

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

Medicinski fakultet

**PETAR BRLEK**

***In silico* analiza genskih, transkripcijskih,  
epigenetičkih i proteinskih promjena sudionika  
signalnog puta EGFR-PI3K-AKT-mTOR  
u difuznim gliomima mozga**

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je u **Laboratoriju za neuroonkologiju** Hrvatskog instituta za istraživanje mozga pod mentorskim vodstvom **prof. dr. sc. Nives Pećina-Šlaus** u sklopu znanstvenog projekta Znanstvenog centra izvrsnosti za temeljnu, kliničku i translacijsku neuroznanost (ZCI - Neuro) „**Eksperimentalna i klinička istraživanja hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga u perinatalnoj i odrasloj dobi**“, **KK.01.1.1.01.0007**, voditelja **prof. dr. sc. Miloša Judaša** te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020.

## POPIS KRATICA:

<b>AA:</b>	anaplastični astroцитom (eng. <i>anaplastic astrocytoma</i> )
<b>AKT/PKB:</b>	proteinska kinaza B (eng. <i>protein kinase B</i> )
<b>AKT1/PKB<math>\alpha</math>:</b>	proteinska kinaza B $\alpha$ (eng. <i>protein kinase B <math>\alpha</math></i> )
<b>AKT2/PKB<math>\beta</math>:</b>	proteinska kinaza B $\beta$ (eng. <i>protein kinase B <math>\beta</math></i> )
<b>AKT3/PKB<math>\gamma</math>:</b>	proteinska kinaza B $\gamma$ (eng. <i>protein kinase B <math>\gamma</math></i> )
<b>Bad:</b>	bcl-2 vezan promotor smrti (eng. <i>bcl-2-associated death promoter</i> )
<b>CHUK/IKK<math>\alpha</math>:</b>	I $\kappa$ B kinaza $\alpha$ (eng. <i>I<math>\kappa</math>B kinase <math>\alpha</math></i> )
<b>DA:</b>	difuzni astroцитom (eng. <i>diffuse astrocytoma</i> )
<b>EGF:</b>	epidermalni faktor rasta (eng. <i>epidermal growth factor</i> )
<b>EGFR:</b>	receptor epidermalnog faktora rasta (eng. <i>epidermal growth factor receptor</i> )
<b>FOXO3a:</b>	eng. <i>forkhead box O3</i>
<b>GBM:</b>	glioblastom (eng. <i>glioblastoma multiforme</i> )
<b>GSK3<math>\beta</math>:</b>	kinaza sintaze glikogena 3 $\beta$ (eng. <i>glycogen synthase kinase 3<math>\beta</math></i> )
<b>IDH1:</b>	izocitrat dehidrogenaza 1 (eng. <i>isocitrate dehydrogenase 1</i> )
<b>IDH2:</b>	izocitrat dehidrogenaza 2 (eng. <i>isocitrate dehydrogenase 2</i> )
<b>MAPK:</b>	mitogenom aktivirana proteinska kinaza (eng. <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
<b>mTOR:</b>	ciljna molekula rapamicina u sisavaca (eng. <i>mammalian target of rapamycin</i> )
<b>mTORC2:</b>	mTOR-kompleks 2 (eng. <i>mTOR complex 2</i> )
<b>NF-<math>\kappa</math>B:</b>	nuklearni faktor $\kappa$ B (eng. <i>nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i> )
<b>PDPK1:</b>	fosfoinozimid ovisna protein kinaza-1 (eng. <i>phosphoinositide-dependent kinase-1</i> )
<b>PI3K:</b>	fosfoinozimid 3-kinaza (engl. <i>phosphoinositide 3-kinase</i> )
<b>PIK3AP1/BCAP:</b>	fosfoinozimid 3-kinaza adapterski protein 1 (eng. <i>phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1</i> )
<b>PIP2:</b>	fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat (eng. <i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i> )
<b>PIP3:</b>	fosfatidilinozitol (3,4,5) -trifosfat (eng. <i>phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i> )
<b>PRAS40:</b>	eng. <i>proline-rich AKT substrate of 40 kD</i>
<b>PTEN:</b>	eng. <i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten</i>
<b>STAT:</b>	signalni pretvarač i aktivator transkripcije (eng. <i>signal transducer and activator of transcription</i> )
<b>TCGA:</b>	Atlas genoma tumora (eng. <i>The Cancer Genome Atlas</i> )
<b>TGF<math>\alpha</math>:</b>	transformirajućeg faktor rasta $\alpha$ (eng. <i>transforming growth factor <math>\alpha</math></i> )
<b>TSC2:</b>	kompleks tuberozne skleroze 2 (eng. <i>tuberous sclerosis complex 2</i> )
<b>WHO:</b>	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i> )

## SADRŽAJ

<b>1</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>HIPOTEZA</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>MATERIJAL I METODE</b>	<b>3</b>
3.1	BAZA PODATAKA CBIOPORTAL	3
3.2	PROTOKOL ZA ANALIZU JAVNO DOSTUPNE BAZE PODATAKA	3
3.3	UZORCI GLIOMA U BAZI CBIOPORTAL I BIOINFORMATIČKE METODE	4
3.4	STATISTIČKA ANALIZA	5
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>5</b>
4.1	DEMOGRAFSKI PODACI ISPITIVANIH DIFUZNH GLIOMA MOZGA	5
4.2	PROMJENE BROJA KOPIJA (CNA) GENA SIGNALNOG PUTA EGFR-PI3K-AKT-mTOR U DIFUZNIM GLIOMIMA	6
4.2.1	<i>AKT1</i>	7
4.2.2	<i>AKT2</i>	8
4.2.3	<i>AKT3</i>	9
4.2.4	<i>CHUK</i>	9
4.2.5	<i>GSK3<math>\beta</math></i>	10
4.2.6	<i>EGFR</i>	11
4.2.7	<i>PTEN</i>	12
4.2.8	<i>PIK3AP1</i>	12
4.3	EKSPRESIJA mRNA I PROTEINA ISPITIVANIH GENA U DIFUZNIM GLIOMIMA	13
4.3.1	<i>Ekspresija mRNA u difuznim gliomima</i>	13
4.3.2	<i>Ekspresija proteina u difuznim gliomima</i>	15
4.4	METILACIJA ISPITIVANIH GENA U DIFUZNIM GLIOMIMA	15
4.5	USPOREDBA SVIH PARAMETARA ISPITIVANIH GENA U DIFUZNIM GLIOMIMA	17
4.5.1	<i>Korelacija CNA i ekspresije mRNA unutar pojedinog patohistološkog tipa glioma</i>	17
4.5.2	<i>Korelacija metilacije i ekspresije mRNA unutar pojedinog patohistološkog tipa glioma</i>	17
4.5.3	<i>Korelacija proteinske i mRNA ekspresije unutar pojedinog patohistološkog tipa glioma</i>	18
<b>5</b>	<b>RASPRAVA</b>	<b>23</b>
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČCI</b>	<b>25</b>
<b>7</b>	<b>ZAHVALE</b>	<b>26</b>
<b>8</b>	<b>POPIS LITERATURE</b>	<b>26</b>
<b>9</b>	<b>SAŽETAK</b>	<b>31</b>
<b>10</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>32</b>
<b>11</b>	<b>ŽIVOTOPIS</b>	<b>33</b>

# 1 UVOD

Gliomi su heterogena skupina tumora središnjeg živčanog sustava za koju danas još uvijek nemamo efikasne metode liječenja. Unatoč multimodalnom liječenju, uključujući kirurško liječenje, radioterapiju te kemoterapiju, medijan preživljenja za pacijente s glioblastomom iznosi samo 12-14 mjeseci (Xia i sur., 2019.). Novija istraživanja molekularnog profila glioma pokazuju složenu dinamiku tumorske progresije te objašnjavaju evoluciju mutacija ove biološki agresivne grupe tumora tijekom vremena i kao odgovor na terapiju (Barthel i sur., 2019.). Najnovije spoznaje u neuroonkologiji dovele su do nozoloških promjena u klasifikaciji tumora središnjeg živčanog sustava, pa je tako klasifikacija WHO (eng. World Health Organization) iz 2016. godine uz fenotipske integrirala i genotipske parametre u podjelu glijalnih tumora (Louis i sur., 2016.). Dotadašnja klasifikacija razvrstavala je sve astrocitne tumore od prvog do četvrtog gradusa kao zasebnu kategoriju, dok je najnovija klasifikacija grupirala zajedno sve difuzne gliome, bili oni astrocitni ili ne (Wesseling i Capper, 2018.). Tako je skupina difuznih glioma središnjeg živčanog sustava grupirana ne samo prema brzini rasta i biološkog ponašanja, već prema statusu mutacija *IDH1* te *IDH2* gena (Chen i sur., 2017.). Takva klasifikacija patogenetski grupira tumore koji dijele iste prognostičke markere te omogućuje potencijalno zajedničke terapijske mogućnosti molekularno sličnih entiteta. Grupa difuznih glioma u najnovijoj WHO klasifikaciji obuhvaća gradus II i III astrocitome, gradus II i III oligodendrogliome, gradus II i III oligoastrocitome, gradus IV glioblastome te ostale difuzne gliome (npr. dječje dobi) (Wesseling i Capper, 2018.). Drugim riječima, difuzni se astroцитomi (gradus II) prema najnovijoj klasifikaciji smatraju sličnijima oligodendrogliomima (gradus II) nego astroцитomima gradusa I, što je razlika u odnosu na starije klasifikacije (Louis i sur., 2016.). Unatoč novim molekularnim saznanjima koja su objedinila grupu difuznih glioma, razlike između pojedinih patohistoloških tipova i gradusa unutar te grupe još su nedovoljno istražene. Upravo iz tog razloga u ovom smo istraživanju odlučili proučiti molekularne karakteristike signalnog puta EGFR-PI3K-AKT-mTOR između tri patohistološka tipa i gradusa difuznih glioma mozga. Receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR) je transmembranska tirozinska kinaza koja se može aktivirati putem epidermalnog faktora rasta (EGF), transformirajućeg faktor rasta  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) ili putem nekoliko drugih liganada (Rutkowska i sur., 2019.). Nakon aktivacije, dimerizacija receptora inducira autofosforilaciju tirozinskih ostataka na C-terminalnoj domeni ovog receptora te dolazi do aktivacije nizvodnih proteina u signalnoj kaskadi kao što su MAPK (mitogenom aktivirana proteinska kinaza), PI3K (fosfoinozimid 3-kinaza), STAT (signalni pretvarač i aktivator transkripcije) i njima pridruženih signalnih puteva (Leonetti i sur., 2019.; Viswanathan i sur., 2019.). Mutacije gena *EGFR* identificirane su u različitim tumorskim tkivima uključujući tumore pluća, tumore glave i vrata, dojke, gastrointestinalnog trakta i mozga, a istraživanja su pokazala njegovu nedvojbenu onkogenost zbog poticanja proliferacije, angiogeneze i invazije tumorskih stanica (Saadeh i sur., 2018.). Jedan od signalnih puteva kojeg stimuliraju receptori tirozinskih kinaza kao što je EGFR je signalni put PI3K-AKT-mTOR (Li i sur., 2016.). Fosforilacija tirozinskih dijelova receptora omogućuje premještanje i sidrenje PI3K (fosfoinozimid 3-kinaze) na membranu stanice, čime ujedno sudjeluju u prijenosu signala raznih molekula izvanstaničnog matriksa. Nakon što se regulatorna podjedinica PI3K veže na odgovarajući receptor ili protein koji veže receptor, aktivira se katalitička podjedinica ove kinaze koja katalizira stvaranje PIP3 (fosfatidilinozitol (3,4,5)-trifosfat), koji preko PDK1 (fosfoinozimid-ovisna proteinska kinaza-1) aktivira molekulu AKT (proteinska kinaza B) (Balasuriya i sur., 2018.). PI3K-AKT-mTOR signalni put igra važnu ulogu u regulaciji transdukcije signala i bioloških procesa poput proliferacije stanica, apoptoze, metabolizma i angiogeneze (Marquard i Jücker, 2020.). Stoga je razumljivo da je neispravno funkcioniranje ovog puta vezano ne samo za pojavu i razvoj tumora, već i mnogih drugih bolesti kao

što su leukemije, dijabetes i shizofrenija (Xu i sur., 2020.). Adapterski proteini važni su relejni proteini receptorskog kompleksa koji omogućuju prijenos signala različitih signalnih puteva. Značajna uloga u aktivaciji receptorskog kompleksa i njihovih nizvodnih puteva dovela je do sve većeg interesa za istraživanje ovih makromolekula. Jedan od njih je PIK3AP1 (BCAP) - šesti identificirani TLR (toll-like receptor) adapterski protein kao dio receptorskog kompleksa EGFR (receptor epidermalnog faktora rasta) koji povezuje TLR signalizaciju s AKT-mTOR signalnim putem preko kinaze PI3K (fosfoinozimid 3-kinaze) klase I te aktivacijom ove kinaze potiče preživljavanje stanica, proliferaciju i sintezu proteina (Yang i sur., 2019.). PIK3AP1 je značajno eksprimiran u zdravim hematopoetskim stanicama kao što su limfociti B, NK stanice te makrofagi (Lovšin i sur., 2020.), dok je njegova ekspresija i uloga u različitim tumorima još nedovoljno istražena. PIK3AP1 djeluje kao ključni negativni regulator upale, izazvane toll-like receptorima, iako točni nizvodni proteini te mehanizmi još nisu opisani (Luo i sur., 2020.). Tumor supresor PTEN negativno regulira AKT signalizaciju pretvaranjem PIP3 (fosfatidilinozitol (3,4,5)-trifosfat) u PIP2 (fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat) (Coronas-Serna i sur., 2020.). Na taj način PTEN inhibira signalni put PI3K-AKT-mTOR te dovodi do usporavanja stanične proliferacije i staničnog metabolizma (Haddadi i sur., 2018.). Inhibicija PTEN-a dovodi do aktivacije AKT i nizvodne signalizacije. Istraživanja na miševima kojima je PTEN bio nokautiran pokazala su da miševi umiru tijekom embrionalnog razvoja zbog nenormalne proliferacije različitih tkiva u kojima je AKT bio kontinuirano aktiviran. Iako su PTEN-heterozigotni miševi preživjeli, u njih su se pojavili spontani tumori (Xu i sur., 2020.). Kao glavna molekula PI3K signalizacije, serin-treonin protein kinaza AKT (proteinska kinaza B) postoji u 3 izoforme: AKT1 (PKB $\alpha$ ), AKT2 (PKB $\beta$ ) i AKT3 (PKB $\gamma$ ) i djeluje nizvodno od PI3K (Revathidevi i Munirajan, 2019.). AKT1 je eksprimirana u mnogim tkivima, dok se AKT2 eksprimira uglavnom u tkivima osjetljivim na inzulin, a u ostalim tkivima se nalazi u vrlo niskim razinama. AKT3 je izražena samo u tkivu mozga i testisa. Tri izoforme kinaze AKT pokazuju 85% homologije u slijedu aminokiselina te imaju vrlo slične trodimenzionalne strukture koje su sastavljene od tri različite funkcionalne domene (Xu i sur., 2020.). N-terminalna PH (pleckstrin homology) domena regulira interakcije između proteina i proteina i lipida. U središnjoj, katalitičkoj domeni kinaze odgovornoj za enzimsku aktivnost dolazi do fosforilacije aminokiseline treonina - Tr308 koja je neophodna za njenu aktivaciju. Regulatorno područje C-terminalne domene sadrži aminokiselinu serin - Ser473, koji je nužan za dovršetak aktivacije AKT proteina. Poznato je da AKT mogu regulirati razni hormoni i faktori rasta, uključujući inzulin. Nakon aktivacije putem PIP3 (fosfatidilinozitol (3,4,5)-trifosfata) i PDK1 (fosfoinozimid ovisna protein kinaza-1) AKT posreduje u regulaciji rasta stanica, proliferaciji, staničnom ciklusu i metabolizmu ugljikohidrata daljnjim fosforiliranjem molekula GSK-3 (glikogen sintaza kinaza 3), Bad (bcl-2 vezan promotor smrti), kaspaza-9, NF- $\kappa$ B (nuklearni faktor  $\kappa$ B), mTOR (ciljna molekula rapamicina u sisavaca) i proteina p21 (Xu i sur., 2020.). Slijedeći molekularni sudionik puta PI3K-AKT-mTOR koji nas je interesirao u ovom istraživanju je glikogen sintaza kinaza-3  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). Radi se o citoplazmatskoj multifunkcionalnoj serin-treonin proteinskoj kinazi koja je izvorno identificirana kao središnji regulator metabolizma glikogena (Gürsel i sur., 2015.). Iako se GSK3 $\beta$  u početku istraživao zbog svoje uloge u dijabetesu, Alzheimerovoj bolesti i poremećajima raspoloženja, novije studije otkrile su važnu ulogu GSK3 $\beta$  u tumorima čovjeka (Revathidevi i Munirajan, 2019.). GSK3 $\beta$  je opisan kao važan regulator preživljavanja u raku gušterače i kao pro-apoptički faktor kod kolorektalnog karcinoma, ali se o njegovoj ulozi u glijalnim tumorima zna vrlo malo. GSK3 $\beta$  ima aktivnu ulogu u nekoliko staničnih procesa, uključujući staničnu diferencijaciju, mitohondrijsku apoptozu, mikrotubularnu reorganizaciju i kontrolu staničnog ciklusa (Gürsel i sur., 2015.). Novija istraživanja pokazala su važnu ulogu I $\kappa$ B kinaza (IKK) u tumorigenezi glioma aktivacijom NF- $\kappa$ B signalnog puta

(Wang i sur. 2020.). IKK je proteinski kompleks koji sadrži dvije katalitičke podjedinice nazvane IKK $\alpha$  (CHUK), IKK $\beta$  te regulatornu podjedinicu IKK $\gamma$ . Eksperimenti pokazuju da IKK $\alpha$  (CHUK) pozitivno potiče fosforilaciju kinaze AKT na aminokiselinama serin - Ser473 i treonin - Thr308. Štoviše, CHUK povećava aktivnost kinaze mTORC2 (mTOR kompleks 2) koja fosforilira Akt na Ser473 što omogućuje daljnju AKT-om posredovanu fosforilaciju FOXO3a i GSK3 $\beta$ . S obzirom da fosforilacija drugih proteina uključenih u AKT signalizaciju kao što su TSC2 i PRAS40 nije omogućena, ovo ukazuje na postojanje više različitih mehanizama aktivacije signalnog puta AKT (Dan i sur., 2016.). Druge studije otkrivaju mehanizam kojim IKK smanjuje PI3K-AKT signalizaciju kao odgovor na nedostatak hranjivih tvari što može imati značajan utjecaj na razvoj bolesti u kojima je poremećen stanični metabolizam kao što je to u onkoloških bolesnika (Huang i sur., 2018.). IKK fosforilira podjedinicu p85 $\alpha$  u C-terminalnoj SH2 domeni PI3K (fosfoinozimid 3-kinaze) i tako suzbija interakciju između PI3K i tirozin kinaza te indirektno spječava aktivaciju AKT proteina (Comb i sur., 2012.). Potreba za boljim razumijevanjem funkcije i mehanizama prijenosa signala puta PI3K-AKT-mTOR dovelo je do ideje o istraživanju i karakterizaciji brojnih uzvodnih i nizvodnih molekula ovoga puta, a što u konačnici može doprinijeti poboljšanju dijagnostike i liječenja primarnih tumora mozga. Zbog složenosti regulacije signalizacije PI3K-AKT-mTOR potrebna su detaljna istraživanja za potpuno razumijevanje ovog puta i njegove uloge u gliomima (Xu i sur., 2020.). Cilj ovog istraživanja je doprinijeti boljem razumijevanju uloge EGFR-PI3K-AKT-mTOR signalnog puta te otkriti razlike u aktivnosti njegovih sudionika unutar različitih gradusa difuznih glioma mozga.

## **2 HIPOTEZA**

Promjene na genskoj, transkripcijskoj, epigenetičkoj i proteinskoj razini gena *AKT1*, *AKT2*, *AKT3*, *CHUK*, *GSK3 $\beta$* , *EGFR*, *PTEN* i *PIK3AP1* različite su između patohistoloških tipova i gradusa difuznih glioma mozga te u višim gradusima imaju značajnu ulogu u aktivaciji signalnog puta EGFR-PI3K-AKT-mTOR.

## **3 MATERIJAL I METODE**

### **3.1 Baza podataka cBioPortal**

Višedimenzionalna analiza difuznih glioma mozga napravljena je uz pomoć cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>) javno dostupne baze podataka za tumorsku genomiku i transkriptomiku (Cerami et al., 2012). Ova baza omogućuje interaktivno istraživanje, obradu, statističku analizu i grafički prikaz promjena u tumorima od genske do proteinske razine. Cilj bioinformatičkih baza je omogućiti brz, a visoko kvalitetan pristup kompleksnim genomskim podacima, molekularnom profilu tumora te kliničkim podacima kako bi znanstvenici preveli veliku količinu podataka u medicinski značajne i klinički primjenjive rezultate (Gao et al., 2013). Rezultati prikazani u ovom istraživanju temelje se na podacima koje je generirala istraživačka mreža TCGA (The Cancer Genome Atlas, <https://www.cancer.gov/tcga>) koja sadrži ukupno više od 400 TB neobrađenih podataka za 33 različite vrste tumora koji zahtijevaju analizu (Ellrott i sur., 2018.).

### **3.2 Protokol za analizu javno dostupne baze podataka**

Upotrebom baze cBioPortal stvorena je virtualna studija koristeći kombinaciju podataka koje su dale dvije velike prethodne studije: Brain Lower Grade Glioma (TCGA Firehose Legacy) i Glioblastoma Multiforme (TCGA Firehose Legacy). Svi TCGA Firehose Legacy podatci su javno dostupni na mrežnoj stranici: <https://gdac.broadinstitute.org/>. Velike analize TCGA podataka na različitim vrstama tumora potvrđuju vjerodostojnost podataka korištenih u našem istraživanju (Hoadley i sur., 2018.; Ellrott i sur., 2018.; Taylor i sur., 2018.; Liu i sur., 2018.; Sanchez-Vega i sur., 2018.; Gao i sur., 2018.; Bhandari i sur., 2019.; Poore i sur., 2020.). Probrani su uzorci koji sadrže podatke o slijedećim parametrima: spol i dob pacijenta pri postavljanju dijagnoze,

pacijent bez višestrukih uzoraka, pacijent sa potpunom genskom analizom, odabrani patohistološki tipovi difuznih glioma (difuzni astrocitom, anaplastični astrocitom, glioblastoma multiforme). U stvorenoj virtualnoj studiji upotrebom programskog jezika OQL (Onco Query Language) uneseni su geni te odabrani parametri za analizu promjene broja kopija odabranih gena (CNA – od engl. copy-number alterations), transkripcijsku (mRNA), epigenetičku analizu metilacije te proteinsku analizu. *In silico* analiza uključila je slijedeće gene: *AKT1*, *AKT2*, *AKT3*, *CHUK*, *GSK3B*, *EGFR*, *PTEN* i *PIK3API* koji pripadaju signalnom putu EGFR-PI3K-AKT-mTOR. Za podatke o povišenoj i sniženoj ekspresiji mRNA i proteina optimizirani su pragovi prema izvornim postavkama cBioPortala (Z-score= $\pm 2.0$ ). Genska analiza CNA uključila je slijedeće promjene upotrebom programskog jezika OQL: homozigotne delecije (HOMDEL), hemizigotne delecije (HETLOSS), amplifikacije (GAIN) i višestruke amplifikacije (AMP). Nakon kreiranja virtualne studije preuzeti su podatci o metilaciji, ekspresiji mRNA, CNA te proteinskoj ekspresiji odabranih gena i obrađeni poput klasične studije. Grafovi genskih promjena CNA napravljeni su u programu Excel 2016 (Microsoft), grafovi dobi po gradusima, metilacije te mRNA ekspresije napravljeni su uz pomoć programskog paketa IBM SPSS Statistics 23.0 (SPSS, Chicago, IL, SAD), a grafovi korelacije različitih parametara preuzeti su s cBioPortal-a. Podatci preuzeti s javno dostupne cBioPortal baze podataka ne zahtijevaju etičko odobrenje. Svi su pacijenti čiji su uzorci korišteni u ovoj analizi potpisali informirani pristanak.

### 3.3 Uzorci glioma u bazi cBioPortal i bioinformatičke metode

Podatci za ovu studiju preuzeti su 30. travnja 2020. godine. Trenutna verzija javno dostupnog cBioPortala koristi hg19/GRCh37 kao referencu humanog genoma. Originalne individualne publikacije iz kojih su prikupljeni podatci unutar cBioPortala mogu se pronaći na stranici TCGA PanCancer Atlas (<https://www.cell.com/pb-assets/consortium/pancanceratlas/pancan3/index.html>). Firehose Legacy studije cBioPortala preuzele su podatke s Broad Institute Firehose-a (<http://gdac.broadinstitute.org/>) te se ažuriraju i nadopunjuju svaka 3 mjeseca kako bi sadržavali što potpuniju i točniju bazu podataka. U istraživanje je uključen 751 uzorak difuznih glioma mozga različitog stupnja malignosti od čega 62 difuzna astrocitoma (gradus II) (DA), 129 anaplastičnih astrocitoma (gradus III) (AA) te 560 glioblastoma multiforme (gradus IV) (GBM). Svi podatci baze cBioPortal imaju unesene jednake kliničke kriterije te su podatci jednako procesuirani i normalizirani što omogućuje komparativnu analizu uzoraka između različitih studija. CNA (copy-number alterations) su linearne vrijednosti promjene broja kopija gena koje su dobivene kao razlika u broju kopija tumorskog gena i pripadajuće normale. Normalizirane linearne vrijednosti CNA su obrađene unutar cBioPortala pomoću Genomic Identification of Significant Targets in Cancer (GISTIC 2.0) algoritma (Mermel i sur., 2011.) te su linearne vrijednosti niže od -2,0 proglašene homozigotnim delecijama (HOMDEL), a između -2,0 i -1,0 hemizigotnim delecijama (HETLOSS), dok su vrijednosti između 1,0 i 2,0 proglašene amplifikacijama (GAIN), a više od 2,0 višestrukim amplifikacijama (AMP). Uzorci čija je linearna vrijednost CNA iznosila između -1,0 i 1,0 proglašeni su diploidnim uzorcima (DIPLOID) što znači da takvi uzorci nemaju promjene u broju kopija gena. Budući da rezultati dobiveni GISTIC algoritmom dobro koreliraju sa stvarnim amplifikacijama i delecijama jednog ili više alela u ovom radu ćemo koristiti slijedeću terminologiju: homozigotne delecije (gubitak oba alela), hemizigotne delecije (gubitak jednog alela), diploidnim uzorci (uzorci s 2 alela, odnosno bez CNA promjena), amplifikacije (postojanje 3 kopije alela) te višestruke amplifikacije (postojanje 4 ili više kopija alela). Za dobivanje mRNA ekspresije korištena je tehnika sekvenciranja sljedeće generacije upotrebom RNA Seq V2 RSEM softvera (Li i Dewey, 2011.) koja određuje ukupni RNA



transkript. Podatci o proteinskoj ekspresiji dobiveni su tehnologijom RPPA (Reverse Phase Protein Arrays) (Gao i sur., 2013.), a metilacija gena određena je metodom HumanMethylation450 (HM450) (Wang i sur., 2019.).

### 3.4 Statistička analiza

Svi uzorci statistički su analizirani prema sljedećim varijablama: patohistološka dijagnoza (PHD); spol; dob; tip CNA, razine mRNA transkripta, razina metilacije te proteinska ekspresija za svaki pojedini gen *AKT1*, *AKT2*, *AKT3*, *CHUK*, *GSK3 $\beta$* , *EGFR*, *PTEN* i *PIK3AP1*. Podatci o metilaciji nedostajali su za gen *PIK3AP1* u skupini glioblastoma multiforme, a podatci o proteinskoj ekspresiji nedostajali su za proteine *CHUK* te *PIK3AP1* u sva tri tipa ispitivanih glioma. Statistička analiza dobivenih podataka napravljena je u programskom paketu IBM SPSS Statistics 23.0 (SPSS, Chicago, IL, SAD), uz razinu značajnosti od  $p < 0.05$ . Dobiveni rezultati prikazani su tablično i grafički. Za statističku analizu CNA gena korištene su linearne vrijednosti podataka, dok su za grafički prikaz CNA korištene vrijednosti dobivene algoritmom GISTIC. Za sve ostale parametre (mRNA, metilacija, proteinska ekspresija) za grafički prikaz i statističku analizu korištene su normalizirane linearne vrijednosti. Normalnost raspodjele pojedinih parametara unutar skupina testirana je upotrebom Kolmogorov-Smirnovljeva i Shapiro-Wilkova testa normalnosti (niska značajna vrijednost ( $p < 0.05$ ) upućuje da se distribucija značajno razlikuje od normalne). Razlike u izmjerenim vrijednostima CNA, mRNA, metilacije te proteinske ekspresije između tri patohistološka tipa glioma testirane su Kruskal-Wallis testom, a nakon toga za usporedbu pojedinih skupina proveden je Mann-Whitney test. Kruskal-Wallis i Mann-Whitney test korišteni su i za usporedbu dobi pacijenata u pojedinim gradusima difuznih glioma. Korelacije između CNA i ekspresije mRNA, metilacije i ekspresije mRNA te između proteinske i mRNA ekspresije provedene su Spearmanovim testom.

## 4 REZULTATI

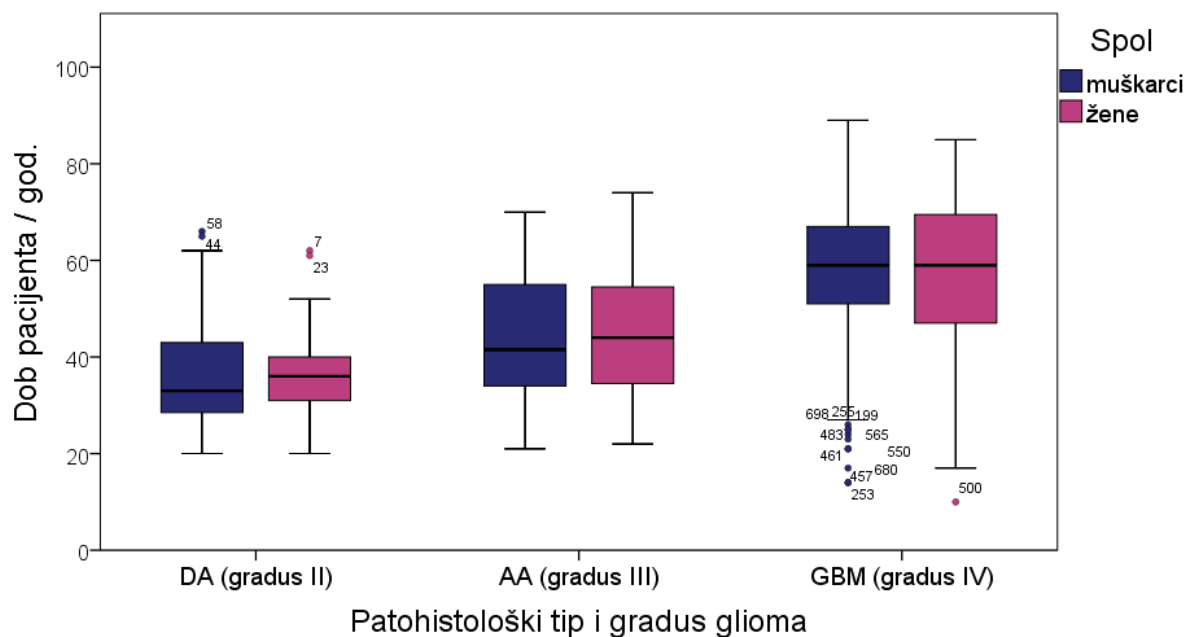
### 4.1 Demografski podaci ispitivanih difuznih glioma mozga

U istraživanju je analiziran 751 uzorak difuznih glioma mozga, od čega 62 difuzna astrocitoma (gradus II) (DA), 129 anaplastičnih astrocitoma (gradus III) (AA) te 560 glioblastoma multiforme (gradus IV) (GBM). Uzorci su prikupljeni od 446 osoba muškog i 305 osoba ženskog spola. Ispitani bolesnici bili su životne dobi u rasponu od 10 do 89 godina života, dok je medijan životne dobi u trenutku postavljanja dijagnoze iznosio 55 godina. Medijan životne dobi za muškarce je iznosio 56 godina, dok je za žene iznosio 54 godine. U tablici 1 prikazana su mjere centralne tendencije (aritmetička sredina i medijan životne dobi u trenutku postavljanja dijagnoze) i zastupljenost spolova prema patohistološkom tipu i gradusu glioma u ukupnom uzorku.

**Tablica 1.** Dob i spol pacijenata prema patohistološkom tipu i gradusu difuznih glioma.

Patohistološki tip i gradus	Dob / god.		Spol	
	Srednja vrijednost $\pm$ SD	Medijan	M	Ž
<b>DA (gradus II)</b>	36.32 $\pm$ 1.41	34.5	36	26
<b>AA (gradus III)</b>	44.71 $\pm$ 1.10	44.0	70	59
<b>GBM (gradus IV)</b>	57.86 $\pm$ 0.62	59.0	340	220
<b>Ukupno</b>	53.83 $\pm$ 15.68	55.0	446	305

DA – difuzni astrocitom; AA – anaplastični astrocitom; GBM – glioblastoma multiforme; SD – standardna devijacija; M – muškarci; Ž – žene

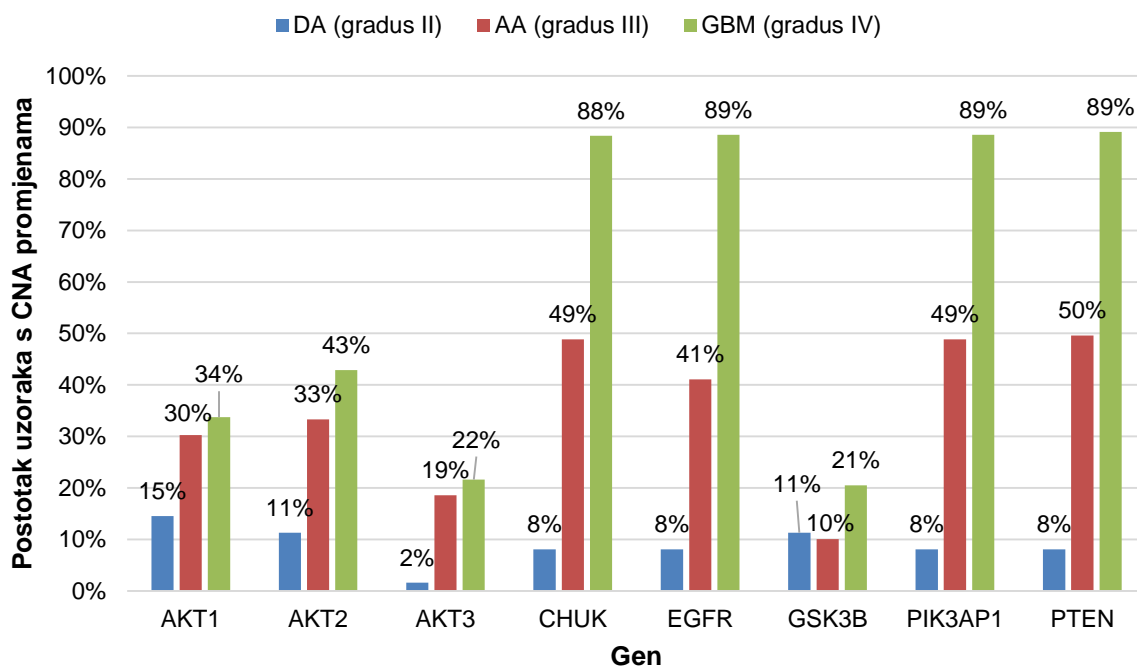


**Slika 1.** Dob pacijenata pri postavljanju dijagnoze za specifičan patohistološki tip i gradus difuznih glioma. DA - difuzni astrocitom; AA - anaplastični astrocitom; GBM - glioblastoma multiforme

Rezultati Kruskal-Wallis testa pokazali su da postoji statistički značajna razlika u dobi obolijevanja od pojedinog patohistološkog tipa difuznih glioma ( $p < 0.001$ ) (Slika 1). Upotrebom Mann-Whitney testa ustanovljeno je da se DA (gradus II) javljaju u mlađoj dobi u odnosu na AA (gradus III) ( $p < 0.001$ ) i u odnosu na GBM (gradus IV) ( $p < 0.001$ ). Također, Mann-Whitney test je pokazao da se GBM (gradus IV) javlja u starijoj dobi u odnosu na AA (gradus III) ( $p < 0.001$ ). Statistička analiza nije pokazala značajnu razliku između spolova ni u jednom patohistološkom tipu glioma mozga.

#### 4.2 Promjene broja kopija (CNA) gena signalnog puta EGFR-PI3K-AKT-mTOR

Analiza CNA gena u ukupno 751 (62 DA, 129 AA, 560 GBM) uzorku difuznih glioma mozga pokazala je da je najveći ukupni broj CNA svih navedenih gena nađen u skupini GBM (gradus IV), dok je najmanje CNA svih ispitivanih gena bilo u skupini DA (gradus II). Ovaj rezultat pokazuje akumulaciju genskih aberacija tijekom progresije glioma te je u skladu s biološkim ponašanjem pojedinog patohistološkog tipa budući da su najagresivniji GBM pokazali najveći broj genskih promjena. Daljnja analiza svakog pojedinog gena je pokazala da su u skupini GBM (gradus IV) najveći broj CNA pokazali geni *CHUK* (88%), *EGFR* (89%), *PIK3API* (89%) te *PTEN* (89%). U skupini AA (gradus III) najveći broj CNA pokazali su geni *PTEN* (50% AA), *PIK3API* (49% AA) te *CHUK* (49% AA). Najveći broj CNA u skupini DA (gradus II) pokazali su geni *AKT1* (15% DA), *AKT2* (11% DA) te *GSK3β* (11% DA). Na slici 2 vidimo da su u gradusu II CNA promjenama primarno zahvaćeni geni *AKT1*, *AKT2* te *GSK3β* koji pokazuju slične CNA udjele, dok u gradusu IV slične udjele CNA pokazuju geni *CHUK*, *EGFR*, *PIK3API* te *PTEN*. To upućuje da geni *AKT1*, *AKT2* i *GSK3β* sudjeluju u ranoj fazi nastanka difuznih glioma, dok se promjene gena *CHUK*, *EGFR*, *PIK3API* i *PTEN* nagomilavaju tijekom progresije u više graduse.



**Slika 2.** Raspodjela promjena broja kopija pojedinog gena u svakom od patohistoloških tipova i stupnjeva malignosti difuznih glioma. DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme; analiza na ukupno 751 uzorku (62 DA, 129 AA, 560 GBM)

Statistička analiza Kruskal-Wallis testom pokazala je da postoji značajna razlika u relativnom linearnom broju CNA promjena između pojedinih patohistoloških tipova glioma za gene *AKT2* ( $p < 0.001$ ), *AKT3* ( $p < 0.001$ ), *CHUK* ( $p < 0.001$ ), *EGFR* ( $p < 0.001$ ), *PIK3AP1* ( $p < 0.001$ ) i *PTEN* ( $p < 0.001$ ). Detaljna analiza između pojedinih patohistoloških tipova i gradusa napravljena je Mann-Whitney testom te je prikazana za svaki gen zasebno u narednim poglavljima.

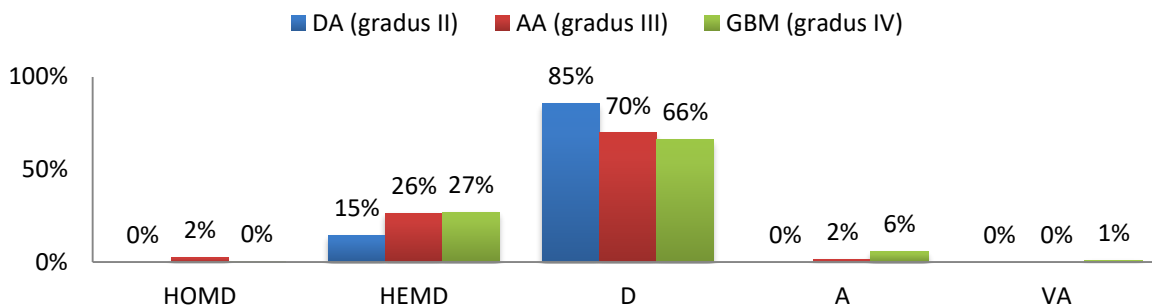
#### 4.2.1 AKT1

Analizom gena *AKT1* je utvrđeno da su u ukupnom uzorku hemizigotne delecije (gubitak jednog alela) najčešća CNA promjena (194 uzorka, 26%). U skupini glioblastoma nađeno je 151 hemizigotna delecija (27%) te su znatno češće od amplifikacija (6% GBM). Tablica 2 i slika 3 pokazuju raspodjelu CNA promjena unutar pojedinog patohistološkog tipa i gradusa. Iako statistička analiza nije pokazala značajne razlike između pojedinih patohistoloških tipova i gradusa vidljivo je da je postotak delecija ovoga gena veći u višim gradusima te je najviši u gradusu IV.

**Tablica 2.** Broj uzoraka s CNA promjenom gena *AKT1* unutar pojedinog patohistološkog tipa i gradusa glioma

Patohistološki tip i gradus	Promjene u broja kopija gena <i>AKT1</i>				
	homozigotna delecija	hemizigotna delecija	diploid	amplifikacija	višestruka amplifikacija
DA (gradus II)	0	9	53	0	0
AA (gradus III)	3	34	90	2	0
GBM (gradus IV)	2	151	371	31	5
<b>Ukupno</b>	5	194	514	33	5

DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme



**Slika 3.** Postotak CNA gena AKT1 u pojedinom patohistološkom tipu i gradusu difuznih glioma. DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme; HOMD-homozigotna delecija; HEMD-hemizigotna delecija; D-diploid; A-amplifikacija; VA-višestruka amplifikacija

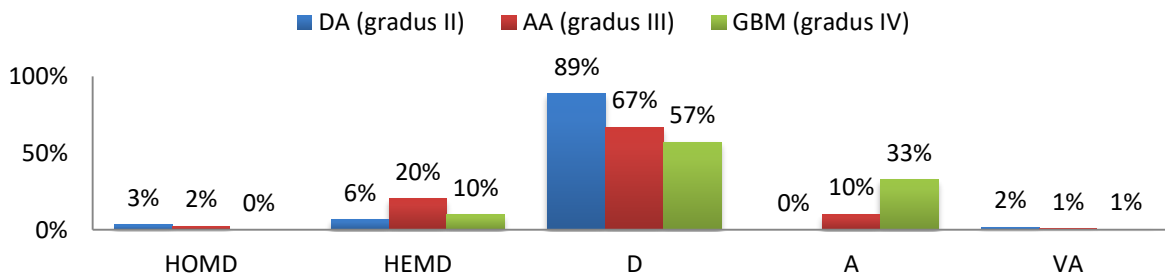
#### 4.2.2 AKT2

Analizom gena *AKT2* je utvrđeno da su u ukupnom uzorku amplifikacije (26%) najčešća CNA promjena. Ova promjena nađena je u 182 (33%) uzorka GBM (gradus IV). Tablica 3 i slika 4 pokazuju raspodjelu CNA promjena unutar pojedinog patohistološkog tipa i gradusa. Rezultati Mann-Whitney testa pokazali su statistički značajnu razliku u linearnim vrijednostima CNA gena *AKT2* između DA (gradus II) i GBM (gradus IV) ( $p < 0.001$ ) te između AA (gradus III) i GBM (gradus IV) ( $p < 0.001$ ), dok razlika između DA (gradus II) i AA (gradus III) nije bila statistički značajna. Ovi rezultati pokazuju da su GBM (gradus IV) značajno više pogođeni amplifikacijama ovog gena u odnosu na AA i DA.

**Tablica 3.** Broj uzoraka s CNA promjenom gena *AKT2* unutar pojedinog patohistološkog tipa i gradusa difuznih glioma.

Patohistološki tip i gradus	Promjene u broja kopija gena <i>AKT2</i>				
	homozigotna delecija	hemizigotna delecija	diploid	amplifikacija	višestruka amplifikacija
DA (gradus II)	2	4	55	0	1
AA (gradus III)	3	26	86	13	1
GBM (gradus IV)	0	55	320	182	3
<b>Ukupno</b>	5	85	461	195	5

DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme



**Slika 4.** Postotak CNA gena *AKT2* u pojedinom patohistološkom tipu i gradusu difuznih glioma. DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme; HOMD-homozigotna delecija; HEMD-hemizigotna delecija; D-diploid; A-amplifikacija; VA-višestruka amplifikacija

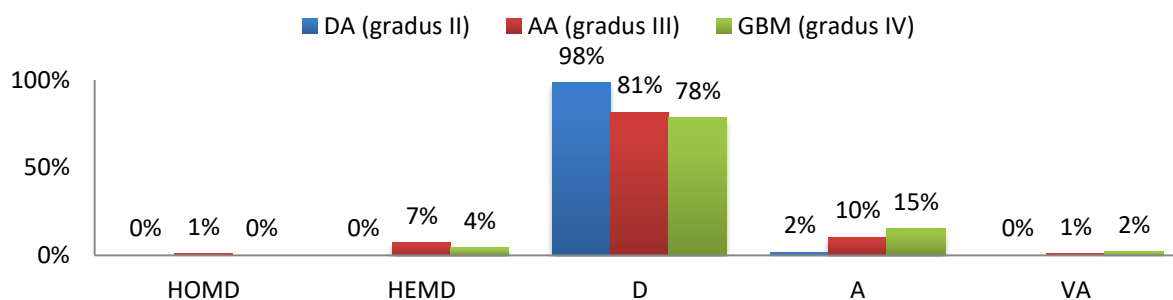
### 4.2.3 AKT3

Analizom gena *AKT3* je utvrđeno da su amplifikacije (3 kopije alela) ponovo najčešća CNA promjena nađena u 99 (13%) ukupnih uzoraka od čega je 85 (15% GBM) uzoraka pridruženo gradusu IV. Tablica 4 i slika 5 prikazuju raspodjelu CNA promjena unutar različitih patohistoloških tipova i gradusa. Rezultati Mann-Whitney testa pokazali su statistički značajnu razliku linearne vrijednosti CNA gena *AKT3* između DA (gradus II) i GBM (gradus IV) ( $p < 0.001$ ) te između AA (gradus III) i GBM (gradus IV) ( $p < 0.001$ ). Ovi rezultati statistički gledano potvrđuju značajno višu zastupljenost amplifikacija u gradusu IV.

**Tablica 4.** Broj uzoraka s CNA promjenom gena *AKT3* unutar pojedinog patohistološkog tipa/gradusa difuznih glioma.

Patohistološki tip i gradus	Promjene u broja kopija gena <i>AKT3</i>				
	homozigotna delecija	hemizigotna delecija	diploid	amplifikacija	višestruka amplifikacija
DA (gradus II)	0	0	61	1	0
AA (gradus III)	1	9	105	13	1
GBM (gradus IV)	1	24	439	85	11
<b>Ukupno</b>	<b>2</b>	<b>33</b>	<b>605</b>	<b>99</b>	<b>12</b>

DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme



**Slika 5.** Postotak CNA promjena gena *AKT3* u pojedinom patohistološkom tipu i gradusu difuznih glioma. DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme; HOMD-homozigotna delecija; HEMD-hemizigotna delecija; D-diploid; A-amplifikacija; VA-višestruka amplifikacija

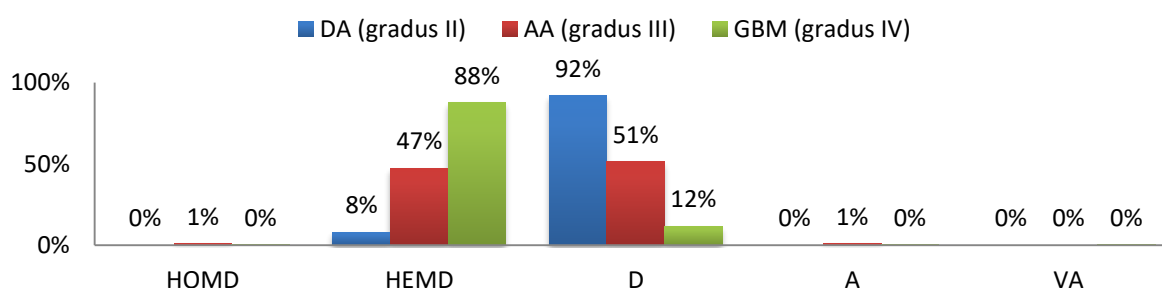
### 4.2.4 CHUK

Analiza gena *CHUK* pokazala je da su hemizigotne delecije (gubitak jednog alela) najčešća CNA promjena ovoga gena. Hemizigotne delecije pretrpjelo je 557 (74%) ukupnih uzoraka. Ova promjena nađena je u 491 uzorku (88%) GBM (gradus IV). Tablica 5 i Slika 6 prikazuju raspodjelu CNA promjena unutar različitih patohistoloških tipova i gradusa. Rezultati Mann-Whitney testa pokazali su statistički značajnu razliku linearne vrijednosti CNA gena *CHUK* između DA (gradus II) i AA (gradus III) ( $p < 0.001$ ), između DA (gradus II) i GBM (gradus IV) ( $p < 0.001$ ) te između AA (gradus III) i GBM (gradus IV) ( $p < 0.001$ ). Statistički testovi pokazuju da je *CHUK* značajno jače pogođen delecijama u višim gradusima.

**Tablica 5.** Broj uzoraka s CNA promjenom gena *CHUK* unutar pojedinog patohistološkog tipa i gradusa difuznih glioma.

Patohistološki tip i gradus	Promjene u broja kopija gena <i>CHUK</i>				
	homozigotna delecija	hemizigotna delecija	diploid	amplifikacija	višestruka amplifikacija
DA (gradus II)	0	5	57	0	0
AA (gradus III)	1	61	66	1	0
GBM (gradus IV)	2	491	65	1	1
<b>Ukupno</b>	3	557	188	2	1

DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme



**Slika 6.** Postotak CNA promjena gena *CHUK* u pojedinom patohistološkom tipu i gradusu difuznih glioma. DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme; HOMD-homozigotna delecija; HEMD-hemizigotna delecija; D-diploid; A-amplifikacija; VA-višestruka amplifikacija

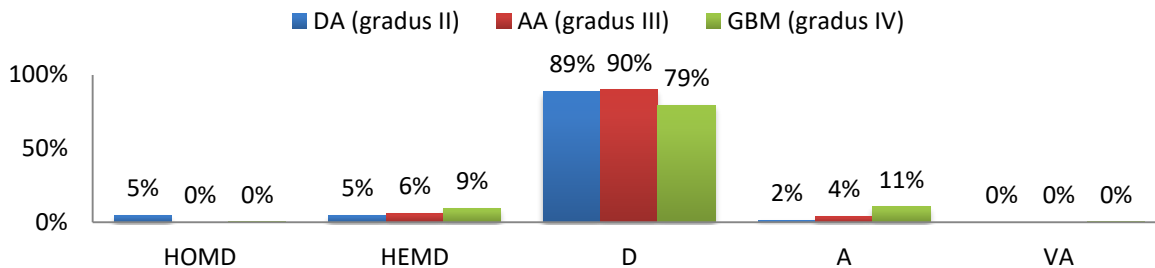
#### 4.2.5 *GSK3β*

Promjene *GSK3β* nisu bile toliko česte, ukupno je 135 uzoraka (18%) imalo CNA promjenu što je vidljivo iz Tablice 6. Najčešće CNA promjene gena *GSK3β* su amplifikacije (3 kopije alela) koje su pronađene u ukupno 65 (9%) uzoraka. Ove promjene zahvatile su 59 (11%) uzoraka GBM (gradus IV). Vrlo česte bile su i hemizigotne delecije ovoga gena u ukupno 64 (9%) uzorka. Unutar skupine GBM bila su 53 (9%) uzorka s hemizigotnom delecijom. Tablica 6 i slika 7 prikazuju raspodjelu CNA promjena unutar različitih patohistoloških tipova i gradusa. Statistička analiza nije pokazala značajne razlike u CNA između pojedinih patohistoloških tipova i gradusa.

**Tablica 6.** Broj uzoraka s CNA promjenom gena *GSK3β* unutar pojedinog patohistološkog tipa/gradusa glioma.

Patohistološki tip i gradus	Promjene u broja kopija gena <i>GSK3β</i>				
	homozigotna delecija	hemizigotna delecija	diploid	amplifikacija	višestruka amplifikacija
DA (gradus II)	3	3	55	1	0
AA (gradus III)	0	8	116	5	0
GBM (gradus IV)	2	53	445	59	1
<b>Ukupno</b>	5	64	616	65	1

DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme



**Slika 7.** Postotak CNA promjena gena GSK3β u pojedinom patohistološkom tipu i gradusu difuznih glioma. DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme; HOMD-homozigotna delecija; HEMD-hemizigotna delecija; D-diploid; A-amplifikacija; VA-višestruka amplifikacija

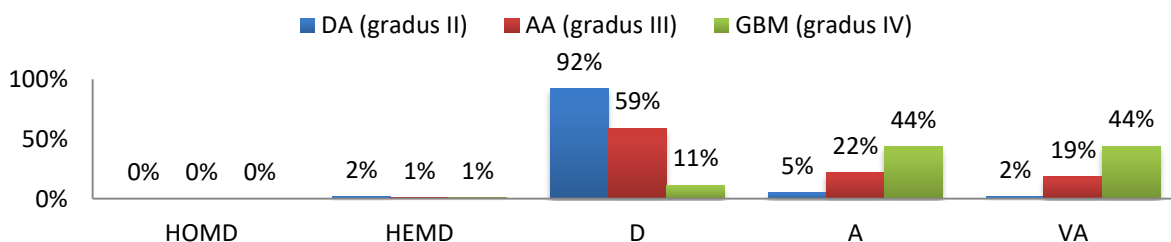
#### 4.2.6 EGFR

Pokazano je da je gen *EGFR* vrlo često pogođen promjenama u uzorcima glioma (554 uzorka, 74%). Analizom gena *EGFR* je utvrđeno da su u ukupnom uzorku amplifikacije (3 kopije alela) najčešće CNA promjene (275 uzoraka, 37%). Ove su promjene nađene u 244 (44%) GBM (gradus IV). Slijede ih višestruka amplifikacije (4 ili više kopija alela) u ukupno 272 (36%) uzorka. U skupini GBM višestruka amplifikacije je pokazalo 247 (44%) uzoraka gradusa IV. Tablica 7 i Slika 8 prikazuju raspodjelu CNA promjena unutar različitih patohistoloških tipova i gradusa. Rezultati Mann-Whitney testa pokazali su statistički značajnu razliku linearnih vrijednosti CNA gena *EGFR* između DA (gradus II) i AA (gradus III) ( $p < 0.001$ ), između DA (gradus II) i GBM (gradus IV) ( $p < 0.001$ ) te između AA (gradus III) i GBM (gradus IV) ( $p < 0.001$ ). Rezultati pokazuju da amplifikacije i višestruka amplifikacije ovoga gena progresivno rastu s porastom gradusa te su značajno više pridružene višim gradusima, posebice gradusu IV (Slika 8).

**Tablica 7.** Broj uzoraka s CNA promjenom gena *EGFR* unutar pojedinog patohistološkog tipa.

Patohistološki tip i gradus	Promjene u broja kopija gena <i>EGFR</i>				
	homozigotna delecija	hemizigotna delecija	diploid	amplifikacija	višestruka amplifikacija
DA (gradus II)	0	1	57	3	1
AA (gradus III)	0	1	76	28	24
GBM (gradus IV)	0	5	64	244	247
<b>Ukupno</b>	0	7	197	275	272

DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme



**Slika 8.** Postotak CNA promjena gena *EGFR* u pojedinom patohistološkom tipu/gradusu difuznih glioma. DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme; HOMD-homozigotna delecija; HEMD-hemizigotna delecija; D-diploid; A-amplifikacija; VA-višestruka amplifikacija

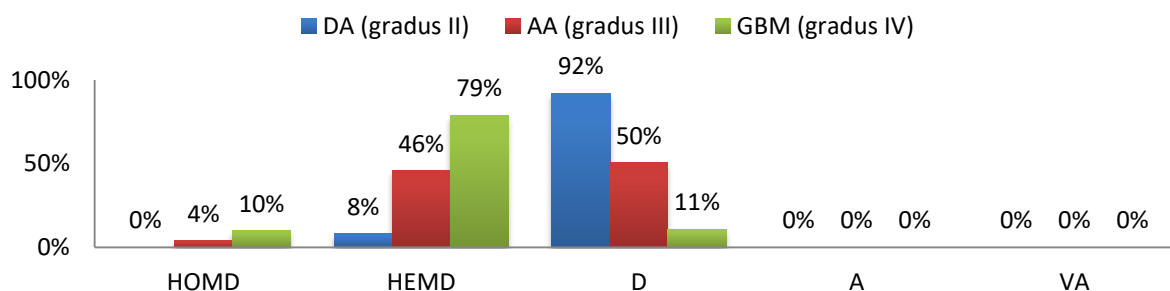
#### 4.2.7 PTEN

Hemizigotne delecije (gubitak jednog alela) najčešća su CNA promjena gena *PTEN* na ukupno 506 (67%) uzoraka. Ove promjene nađene su u 442 (79%) uzorka GBM (gradus IV). Tablica 8 i Slika 9 prikazuju raspodjelu CNA promjena unutar različitih patohistoloških tipova i gradusa. Rezultati Mann-Whitney testa pokazali su statistički značajnu razliku linearne vrijednosti CNA gena *PTEN* između DA (gradus II) i AA (gradus III) ( $p < 0.001$ ), između DA (gradus II) i GBM (gradus IV) ( $p < 0.001$ ) te između AA (gradus III) i GBM (gradus IV) ( $p < 0.001$ ). Ovi rezultati statistički potvrđuju da je *PTEN* značajno deletiran u višim gradusima.

**Tablica 8.** Broj uzoraka s CNA promjenom gena *PTEN* unutar pojedinog patohistološkog tipa/gradusa difuznih glioma.

Patohistološki tip i gradus	Promjene u broja kopija gena <i>PTEN</i>				
	homozigotna delecija	hemizigotna delecija	diploid	amplifikacija	višestruka amplifikacija
DA (gradus II)	0	5	57	0	0
AA (gradus III)	5	59	65	0	0
GBM (gradus IV)	55	442	61	1	1
<b>Ukupno</b>	60	506	183	1	1

DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme



**Slika 9.** Postotak CNA promjena gena *PTEN* u pojedinom patohistološkom tipu i gradusu. DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme; HOMD-homozigotna delecija; HEMD-hemizigotna delecija; D-diploid; A-amplifikacija; VA-višestruka amplifikacija

#### 4.2.8 PIK3API

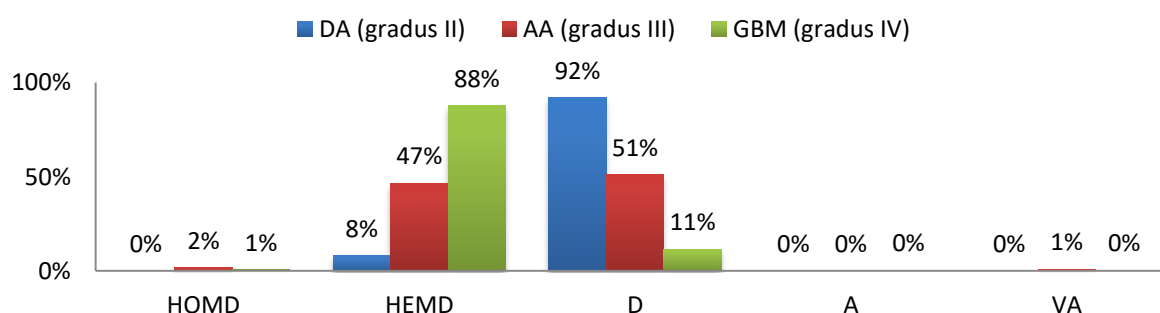
Analizom gena *PIK3API* je utvrđeno da su hemizigotne delecije (gubitak jednog alela) vrlo česte u ispitanoj uzorku sa 88% promijenjenih GMB i 47% AA. Ova najčešća CNA promjena nađena je ukupno u 556 (74%) uzoraka. Tablica 9 i Slika 10 prikazuju raspodjelu CNA promjena unutar različitih patohistoloških tipova i gradusa. Rezultati Mann-Whitney testa pokazali su statistički značajnu razliku linearne vrijednosti CNA gena *PIK3API* između DA (gradus II) i AA (gradus III) ( $p < 0.001$ ), između DA (gradus II) i GBM (gradus IV) ( $p < 0.001$ ) te između AA (gradus III) i GBM (gradus IV) ( $p < 0.001$ ). Ovo pokazuje da su viši gradusi, a posebice GBM, jače pogođeni delecijama ovoga gena.



**Tablica 9.** Broj uzoraka s CNA promjenom gena *PIK3AP1* unutar pojedinog patohistološkog tipa/gradusa difuznih glioma

Patohistološki tip i gradus	Promjene u broja kopija gena <i>PIK3AP1</i>				
	homozigotna delecija	hemizigotna delecija	diploid	amplifikacija	višestruka amplifikacija
DA (gradus II)	0	5	57	0	0
AA (gradus III)	2	60	66	0	1
GBM (gradus IV)	3	491	64	1	1
<b>Ukupno</b>	5	556	187	1	2

DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme



**Slika 10.** Postotak CNA promjena gena *PIK3AP1* u pojedinom patohistološkom tipu i gradusu difuznih glioma. DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme; HOMD-homozigotna delecija; HEMD-hemizigotna delecija; D-diploid; A-amplifikacija; VA-višestruka amplifikacija

### 4.3 Ekspresija mRNA i proteina ispitivanih gena u difuznim gliomima

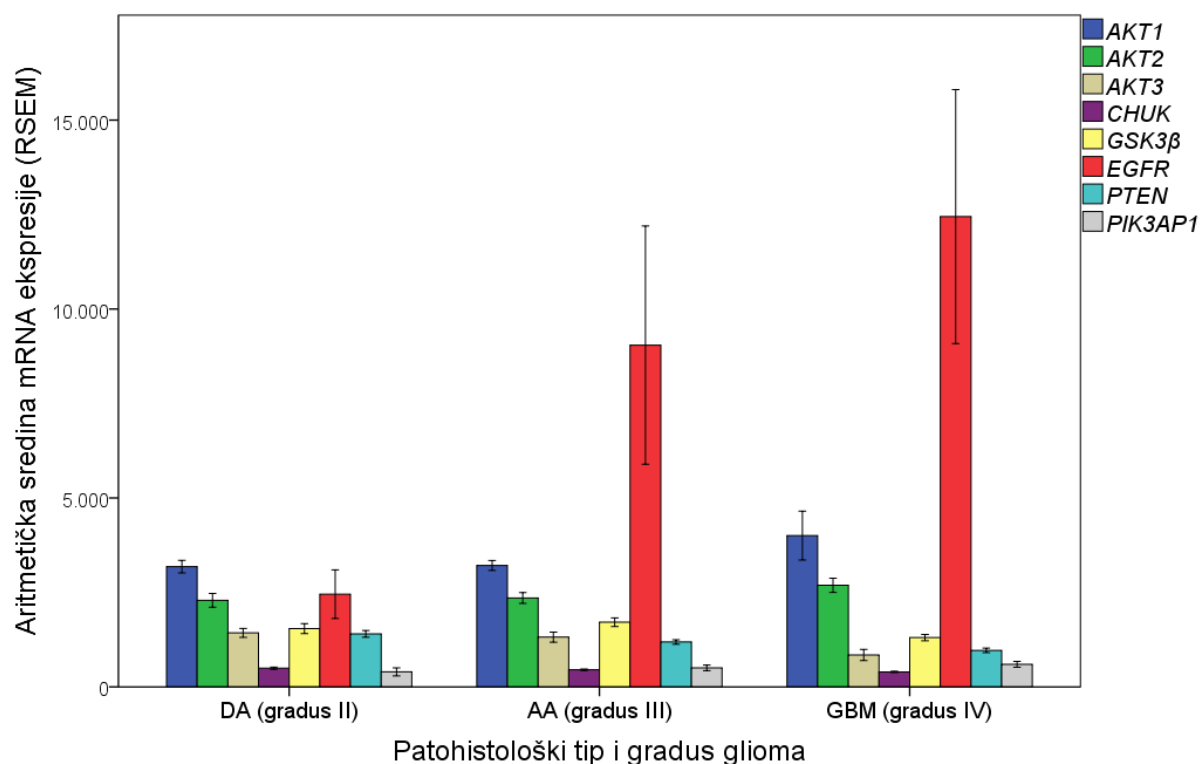
#### 4.3.1 Ekspresija mRNA u difuznim gliomima

Za usporedbu ekspresije mRNA gena signalnog puta EGFR-PI3K-AKT-mTOR analizirana su 62 DA (gradus II), 129 AA (gradus III) te 140 GBM (gradus IV) (Tablica 10). Analiza rezultata je pokazala da transkripti gena *AKT1* pokazuju najvišu razinu ekspresije mRNA u DA (gradus II), dok je u AA (gradus III) te GBM (gradus IV) najvišu ekspresiju mRNA pokazao gen *EGFR*. Najnižu ekspresiju mRNA u DA (gradus II) pokazao je *PIK3AP1*, a u AA i GBM (gradusi III i IV) najnižu je pokazao *CHUK* (Tablica 10, Slika 11). Rezultati Kruskal-Wallis testa pokazali su da postoji statistički značajna razlika u ekspresiji mRNA svih ispitivanih gena između pojedinih patohistoloških tipova i gradusa ( $p < 0.001$  za *AKT1*, *AKT3*, *CHUK*, *GSK3β*, *PTEN* i *PIK3AP1*;  $p = 0.025$  za *AKT2*;  $p = 0.003$  za *EGFR*). Mann-Whitney test je pokazao da postoji značajno niža razina ekspresija mRNA gena *AKT3* ( $p = 0.019$ ), *CHUK* ( $p = 0.008$ ) i *PTEN* ( $p < 0.001$ ) u AA (gradus III) u odnosu na DA (gradus II) te značajno viša ekspresija mRNA gena *EGFR* ( $p = 0.020$ ) i *PIK3AP1* ( $p = 0.047$ ) u AA (gradus III) u odnosu na DA (gradus II). Daljnja analiza Mann-Whitney testom pokazala je značajno višu ekspresiju mRNA gena *AKT1* ( $p = 0.002$ ), *AKT2* ( $p = 0.030$ ), *EGFR* ( $p = 0.001$ ) i *PIK3AP1* ( $p < 0.001$ ), a značajno nižu ekspresiju mRNA gena *AKT3* ( $p < 0.001$ ), *CHUK* ( $p < 0.001$ ), *GSK3β* ( $p = 0.001$ ) i *PTEN* ( $p < 0.001$ ) u GBM (gradus IV) u odnosu na DA (gradus II). Također, Mann-Whitney test je pokazao značajno višu ekspresiju mRNA gena *AKT1* ( $p < 0.001$ ), *AKT2* ( $p = 0.018$ ) i *PIK3AP1* ( $p = 0.013$ ), a značajno nižu ekspresiju gena *AKT3*, *CHUK*, *GSK3β* i *PTEN* ( $p < 0.001$ ) u GBM (gradus IV) u odnosu na AA (gradus III).

**Tablica 10.** Srednje vrijednosti ekspresije mRNA ispitivanih gena unutar pojedinog patohistološkog tipa i gradusa glioma.

GEN		Razina ekspresije mRNA (RNASeq V2 RSEM)							
		<i>AKT1</i>	<i>AKT2</i>	<i>AKT3</i>	<i>CHUK</i>	<i>GSK3<math>\beta</math></i>	<i>EGFR</i>	<i>PTEN</i>	<i>PIK3AP1</i>
DA (gradus II)	N	62	62	62	62	62	62	62	62
	AS	3182,20	2291,16	1428,41	494,95	1540,72	2453,12	1403,90	397,07
	SD	$\pm 659,60$	$\pm 722,17$	$\pm 468,29$	$\pm 116,16$	$\pm 519,52$	$\pm 2538,78$	$\pm 349,50$	$\pm 417,35$
	M	3123,58	2245,96	1450,79	501,64	1530,27	1901,81	1403,18	311,42
AA (gradus III)	N	129	129	129	129	129	129	129	129
	AS	3212,82	2353,85	1316,06	452,55	1711,55	9044,42	1187,80	503,68
	SD	$\pm 759,42$	$\pm 826,28$	$\pm 762,44$	$\pm 110,24$	$\pm 653,53$	$\pm 18095,74$	$\pm 346,20$	$\pm 425,20$
	M	3213,98	2179,75	1174,06	442,53	1659,60	2612,05	1212,54	364,66
GBM (gradus IV)	N	140	140	140	140	140	140	140	140
	AS	4004,13	2688,12	844,66	395,44	1304,77	12446,15	966,19	596,24
	SD	$\pm 3866,07$	$\pm 1125,53$	$\pm 890,85$	$\pm 103,84$	$\pm 500,88$	$\pm 20111,17$	$\pm 363,05$	$\pm 455,47$
	M	3737,21	2394,95	693,48	383,62	1215,72	4179,58	952,07	536,57

DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme; N-broj uzoraka; AS-aritmetička sredina; SD-standardna devijacija; M-medijan



**Slika 11.** Distribucija mRNA ekspresije dobivene metodom RSEM s intervalom pouzdanosti (95%) ispitivanih gena prema patohistološkom tipu i gradusu difuznih glioma. DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme

### 4.3.2 Ekspresija proteina u difuznim gliomima

Za usporedbu proteinske ekspresije u pojedinom patohistološkom gradusu cBioPortal sadržavao je podatke proteinske ekspresije za 348 glioma, te su analizirana 46 DA (gradus II), 99 AA (gradus III) te 213 GBM (gradus IV) (Tablica 11). Potrebno je napomenuti da su u procesu normalizacije podataka dobivenim metodom RPPA (od engl. Reverse Phase Protein Arrays) podatci iz cBioPortala logaritmirani te su vrlo male vrijednosti (manje od 1) prikazane kao negativne vrijednosti, stoga je važno razumjeti da što je vrijednost proteinske ekspresije negativnija, ekspresija je niža. Dakle negativna vrijednost ekspresije ne ukazuje na potpuni gubitak ekspresije, već da je ekspresija znatno oslabljena. Rezultati analize pokazuju da najvišu aritmetičku sredinu proteinske ekspresije u sva tri gradusa ima *EGFR*, a najnižu *GSK3β* u DA i GBM te *PTEN* u AA (Tablica 11).

**Tablica 11.** Srednje vrijednosti proteinske ekspresije (RPPA, od engl. Reverse Phase Protein Arrays) ispitivanih gena unutar pojedinog patohistološkog tipa i gradusa glioma

PROTEIN		Razina proteinske ekspresije (RPPA)					
		AKT1	AKT2	AKT3	GSK3β	EGFR	PTEN
DA (gradus II)	N	46	46	46	46	46	46
	AS	-0,063	-0,063	-0,063	-0,073	0,051	-0,041
	SD	±0,383	±0,383	±0,383	±0,380	±0,493	±0,374
	M	-0,024	-0,024	-0,024	-0,160	0,042	-0,055
AA (gradus III)	N	99	99	99	99	99	99
	AS	0,067	0,067	0,067	-0,024	0,434	-0,177
	SD	±0,367	±0,367	±0,367	±0,328	±1,075	±0,415
	M	0,082	0,082	0,082	-0,051	0,023	-0,162
GBM (gradus IV)	N	213	213	213	213	213	213
	AS	-0,004	-0,004	-0,004	-0,050	0,200	-0,043
	SD	±0,621	±0,621	±0,621	±0,446	±1,551	±0,422
	M	0,073	0,073	0,073	0,0004	-0,116	0,018

DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme; N-broj uzoraka; AS-aritmetička sredina; SD-standardna devijacija; M-medijan

Napomena: Zbog nedostatka podataka o proteinskoj ekspresiji CHUK i PIK3AP1 nisu prikazani tablično.

Statistička analiza nije pokazala da postoji značajna razlika u ekspresiji proteina unutar različitih patohistoloških tipova i gradusa difuznih glioma. U tablici 11 vidimo da je ekspresija proteina AKT1, AKT2, AKT3, GSK3β te EGFR bila viša u GBM (gradus IV) i AA (gradus III) u odnosu na DA (gradus II). Iako su vrijednosti ekspresije gena *EGFR* bile znatno više, a gena *PTEN* znatno niže u AA (gradus III) u odnosu na vrijednosti u DA (gradus II) ova razlika nije bila statistički značajna, vjerojatno zbog relativno malog broja uzoraka DA. Također, značajna razlika nije pronađena u proteinskoj ekspresiji EGFR između DA(gradus II) i GBM (gradus IV) iako je aritmetička sredina ekspresije EGFR u gradusu IV bila znatno viša u odnosu na gradus II.

### 4.4 Metilacija ispitivanih gena u difuznim gliomima

Za usporedbu metilacije ispitivanih gena u ukupnom ali i pojedinom patohistološkom tipu i gradusu analizirana su 62 DA (gradus II), 129 AA (gradus III) te 123 GBM (gradus IV) te je broj uzorka (N=314) prikazan za svaki gen u tablici 12. Od 129 uzoraka AA (gradus III) podaci o metilaciji gena *AKT2* su nedostajali za 2 uzorka. Također, podatci o metilaciji gena *PIK3AP1* unutar skupine GBM (gradus IV) nisu bili dostupni. U tablici 12 i na slici 12 prikazane su srednje vrijednosti metilacije za ispitivane gene. Metilacija gena *AKT3* bila je najviša u GBM

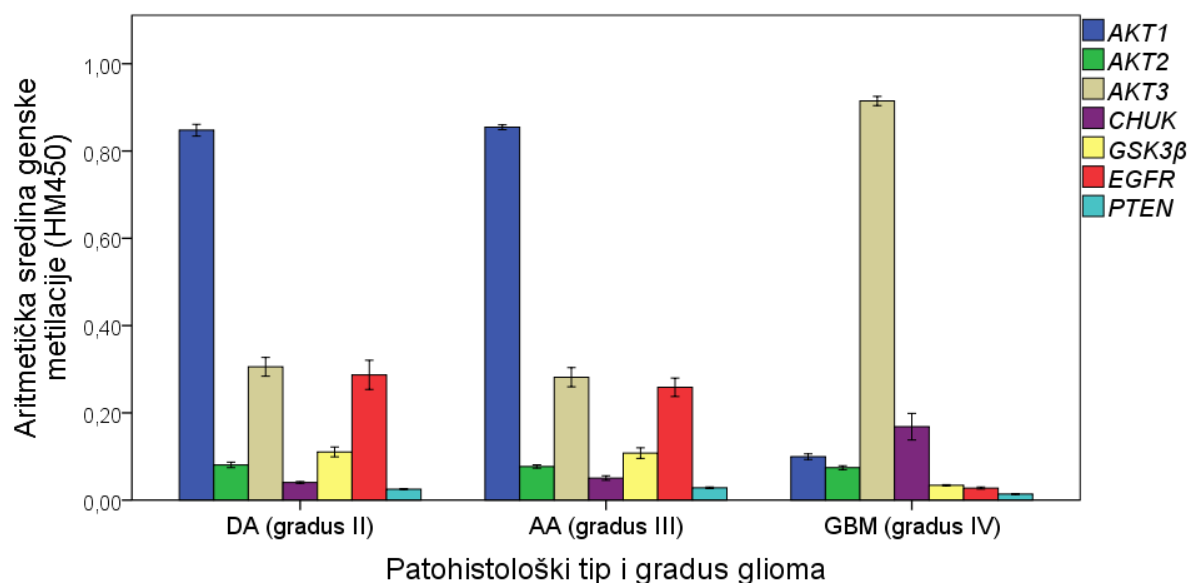
(gradus IV), dok su srednje vrijednosti metilacije gena *AKT1* bile najviše u DA (gradus II) te AA (gradus III). Najnižu vrijednost metilacije imao je gen *PTEN* u sva tri gradusa difuznih glioma mozga što je vidljivo na slici 12. U ukupnom uzorku najveću metilaciju pokazao je gen *AKT3*.

Rezultati Kruskal-Wallis testa pokazali su da postoji statistički značajna razlika u metilaciji svih ispitivanih gena između pojedinih patohistoloških tipova i gradusa ( $p < 0.001$  za *AKT1*, *AKT3*, *CHUK*, *GSK3 $\beta$* , *EGFR*, *PTEN*, *PIK3API*;  $p = 0.032$  za *AKT2*). Upotrebom Mann-Whitney testa ustanovljeno je da je metilacija gena *AKT3* ( $p = 0.015$ ) te *PIK3API* ( $p < 0.001$ ) značajno viša u DA (gradus II) u odnosu na AA (gradus III), dok je metilacija gena *CHUK* ( $p < 0.001$ ) i *PTEN* ( $p = 0.008$ ) značajno viša u AA (gradus III) u odnosu na DA (gradus II). Daljnja analiza Mann-Whitney testom pokazala je značajno višu metilaciju gena *AKT1* ( $p < 0.001$ ), *AKT2* ( $p = 0.047$ ), *GSK3 $\beta$*  ( $p < 0.001$ ), *PTEN* ( $p < 0.001$ ) te *EGFR* ( $p < 0.001$ ) u AA (gradus III) u odnosu na GBM (gradus IV). Statistički značajno višu metilaciju u GBM (gradus IV) u odnosu na AA (gradus III) imali su geni *AKT3* ( $p < 0.001$ ) i *CHUK* ( $p < 0.001$ ). Metilacija gena *AKT1*, *GSK3 $\beta$* , *EGFR*, *PTEN* ( $p < 0.001$ ) te *AKT2* ( $p = 0.018$ ) bila je značajno niža u GBM (gradus IV), dok su geni *AKT3* i *CHUK* ( $p < 0.001$ ) bili značajno više metilirani u GBM (gradus IV) u odnosu na DA (gradus II). Na slici 12 vidljivo je da su specifični geni različito utišani u različitim tipovima glijalnih tumora: *AKT1*, *GSK3 $\beta$*  i *EGFR* bili su znatno utišani u gradusima II i III, dok su *AKT3* i *CHUK* pokazali višu metilaciju u gradusu IV. Ovi rezultati upućuju na potencijalno značajnu ulogu metilacije u regulaciji ekspresije gena *AKT1*, *AKT3*, *CHUK*, *EGFR* te *PIK3API*.

**Tablica 12.** Srednje vrijednosti metilacije (HM450) ispitivanih gena unutar pojedinog patohistološkog tipa i gradusa difuznih glioma.

GEN		Razina genske metilacije (HM450)							
		<i>AKT1</i>	<i>AKT2</i>	<i>AKT3</i>	<i>CHUK</i>	<i>GSK3<math>\beta</math></i>	<i>EGFR</i>	<i>PTEN</i>	<i>PIK3API</i>
<b>DA (gradus II)</b>	N	62	62	62	62	62	62	62	62
	AS	0,848	0,081	0,305	0,041	0,110	0,287	0,025	0,773
	SD	$\pm 0,053$	$\pm 0,025$	$\pm 0,085$	$\pm 0,009$	$\pm 0,044$	$\pm 0,132$	$\pm 0,005$	$\pm 0,082$
	M	0,856	0,075	0,294	0,040	0,108	0,250	0,025	0,796
<b>AA (gradus III)</b>	N	129	127	129	129	129	129	129	129
	AS	0,856	0,077	0,280	0,051	0,108	0,263	0,030	0,658
	SD	$\pm 0,033$	$\pm 0,021$	$\pm 0,125$	$\pm 0,030$	$\pm 0,069$	$\pm 0,129$	$\pm 0,022$	$\pm 0,177$
	M	0,856	0,073	0,252	0,045	0,095	0,235	0,026	0,696
<b>GBM (gradus IV)</b>	N	123	123	123	123	123	123	123	0
	AS	0,100	0,074	0,915	0,168	0,034	0,028	0,014	-
	SD	$\pm 0,036$	$\pm 0,025$	$\pm 0,059$	$\pm 0,170$	$\pm 0,008$	$\pm 0,012$	$\pm 0,003$	-
	M	0,096	0,068	0,934	0,105	0,032	0,025	0,014	-

DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme; N-broj uzoraka; AS-aritmetička sredina; SD-standardna devijacija; M-medijan



**Slika 12.** Distribucija genske metilacije (HM450) s intervalom pouzdanosti (95%) prema patohistološkom tipu i gradusu glioma. DA-difuzni astrocitom; AA-anaplastični astrocitom; GBM-glioblastoma multiforme. Napomena: Zbog nedostatka podataka o metilaciji u GBM gen *PIK3AP1* nije prikazan grafički.

#### 4.5 Usporedba svih parametara ispitivanih gena u difuznim gliomima

##### 4.5.1 Korelacija CNA i ekspresije mRNA unutar pojedinog patohistološkog tipa glioma

Analiza korelacija između CNA promjena gena i ekspresije mRNA u pojedinom patohistološkom tipu i gradusu glioma uključivala je 62 DA (gradus II), 129 AA (gradus III) te 140 GBM (gradus IV). Rezultati Spearmanova testa su pokazali statistički značajnu pozitivnu korelaciju između ekspresije mRNA i linearne vrijednosti CNA u AA (gradus III) te GBM (gradus IV) za gene *AKT1*, *AKT2*, *CHUK*, *EGFR* te *PTEN* ( $p < 0.001$ ). Geni *EGFR* i *PTEN* su pokazali pozitivnu korelaciju CNA promjena i ekspresije mRNA i u DA (gradus II) ( $p < 0.05$ ), a geni *GSK3β* i *PIK3AP1* pokazuju korelaciju samo u GBM (gradus IV) ( $p < 0.001$ ). Slike 13 i 14 pokazuju grafove međusobne ovisnosti CNA promjena s ekspresijom mRNA svakog patohistološkog tipa. Također, na slikama 13 i 14 vidi se da uzorci prikazani crvenim točkama (amplifikacije i višestruke amplifikacije) pokazuju povišenu ekspresiju mRNA u odnosu na uzorke bez CNA (sive točke), dok uzorci prikazani plavim točkama (homozigotne i hemizigotne delecije) pokazuju sniženu ekspresiju mRNA u odnosu na uzorke bez CNA (sive točke). Bitno je uočiti da s porastom gradusa raste i jačina korelacije između sve većeg broja gena, pa je tako u GBM (gradus IV) jača korelacija (koeficijent korelacije) između CNA i ekspresije mRNA nego metilacije i ekspresije mRNA u svim ispitivanim genima osim gena *AKT3* (Slike 13, 14 i 15). To upućuje na zaključak da u višim gradusima biološka agresivnost tumora više ovisi o CNA promjenama, dok u nižim gradusima važniju ulogu u ekspresiji ispitivanih proteina ima metilacija njihovih gena.

##### 4.5.2 Korelacija metilacije i ekspresije mRNA unutar pojedinog patohistološkog tipa glioma

Analiza korelacija između metilacije pojedinog gena i ekspresije njegove mRNA u pojedinom patohistološkom tipu i gradusu glioma uključila je ukupno 62 DA (gradus II), 127 AA (gradus III) te 42 GBM (gradus IV). Zbog nedostatka podataka o metilaciji gena *PIK3AP1* u GBM (gradus IV) korelaciju s mRNA nije bilo moguće provesti. Spearmanovim testom utvrđena je statistički značajna negativna korelacija između metilacije i mRNA ekspresije gena *GSK3β*, *EGFR* te *PIK3AP1* u DA (gradus II) ( $p < 0.05$ ), gena *AKT1* ( $p < 0.05$ ), *AKT2*, *AKT3*, *GSK3β*, *EGFR* te *PTEN* ( $p < 0.001$ ) u AA (gradus III) te gena *EGFR* i *PTEN* u GBM (gradus IV) ( $p < 0.05$ ). Slika 15 prikazuje grafove međusobne ovisnosti metilacije o mRNA ekspresiji gena *AKT3*, *GSK3β*,

*EGFR* te *PTEN* kroz sva tri patohistološka tipa i gradusa ispitivanih glioma. Također, usporedbom Spearmanova koeficijenta korelacije ( $r$ ) (tablica 13) metilacija pokazuje jaču korelaciju s ekspresijom mRNA u odnosu na korelaciju ekspresije mRNA s CNA promjenama u nižim gradusima. U gradusu II ukupno je 5 gena (*AKT1*, *AKT3*, *GSK3 $\beta$* , *EGFR* te *PIK3AP1*) pokazalo jaču korelaciju, u gradusu III 3 gena (*AKT3*, *GSK3 $\beta$*  i *EGFR*), dok je u gradusu IV samo *AKT3* pokazao jaču korelaciju mRNA i metilacije. Međutim, u gradusu IV geni *AKT1*, *AKT2*, *GSK3 $\beta$* , *EGFR*, *PIK3AP1*, *CHUK* i *PTEN* pokazuju bolju korelaciju ekspresije mRNA s CNA promjenama u usporedbi s korelacijom mRNA i metilacije (Slike 13, 14 i 15; tablica 13). Iz toga proizlazi da su u gliomima viših gradusa za kontrolu ekspresije mRNA zaslužnije CNA promjene od metilacije svih ispitivanih gena osim *AKT3* koji je pokazao drugačiji obrazac regulacije

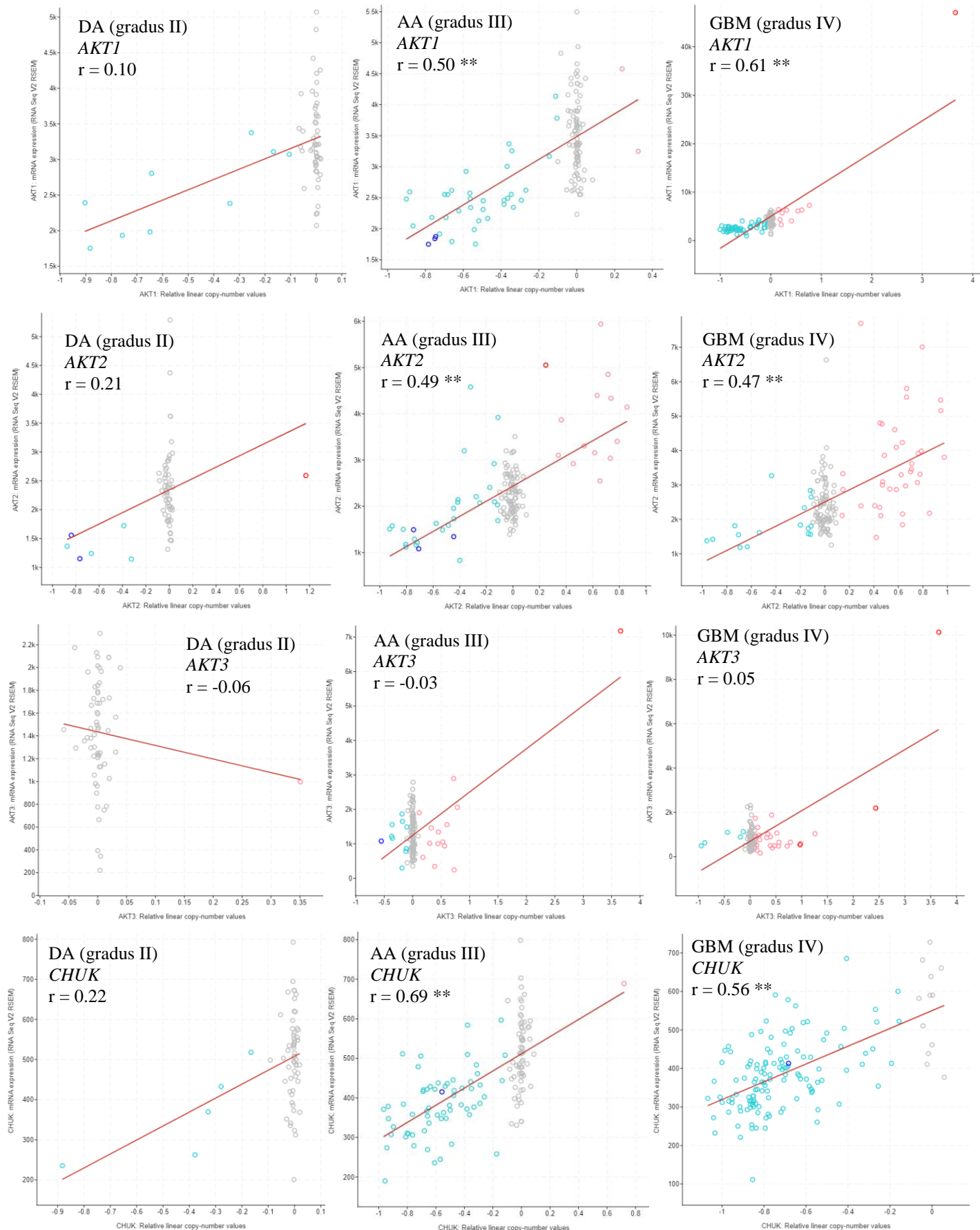
#### 4.5.3 Korelacija proteinske i mRNA ekspresije unutar pojedinog patohistološkog tipa glioma

Za analizu korelacije između mRNA i proteinske ekspresije u pojedinom patohistološkom tipu i gradusu glioma analizirano je ukupno 46 DA (gradus II), 99 AA (gradus III) te 63 GBM (gradus IV). Spearmanov test pokazao je statistički značajnu pozitivnu korelaciju između mRNA i proteinske ekspresije gena *EGFR* ( $p < 0.001$ ) i *PTEN* ( $p < 0.001$ ) u DA (gradus II), gena *AKT1*, *AKT2* i *GSK3 $\beta$*  ( $p < 0.05$ ) te gena *EGFR* i *PTEN* ( $p < 0.001$ ) u AA (gradus III) te gena *AKT2* ( $p = 0.031$ ), *GSK3 $\beta$*  ( $p = 0.025$ ) i *EGFR* ( $p < 0.001$ ) u GBM (gradus IV) (Tablica 13). Slika 16 prikazuje grafove ovisnosti proteinske ekspresije o mRNA ekspresiji gena *AKT2*, *GSK3 $\beta$* , *EGFR* te *PTEN* u sva tri patohistološka tipa i gradusa difuznih glioma. Iz navedenih korelacija na slici 16 i tablici 13 vidljivo je da mRNA ekspresija gena *EGFR* najbolje korelira s proteinskom ekspresijom u sva tri patohistološka tipa glioma.

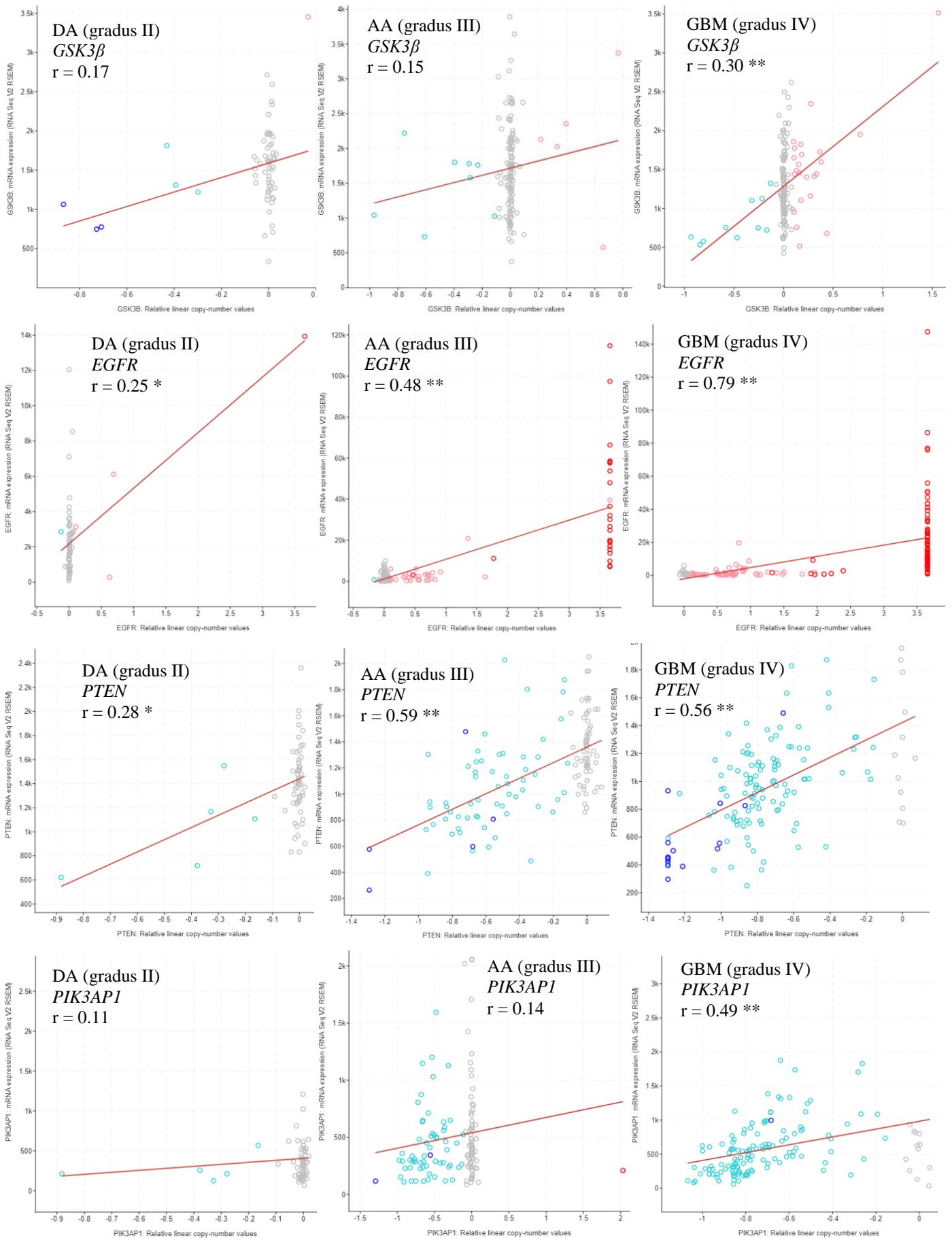
**Tablica 13.** Korelacija metilacije i proteinske ekspresije s mRNA ekspresijom u 3 patohistološka tipa glioma

Patohistološki tip i gradus	GENI	KORELACIJA					
		CNA gena vs mRNA ekspresija		Genska metilacija vs mRNA ekspresija		Proteinska ekspresija vs mRNA ekspresija	
		Spearmanov koeficijent korelacije ( $r$ )	p	Spearmanov koeficijent korelacije ( $r$ )	p	Spearmanov koeficijent korelacije ( $r$ )	p
DA (gradus II)	<i>AKT1</i>	0.10	0.448	-0.15	0.239	0.10	0.525
	<i>AKT2</i>	0.21	0.108	-0.10	0.420	0.12	0.417
	<i>AKT3</i>	-0.06	0.655	-0.22	0.080	0.27	0.070
	<i>CHUK</i>	0.22	0.092	-0.16	0.201	-	-
	<i>GSK3<math>\beta</math></i>	0.17	0.187	-0.29	0.024*	0.16	0.295
	<i>EGFR</i>	0.25	0.047*	-0.32	0.012*	0.55	<0.001*
	<i>PTEN</i>	0.28	0.030*	-0.02	0.859	0.46	0.001*
	<i>PIK3AP1</i>	0.11	0.382	-0.28	0.028*	-	-
AA (gradus III)	<i>AKT1</i>	0.50	<0.001*	-0.26	0.003*	0.32	0.001*
	<i>AKT2</i>	0.49	<0.001*	-0.42	<0.001*	0.29	0.003*
	<i>AKT3</i>	-0.03	0.714	-0.45	<0.001*	0.01	0.910
	<i>CHUK</i>	0.69	<0.001*	-0.45	<0.001*	-	-
	<i>GSK3<math>\beta</math></i>	0.15	0.0985	-0.36	<0.001*	0.23	0.023*
	<i>EGFR</i>	0.48	<0.001*	-0.49	<0.001*	0.73	<0.001*
	<i>PTEN</i>	0.59	<0.001*	-0.32	<0.001*	0.37	<0.001*
	<i>PIK3AP1</i>	0.14	0.123	-0.12	0.160	-	-
GBM (gradus IV)	<i>AKT1</i>	0.61	<0.001*	-0.06	0.703	0.24	0.063
	<i>AKT2</i>	0.47	<0.001*	-0.30	0.052	0.27	0.031*
	<i>AKT3</i>	0.05	0.526	0.34	0.030*	0.15	0.254
	<i>CHUK</i>	0.56	<0.001*	0.05	0.763	-	-
	<i>GSK3<math>\beta</math></i>	0.30	<0.001*	0.09	0.571	0.28	0.025*
	<i>EGFR</i>	0.79	<0.001*	-0.44	0.003*	0.89	<0.001*
	<i>PTEN</i>	0.56	<0.001*	-0.40	<0.001*	0.19	0.126
	<i>PIK3AP1</i>	0.49	<0.001*	-	-	-	-

DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme; \* -  $p < 0.05$

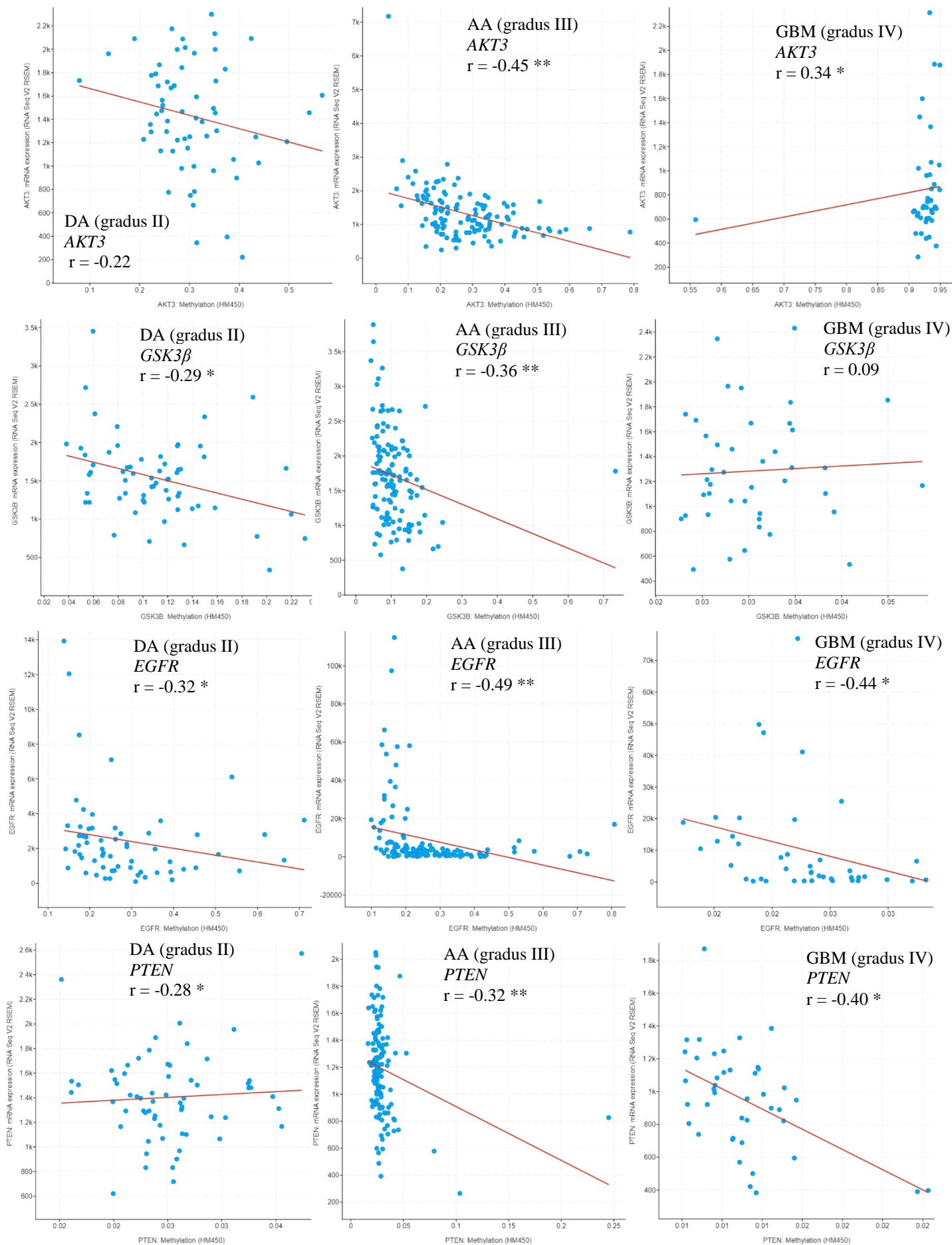


**Slika 13.** Korelacija mRNA ekspresije i CNA u gena *AKT1*, *AKT2*, *AKT3* i *CHUK* unutar pojedinog patohistološkog tipa glioma. DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme; \* $p < 0.05$  (Spearman); \*\* $p < 0.001$  (Spearman); r-Spearmanov koeficijent korelacije; x os-relativan linearni broj CNA; y os-mRNA ekspresija (RSEM); crveni pravac-pravac regresije; plave točke-uzorci s delecijom gena; crvene točke-uzorci s amplifikacijom gena; sive točke-diploidni uzorci

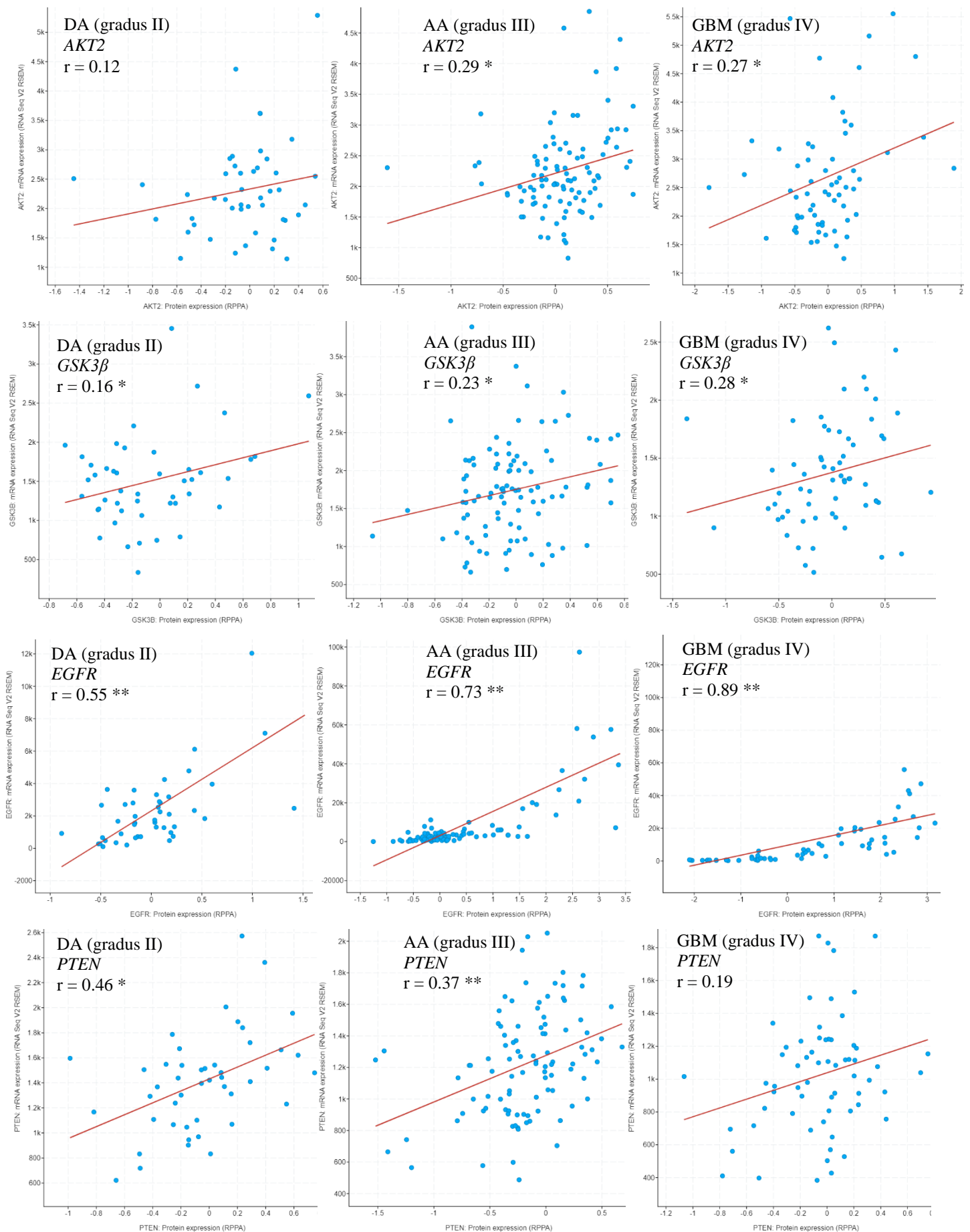


**Slika 14.** Korelacija mRNA ekspresije i CNA u gena *GSK3β*, *EGFR*, *PTEN* i *PIK3AP1* unutar pojedinog patohistološkog tipa glioma. DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme; \* $p < 0.05$  (Spearman); \*\* $p < 0.001$  (Spearman); r-Spearmanov koeficijent korelacije; x os-relativan linearni broj CNA; y os-mRNA ekspresija (RSEM); crveni pravac-pravac regresije; plave točke-uzorci s delecijom gena; crvene točke-uzorci s amplifikacijom gena; sive točke-diploidni uzorci





**Slika 15.** Korelacija mRNA ekspresije i metilacije u gena *AKT3*, *GSK3β*, *EGFR* i *PTEN* unutar pojedinog patohistološkog tipa glioma. DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme; \* $p < 0.05$  (Spearman); \*\* $p < 0.001$  (Spearman); r-Spearmanov koeficijent korelacije; x os-metilacija (HM450); y os-mRNA ekspresija (RSEM); crveni pravac-pravac regresije.



**Slika 16.** Korelacija proteinske ekspresije i mRNA ekspresije gena *AKT2*, *GSK3β*, *EGFR* i *PTEN* unutar pojedinog patohistološkog tipa glioma. DA-difuzni astroцитom; AA-anaplastični astroцитom; GBM-glioblastoma multiforme; \* $p < 0.05$  (Spearman); \*\* $p < 0.001$  (Spearman); r-Spearmanov koeficijent korelacije; x os-proteinska ekspresija (RPPA); y os-mRNA ekspresija (RSEM); crveni pravac-pravac regresije

## 5 RASPRAVA

Medicinski značaj proteinske kinaze B (AKT) i njoj pridruženih signalnih puteva dokazuju brojna istraživanja koja potvrđuju aktivaciju AKT u različitim tipovima karcinoma uključujući karcinome bubrega (Guo i sur., 2015.), papilarni karcinom štitnjače (Minna i sur., 2016.), nazofaringealni karcinom (Qin i sur., 2017.), planocelularni karcinom jednjaka (Song i sur., 2018.), karcinom pluća (Chen i sur., 2019.) i uznapredovali karcinom dojke (Xing i sur., 2019.). U ovoj studiji željeli smo saznati učestalost genskih promjena te njihovu povezanost s transkripcijskim i epigenetičkim promjenama te promjenama u proteinskoj ekspresiji gena *AKT1*, *AKT2*, *AKT3*, *CHUK*, *GSK3β*, *EGFR*, *PTEN* i *PIK3API* u različitim tipovima difuznih glioma mozga. Naše istraživanje *in silico* na ukupnom uzorku od 751 glioma pokazalo je genske promjene *PTEN*-a u 76% ukupnog uzorka, *PIK3API*-a i *CHUKA*-a u 75% ukupnih uzoraka svaki, te *EGFR*-a u 74% uzoraka. Ovi nam rezultati pokazuju vrlo visok stupanj uključenosti ovih gena u složenu regulaciju PI3K-AKT-mTOR signalnog puta u difuznim gliomima mozga. Ostali ispitivani geni bili su promijenjeni u manjem postotku, gen *AKT2* u 39% uzoraka, *AKT1* u 32% uzoraka, *AKT3* u 19% uzoraka, dok je *GSK3β* pokazao najmanji stupanj genskih promjena u ukupno 18% uzoraka. Učestalost genskih promjena varirala je između gradusa te su daleko veći broj CNA imali GBM, gradusa IV, u usporedbi s nižim gradusima. Treba naglasiti da kada se usredotočimo na najteži stupanj *EGFR*, *PIK3API* te *PTEN* pokazali su genske promjene u čak 89% GBM, dok je *CHUK* bio promijenjen u 88% , a *AKT2* u 43% uzoraka GBM-a. Ovakva visoka učestalost na genskoj razini ukazuje nam na važnu ulogu ovih gena u tumorigenezi glioma mozga te na povezanost s biološkom agresivnošću budući da je gradus IV (GBM) imao daleko najveći udio CNA promjena. Analiza gena koji kodira za proteinsku kinazu B pokazala je razlike u genskim i epigenetskim promjenama kao i u ekspresiji različitih izoformi ovog proteina: *AKT1*, *AKT2* i *AKT3*. Gen *AKT1* je bio promijenjen u 15% DA (gradus II), 30% AA (gradus III) te 34% GBM (gradus IV), a *AKT2* u 11% DA, 33% AA te čak 43% GBM. Za razliku od njih, *AKT3* je pokazao promjene u samo 2% DA, 19% AA te 22% GBM. U podacima iz literature (Xia i sur., 2019.) je navedeno da približno 70% GBM pokazuje pojačanu aktivaciju jedne od izoformi proteinske kinaze B (AKT) što se podudara s našim rezultatima. U istraživanju različite uloge AKT izoformi, Western blot analiza je pokazala da je u 5/5 uzoraka *AKT2* bio aktivan/fosforiliran, a njegova je mRNA ekspresija pozitivno korelirala s gradusom, dok su *AKT1* i *AKT3* bili aktivni u samo 3/5 uzoraka (Joy i sur., 2016.). U istoj je studiji pretpostavljeno da snižena ekspresija *AKT3* dovodi do dediferencijacije stanica koje postaju nalik na matične stanice te su zaslužne za progresiju GBM (Joy i sur.2016.). Novije istraživanje potvrdilo je tu hipotezu pokazavši da povišena ekspresija *AKT3* može odgoditi progresiju glioblastoma (Paul-Samojedny i sur., 2014.; Xia i sur., 2019.). Naši rezultati i literaturni podatci potvrđuju da *AKT1* i *AKT2* djeluju kao promotori tumorigeneze GBM-a, dok *AKT3* pokazuje tumor-supresorsku ulogu. Na epigenetičkoj razini naši rezultati pokazuju sniženu metilaciju gena *AKT1* te *AKT2* u GBM u odnosu na niže graduse (Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ), dok je gen *AKT3* pokazao značajno višu metilaciju u GBM u odnosu na niže graduse (Mann-Whitney,  $p < 0.001$ ). Ovi nam podatci govore o važnoj ulozi metilacijskog mehanizma koji interferira sa genetskim promjenama te pridonosi visokoj ekspresiji *AKT1*, *AKT2* i sniženoj ekspresiji *AKT3* čime dolazi do stanične dediferencijacije i tumorske progresije (Majewska i Szeliga, 2017.). U našem istraživanju analiza gena *CHUK* pokazala je visok udio CNA promjena od čega 8% u gradusu II (DA), 49% u AA (gradus III) te čak 88% u GBM (gradus IV). Usprkos nedostatku literaturnih podataka o ponašanju *CHUK*-a u gliomima, radovi na nazofaringealnim karcinomima govore o pojačanom bojenju uzoraka u 77,78% diferenciranih karcinoma u odnosu na samo 22,22% u nediferenciranih nazofaringealnih karcinoma (Xiao i sur., 2015.). U istoj studiji (Xiao i sur., 2015.) *in situ*

*hibridizacija* je pokazala povišene razine mRNA povezane s duljim preživljenjem pacijenata s nazofaringealnim karcinomom. Takva su opažanja u skladu s našim rezultatima u kojima je najveći broj CNA promjena *CHUK* u obliku hemizigotnih delecija (88%) pridružen upravo gradus IV (GBM) sa najlošijom prognozom, dok su DA (gradus II) sa boljom prognozom imali značajno višu ekspresiju njegove mRNA u odnosu na AA (Mann-Whitney,  $p=0.008$ ) te GBM (Mann-Whitney,  $p<0.001$ ). Genska analiza *GSK3 $\beta$*  pokazala je CNA promjene u 11% DA, 10% AA te 21% GBM. Iako su naši rezultati pokazali relativno nizak udio CNA promjena, prethodno istraživanje na kulturi humanih gliomskih stanica pokazalo je da inaktivacija *GSK3 $\beta$*  putem točkastih mutacija i fosforilacije postoji u 67% uzoraka glioma (Zhao i sur., 2015.). Ti rezultati pokazuju da je uloga *GSK3 $\beta$*  u tumorigenezi većim djelom regulirana aktivacijom/inaktivacijom putem mehanizma fosforilacije, a manjim djelom putem CNA. U istom je istraživanju (Zhao i sur., 2015.) dokazano da povišena ekspresija aktivnog oblika *GSK3 $\beta$*  sprječava angiogenezu i tumorski rast što je u skladu s našim rezultatima koji pokazuju sniženu ekspresiju mRNA u GBM (gradus IV) u odnosu na DA ( $p=0.001$ ) i AA ( $p<0.001$ ). Udio CNA promjena gena *EGFR* znatno se razlikovao između 3 patohistološka tipa. DA (gradus II) imali su CNA promjene u samo 8% uzoraka, a AA (gradus III) u 41% uzoraka, dok su GBM (gradus IV) pokazali više od dvostrukog udjela CNA promjena (89%) u odnosu na gradus III. Druga istraživanja u skladu su sa našim rezultatima te ukazuju na visoku učestalost genskih amplifikacija *EGFR* gena u čak 57.4% glioblastoma (An i sur., 2018.). U našem je uzorku amplifikaciju pokazalo 43,6% uzoraka GBM-a, dok je 44,1% uzoraka pokazalo višestruke amplifikacije gena. Literaturni podatci također govore da oko 45% glioblastoma sadrži promjene u obliku amplifikacije gena *EGFR* što je u skladu s našim podacima (Xia i sur., 2019.). Naši rezultati pokazali su i velike promjene na epigenetskoj razini te je Mann-Whitney testom dokazana značajno snižena metilacija gena *EGFR* u GBM u odnosu na DA i AA ( $p<0.001$ ). Također je dokazana povišena ekspresija mRNA u GBM u odnosu na DA (Mann-Whitney,  $p<0.001$ ), a proteinska ekspresija pozitivno je korelirala s mRNA ekspresijom u sva tri gradusa (Spearman,  $p<0.001$ ). Tumor supresor *PTEN* u našem je istraživanju pokazao promjene u 8% DA, 50% AA te 89% GBM. Iako literaturni podatci govore da oko 36% (Xia i sur., 2019.), odnosno 34,3% (An i sur., 2018.) uzoraka GBM pokazuje homozigotne delecije (gubitak oba alela), u rezultatima naše analize samo 10% uzoraka pokazalo homozigotne delecije, dok je hemizigotne delecije (gubitak jednog alela) doživjelo čak 79% uzoraka GBM. U skladu s našim rezultatima su rezultati imunohistokemijske analize istraživanja na GBM koji su pokazali statistički značajno nižu ekspresiju *PTEN*-a ( $p<0.05$ ) u tumorskom tkivu u odnosu na okolno zdravo tkivo mozga (Li i sur., 2018.). Iako je naša epigenetička analiza pokazala sniženu metilaciju gena *PTEN* u GBM mozga u odnosu na niže graduse, CNA promjene su snažno pozitivno korelirale s mRNA ekspresijom (Spearman,  $p<0.001$ ) u skupini GBM te su uzorci s homozigotnim delecijama pokazali najniže vrijednosti mRNA ekspresije. Gen za adapterski protein *PIK3AP1* zadobio je CNA promjene u 8% DA, 49% AA te čak 89% uzoraka GBM mozga. Iako je uloga ovog proteina u gliomima mozga još nedovoljno istražena novije istraživanje na staničnoj kulturi makrofaga i limfocita B pokazuje hiperfosforilaciju proteina *PIK3AP1* čime je omogućena aktivacija *PI3K-AKT* signalizacije (Lauenstein i sur., 2019.). Naši su rezultati potvrdili značajno višu ekspresiju mRNA u GBM (gradus IV) u odnosu na DA (Mann-Whitney,  $p<0.001$ ) i AA (Mann-Whitney,  $p=0.013$ ) što upućuje na važnu ulogu ovog proteina u prijenosu signala preko *PI3K* te pojačanu proliferaciju u GBM. Naši rezultati pokazuju da AA (gradus III) imaju značajno sniženu metilaciju u odnosu na DA (gradus II) (Mann-Whitney,  $p<0,001$ ), a pretpostavka je da snižena metilacija u GBM također uzrokuje pojačanu ekspresiju iako podatci o metilaciji *PIK3AP1* u GBM nisu bili dostupni. *In silico* analiza sudionika signalnog puta *EGFR-PI3K-AKT-mTOR* pokazuje važnu ulogu navedene signalizacije u tumorigenezi

difuznih glioma mozga. Naši su rezultati doprinjeli molekularnim saznanjima o razlikama između pojedinih patohistoloških tipova i gradusa unutar grupe difuznih glioma mozga. Detaljnije razumijevanje molekularne signalizacije te različitosti između pojedinih tipova ovih tumora sigurno će poslužiti za daljnje usmjerenje naših *in vivo* istraživanja gliomske genomike i proteomike. Nepovoljna prognoza biološki najagresivnijih tumora ove skupine usprkos multimodalnom liječenju poticaj je za daljnja istraživanja na cijeloj skupini difuznih glioma kako bismo poboljšali karakterizaciju i klasifikaciju tumora, unaprijedili trenutno dostupne metode liječenja te omogućili bolju prognozu ove teške bolesti.

## 6 ZAKLJUČCI

1. *AKT1, AKT2, AKT3, CHUK, GSK3 $\beta$ , EGFR, PTEN* i *PIK3AP1* na genskoj, transkripcijskoj, epigenetičkoj i proteinskoj razini pokazali su razlike između 3 patohistološka tipa i gradusa difuznih glioma mozga. Rezultati sugeriraju da se geni *AKT3, CHUK, GSK3 $\beta$*  i *PTEN* ponašaju poput tumor supresora, a geni *AKT1, AKT2, EGFR* i *PIK3AP1* poput onkogeni te su u višim gradusima uključeni u pojačanu aktivaciju signalnog puta EGFR-PI3K-AKT-mTOR.

2. *In silico* analiza pokazuje da su geni *PIK3AP1* te *CHUK* izrazito bitni i povezani s AKT signalizacijom u difuznim gliomima mozga s visokim postotkom promjena na svim razinama od gena do proteina.

3. Onkogen *AKT1* je pokazao značajno (Mann-Whitney,  $p < 0.001$ ) smanjenu metilaciju u GBM (gradus IV) u odnosu na niže graduse II i III uz značajno povišenu ekspresiju njegove mRNA u gradus IV u odnosu na gradus II (Mann-Whitney,  $p = 0.002$ ) i III (Mann-Whitney,  $p < 0.001$ ). Ovi rezultati upućuju na važnu onkogeni ulogu gena *AKT1* u kojeg je smanjena metilacija značajno povezana s gradusom IV omogućila pojačanu ekspresiju mRNA.

4. Amplifikacije gena *AKT2* u 33% uzoraka GBM uz značajno smanjenje metilacije u gradus IV u odnosu na AA (gradus III) (Mann-Whitney,  $p = 0.047$ ) te DA (gradus II) (Mann-Whitney,  $p = 0.018$ ) rezultiralo je značajnim povišenjem ekspresije mRNA u GBM (gradus IV) u odnosu na DA (gradus II) (Mann-Whitney,  $p = 0.030$ ) i AA (gradus III) (Mann-Whitney,  $p = 0.018$ ). Proteinska ekspresija je značajno pozitivno korelirala s pojačanom ekspresijom mRNA (Spearman,  $p = 0.031$ ) kao rezultat čestih amplifikacija i smanjenja metilacije. To upućuje na pojačanu aktivnost onkogeni *AKT2* u gradusu IV i njegovom povezanošću s biološkom agresivnošću difuznih glioma.

5. *AKT3* je pokazao značajno nižu ekspresiju mRNA u gradusu IV u odnosu na graduse II i III (Mann-Whitney,  $p < 0.001$ ). Značajno povišena metilacija u GBM u odnosu na niže graduse (Mann-Whitney,  $p < 0.001$ ) objašnjava sniženje transkripcije gena *AKT3* i upućuje na njegovo djelovanje kao tumor supresora.

6. Rezultati o visokom postotku hemizigotnih delecija (74% uzoraka) gena *CHUK* i povišenoj metilaciji, koja je značajno viša u GBM u odnosu na DA i AA (Mann-Whitney,  $p < 0.001$ ), objašnjavaju smanjenje ekspresije mRNA gena *CHUK* u GBM (gradus IV) u odnosu na niže graduse (Mann-Whitney,  $p < 0.001$ ) te značajno nižu ekspresiju mRNA u AA u odnosu na DA (Mann-Whitney,  $p = 0.008$ ). Rezultati sugeriraju da delecije i povišena metilacija ovog tumor supresora imaju ulogu u progresiji.

7. Gen *GSK3 $\beta$*  je pretrpio hemizigotne delecije u 9% uzoraka i amplifikacije također u 9% uzoraka. Unatoč značajno nižoj genskoj metilaciji u GBM (gradus IV) u odnosu na DA i AA (Mann-Whitney,  $p < 0.001$ ) analiza je pokazala pad ekspresije mRNA u GBM (gradus IV) u odnosu na DA (Mann-Whitney,  $p = 0.001$ ) i AA (Mann-Whitney,  $p < 0.001$ ). Na temelju ovih rezultata zaključujemo da ekspresija mRNA ovog tumor supresora gena nije kontrolirana promjenom u broju kopija gena, niti genskom metilacijom.

8. Amplifikacija i višestruka amplifikacija *EGFR* u 37% i 36% uzoraka, kao i značajno snižena metilacija ovog onkogenog u GBM (gradus IV) u odnosu na graduse II i III (Mann-Whitney,  $p < 0.001$ ), praćeno je povećanjem ekspresije mRNA u GBM u odnosu na niže graduse (Mann-Whitney,  $p < 0.001$ ) i povećanjem ekspresije mRNA u AA u odnosu na DA (Mann-Whitney,  $p < 0.02$ ) pozitivno korelira s proteinskom ekspresijom u sva tri gradusa difuznih glioma (Spearman,  $p < 0.001$ ). Ovo navodi na zaključak o važnoj ulozi *EGFR* u aktivaciji signalnog puta PI3K-AKT-mTOR i progresiji difuznih glioma.

9. Iako je tumor supresor *PTEN* pokazao značajno povišenu metilaciju u DA (gradus II) i AA (gradus III) u odnosu na GBM (gradus IV) (Mann-Whitney,  $p < 0.001$ ) pad ekspresije mRNA gena *PTEN* može se objasniti velikim brojem hemizigotnih delecija u 67% ukupnih uzoraka, odnosno 89% uzoraka GBM u kojima su niske linearne vrijednosti CNA (delecije) snažno korelirale s niskom mRNA ekspresijom (Spearman,  $p < 0.001$ ).

10. Onkogen *PIK3API* pokazuje značajno višu ekspresiju mRNA u GBM (gradus IV) u odnosu na DA (Mann-Whitney,  $p < 0.001$ ) i AA (Mann-Whitney,  $p = 0.013$ ). Metilacija gena pokazala se značajno nižom u AA (gradus III) u odnosu na DA (gradus II) (Mann-Whitney,  $p < 0.001$ ) što omogućuje povišenu ekspresiju mRNA. Iako podaci o metilaciji u GBM (gradus IV) nisu bili dostupni moguće je da unatoč velikom broju hemizigotnih delecija gubitak metilacije omogućuje visoku razinu mRNA ekspresije.

11. Na temelju korelacije CNA promjena, mRNA ekspresije te metilacije svih ispitivanih gena možemo zaključiti da u višim gradusima difuznih glioma CNA gena utječu na ekspresiju mRNA, dok u nižim gradusima važniju ulogu ima genska metilacija.

## 7 ZAHVALE

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Nives Pećina-Šlaus na velikoj podršci i stručnom vodstvu tijekom izrade ovog rada. Hvala na savjetima, strpljenju i pruženom znanju koje me potaknulo na razvoj kritičkog rasuđivanja i kreativnosti te stjecanje dodatnog znanja i istraživačkih vještina.*

*Veliko hvala dragim asistenticama Anji Bukovac i dr. sc. Anji Kafki s Hrvatskog instituta za istraživanje mozga koje su me pratile tijekom izrade ovog rada, uvijek mi bile neizmjerena podrška i pomoć.*

*Posebnu zahvalnost dugujem svojoj obitelji bez čije ljubavi, razumijevanja i stalne potpore ni jedan moj uspjeh ne bi bio moguć.*

*I na kraju, najveća hvala svim mojim prijateljima koji su vjerovali u mene te iskrenošću i konstruktivnim savjetima učinili ovaj rad još boljim.*

## 8 POPIS LITERATURE

1. An, Z., Aksoy, O., Zheng, T., Fan, Q. W., i Weiss, W. A. (2018). Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies. *Oncogene*, 37(12), 1561–1575. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0045-7>
2. Balasuriya, N., McKenna, M., Liu, X., Li, S., i O'Donoghue, P. (2018). Phosphorylation-Dependent Inhibition of Akt1. *Genes*, 9(9), 450. <https://doi.org/10.3390/genes9090450>
3. Barthel, F. P., Johnson, K. C., Varn, F. S., Moskalik, A. D., Tanner, G., Kocakavuk, E., Anderson, K. J., Abiola, O., Aldape, K., Alfaro, K. D., Alpar, D., Amin, S. B., Ashley, D. M., Bandopadhyay, P., Barnholtz-Sloan, J. S., Beroukhim, R., Bock, C., Brastianos, P. K., Brat, D. J., Brodbelt, A. R., ... GLASS Consortium (2019). Longitudinal molecular trajectories of diffuse glioma in adults. *Nature*, 576(7785), 112–120. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1775-1>

4. Bhandari, V., Hoey, C., Liu, L. Y., Lalonde, E., Ray, J., Livingstone, J., Lesurf, R., Shiah, Y. J., Vujcic, T., Huang, X., Espiritu, S., Heisler, L. E., Yousif, F., Huang, V., Yamaguchi, T. N., Yao, C. Q., Sabelnykova, V. Y., Fraser, M., Chua, M., van der Kwast, T., ... Bristow, R. G. (2019). Molecular landmarks of tumor hypoxia across cancer types. *Nature genetics*, 51(2), 308–318. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0318-2>
5. Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Jacobsen, A., Byrne, C. J., Heuer, M. L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A. P., Sander, C., i Schultz, N. (2012). The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer discovery*, 2(5), 401–404. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>
6. Chen, G., Park, D., Magis, A. T., Behera, M., Ramalingam, S. S., Owonikoko, T. K., Sica, G. L., Ye, K., Zhang, C., Chen, Z., Curran, W. J., i Deng, X. (2019). Mcl-1 Interacts with Akt to Promote Lung Cancer Progression. *Cancer research*, 79(24), 6126–6138. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0950>
7. Chen, R., Smith-Cohn, M., Cohen, A. L., i Colman, H. (2017). Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. *Neurotherapeutics*, 14(2), 284–297. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0519-x>
8. Comb, W. C., Hutti, J. E., Cogswell, P., Cantley, L. C., i Baldwin, A. S. (2012). p85 $\alpha$  SH2 domain phosphorylation by IKK promotes feedback inhibition of PI3K and Akt in response to cellular starvation. *Molecular cell*, 45(6), 719–730. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.01.010>
9. Coronas-Serna, J. M., Valenti, M., Del Val, E., Fernández-Acero, T., Rodríguez-Escudero, I., Mingo, J., Luna, S., Torices, L., Pulido, R., Molina, M., i Cid, V. J. (2020). Modeling human disease in yeast: recreating the PI3K-PTEN-Akt signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *International microbiology*, 23(1), 75–87. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00082-4>
10. Dan, H. C., Antonia, R. J., i Baldwin, A. S. (2016). PI3K/Akt promotes feedforward mTORC2 activation through IKK $\alpha$ . *Oncotarget*, 7(16), 21064–21075. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8383>
11. Ellrott, K., Bailey, M. H., Saksena, G., Covington, K. R., Kandath, C., Stewart, C., Hess, J., Ma, S., Chiotti, K. E., McLellan, M., Sofia, H. J., Hutter, C., Getz, G., Wheeler, D., Ding, L., MC3 Working Group, i Cancer Genome Atlas Research Network (2018). Scalable Open Science Approach for Mutation Calling of Tumor Exomes Using Multiple Genomic Pipelines. *Cell systems*, 6(3), 271–281.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.03.002>
12. Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., Cerami, E., Sander, C., i Schultz, N. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling*, 6(269), p11. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>
13. Gao, Q., Liang, W. W., Foltz, S. M., Mutharasu, G., Jayasinghe, R. G., Cao, S., Liao, W. W., Reynolds, S. M., Wyczalkowski, M. A., Yao, L., Yu, L., Sun, S. Q., Fusion Analysis Working Group, Cancer Genome Atlas Research Network, Chen, K., Lazar, A. J., Fields, R. C., Wendl, M. C., Van Tine, B. A., Vij, R., ... Ding, L. (2018). Driver Fusions and Their Implications in the Development and Treatment of Human Cancers. *Cell reports*, 23(1), 227–238.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.050>
14. Guo, H., German, P., Bai, S., Barnes, S., Guo, W., Qi, X., Lou, H., Liang, J., Jonasch, E., Mills, G. B., i Ding, Z. (2015). The PI3K/AKT Pathway and Renal Cell Carcinoma. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*, 42(7), 343–353. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2015.03.003>

15. Gürsel, D. B., Banu, M. A., Berry, N., Marongiu, R., Burkhardt, J. K., Kobylarz, K., Kaplitt, M. G., Rafii, S., i Boockvar, J. A. (2015). Tight regulation between cell survival and programmed cell death in GBM stem-like cells by EGFR/GSK3 $\beta$ /PP2A signaling. *Journal of neuro-oncology*, 121(1), 19–29. <https://doi.org/10.1007/s11060-014-1602-3>
16. Haddadi, N., Lin, Y., Travis, G., Simpson, A. M., Nassif, N. T., i McGowan, E. M. (2018). PTEN/PTENP1: 'Regulating the regulator of RTK-dependent PI3K/Akt signalling', new targets for cancer therapy. *Molecular cancer*, 17(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0803-3>
17. Hoadley, K. A., Yau, C., Hinoue, T., Wolf, D. M., Lazar, A. J., Drill, E., Shen, R., Taylor, A. M., Cherniack, A. D., Thorsson, V., Akbani, R., Bowlby, R., Wong, C. K., Wiznerowicz, M., Sanchez-Vega, F., Robertson, A. G., Schneider, B. G., Lawrence, M. S., Noushmehr, H., Malta, T. M., ... Laird, P. W. (2018). Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer. *Cell*, 173(2), 291–304.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.022>
18. Joy, A., Kapoor, M., Georges, J., Butler, L., Chang, Y., Li, C., Crouch, A., Smirnov, I., Nakada, M., Hepler, J., Marty, M., i Feuerstein, B. G. (2016). The role of AKT isoforms in glioblastoma: AKT3 delays tumor progression. *Journal of neuro-oncology*, 130(1), 43–52. <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2220-z>
19. Lauenstein, J. U., Udgata, A., Bartram, A., De Sutter, D., Fisher, D. I., Halabi, S., Eyckerman, S., i Gay, N. J. (2019). Phosphorylation of the multifunctional signal transducer B-cell adaptor protein (BCAP) promotes recruitment of multiple SH2/SH3 proteins including GRB2. *The Journal of biological chemistry*, 294(52), 19852–19861. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009931>
20. Leonetti, A., Sharma, S., Minari, R., Perego, P., Giovannetti, E., i Tiseo, M. (2019). Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *British journal of cancer*, 121(9), 725–737. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0573-8>
21. Li, B., i Dewey, C. N. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics*, 12, 323. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>
22. Li, X., Wu, C., Chen, N., Gu, H., Yen, A., Cao, L., Wang, E., i Wang, L. (2016). PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget*, 7(22), 33440–33450. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7961>
23. Li, Y., Ji, F., Jiang, Y., Zhao, T., i Xu, C. (2018). Correlation analysis of expressions of PTEN and p53 with the value obtained by magnetic resonance spectroscopy and apparent diffusion coefficient in the tumor and the tumor-adjacent area in magnetic resonance imaging for glioblastoma. *J BUON*, 23(2), 391–397.
24. Liu, J., Lichtenberg, T., Hoadley, K. A., Poisson, L. M., Lazar, A. J., Cherniack, A. D., Kovatich, A. J., Benz, C. C., Levine, D. A., Lee, A. V., Omberg, L., Wolf, D. M., Shriver, C. D., Thorsson, V., Cancer Genome Atlas Research Network, i Hu, H. (2018). An Integrated TCGA Pan-Cancer Clinical Data Resource to Drive High-Quality Survival Outcome Analytics. *Cell*, 173(2), 400–416.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.052>
25. Louis, D.N., von Deimling, A., Cavenee, W.K. (2016). Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours - Introduction. U: WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System (IARC WHO Classification of Tumours), 4th Edition Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K. (Urednici), The International Agency for Research on Cancer (IACR). Lyon. str. 15-17.



26. Lovšin, E., Kovač, J., Tesovnik, T., Toplak, N., Perko, D., Rozmarič, T., Debeljak, M., i Avčín, T. (2020). *PIK3AP1* and *SPON2* Genes Are Differentially Methylated in Patients With Periodic Fever, Aphthous Stomatitis, Pharyngitis, and Adenitis (PFAPA) Syndrome. *Frontiers in immunology*, *11*, 1322. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01322>
27. Luo, L., Lucas, R. M., Liu, L., i Stow, J. L. (2019). Signalling, sorting and scaffolding adaptors for Toll-like receptors. *Journal of cell science*, *133*(5), jcs239194. <https://doi.org/10.1242/jcs.239194>
28. Majewska, E., i Szeliga, M. (2017). AKT/GSK3 $\beta$  Signaling in Glioblastoma. *Neurochemical research*, *42*(3), 918–924. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2044-4>
29. Marquard, F. E., i Jücker, M. (2020). PI3K/AKT/mTOR signaling as a molecular target in head and neck cancer. *Biochemical pharmacology*, *172*, 113729. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113729>
30. Mermel, C. H., Schumacher, S. E., Hill, B., Meyerson, M. L., Beroukhi, R., i Getz, G. (2011). GISTIC2.0 facilitates sensitive and confident localization of the targets of focal somatic copy-number alteration in human cancers. *Genome biology*, *12*(4), R41. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-4-r41>
31. Minna, E., Romeo, P., Dugo, M., De Cecco, L., Todoerti, K., Pilotti, S., Perrone, F., Seregini, E., Agnelli, L., Neri, A., Greco, A., i Borrello, M. G. (2016). miR-451a is underexpressed and targets AKT/mTOR pathway in papillary thyroid carcinoma. *Oncotarget*, *7*(11), 12731–12747.
32. Paul-Samojedny, M., Suchanek, R., Borkowska, P., Pudelko, A., Owczarek, A., Kowalczyk, M., Machnik, G., Fila-Daniłow, A., i Kowalski, J. (2014). Knockdown of AKT3 (PKB $\gamma$ ) and PI3KCA suppresses cell viability and proliferation and induces the apoptosis of glioblastoma multiforme T98G cells. *BioMed research international*, *2014*, 768181. <https://doi.org/10.1155/2014/768181>
33. Poore, G. D., Kopylova, E., Zhu, Q., Carpenter, C., Fraccio, S., Wandro, S., Kosciolk, T., Janssen, S., Metcalf, J., Song, S. J., Kanbar, J., Miller-Montgomery, S., Heaton, R., McKay, R., Patel, S. P., Swafford, A. D., i Knight, R. (2020). Microbiome analyses of blood and tissues suggest cancer diagnostic approach. *Nature*, *579*(7800), 567–574. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2095-1>
34. Qin, L., Li, X., Lin, Z., Li, H., Mo, Y., Su, F., Mo, W., i Yang, Z. (2017). EBV-LMP1 regulating AKT/mTOR signaling pathway and WWOX in nasopharyngeal carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology*, *10*(8), 8619–8625.
35. Revathidevi, S., i Munirajan, A. K. (2019). Akt in cancer: Mediator and more. *Seminars in cancer biology*, *59*, 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.06.002>
36. Rutkowska, A., Stoczyńska-Fidelus, E., Janik, K., Włodarczyk, A., i Rieske, P. (2019). EGFRvIII: An Oncogene with Ambiguous Role. *Journal of oncology*, *2019*, 1092587. <https://doi.org/10.1155/2019/1092587>
37. Saadeh, F. S., Mahfouz, R., i Assi, H. I. (2018). EGFR as a clinical marker in glioblastomas and other gliomas. *The International journal of biological markers*, *33*(1), 22–32. <https://doi.org/10.5301/ijbm.5000301>
38. Sanchez-Vega, F., Mina, M., Armenia, J., Chatila, W. K., Luna, A., La, K. C., Dimitriadoy, S., Liu, D. L., Kantheti, H. S., Saghafeinia, S., Chakravarty, D., Dai, F., Gao, Q., Bailey, M. H., Liang, W. W., Foltz, S. M., Shmulevich, I., Ding, L., Heins, Z., Ochoa, A., ... Schultz, N. (2018). Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell*, *173*(2), 321–337.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.035>
39. Song, M., Liu, X., Liu, K., Zhao, R., Huang, H., Shi, Y., Zhang, M., Zhou, S., Xie, H., Chen, H., Li, Y., Zheng, Y., Wu, Q., Liu, F., Li, E., Bode, A. M., Dong, Z., i Lee, M. H. (2018). Targeting AKT with Oridonin Inhibits

- Growth of Esophageal Squamous Cell Carcinoma In Vitro and Patient-Derived Xenografts In Vivo. *Molecular cancer therapeutics*, 17(7), 1540–1553. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0823>
40. Taylor, A. M., Shih, J., Ha, G., Gao, G. F., Zhang, X., Berger, A. C., Schumacher, S. E., Wang, C., Hu, H., Liu, J., Lazar, A. J., Cancer Genome Atlas Research Network, Cherniack, A. D., Beroukhi, R., i Meyerson, M. (2018). Genomic and Functional Approaches to Understanding Cancer Aneuploidy. *Cancer cell*, 33(4), 676–689.e3. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.007>
  41. Viswanathan, A., Musa, A., Murugesan, A., Vale, J. R., Afonso, C., Konda Mani, S., Yli-Harja, O., Candeias, N. R., i Kandhavelu, M. (2019). Battling Glioblastoma: A Novel Tyrosine Kinase Inhibitor with Multi-Dimensional Anti-Tumor Effect (Running Title: Cancer Cells Death Signalling Activation). *Cells*, 8(12), 1624. <https://doi.org/10.3390/cells8121624>
  42. Wang, H., Chen, Z., Wang, S., Gao, X., Qian, M., Qiu, W., Zhang, Z., Zhang, S., Qi, Y., Sun, X., Xue, H., Guo, X., Zhao, R., i Li, G. (2020). TGFβ1-induced beta-site APP-cleaving enzyme 2 upregulation promotes tumorigenesis through the NF-κB signalling pathway in human gliomas. *Molecular oncology*, 14(2), 407–425. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12623>
  43. Wang, L., Zhao, J., Li, Y., Wang, Z., i Kang, S. (2019). Genome-wide analysis of DNA methylation in endometriosis using Illumina Human Methylation 450 K BeadChips. *Molecular reproduction and development*, 86(5), 491–501. <https://doi.org/10.1002/mrd.23127>
  44. Wesseling, P., i Capper, D. (2018). WHO 2016 Classification of gliomas. *Neuropathology and applied neurobiology*, 44(2), 139–150. <https://doi.org/10.1111/nan.12432>
  45. Xia, X., Li, X., Li, F., Wu, X., Zhang, M., Zhou, H., Huang, N., Yang, X., Xiao, F., Liu, D., Yang, L., i Zhang, N. (2019). A novel tumor suppressor protein encoded by circular AKT3 RNA inhibits glioblastoma tumorigenicity by competing with active phosphoinositide-dependent Kinase-1. *Molecular cancer*, 18(1), 131. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1056-5>
  46. Xiao, D., Jia, J., Shi, Y., Fu, C., Chen, L., Jiang, Y., Zhou, L., Liu, S., i Tao, Y. (2015). Opposed expression of IKKα: loss in keratinizing carcinomas and gain in non-keratinizing carcinomas. *Oncotarget*, 6(28), 25499–25505. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4548>
  47. Xing, Y., Lin, N. U., Maurer, M. A., Chen, H., Mahvash, A., Sahin, A., Akcakanat, A., Li, Y., Abramson, V., Litton, J., Chavez-MacGregor, M., Valero, V., Piha-Paul, S. A., Hong, D., Do, K. A., Tarco, E., Riall, D., Eterovic, A. K., Wulf, G. M., Cantley, L. C., ... Meric-Bernstam, F. (2019). Phase II trial of AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced breast cancer who have tumors with PIK3CA or AKT mutations, and/or PTEN loss/PTEN mutation. *Breast cancer research : BCR*, 21(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1154-8>
  48. Xu, F., Na, L., Li, Y., i Chen, L. (2020). Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. *Cell i bioscience*, 10, 54. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00416-0>
  49. Yang, Q., Jiang, W., i Hou, P. (2019). Emerging role of PI3K/AKT in tumor-related epigenetic regulation. *Seminars in cancer biology*, 59, 112–124. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.04.001>
  50. Zhao, P., Li, Q., Shi, Z., Li, C., Wang, L., Liu, X., Jiang, C., Qian, X., You, Y., Liu, N., Liu, L. Z., Ding, L., i Jiang, B. H. (2015). GSK-3β regulates tumor growth and angiogenesis in human glioma cells. *Oncotarget*, 6(31), 31901–31915. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5043>

## 9 SAŽETAK

Petar Brlek

### ***In silico* analiza genskih, transkripcijskih, epigenetičkih i proteinskih promjena sudionika signalnog puta EGFR-PI3K-AKT-mTOR u difuznim gliomima mozga**

Difuzni gliomi heterogena su skupina tumora s agresivnim biološkim ponašanjem. Unatoč novim molekularnim saznanjima razlike između patohistoloških tipova su nedovoljno istražene. U ovoj *in silico* analizi istraživali smo uloge 8 gena sudionika signalizacije EGFR-PI3K-AKT-mTOR u gliomima mozga.

Analiza *AKT1*, *AKT2*, *AKT3*, *CHUK*, *GSK3 $\beta$* , *EGFR*, *PTEN* i *PIK3API* je napravljena korištenjem podataka javno dostupne baze cBioPortal za tumorsku genomiku i transkriptomiku. Genske, transkripcijske, epigenetičke te proteinske promjene obrađene su na 751 uzorku (62 difuzna i 129 anaplastična astrocitoma te 560 glioblastoma).

Rezultati su pokazali promjene u broju kopija (CNA od engl. Copy number aberation) gena *PTEN* (76%), *PIK3API* i *CHUK* (75% svaki), *EGFR* (74%), *AKT2* (39%), *AKT1* (32%), *AKT3* (19%) te *GSK3 $\beta$*  (18%). Učestalost promjena razlikovala se između gradusa. Najveći broj imali su glioblastomi u kojima su *EGFR*, *PIK3API* i *PTEN* bili promijenjeni u 89%, *CHUK* u 88%, a *AKT2* u 43%. Kruskal-Wallis test je pokazao značajnu razliku u metilaciji i ekspresiji mRNA ispitivanih gena između pojedinih gradusa. Korelacija rezultata sugerira da se geni *AKT1*, *AKT2*, *EGFR* i *PIK3API* ponašaju poput onkogeni, a geni *AKT3*, *CHUK*, *GSK3 $\beta$*  i *PTEN* tumor supresora.

Rezultati doprinose saznanjima o molekularnim razlikama između patohistoloških tipova glioma te mogu poslužiti za bolju klasifikaciju i poboljšanje metoda liječenja.

Ključne riječi: difuzni gliom, AKT, EGFR, PI3K, cBioPortal

## 10 SUMMARY

Petar Brlek

### ***In silico* analysis of genetic, transcription, epigenetic and protein changes of EGFR-PI3K-AKT-mTOR signaling pathway participants in diffuse gliomas of the brain**

Diffuse gliomas are a heterogeneous group of tumors with aggressive biological behavior. Despite new molecular findings, the differences between pathohistological types need to be better explained. In this *in silico* analysis, we investigated participants of EGFR-PI3K-AKT-mTOR signaling in brain gliomas.

The analysis of *AKT1*, *AKT2*, *AKT3*, *CHUK*, *GSK3 $\beta$* , *EGFR*, *PTEN*, and *PIK3API* was performed using data from the publicly available cbBioPortal database. 751 samples (62 diffuse astrocytoma, 129 anaplastic astrocytoma, and 560 glioblastomas) revealed changes at genetic, transcriptome, epigenome, and protein levels. The results showed copy number aberrations (CNA) of *PTEN* (76%), *PIK3API* and *CHUK* (75% each), *EGFR* (74%), *AKT2* (39%), *AKT1* (32%), *AKT3* (19%) and *GSK3 $\beta$*  (18%). The highest number of CNA had glioblastomas with alterations in *EGFR*, *PIK3API*, and *PTEN* in 89%, *CHUK* in 88%, and *AKT2* in 43%. The Kruskal-Wallis test showed a significant difference in the methylation and expression of the mRNA of the tested genes between individual grades. The correlation of the results suggests that *AKT1*, *AKT2*, *EGFR*, and *PIK3API* behave like oncogenes, while *AKT3*, *CHUK*, *GSK3 $\beta$* , and *PTEN* tumor suppressors.

The results contribute to the knowledge of molecular differences between pathohistological types of gliomas and may serve for better classification and treatment methods improvement.

Key words: diffuse glioma, AKT, EGFR, PI3K, cBioPortal

## 11 ŽIVOTOPIS

Petar Brlek rođen je 6. travnja 1995. u Varaždinu, a svoje djetinjstvo provodi u Petrijancu gdje završava svoje osnovnoškolsko obrazovanje nakon čega upisuje Prvu gimnaziju Varaždin. Tijekom svog obrazovanja pokazao je interes za prirodoslovne predmete te već u 4. razredu osnovne škole osvaja 3. mjesto na državnom natjecanju tog karaktera. Ukupno se natjecao na 26 županijskih i 12 državnih i međunarodnih natjecanja na kojima je osvojio 11 prvih, 2 druga i 6 trećih mjesta. U svrhu promicanja i popularizacije znanosti, na kreativan i zanimljiv način, sudjelovao je u Školskom laboratoriju slave kao i u Centru izvrsnosti iz biologije, kemije i fizike Varaždinske županije. Uz velik broj općinskih i županijskih nagrada i priznanja, Ministarstvo znanosti, obrazovanja i sporta dodjeljuje mu nagradu „Oskar znanja“ za izvrsne rezultate i osvojeno 1. mjesto na državnom natjecanju iz biologije u školskoj godini 2011./2012. Nakon državne mature na kojoj se istaknuo riješivši ispit iz biologije kao najbolji u generaciji, upisuje Medicinski fakultet u Zagrebu. Uskoro postaje demonstrator na katedrama za Medicinsku biologiju te Medicinsku kemiju i biokemiju, a 2016. se priključuje u znanstveni rad Laboratorija za neuroonkologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga. Uključenjem u projekt „WNT4EMT“ sudjelovao je na 8 domaćih i međunarodnih skupova. Autor je i koautor na ukupno 12 kongresnih priopćenja. Prepoznavši njegov dugogodišnji rad, 2018. godine Općina Petrijanec dodjeljuje mu nagradu za izvrsnost te postignute rezultate u učenju i obrazovanju. Na studentskom kongresu neuroznanosti s međunarodnim sudjelovanjem 2019. godine osvaja nagradu za najbolju poster prezentaciju.