućuju formiranje izrazitih tumorskih podgrupa (Northcott i sur. 2011, Taylor i sur.2012). GLI1 u stanicama meduloblastoma, u fizičkoj je interakciji sa  $\beta$ -kateninom uzrokujući pritom njegovu degradaciju, a ujedno podržavajući mogućnost da SHH i WNT možda ipak nisu koaktivirani u ovim tumorima (Zinke i sur.2015). Uistinu, mutacije u SHH signalnim komponentama (PTCH1 i SUFU) koje su dovele do aberantne SHH signalne aktivacije, pronađene su kod 30% pacijenata oboljelih od meduloblastoma(Taylor i sur. 2002). Iako su alteracije SHH signalnih komponenti i amplifikacija kromosoma na 12q regiji koja sadrži GLI1 bili rjeđe pronađeni (Reifenberger i sur. 1994, Collins i sur. 1995, Werner i sur. 1996, Rao i sur. 1997), uočena je aktivacija SHH signalnog puta u GBM. Npr. blokada SHH signalnog puta kemijskim inhibitorom Vismodegib inducirala je zastoj staničnog ciklusa i apoptozu te negativno reguliranu ekspresiju GLI1 u uzorcima GBM-a (Chandra i sur. 2015). Nekoliko je studija otkrilo da SHH signalizacija ima supresijski efekt na WNT signalni put (He i sur. 2006, Rossi i sur. 2011,Zinke i sur. 2015). Npr. opisano je da se GLI1 veže na sFRP1 promotor i povećava sFRP1 mRNA ekspresiju u GBM. Daljnja su istraživanja provedena sa ciljem da se razjasni povezanost između SHH i WNT signalnih puteva u GBM.

### **8. CILJANJE WNT SIGNALNIH PUTEVA GBM-a**

Razine ekspresije gena WNT signalnog puta pronađeni su kod više istraživanih grupa u kojima su sudjelovali, uglavnom, pacijenti s lošim prognozama za preživljavanje. Pomoću RT-PCR i imuno-histokemijskog bojenja, analizirane su razine ekspresije WNT komponenata(Sareddy i sur. 2011). Ekspresija mRNA  $\beta$ -katenina, Dul3 i ciklina D1 bila je značajnije viša na uzorcima tkiva oboljelog od glioblastoma nego kod zdravog tkiva mozga. Uz to, proteinski nivoi  $\beta$ -katenina, TCF4, LEF1, c-MYC, n-MYC, c-JUN i ciklina D1 bili su u korelaciji sa stupnjem glioma, gdje je  $\beta$ -katenin imao značajnije pozitivniju korelaciju s TCF4 i LEF1. U drugoj je studiji ekspresija WNT1,  $\beta$ -katenina i ciklina D1 bila povezana s malignošću i kliničkim posljedicama kod pacijenata oboljelih od GBM (Liu i sur. 2011).

Novije genske studije pokazale su gensku i molekularnu heterogenost između tumora kao i između GBM tumora. LEF1, ključni efektor WNT signalnog puta, regulira intra-tumorsku heterogenost, pokazujući time raširenost i povezanost između transkripcijom reguliranog WNT signalizirajućeg faktora i GBM puteva (Rheinbay i sur. 2013, Sottoriva i sur. 2013).

Sve gore navedene studije pokazuju da otkrivanje lokacije WNT-a može imati efektivan terapijski pristup protiv GBM-a (Tablica 2). Identifikacija WNT signalnih inhibitora omogućila je demonstraciju terapijske učinkovitosti kod raznovrsnih slučajeva tumora kod čovjeka (Su i sur. 2003, You i sur. 2004, Liu i sur. 2004, Yoshizumi i sur. 2004, Emami i sur. 2004, He i sur. 2005, Nagayama i sur. 2005, Fuji i sur. 2007, Chen i sur. 2009, Lazarova i sur. 2013). No ipak, relativno je malo poznato o kliničkoj primjeni WNT inhibitora kao tretmana za GBM, stoga će u ovom dijelu biti prikazana lista WNT signalnih inhibitora koji bi mogli imati potencijalnu primjenu kod anti-GBM terapije. Neke vrste lijekova, koje su se pokazale uspješnima prilikom lociranja WNT signalnog puta, razvile su se ili se još uvijek razvijaju za klinička ispitivanja. Ti se lijekovi mogu svrstati u tri skupine: 1) ne-steroidni protiv-upalni lijekovi, 2) nisko-molekularni kemijski inhibitori i 3) terapijska antitijela koja ciljaju različite WNT signalne komponente (Slika 5.).



**Slika 5.** Višestruke uloge WNT signalnog puta, jednog od ključnih signalnih puteva u GBM. Iako nisu detektirane strukturne genske promjene WNT signalnih komponenti, primijećena je hipermetilacija WNT signalnog represora u 50% GBM pacijenata. WNT signalizacija ima višestruke uloge u razvoju središnjeg živčanog sustava i gliomagenezi. Uloge WNT signalnog puta su: 1. Održavanje nematičnosti (stemness), 2. Migracija i invazivnost, 3. Indukcija rezistencije na liječenje. Prema tome, liječenje koje uključuje ciljanje WNT signalnog puta, bit će važno za iskorjenjivanje GSC-a i svladavanje rezistencije na standardna liječenja.



Ne-steroidni protiv-upalni lijekovi (NSAIDs) korišteni su za liječenje upala i vrućice. NSAIDs inhibiraju aktivnost prostaglandin biosintetskih enzima, izomere ciklooksigenaze (COX-1 i COX-2); pokazali su anti-kancerogene kao i protiv-upalne efekte te efikasno prolaze barijeru ulazeći iz krvi u mozak (Courad i sur. 2001, Parepally i sur. 2006). Ipak, NSAIDs su privukli veliku pažnju kao potencijalni antikancerogeni agensi (Tablica 3.).

**Tablica 3.** Klinička testiranja NSAIDs (Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs ) u stanicama raka kod ljudi

Compound	Tumor type	Identifier	Phase	Detailed description
Aspirin	Esophageal cancer	NCT02326779	3	Effect of low-dose aspirin on survival of esophageal cancer patients
		NCT00224679	3	Efficacy test of regular low-dose aspirin in reducing the recurrent tumor of colorectal adenomatous polyps
	Colorectal cancer	NCT00002527	3	Examination of chemo-preventive effect to reduce risk of colorectal cancer
		NCT02394769		
		NCT02125409	3	
		NCT00983580	2	
		NCT00062023	2	Safety/efficacy test of NSAIDs in colorectal cancer
		NCT00727948		Examination of anti-angiogenic effect in breast cancer patients
		NCT01431053	2	Efficacy and safety test of aspirin as the adjuvant treatment in breast cancer patients
		NCT01612247	2/3	Safety/efficacy study of cyclophosphamide and methotrexate in combination with aspirin treatment in breast cancer
Lung cancer	NCT01058902	3	Efficacy study of aspirin on survival of NSCLC	
Prostate cancer	NCT02420652	2	Examination of anti-proliferation effect in prostate cancer patients	
	NCT00316927	3	Examination of anti-proliferation effect of locally advanced or metastatic prostate cancer	
Diclofenac	Basal cell carcinoma	NCT01358045		Efficacy test of NSAIDs in basal cell carcinoma
	Breast cancer	NCT01596647	1	Examination of dovitinib–drug interaction effect on the pharmacokinetics of a cocktail including caffeine, diclofenac, omeprazole, and midazolam
Celecoxib	Head and neck cancer and Lung cancer	NCT00058006	2	Examination of chemo-preventive effect to reduce risk of recurrent cancer
		NCT00052611		
		NCT00527982		Examination of toxicity/efficacy test as adjuvant therapy
	Head and neck cancer	NCT00400374	1	Examination of tumor prevention effect on Erlotinib (OSI-774, Tarceva)
		NCT00061906	2	Safety/anti-proliferation efficacy study of celecoxib in differentiated thyroid carcinoma
	Pancreatic cancer	NCT00581971	1b/2	Radiosensitizing effect with radiation treatment
		NCT00177853	1	Safety/efficacy study of celecoxib and irinotecan combination effect concurrent radiation treatment
	Esophageal cancer	NCT00137852	2	Safety/efficacy study of celecoxib treatment combined with irradiation
		NCT00520091		
	Glioblastoma	NCT00112502	2	Examination of anti-proliferation effect with radiation treatment

Clinical information pertaining to aspirin, diclofenac, and celecoxib in various cancer types is available at the following website: <https://clinicaltrials.gov>.

Aspirin je mala molekula topiva u mastima koja se koristi za suzbijanje bolova. Mnoge studije pokazuju da aspirin inhibira proliferaciju staničnih linija raka koje nemaju ekspresiju gena *COX-1* i *COX-2* (Zhang i sur. 1999). Ranije studije pokazuju da aspirin negativno regulira WNT signalni put u stanicama raka rektuma. Potvrđeno je da dnevno uzimanje aspirina kroz period od pet godina više ne reducira rizik za razvitak raka debelog crijeva. U GBM-u aspirin inhibira proliferaciju i invazivnost te povećava apoptozu radi zastoja interfaze stanične diobe u genima U87MG i A172. Do toga dolazi radi pozitivne regulacije WNT signalnog puta. Prateći razvoj tretmana aspirinom TCF/LEF promotorske aktivnosti i ekspresije WNT signalno-lociranih gena (*c-MYC*, *ciklin D1* i *FRA-1*) bili su povišeni u GBM staničnim linijama (Chen i sur. 2011). Diklofenak je jedan od tipičnih NSAIDs-a i djeluje tako da inhibira gene *COX-1* i *COX-2*, dok je Celecoxib novija generacija lijekova koja selektivno inhibira *COX-2* aktivnost. Tretman tim lijekovima reducira proliferaciju, formiranje kolonija i metastaziranje GBM stanica (Sareddy i sur.2013).

Novija istraživanja su otkrila nekoliko malih molekula koje djeluju kao inhibitori i antitijela pronađenih kod WNT signalnog puta(Tablica 4.) (De Robertis i sur.2013).

**Tablica 4.** Eksperimentalni lijekovi koji ciljaju WNT signalni put

Developmental agents	Type	Target	Tumor type	Detailed description	Reference
SEN461	Small-molecule inhibitor	AXIN	Glioblastoma	SEN461 protected AXIN degradation, causing $\beta$ -catenin loss	158
XAV939	Small-molecule inhibitor	Tankyrase	Glioblastoma	XAV939 inhibited TNK degradation, increasing AXIN stability	110
Thiazolidinedione	Small-molecule inhibitor	$\beta$ -Catenin	Colon cancer	Thiazolidinedione inhibited cellular proliferation and metastasis	144
ICG-001	Small-molecule inhibitor	$\beta$ -Catenin	Colon cancer	ICG-001 downregulated survivin and cyclin D1 expression by disrupting the interaction between $\beta$ -catenin and CBP	148
Artificial F box protein	Small-molecule inhibitor	$\beta$ -catenin	Colorectal cancer	A chimeric F box protein (CFP) lead to <i>in vitro/vivo</i> growth inhibition by nuclear $\beta$ -catenin destruction	149
	Small-molecule inhibitor	$\beta$ -catenin	Colon cancer	A chimeric F box fusion protein reduced the $\beta$ -catenin, which downregulated TCF/LEF promoter activity	147
Inhibitors of WNT response	Small-molecule inhibitor	AXIN2	Colorectal cancer	IWRs stabilized AXIN2 via interacting with AXIN2 protein, which induced $\beta$ -catenin degradation	146
Inhibitors of WNT production	Small-molecule inhibitor	Porcupine	Colorectal cancer	IWPs was as a Porcn inhibitor, which blocked palmitoylation of WNT ligands	
FJ9	Small-molecule inhibitor	FZD7	Lung cancer	FJ9 inhibits the canonical WNT signaling, interrupting the interaction between FZD7 and Dvl.	143
WNT monoclonal antibodies	Monoclonal antibody	WNT1	Lung cancer	Anti-Wnt-1 suppressed cellular growth of lung cancer cells <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	161
	Monoclonal antibody	WNT1	Colorectal cancer	WNT1 monoclonal antibody reduced the clonogenic potential and TCF/LEF promoter activity	140
	Monoclonal antibody	WNT2	Melanoma	WNT2 monoclonal antibody inhibited <i>in vitro/vivo</i> proliferation and WNT signaling activation, whereas it induced cellular apoptosis	141
pAb5a-5	Polyclonal antibody	WNT5A	Gastric cancer	pAb5a-5 inhibited migration of gastric cancer cells and WNT5A-dependent Rac1 activation	162
SFRP2 Mab	Monoclonal Antibody	SFRP2	Angiosarcoma, Breast cancer	SFRP2 antibody inhibited tumor growth and migration	163
Foxy-5	Peptide	FZD5	Murine breast cancer	Foxy-5 inhibited metastasis capacity of mouse breast cell lines	164
MAb92-13	Murine monoclonal antibody	FZD10	Synovial sarcoma	MAb92-13 bound to FZD10 and exhibited anti-tumor effect	165
TT641	Polyclonal	FZD10	Synovial sarcoma	TT641 decreased <i>in vivo/vitro</i> proliferation	142

Small molecules and antibodies targeting WNT signaling are listed, along with their mechanisms of action.

Nasumična selekcija 16 000 molekula korištena je u istraživanju SEN461 kao obećavajući inhibitor WNT signalnoga puta, potvrdivši molekularni mehanizam inhibicije. SEN461 sprječavao je proteosomalnu degradaciju AXIN-a. Stabilizacijom AXIN-a, citoplazmatski nivo fosforiliranoga  $\beta$ -katenina je povećan, popraćen smanjenjem ukupne koncentracije  $\beta$ -katenina. Eksperimentalno, SEN461 uvelike je odgovoran za inhibiciju rasta potisnuvši WNT signalni put u GBM stanicama. XAV939 je antagonist Tankyrase (TRF-1, TNK) tako što inhibira interakciju s AXIN-om i regulira njegovu stabilnost. TNK enzimska aktivnost posredovana je ubikvitinizacijom AXIN-a i proteosomalnom degradacijom. XAV939 kontrolira WNT signalni put povećavajući stabilizaciju AXIN-a (Huang i sur.2009). Kim i sur.(2013) pokazali su da XAV939 potencijalno inhibira WNT signalni put u GBM stanicama U373 koje su rezistentne na zračenje (Kim i sur.2013). Kako bilo, nema kliničkog napretka u istraživanju gena *SEN461* i *XAV939*.

Antitijela koja napadaju WNT signalni put kategorizirana su kao: anti-ligand antitijela koja zarobljuju i neutraliziraju WNT ligande (WNT1, 2, 5A i sFRP2) (You i sur. 2004, Hanaki i sur. 2004, He i sur. 2005, Fontenot i sur. 2012) i anti-FZD antitijela (FZD5 i FZD10) (Nagayama i sur. 2005, Safholm i sur. 2008, Fukukawa i sur. 2008). Da bi se povećala sposobnost terapijskih antitijela da penetriraju kroz krvno-moždanu barijeru, novi su pristupi kao npr. konjugacija nanočestica i protutijelno inženjerstvom fazi istraživanja s ciljem razvoja novih terapijskih antitijela (Gabathuler i sur. 2010, Hernandez-Pedro i sur. 2013).

## 9. ZAKLJUČAK

WNT signalni put uvelike pridonosi nastanku i razvoju GBM-a, stoga su istraživanja uglavnom usmjerena prema otkrivanju gena zaslužnih za nastajanje određenih WNT proteina te pronalaženjem njihovih funkcija u svrhu što boljeg poznavanja mehanizma nastanka i djelovanja. Tako je u genomu sisavaca do sada detektirano 19 WNT gena čiji su produkti bogati cisteinom i koji u prosjeku sadrže 350-400 aminokiselina. U WNT regulaciji sudjeluje velik broj sekrecijskih glikoproteina koji djeluju kao ligandi ili okidači specifične kaskade signalnog puta. WNT signalni put može u stanici biti u aktivnom ili neaktivnom stanju, ovisno o prisutnosti WNT liganda s ekstracelularne strane membrane. Kad je WNT odsutan nekoliko proteina s citoplazmatske strane formira degradacijski kompleks. On se sastoji od aksina, adenomatous polyposis coli proteina (APC), glikogen sintaze kinaze (GSK3 $\beta$ ) i kazein kinaze I (CKI). Svrha ovog kompleksa je modifikacija transkripcijskog kofaktora  $\beta$ -katenina. CKI fosforilira serin 45 i treonin 41, a GSK3 $\beta$  serine na pozicijama 33 i 37 (svi su na amino terminalnoj regiji). Slijedi ubikvitinizacija pomoću E3 podjedinice ubikvitin ligaze-  $\beta$ -transducin repeat containing protein ( $\beta$ -TrCP) čiji F box/WD ponavljajući motiv prepoznaje fosforilirano mjesto. Ubikvitinizacija je signal kojidovodi do degradacije  $\beta$ -kateninapomoću 26S proteosoma. Posljedično, on ne ulazi u jezgru i izostaje aktivacija obitelji transkripcijskih faktora T-cell factor/lymphoid enhancing factor (TCF/LEF) tj. održava se stanje represije. TCF se u ovom stanju veže za transkripcijski represor Groucho. WNT ligand se s vanjske strane stanične membrane veže za sedmerostruki transmembranski receptor Frizzled (Fz) i njegov koreceptor low-density lipoprotein receptor related protein (LRP6 ili srodni protein LRP5). Citoplazmatski dio LRP-a fosforiliran je kompleksom WNT-Fz-LRP6 i tako aktivira aksin. Koncentracija  $\beta$ -katenina u citoplazmi raste i  $\beta$ -katenin prelazi u jezgru gdje aktivira transkripcijske faktore obitelji TCF/LEF i njihove ciljne gene. Nuklearni proteini Bcl9 i Pygopus također sudjeluju u aktivaciji ciljnih gena. Vežanje WNT na Fz receptor uzrokuje hiperfosforilaciju proteina dishevelled (DVL) koji time postaje aktivan i djeluje kao inhibitor GSK3 $\beta$ . DVL djeluje na sjecištu na kojem se WNT signalni put grana na dva segmenta. PLAGL2 podržava samoobnavljajuću sposobnost GBM stanica, dok s druge strane ograničava NSC (Neural stem cell) diferencijaciju. Prekomjerna ekspresija PLAGL2 u astrocitama i GBM stanicama dovodi do pozitivne regulacije WNT signalizirajućih komponenti, uključujući WNT6, FZD9 i FZD2. K tome, PLAGL2 se pokazao bitnim za održavanje matičnih stanica i gliomagenezu putem aktivacije kanonske WNT signalizacije. Radiorezistentne GBM stanice eksprimiraju visoke razine WNT signalno povezanih gena

poput *WISP1*, *FZD1*, *LEF1*, *TCF4*, *WNT9B* i *AXIN2*. Inhibicija WNT signalnog puta preko XAV93S, WNT signalnog inhibitora, izaziva povećanje senzitivnosti GBM stanica na radijaciju.

## 10. LITERATURA

1. Anastas JN, Kulikauskas RM, Tamir T et al. Wnt5a enhances resistance of melanoma cells to targeted Braf inhibitors. *J Clin Invest* 2014;124:2877–2890.
2. Anastas JN, Moon RT. Wnt signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer* 2013;13:11–26.
3. Andl T, Reddy ST, Gaddapara T et al. Wnt signals are required for the initiation of hair follicle development. *Dev Cell* 2002;2:643–653.
4. Augustin I, Goidts V, Bongers A et al. The Wnt secretion protein Evi/Gpr177 promotes glioma tumorigenesis. *EMBO Mol Med* 2012;4:38–51.
5. Austinat M, Dunsch R, Wittekind C et al. Correlation between betacatenin mutations and expression of wnt-signaling target genes in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer* 2008;7:21.
6. Aust DE, Terdiman JP, Willenbacher RF et al. The Apc/Beta-Catenin pathway in ulcerative colitis-related colorectal carcinomas: a mutational analysis. *Cancer* 2002;94:1421–1427.
7. Baeza N, Masuoka J, Kleihues P et al. Axin1 mutations but not deletions in cerebellar medulloblastomas. *Oncogene* 2003;22:632–636.
8. Bao S, Wu Q, McLendon RE et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006;444:756–760.
9. Baron JA, Cole BF, Sandler RS et al. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med* 2003;348:891–899.
10. Bartscherer K, Pelte N, Ingelfinger D et al. Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein. *Cell* 2006;125:523–533.
11. Bordonaro M, Tewari S, Cicco CE et al. A switch from canonical to noncanonical wnt signaling mediates drug resistance in colon cancer cells. *PLoS One* 2011;6:e27308.
12. Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *Journal of Cell Science*. 2008;121, 737-746.
13. Chandra V, Das T, Gulati P et al. Hedgehog signaling pathway is active in Gbm with Gli1 Mrna expression showing a single continuous distribution rather than discrete high/low clusters. *PLoS One* 2015;10:

e0116390.

14. Chen B, Dodge ME, Tang W et al. Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat Chem Biol* 2009;5:100–107.
15. Chen L, Huang K, Han L et al. Beta-Catenin/Tcf-4 complex transcriptionally regulates Akt1 in glioma. *Int J Oncol* 2011;39:883–890.
16. Chen MS, Woodward WA, Behbod F et al. Wnt/Beta-catenin mediates radiation resistance of Sca1+ progenitors in an immortalized mammary gland cell line. *J Cell Sci* 2007;120:468–477.
17. Clevers H, Nusse R. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell*. 2012;8;149(6):1192-1205.
18. Collins VP. Gene amplification in human gliomas. *Glia* 1995;15:289–296.
19. Courad JP, Besse D, Delchambre C et al. Acetaminophen distribution in the rat central nervous system. *Life Sci* 2001;69:1455–1464.
20. Dahmane N, Sanchez P, Gitton Y et al. The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. *Development* 2001;128:5201–5212.
21. Das S, Srikanth M, Kessler JA. Cancer stem cells and glioma. *Nat Clin Pract Neurol* 2008;4:427–435.
22. De Robertis A, Valensin S, Rossi M et al. Identification and characterization of a small-molecule inhibitor of Wnt signaling in glioblastoma cells. *Mol Cancer Ther* 2013;12:1180–1189.
23. Dihlmann S, Siermann A, von Knebel Doeberitz M. The nonsteroidal anti-inflammatory drugs aspirin and indomethacin attenuate Beta-Catenin/Tcf-4 signaling. *Oncogene* 2001;20:645–653.
24. Eberhart CG, Tihan T, Burger PC. Nuclear localization and mutation of beta-catenin in medulloblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000;59:333–337.
25. Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD et al. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4309–4313.
26. Emami KH, Nguyen C, Ma H et al. A small molecule inhibitor of beta-catenin/creb-binding protein transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:12682–12687.



27. Facchino S, Abdouh M, Bernier G. Brain cancer stem cells: current status on glioblastoma multiforme. *Cancers (Basel)* 2011;3:1777–1797.
28. Fattet S, Haberler C, Legoix P et al. Beta-catenin status in paediatric medulloblastomas: correlation of immunohistochemical expression with mutational status, genetic profiles, and clinical characteristics. *J Pathol* 2009;218:86–94.
29. Fodde R, Brabletz T. Wnt/Beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:150–158.
30. Foltz G, Yoon JG, Lee H et al. Epigenetic regulation of wnt pathway antagonists in human glioblastoma Multiforme. *Genes Cancer* 2010;1:81–90.
31. Fontenot E, Rossi E, Mumper R et al. A novel monoclonal antibody to secreted frizzled-related protein 2 inhibits tumor growth. *Mol Cancer Ther* 2013;12:685–695.
32. Fujii N, You L, Xu Z et al. An antagonist of Dishevelled protein-protein interaction suppresses beta-catenin-dependent tumor cell growth. *Cancer Res* 2007;67:573–579.
33. Fukukawa C, Hanaoka H, Nagayama S et al. Radioimmunotherapy of human synovial sarcoma using a monoclonal antibody against Fzd10. *Cancer Sci* 2008;99:432–440.
34. Gabathuler R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiol Dis* 2010;37:48–57.
35. Gat U, DasGupta R, Degenstein L et al. De novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell* 1998;95:605–614.
36. Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003;1653:1-24.
37. Goodman RM, Thombre S, Firtina Z et al. Sprinter: a novel transmembrane protein required for Wg secretion and signaling. *Development* 2006;133:4901–4911.
38. Griesmann H, Ripka S, Pralle M et al. Wnt5a-Nfat signaling mediates resistance to apoptosis in pancreatic cancer. *Neoplasia* 2013;15:11–22.
39. Gursel DB, Shin BJ, Burkhardt JK et al. Glioblastoma stem-like cells biology and therapeutic implications. *Cancers (Basel)* 2011;3:2655–2666.

40. Hanaki H, Yamamoto H, Sakane H et al. An Anti-Wnt5a antibody suppresses metastasis of gastric cancer cells in vivo by inhibiting receptor-mediated endocytosis. *Mol Cancer Ther* 2012;11:298–307.
41. Han SP, Kim JH, Han ME et al. Snai1 is involved in the proliferation and migration of glioblastoma cells. *Cell Mol Neurobiol* 2011;31:489–496.
42. He B, Reguart N, You L et al. Blockade of Wnt-1 signaling induces apoptosis in human colorectal cancer cells containing downstream mutations. *Oncogene* 2005;24:3054–3058.
43. He B, You L, Uematsu K et al. A monoclonal antibody against Wnt-1 induces apoptosis in human cancer cells. *Neoplasia* 2004;6:7–14.
44. He J, Sheng T, Stelter AA et al. Suppressing Wnt signaling by the Hedgehog pathway through Sfrp-1. *J Biol Chem* 2006;281:35598–35602.
45. Hernandez-Pedro NY, Rangel-Lopez E, Vargas Felix G et al. An update in the use of antibodies to treat glioblastoma multiforme. *Autoimmune Dis* 2013;2013:716813.
46. Holland EC. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet* 2001;2:120–129.
47. Howe LR, Watanabe O, Leonard J et al. Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation. *Cancer Res* 2003;63:1906–1913.
48. Hrčak, srce; Intracellular pathways in colorectal carcinogenesis, Saša Badžek , Vesna Lesko Kelović , Stjepko Pleština , Juraj Prejac , Mate Majerović , Goran Augustin; <Vol\_9\_Br\_1\_Unutarstanični\_signalni\_putevi\_u\_karcinogenezi\_kolorektalnog\_tumora.pdf>
49. Huang PH, Xu AM, White FM. Oncogenic EGFR signaling networks in glioma. *Sci Signal* 2009;2:re6.
50. Huang SM, Mishina YM, Liu S et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes wnt signalling. *Nature* 2009;461:614–620.
51. Indranil P, Seemana B, Anirban C, Mrinal KG. Current understanding on EGFR and Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling in glioma and their possible crosstalk. *Genes & Cancer*. 2013;4(11-12) 427-446.
52. Ji H, Wang J, Nika H et al. Egf-induced Erk activation promotes Ck2-mediated disassociation of alpha-catenin from beta-catenin and transactivation of beta-catenin. *Mol Cell* 2009;36:547–559.
53. Jin X, Jeon HY, Joo KM et al. Frizzled 4 Regulates Stemness and Invasiveness of Migrating Glioma Cells Established by Serial

Intracranial Transplantation. *Cancer Res* 2011;71:3066–3075.

54. Joo KM, Jin J, Kim E et al. Met signaling regulates glioblastoma stem cells. *Cancer Res* 2012;72:3828–3838.

55. Joost S, Almada LL, Rohnalter V et al. Gli1 inhibition promotes epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2012;72:88–99.

56. Joshi K, Banasavadi-Siddegowda Y, Mo X et al. Melk-dependent foxm1 phosphorylation is essential for proliferation of glioma stem cells. *Stem Cells* 2013;31:1051–1063.

57. Kahlert UD, Maciaczyk D, Doostkam S et al. Activation of canonical Wnt/Beta-catenin signaling enhances in vitro motility of glioblastoma cells by activation of Zeb1 and other activators of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Lett* 2012;325:42–53.

58. Kamino M, Kishida M, Kibe T et al. Wnt-5a signaling is correlated with infiltrative activity in human glioma by inducing cellular migration and Mmp-2. *Cancer Sci* 2011;102:540–548.

59. Kanwar SS, Yu Y, Nautiyal J et al. The Wnt/Beta-catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres. *Mol Cancer* 2010;9:212.

60. Karpel-Massler G, Schmidt U, Unterberg A et al. Therapeutic inhibition of the epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas: where do we stand? *Mol Cancer Res* 2009;7:1000–1012.

61. Kemler R, Hierholzer A, Kanzler B et al. Stabilization of beta-catenin in the mouse zygote leads to premature epithelial-mesenchymal transition in the epiblast. *Development* 2004;131:5817–5824.

62. Kendziorra E, Ahlborn K, Spitzner M et al. Silencing of the Wnt transcription factor Tcf4 sensitizes colorectal cancer cells to (chemo-) radiotherapy. *Carcinogenesis* 2011;32:1824–1831.

63. Kikuchi A. Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Sci* 2003;94:225–229.

64. Kim KH, Seol HJ, Kim EH et al. Wnt/Beta-catenin signaling is a key downstream mediator of met signaling in glioblastoma stem cells. *Neuro Oncol* 2013;15:161–171.

65. Kim Y, Kim KH, Lee J et al. Wnt activation is implicated in glioblastoma radioresistance. *Lab Invest* 2012;92:466–473.

66. Kim YD, Park CH, Kim HS et al. Genetic alterations of wnt signaling pathway-associated genes in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*

Hepatol 2008;23:110–118.

67. Klinički zavod za patologiju “Ljudevit Jurak”, KBC “Sestre milosrdnice”, Zagreb (2011.), Leo Pažanin: Histopatologija glijalnih tumora mozga <Pazanin\_Histopathology\_of\_glial\_tumors.pdf> . Pristupljeno 20. veljače 2016.
68. Kong DS, Song SY, Kim DH et al. Prognostic significance of C-Met expression in glioblastomas. *Cancer* 2009;115:140–148.
69. Korinek V, Barker N, Moerer P et al. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* 1998;19:379–383.
70. Laboratory investigation (2016.), Pathobiology in focus, WNT signaling in glioblastoma and therapeutic opportunities, Yeri Lee, Jin-Ku Lee, Sun He Ahn, Jeongwu Lee, Do-Hyun Nam; <WNT signaling in glioblastoma.pdf>
71. Lan F, Yue X, Han L et al. Antitumor effect of aspirin in glioblastoma cells by modulation of beta-catenin/T-cell factor-mediated transcriptional activity. *J Neurosurg* 2011;115:780–788.
72. Lazarova DL, Chiaro C, Wong T et al. Cbp activity mediates effects of the histone deacetylase inhibitor butyrate on Wnt activity and apoptosis in colon cancer cells. *J Cancer* 2013;4: 481–490.
73. Lee Y, Kim KH, Kim DG et al. Foxm1 promotes stemness and radioresistance of glioblastoma by regulating the master stem cell regulator Sox2. *PLoS One* 2015;10:e0137703.
74. Liu C, Tu Y, Sun X et al. Wnt/Beta-catenin pathway in human glioma: expression pattern and clinical/prognostic correlations. *Clin Exp Med* 2011;11:105–112.
75. Liu J, Stevens J, Matsunami N et al. Targeted degradation of beta-catenin by chimeric F-Box fusion proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313:1023–1029.
76. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781–810.
77. Louis DN. Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu Rev Pathol* 2006;1:97–117.
78. Lu Z, Ghosh S, Wang Z et al. Downregulation of caveolin-1 function by Egf leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell* 2003;4:499–515.

79. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*. 2009;17(1):9-26
80. Mii Y, Taira M. Secreted Wnt „inhibitors“ are not just inhibitors: Regulation of extracellular Wnt by secreted Frizzled-related proteins. *Development, Growth and Differentiation*. 2011;53, 911-923
81. Mikheeva SA, Mikheev AM, Petit A et al. Twist1 promotes invasion through mesenchymal change in human glioblastoma. *Mol Cancer* 2010;9:194.
82. Nabeshima K, Shima Y, Sato S et al. Expression of C-Met correlates with grade of malignancy in human astrocytic tumours: an immunohistochemical study. *Histopathology* 1997;31:436–443.
83. Nagayama S, Fukukawa C, Katagiri T et al. Therapeutic potential of antibodies against Fzd 10, a cell-surface protein, for synovial sarcomas. *Oncogene* 2005;24:6201–6212.
84. Northcott PA, Korshunov A, Witt H et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol* 2011;29: 1408–1414.
85. Noshmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 2010;17:510–522.
86. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 2004;64:6892–6899.
87. Ortensi B, Setti M, Osti D et al. Cancer stem cell contribution to glioblastoma invasiveness. *Stem Cell Res Ther* 2013;4:18.
88. Parepally JM, Mandula H, Smith QR. Brain uptake of nonsteroidal antiinflammatory drugs: ibuprofen, flurbiprofen, and indomethacin. *Pharm Res* 2006;23:873–881.
89. Pasca di Magliano M, Hebrok M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer* 2003;3:903–911.
90. Pecorino L. *Molecular biology of cancer*. Oxford University Press, Oxford. 177-180. 2012.
91. Pećina-Šlaus N, Kafka A, Tomas D, Marković L, Okštajner PK, Sukser V, Krušlin B. Wnt signaling transcription factors TCF-1 and LEF-1 are upregulated in malignant astrocytic brain tumors. *Histology and Histopathology*. 2014;29:1557-1564.
92. Pećina-Šlaus N, Martić TN, Kokotović T, Kušec V, Tomas D, Hrašćan R. AXIN-1 protein expression and localization in glioblastoma. *Collegium Antropologicum*. 2011;35 Suppl 1:101-106.

93. Pećina-Šlaus N. Odabrane metode molekularne biologije - laboratorijski priručnik. Medicinska naklada d.o.o. 2009.
94. Pećina-Šlaus N. Wnt signal transduction pathway and apoptosis: a review. *Cancer Cell International*. 2010;10:22.
95. Pećina-Šlaus N, Zigmund M, Kušec V, Martić TN, Cacić M, Šlaus M. E-cadherin and beta-catenin expression patterns in malignant melanoma assessed by image analysis. *Journal of Cutaneous Pathology*. 2007;34(3):239-246.
96. Peng C, Zhang X, Yu H et al. Wnt5a as a predictor in poor clinical outcome of patients and a mediator in chemoresistance of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2011;21:280–288.
97. PMF, Biološki odsjek; Mateja Bačić Optimizacija lančane reakcije polimerazom za umnažanje mikrosatelitnih biljega gena Dishevelled1 u glioblastomima, Diplomski rad (2014.)  
<http://digre.pmf.unizg.hr/3268/1/Mateja%20Bačić%20-%20Optimizacija%20lančane%20reakcije%20polimerazom%20za%20umnažanje%20mikrosatelitnih%20biljega%20gena%20Dishevelled1%20u%20gliobl~1.pdf>  
Pristupljeno 16. svibnja 2016.
98. PMF, Biološki odsjek; Tea Gabud: Ekspresija proteina sFRP3 i DVL3, ključnih molekula signalnog puta Wnt u glioblastomu, Diplomski rad (2015.)  
<<http://digre.pmf.unizg.hr/4600/1/gabud%20diplomski.pdf>>  
Pristupljeno 14. travnja 2016.
99. Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2007;17:45–51.
100. Pu P, Zhang Z, Kang C et al. Downregulation of Wnt2 and Betacatenin by Sirna suppresses malignant glioma cell growth. *Cancer Gene Ther* 2009;16:351–361.
101. Ramachandran I, Ganapathy V, Gillies E et al. Wnt inhibitory factor 1 suppresses cancer stemness and induces cellular senescence. *Cell Death Dis* 2014;5:e1246.
102. Rao PH, Houldsworth J, Dyomina K et al. Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998;92:234–240.
103. Reifenberger G, Ichimura K, Reifenberger J et al. Refined mapping of 12q13-Q15 amplicons in human malignant gliomas suggests cdk4/sas and mdm2 as independent amplification targets. *Cancer Res* 1996;56:5141–5145.
104. Reifenberger G, Reifenberger J, Ichimura K et al. Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human

malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of Cdk4, Sas, and Mdm2. *Cancer Res* 1994;54:4299–4303.

105. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005;434:843–850.

106. Rheinbay E, Suva ML, Gillespie SM et al. An aberrant transcription factor network essential for wnt signaling and stem cell maintenance in glioblastoma. *Cell Rep* 2013;3:1567–1579.

107. Rossi M, Magnoni L, Miracco C et al. Beta-catenin and Gli1 are prognostic markers in glioblastoma. *Cancer Biol Ther* 2011;11:753–761.

108. Roth W, Wild-Bode C, Platten M et al. Secreted frizzled-related proteins inhibit motility and promote growth of human malignant glioma cells. *Oncogene* 2000;19:4210–4220.

109. Safholm A, Tuomela J, Rosenkvist J et al. The Wnt-5a-derived hexapeptide Foxy-5 inhibits breast cancer metastasis in vivo by targeting cell motility. *Clin Cancer Res* 2008;14:6556–6563.

110. Sandler RS, Halabi S, Baron JA et al. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003;348:883–890.

111. Sareddy GR, Kesanakurti D, Kirti PB et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs diclofenac and celecoxib attenuates Wnt/Beta-Catenin/Tcf signaling pathway in human glioblastoma cells. *Neurochem Res* 2013;38:2313–2322.

112. Sarrio D, Franklin CK, Mackay A et al. Epithelial and mesenchymal subpopulations within normal basal breast cell lines exhibit distinct stem cell/progenitor properties. *Stem Cells* 2012;30:292–303.

113. Scheel C, Eaton EN, Li SH et al. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell* 2011;145:926–940.

114. Schiefer L, Visweswaran M, Perumal V et al. Epigenetic regulation of the secreted frizzled-related protein family in human glioblastoma multiforme. *Cancer Gene Ther* 2014;21:297–303.

115. Sekiya R, Maeda M, Yuan H et al. Plagl2 regulates actin cytoskeletal architecture and cell migration. *Carcinogenesis* 2014;35:1993–2001.

116. Shou J, Ali-Osman F, Multani AS et al. Human Dkk-1, a gene encoding a wnt antagonist, responds to dna damage and its overexpression

sensitizes brain tumor cells to apoptosis following alkylation damage of DNA. *Oncogene* 2002;21:878–889.

117. Silva R, Marie SK, Uno M et al. Ctnnb1, Axin1 and Apc expression analysis of different medulloblastoma variants. *Clinics (Sao Paulo)* 2013;68:167–172.

118. Sieber OM, Heinemann K, Gorman P et al. Analysis of chromosomal instability in human colorectal adenomas with two mutational hits at Apc. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:16910–16915.

119. Smit MA, Peeper DS. Zeb1 is required for trkb-induced epithelial-mesenchymal transition, anoikis resistance and metastasis. *Oncogene* 2011;30:3735–3744.

120. Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SG et al. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:4009–4014.

121. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B et al. Mutational analysis of the Apc/Beta-Catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:1130–1134.

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

123. Suva ML, Rheinbay E, Gillespie SM et al. Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell* 2014;157:580–594.

124. Su Y, Ishikawa S, Kojima M et al. Eradication of pathogenic beta-catenin by Skp1/Cullin/F Box ubiquitination machinery. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:12729–12734.

125. Takezaki T, Hide T, Takanaga H et al. Essential role of the Hedgehog signaling pathway in human glioma-initiating cells. *Cancer Sci* 2011;102:1306–1312.

126. Taylor MD, Liu L, Raffel C et al. Mutations in Sufu predispose to medulloblastoma. *Nat Genet* 2002;31:306–310.

127. Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol* 2012;123:465–472.

128. Thun MJ, Namboodiri MM, Heath Jr CW. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med* 1991;325:1593–1596.

129. Varma RR, Hector SM, Clark K et al. Gene expression profiling of a



clonal isolate of oxaliplatin-resistant ovarian carcinoma cell line A2780/C10. *Oncol Rep* 2005;14:925–932.

130. Vaš doktor; informativno edukativni portal; medicina od a do ž, tumori mozga (2016.) <<http://www.vasdoktor.com/medicina-od-a-do-z/neurologija/620-tumori-mozga>>Pristupljeno 1. ožujak 2016.

131. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in *Pdgfra*, *Idh1*, *Egfr*, and *Nf1*. *Cancer Cell* 2010;17: 98–110.

132. Vermeulen L, De Sousa EMF, van der Heijden M et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol* 2010;12:468–476.

133. Wang J, Ma Y, Cooper MK. Cancer stem cells in glioma: challenges and opportunities. *Transl Cancer Res* 2013;2:429–441.

134. Watanabe K, Tachibana O, Sata K et al. Overexpression of the *Egf* receptor and *P53* mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 1996;6: 217–223.

135. Wellner U, Schubert J, Burk UC et al. The *Emt*-activator *Zeb1* promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting micro-RNAs. *Nat Cell Biol* 2009;11:1487–1495.

136. Werner CA, Dohner H, Joos S et al. High-level DNA amplifications are common genetic aberrations in B-cell neoplasms. *Am J Pathol* 1997;151:335–342.

137. Wikipedia, slobodna enciklopedija; <<https://bs.wikipedia.org/wiki/Tumor>> Pristupljeno 10. veljače 2016.

138. Woodward WA, Chen MS, Behbod F et al. Wnt/Beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:618–623.

139. Xue Y, Li L, Zhang D et al. Twisted epithelial-to-mesenchymal transition promotes progression of surviving bladder cancer T24 cells with *Htert*-dysfunction. *PLoS One* 2011;6:e27748.

140. Yang HW, Menon LG, Black PM et al. *Snai2/Slug* promotes growth and invasion in human gliomas. *BMC Cancer* 2010;10:301.

141. Yokota N, Nishizawa S, Ohta S et al. Role of Wnt pathway in medulloblastoma oncogenesis. *Int J Cancer* 2002;101:198–201.

142. Yoshizumi T, Ohta T, Ninomiya I et al. Thiazolidinedione, a peroxisome

proliferator-activated receptor-gamma ligand, inhibits growth and metastasis of Ht-29 human colon cancer cells through differentiationpromoting effects. *Int J Oncol* 2004;25:631–639.

143. You L, He B, Xu Z et al. An anti-Wnt-2 monoclonal antibody induces apoptosis in malignant melanoma cells and inhibits tumor growth. *Cancer Res* 2004;64:5385–5389.

144. Yue X, Lan F, Yang W et al. Interruption of beta-catenin suppresses the Egfr pathway by blocking multiple oncogenic targets in human glioma cells. *Brain Res* 2010;1366:27–37.

145. Zhang M, Atkinson RL, Rosen JM. Selective targeting of radiation-resistant tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:3522–3527.

146. Zhang N, Wei P, Gong A et al. Foxm1 promotes beta-catenin nuclear localization and controls Wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis. *Cancer Cell* 2011;20:427–442.

147. Zhang N, Wu X, Yang L et al. Foxm1 inhibition sensitizes resistant glioblastoma cells to temozolomide by downregulating the expression of DNA-repair gene Rad51. *Clin Cancer Res* 2012;18:5961–5971.

148. Zhang X, Morham SG, Langenbach R et al. Malignant transformation and antineoplastic actions of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) on cyclooxygenase-null embryo fibroblasts. *J Exp Med* 1999;190:451–459.

149. Zheng H, Ying H, Wiedemeyer R et al. Plagl2 regulates Wnt signaling to impede differentiation in neural stem cells and gliomas. *Cancer Cell* 2010;17:497–509.

150. Zinke J, Schneider FT, Harter PN et al. Beta-Catenin-Gli1 Interaction regulates proliferation and tumor growth in medulloblastoma. *Mol Cancer* 2015;14:17.

151. Zurawel RH, Chiappa SA, Allen C et al. Sporadic medulloblastomas contain oncogenic beta-catenin mutations. *Cancer Res* 1998;58:896–899.