

# NOTCH2 u meningeomima različitih gradusa: analiza metilacijskog statusa promotora gena i ekspresije proteina

---

**Blažević, Božana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:925913>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-12**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Božana Blažević

**NOTCH2 u meningeomima različitih  
gradusa: analiza metilacijskog statusa  
promotora gena i ekspresije proteina**

Diplomski rad

Zagreb, 2023.



Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za neuroonkologiju na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof.dr.sc. Dubravke Hranilović te komentorstvom dr.sc. Anje Bukovac. Eksperimentalni postupci, analiza preparata i troškovi izrade ovog diplomskog rada financirani su sredstvima Znanstvenog centra izvrsnosti za temeljnu, kliničku i translacijsku neuroznanost (ZCI - Neuro) iz projekta "Experimental and clinical research of hypoxic-ischemic damage in perinatal and adult brain"; GA KK01.1.1.01.0007. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

## Zahvale

*Zahvaljujem svojoj komentorici dr.sc. Anji Bukovac na uloženom trudu, vremenu, strpljenju i nesebičnosti, kao i na svakom korisnom savjetu i riječima ohrabrenja i pohvale.*

*Zahvaljujem se i prof. dr. sc. Nives Pećini-Šlaus na prilici da ovaj diplomski rad izradim u Laboratoriju za neuroonkologiju te prof.dr.sc. Dubravki Hranilović na uloženom vremenu i korisnim savjetima.*

*Posebne zahvale dugujem svojoj obitelji na podršci i ljubavi. Posebna zahvala mojim roditeljima koji su mi omogućili da danas budem ono što jesam i ovdje gdje jesam i osigurali da slijedim svoje snove i ispunim ciljeve.*

*Zahvala mojim prijateljicama koje su uljepšale ovo, ne uvijek lako studentsko doba, i iz kolegica prerasle u bliske prijateljice s kojima dijelim nezaboravne uspomene iz studentskih dana.*

*Zahvaljujem svojim najboljim prijateljicama, koje me prate od osnovnoškolskih i srednjoškolskih dana i koje su uvijek tu za mene.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

NOTCH2 u meningeomima različitih gradusa: analiza metilacijskog statusa  
promotora gena i ekspresije proteina

Božana Blažević

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Meningeomi su najčešći primarni tumori središnjeg živčanog sustava klasificirani u tri histološka gradusa; benigni, atipični i anaplastični. Većinom su benignog karaktera, dok manji dio pripada višim gradusima s lošijom kliničkom slikom, povećanom stopom recidiva i smrtnosti. Signalni put Notch je neophodan u embriogenezi, ali dokazana je njegova uloga i u tumorigenezi. Protein NOTCH2 ovisno o vrsti tumora i tkiva može biti onkogen ili tumor supresor, a njegova uloga u tumorigenezi meningeoma još nije istražena. Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti metilaciju promotora gena i ekspresiju proteina NOTCH2 u različitim gradusima intrakranijalnih meningeoma. U ovom istraživanju, metilacija promotora gena *NOTCH2* bila je značajno povezana s atipičnim oblikom meningeoma. Metilacijski status gena *NOTCH2* nije utjecao na razinu ekspresije proteina. Analiza ekspresije proteina NOTCH2 pokazala je umjerenu do jaku ekspresiju na razini citoplazme i stanične membrane u većini uzoraka meningeoma te u kori velikog mozga zdrave osobe. Međutim, ekspresija na razini jezgre je detektirana samo u tumorskom tkivu te je pozitivno korelirala s intenzitetom ekspresije u citoplazmi. Rezultati ovog istraživanja upućuju na aktivnost signalnog puta Notch i uključenost proteina NOTCH2 u tumorigenezi meningeoma.

Ključne riječi: intrakranijalni meningeomi, signalni put Notch, metilacijski obrazac promotora gena *NOTCH2*, ekspresija proteina NOTCH2

(45 stranica, 13 slika, 4 tablice, 47 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Dubravka Hranilović, prof.dr.sc.  
Komentor: Anja Bukovac, dr.sc.

Ocjenitelji:

Prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

Izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

Prof. dr. sc. Biljana Balen

Rad prihvaćen: (navesti datum sjednice Povjerenstva za diplomske radove na kojoj je rad prihvaćen)

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

NOTCH2 in different meningioma grades: protein  
expression and gene promoter methylation status analysis

Božana Blažević  
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Meningiomas are the most common primary tumors of the central nervous system classified into three different histological grades; benign, atypical, and anaplastic. They are usually benign, while smaller part belongs to higher grades with worse clinical outcomes, higher recurrence, and mortality rates. The Notch signaling pathway is crucial for embryogenesis and its part in carcinogenesis has also been proven. Depending on tissue and tumor type, protein NOTCH2 can act as an oncogene or tumor suppressor, but its role in meningioma tumorigenesis still remains unknown. The aim of this master thesis was to examine gene promoter methylation and NOTCH2 protein expression in different grades of intracranial meningioma. In this study, gene promoter methylation was significantly correlated with atypical meningioma and didn't affect protein expression. Immunohistochemical analysis showed moderate to strong cytoplasmatic and cell membrane protein expression in all meningioma samples, including the cerebral cortex of a healthy person. However, expression in the nucleus was only detected in tumor tissue and it positively correlated with the intensity of cytoplasmatic expression. The results of this study indicate the activity of the Notch signalling pathway and involvement of NOTCH2 in meningioma tumorigenesis.

Keywords: intracranial meningioma, Notch signaling pathway, NOTCH2 gene promoter methylation pattern, NOTCH2 protein expression

(45 pages, 13 figures, 4 tables, 47 references, original in: Croatian)  
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. Dubravka Hranilović, PhD

Co-mentor: Anja Bukovac, PhD

Reviewers:

Prof. Dubravka Hranilović, PhD

Assoc. Prof. Maja Matulić, PhD

Prof. Biljana Balen, PhD

Thesis accepted:

SADRŽAJ

1.	UVOD	
1.1	Meningeomi.....	1
1.1.1.	Etiologija, dijagnostika i liječenje meningeoma.....	2
1.1.2.	Patohistološka klasifikacija meningeoma.....	3
1.1.3.	Molekularna klasifikacija meningeoma.....	4
1.2.	Signalni put Notch.....	6
1.2.1.	Signalni put Notch i karcinogeneza.....	10
1.2.2.	NOTCH2 i karcinogeneza.....	12
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	14
3.	MATERIJALI I METODE.....	15
3.1.	Uzorci tumorskog tkiva.....	15
3.2.	Izolacija iz tumorskog tkiva fenolom i kloroformom.....	15
3.3.	Mjerenje koncentracije i čistoće tumorske DNA.....	16
3.4.	Bisulfitna konverzija tumorske DNA.....	17
3.5.	Određivanje metilacijskog statusa promotorskog mjesta gena <i>NOTCH2</i> metodom lančane reakcije polimerazom ovisne o metilaciji.....	18
3.6.	Elektroforeza u agaroznom gelu.....	20
3.7.	Imunohistokemijska analiza proteina NOTCH2 u tumorsokom tkivu.....	20
3.8.	Semikvantifikacija rezultata imunohistokemijske analize.....	22
3.9.	Statistička analiza podataka.....	22
4.	REZULTATI.....	24
4.1.	Analiza demografskih i patrohistoloških podataka.....	24
4.2.	Rezultati analize metilacijskog statusa promotora gena <i>NOTCH2</i> u uzorcima intrakranijalnih meningeoma.....	25
4.3.	Rezultati imunohistokemijske analize ekspresije i lokalizacije proteina NOTCH2 u uzorcima intrakranijalnih meningeoma.....	27
5.	RASPRAVA.....	32
6.	ZAKLJUČAK.....	37
7.	LITERATURA.....	38
8.	ŽIVOTOPIS.....	43

## KRATICE

ADAM, engl. *A Disintegrin and Metalloprotease*, metaloproteaza ADAM

$\alpha$ -IFN, engl. Alpha interferon, alfa interferon

AKT1, engl. *AKT serine/threonine kinase 1*

CDK8, engl. *Cyclin dependent kinase 8*, CDK8

COX2, engl. *Cyclooxygenase 2*, ciklooksigenaza 2

CSL, engl. *CBF1/suppressor of hairless/Lag*

DAB, engl. 3,3'-Diaminobenzidine, 3,3'-diaminobenzidin tetraklorid

DLL 1,3,4, engl. *Delta-like 1,3,4*

DSL, engl. *Delta/Serrate/Lag-2*

EGF, engl. *Epidermal growth factor*, epidermalni faktor rasta

Hes, engl. *Hairy and Enhancer of split*

Hes6, engl. *Hes Family BHLH Transcription Factor 6*

HIF-1, engl. *Hypoxia-inducible factor 1*

HOX, engl. *Homeobox*

HPF, engl. *High power field*, vidno polje velikog povećanja

IRS, engl. *Immunoreactivity Score*, indeks obojenja

JAGG 1,2, engl. *Jagged 1,2*

KLF4, engl. *Kruppel-like factor 4*,

LNR, engl. *Cysteine-rich Lin12/Notch repeats*

MAML1, engl. *Mastermind like transcriptional coactivator 1*

MC, engl. *Methylation class*, metilacijska klasa

mRNA, engl. *Messenger RNA*, glasnička RNA

miRNA, engl. microRNA, mikroRNA

MS-PCR, engl. *Methylation-specific PCR*, lančana reakcija polimerazom ovisna o metilaciji

NICD, engl. *Notch intracellular domain*, unutarstanična domena receptora Notch



NF2, engl. *Neurofibromin 2*, neurofibromin 2

NLS, engl. *Nuclear localization signal*, jezgrin lokalizacijski signal

Notch, engl. *Neurogenic locus notch homolog protein*

NOTCH2, engl. *Neurogenic locus notch homolog protein 2*

NRR, engl. *Negative regulatory region*, negativna regulatorna regija

PBS, engl. *Phosphate buffer solution*, otopina fosfatnog pufera

PEST, engl. *Proline (P), glutamate (E), serine (S), and threonine (T)*

RAM, engl. *RBP-J<sub>k</sub>-associated module*

SMO, engl. *Smoothened*

SNAI1,2, engl. *Snail family transcriptional repressor 1*

SŽS, engl. *Central Nervous System*, središnji živčani sustav

SZO, engl. *World Health Organisation*, Svjetska zdravstvena organizacija

TAD, engl. *Transactivation domain*, transaktivacijska domena

TAE, engl. *Tris-acetate-EDTA*

TE-pufer, engl. *Tris-EDTA buffer*

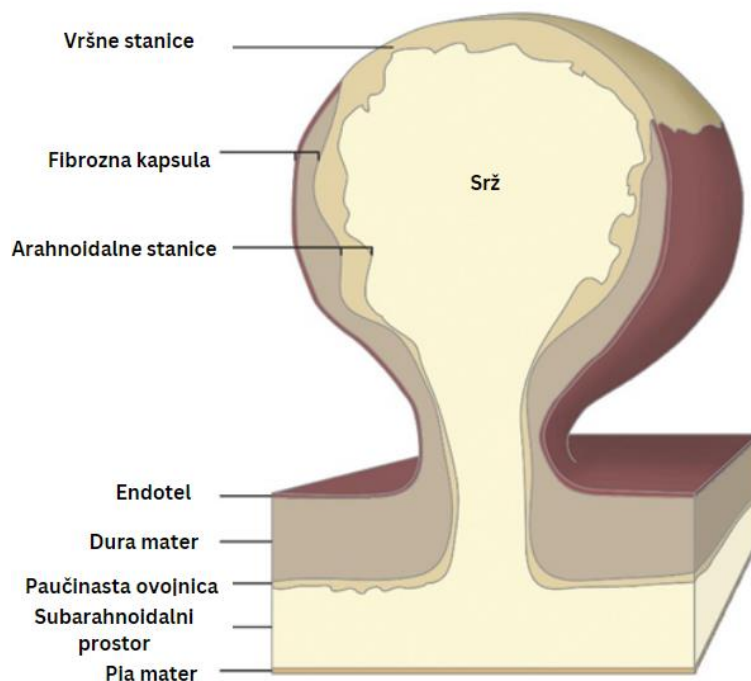
TRAF7, engl. *TNF receptor associated factor 7*

VEGF, engl. *Vascular endothelial growth factor*, vaskularni endotelni faktor rasta

# 1. UVOD

## 1.1. Meningeomi

Meningeomi su najčešći primarni tumori središnjeg živčanog sustava (SŽS, engl. *Central nervous system*, CNS). Prema službenoj klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO, engl. *World Health Organisation*, WHO), ovi tumori čine jednu trećinu intrakranijalnih tumora (Louis i sur. 2016a; Pawloski i sur. 2021). Postoje različite teorije o njihovom porijeklu, a najzastupljenija teorija tvrdi kako se ove neoplazije formiraju iz arahnoidalnih (meningotelijalnih) stanica koje tvore vršni dio arahnoidalnih resica (Slika 1). Resice su sastavni dio paučinaste ovojnice čija je uloga reapsorpcija cerebrospinalne tekućine (Ogasawara i sur. 2021). Sukladno funkciji same ovojnice, arahnoidalne stanice su povezane čvrstim međustaničnim vezama i sadrže brojne dezmosome, a arahnoidalne resice prolaze kroz sloj dure mater i otvaraju se u venskom sinus mozga (Patel i Kirmi 2009). Ovi tumori su u 90% slučajeva smješteni intrakranijalno, a preostalih 10% razvija se na području leđne moždine (Louis i sur. 2016a). Iako su u većini slučajeva benigni, određeni postotak meningeoma može diferencirati u više graduse koji se povezuju s lošijom kliničkom slikom i stopom preživljenja (Maggio i sur. 2021).



Slika 1. Shematski prikaz moždanih ovojnica i građe arahnoidalne resice. Preuzeto i prilagođeno prema Patel i Kirmi (2009).

Godišnja incidencija meningeoma iznosi 8/100 000 i proporcionalna je životnoj dobi, pri čemu je srednja životna dob osobe s postavljenom dijagnozom 66 godina (Ogasawara i sur. 2021, Birzu i sur. 2020). Pojavnost kod djece i adolescenata je vrlo rijetka i iznosi 0,14/100 000. (Buerki i sur. 2018).

#### 1.1.1. Etiologija, dijagnostika i liječenje meningeoma

Iako se u većini slučajeva meningeomi pojavljuju sporadično, prepoznati su rizični faktori za njihov razvoj. Ionizirajuće zračenje zasad je jedini rizični faktor izravno povezan s nastankom meningeoma i takvi tumori su često agresivnije prirode s većom stopom pojave recidiva. Osim zračenja, u rizične faktore ubrajaju se i povećani indeks tjelesne mase, pušenje te ženski spolni hormoni koji su odgovorni za povećanu pojavnost meningeoma u ženskoj populaciji (Maggio i sur. 2021). Uključenost ženskih spolnih hormona u razvoj meningeoma podupire činjenica da 88% meningeoma eksprimira progesteronske receptore, a rast tumorskog tkiva zabilježen je i tijekom trudnoće i luteinske faze menstrualnog ciklusa (Delgado-López i sur. 2020). Uz navedene okolišne faktore, za nastanak meningeoma mogu biti odgovorni i nasljedni sindromi. Jedan od najučestalijih je neurofibromatoza tipa 2, sindrom nastao kao posljedica mutacije gena *NF2*, koji za posljedicu ima razvoj multiplih meningeoma kod mlađih osoba (Ogasawara i sur. 2021).

Glavna dijagnostička metoda za detekciju meningeoma je magnetska rezonanca, no oboljeli često ne pokazuju simptome te se nerijetko dijagnoza postavlja nasumično tijekom medicinskih snimanja (Fathi i Roelcke 2013, Alruwaili i DeJesus 2022). Također, u 2-3% slučajeva meningeomi budu uočeni tek nakon autopsije (Ogasawara i sur. 2021). Simptomi mogu izostati, ali ako dođe do njihove pojave, oni variraju te su ovisni o lokaciji samog tumora. Najčešće su glavobolje uslijed povišenog intrakranijalnog tlaka, neurološki problemi, vrtoglavica, vidne smetnje, a pacijenti mogu iskusiti napadaje kao i promjene u ponašanju i osobnosti te zbunjenost (Buerki i sur. 2018, Maggio i sur. 2021, Ogasawara i sur. 2021).

Postoji nekoliko pristupa u liječenju oboljelih, te se za odabir adekvatne terapije u obzir uzimaju lokacija, gradus i veličina tumora, zahvaćenost okolnog moždanog tkiva te opće stanje pacijenta. Ako je riječ o benignom tumoru i asimptomatskoj bolesti te osoba nije u životnoj opasnosti, pacijenta se upućuje na redovno praćenje rasta tumora. Kod brzorastućih meningeoma koji uzrokuju simptome, kao i kod agresivnih

meningeoma s recidivima, najčešća metoda liječenja koja se primjenjuje je djelomično ili potpuno kirurško uklanjanje popraćeno radioterapijom. U slučajevima kada operacija nije moguća ili je lokacija tumora takva da on ne može biti kirurški uklonjen, kao primarni oblik liječenja koristi se radioterapija. Kemoterapija se primjenjuje prilikom progresije bolesti, kada kirurško uklanjanje nije moguće, a radioterapija nije učinkovita. Korišteni kemoterapeutici su alfa-interferon ( $\alpha$ -IFN), agonisti somatostatinskih receptora i inhibitori vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. *Vascular endothelial growth factor*, VEGF) (Buerki i sur. 2018).

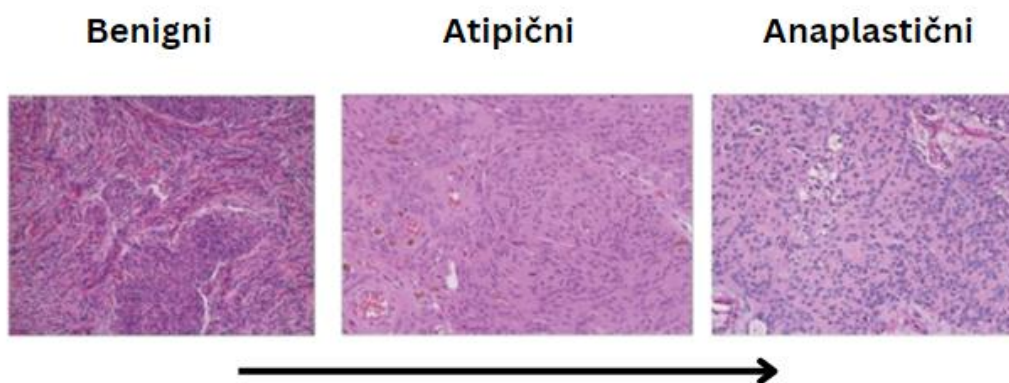
#### 1.1.2. Patohistološka klasifikacija meningeoma

Svjetska zdravstvena organizacija klasificira meningeome u 15 različitih podtipova i tri histološka gradusa: gradus I (benigni), gradus II (atipični) i gradus III (anaplastični) (Slika 2). Ovakva podjela temelji se na različitim patohistološkim karakteristikama, stopi mitotske aktivnosti, sposobnosti invazije i morfologiji tumorskih stanica, kao i pojavnosti spontane nekroze tumorskog tkiva (Fathi i Roelcke 2013, Birzu i sur. 2020, Lee i Lee 2020).

Benigni meningeomi ili meningeomi gradusa I su najučestaliji i čine 80% dijagnosticiranih meningeoma (Birzu i sur. 2020). Ova skupina je patohistološki vrlo heterogena i u nju se ubraja 9 histoloških podtipova; meningotelijalni, fibrozni, psamomatozni, tranzicijski, sekretorni, angiomatozni, metaplastični, mikrocistički i meningeomi bogati limfoplazmacitima pri čemu su najzastupljeniji meningotelijalni i fibrozni podtip (Fathi i Roelcke 2013, Buerki i sur. 2018, Maggio i sur. 2021). Karakteristika tumora ove skupine je spori rast, nemogućnost invazije u ostala moždana tkiva i stopa recidiva manja od 10% (Lee i Lee 2020, Maggio i sur. 2021).

Skupinu atipičnih meningeoma ili meningeoma gradusa II čine tri histološka podtipa; horoidni, meningeomi svijetlih stanica i atipični meningeomi, a njihova zastupljenost u populaciji iznosi oko 18% (Birzu i sur. 2020). Za razliku od benignih, stopa recidiva kod atipičnih meningeoma je veća i iznosi oko 50% (Lee i Lee 2020). Uz povećanu stopu recidiva, ove tumore karakteriziraju spontana nekroza tkiva, istaknuta jezgra, male stanice s visokim omjerom jezgra/citoplazma, povećana mitotska aktivnost, 4-19 mitozu u 10 vidnih polja velikog povećanja (engl. *High power field*, HPF), proliferacija kao i sposobnost invazije u okolna moždana tkiva (Maggio i sur. 2021).

Najagresivniji meningeomi spadaju u skupinu anaplastičnih meningeoma ili meningeoma gradusa III i zabilježeni su u manje od 2% slučajeva (Birzu i sur. 2020). Meningeomi gradusa III obuhvaćaju tri podtipa; rabdoidni, anaplastični i papilarni koji izgledom često podsjećaju na melanome i sarkome viših gradusa (Maggio i sur. 2021). Anaplastični meningeomi pokazuju visoku celularnost, povećan broj mikronekrotičkih žarišta, a mitotički indeks iznosi preko 20 mitozu u 10 vidnih polja velikog povećanja. Karakteristike poput izrazite sposobnosti metastaziranja i visoke stope pojave recidiva koja prelazi 80% uvelike smanjuju stopu preživljenja pacijenata (Yuzawa 2016, Buerki i sur. 2018). Najučestalija mjesta metastaziranja meningeoma ove skupine su pluća i pleura, no metastaze se mogu nalaziti i na kostima, jetri, limfnim čvorovima i bubrezima (Ogasawara i sur. 2021).



Slika 2. Histološki prikaz različitih gradusa meningeoma. Preuzeto i prilagođeno prema Barkhoudarian i sur. (2016).

### 1.1.3. Molekularna klasifikacija meningeoma

U posljednjem desetljeću sve je veći naglasak stavljen na istraživanje molekularnih karakteristika i potencijalnih biomarkera specifičnih za različite graduse meningeoma. Za razliku od patohistološke klasifikacije, klasifikacija na molekularnoj razini omogućava bolju predikciju tijeka bolesti, ali i razvoj ciljanih terapija. Izrada molekularnih profila meningeoma uključuje istraživanje genetičkih i epigenetskih promjena kao i aberantne signalizacije.

Još 1970-ih godina gubitak kromosoma 22 detektiran je kao genetička alternacija karakteristična za meningeome, a dvadesetak godina kasnije pronađena je

i mutacija gena *NF2* smještenog na ovom kromosomu. Mutacija gena *NF2*, inaktivacija alela ili delecija kromosoma 22 zabilježena je u 60% dijagnosticiranih meningeoma i dovodi do sinteze nefunkcionalnog citoskeletnog proteina merlina. Posljedično tome stanice gube kontaktnu inhibiciju, a zbog uključenosti ovog proteina u različite signalne puteve dolazi do deregulacije stanične proliferacije i povećane mobilnosti stanica (Bi i sur 2016). Izuzev mutacije gena *NF2*, razvojem nove generacije sekvenciranja (engl. *Next generation sequencing*, NGS) počelo se rasvijetljavati pitanje uključenosti mutacija drugih gena u inicijaciju tumorigeneze meningeoma. Neki od najčešće mutiranih gena u meningeomima su: proapoptotska E3 ubikvitinska ligaza *TRAF7* (engl. *TNF receptor-associated factor 7*, TRAF7), transkripcijski faktor za održavanje pluripotencije *KLF4* (engl. *Kruppel-like factor 4*, KLF4), protoonkogen *AKT1* (engl. *AKT serine/threonine kinase 1*, AKT1) te protein signalnog puta Hedgehog *SMO* (engl. *smoothed*, SMO). U meningeomima s nemutiranim genom *NF2*, najučestalija je mutacija gena *TRAF7* na kromosomu 16 i pojavljuje se u 12-25% meningeoma (Bi i sur. 2016, Lee i Lee 2020).

Promijenjena ekspresija pojedinih gena primarno je posljedica genetičkih alternacija i jedan je od glavnih pokretača kancerogeneze. Ipak, treba naglasiti i ulogu epigenetskih promjena koje, bez mijenjanja same sekvence DNA, utječu na regulaciju transkripcije i ekspresijske profile stanica. Epigenetske promjene uključuju metilaciju molekule DNA, modifikacije histona, remodeliranje kromatina i interakcije malih nekodirajućih molekula RNA, pri čemu je u kontekstu tumora najviše istraživana metilacija. Hipermetilacija je najučestalija epigenetska modifikacija pronađena u tumorima, a ovisno o genu kojeg zahvaća i njegovoj funkciji, može imati različite učinke na tumorigenezu (Kulis i Esteller 2010). Pokazano je kako je u 77% meningeoma barem jedan gen metilirani, dok je u 25% metilirano tri ili više gena (Kulis i Esteller 2010, Bi i sur. 2016). Jedan od primjera je hipermetilacija gena *HOX* (engl. *homebox*, HOX) koja potiče utišavanje i smanjenu ekspresiju različitih tumor supresora. Molekularna klasifikacija bazirana na izradi metilacijskih profila DNA omogućava precizniju dijagnostiku kao i bolju predikciju progresije meningeoma i pojave recidiva. Sahm i sur. (2017) su izradili metilacijski profil meningeoma na temelju 497 uzoraka svrstavajući ih u dvije glavne epigenetske grupe (grupa A i grupa B) i šest podgrupa, odnosno metilacijskih klasa (engl. *Methylation class*, MC). Analizirani su obrasci metilacije, broj kopija i mutacije gena čija je aktivnost prepoznata u meningeomima.

Na temelju dobivenih rezultata, identificirano je 6 metilacijskih klasa s različitim histološkim obilježjima, citogenetičkim promjenama i mutacijama, a svaka pojedina podgrupa sadrži i podatke o lokaciji tumora te stopi ukupnog preživljenja pacijenata. Prema takvoj klasifikaciji tri metilacijske podgrupe (MC ben-1, MC ben-2, MC ben-3) ubrajaju se u benigne, dvije (MC int-A, MC-int-B) u umjerene, a jedna (MC-mal) u maligne meningeome. U svaku podgrupu uključeni su pojedini patohistološki gradusi. U podgrupi MC ben-1, MC ben-2, MC ben-3 prevladavaju menigeomi gradusa I, podgrupa MC-mal obuhvaća meningeome gradusa III, dok su meningeomi gradusa II raspoređeni unutar svih metilacijskih klasa.

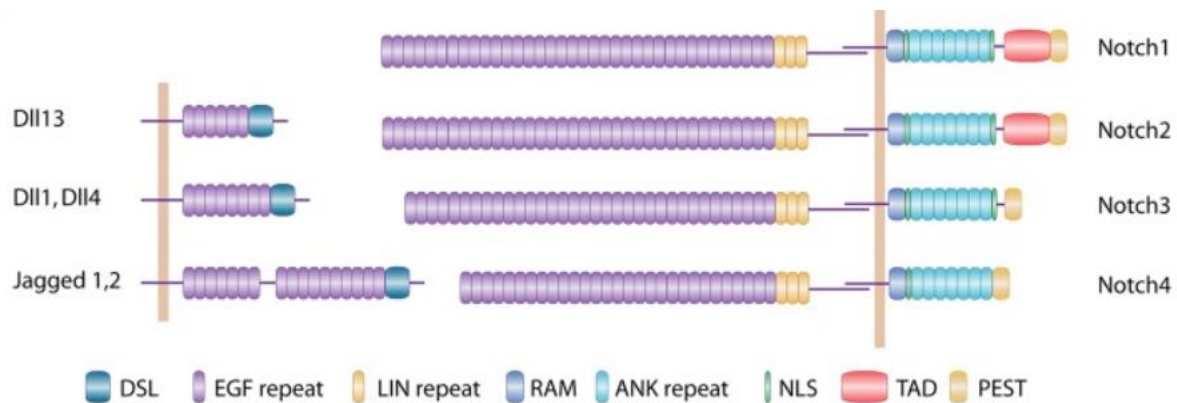
Uz metilaciju, promjene u epigenetskim mehanizmima poput remodeliranja kromatina, regulacije na razini miRNA i modifikacije histona također su zabilježene u meningeomima, te su predmet aktivnog istraživanja (Lee i Lee 2020).

## 1.2. Signalni put Notch

Signalni put Notch je evolucijski konzerviran i njegova aktivnost je neophodna za normalan razvoj višestaničnih organizama. Tijekom embriogeneze ovaj signalni put posreduje u međustaničnoj komunikaciji, proliferaciji, diferencijaciji, morfogenezi i preživljenju stanica. Postnatalno njegova se uloga očituje u održavanju homeostaze tkiva, a promjene u njegovoj aktivaciji i regulaciji povezuju se s različitim patološkim stanjima i razvojem tumora (Aggarwal i sur. 2021, Allen i Maillard 2021).

U signalizaciju puta Notch uključeno je pet različitih liganada, Delta-like 1,3,4 (DLL 1,3,4) ili Jagged 1,2 (JAG 1,2) koji se vežu na jedan od četiri receptora Notch (Slika 3). Svi receptori su transmembranski heterodimerni proteini i sastoje se od izvanstanične, transmembranske i unutarstanične domene. Izvanstanična domena sadrži 29-36 ponavljanja motiva EGF (engl. *Epidermal growth factor*, EGF) iza kojeg slijedi takozvana negativna regulatorna regija (engl. *Negative regulatory region*, NRR). NRR, odgovorna za zaustavljanje signalizacije u odsustvu vezanog liganda, sastoji se od ponavljajućeg motiva LNR (engl. *Cysteine-rich Lin12/Notch repeats*) i heterodimerizacijske domene (engl. *Heterodimerization domain*, HD). Motiv EGF na svojoj površini može imati vezane O ili N-glikane. N-glikozilacija započinje u endoplazmatskom retikulumu i N-glikani se dodatno modificiraju u Golgijevom aparatu, dok se proces O-glikozilacije odvija tijekom sinteze u Golgijevom aparatu. Unutarstanični dio receptora sastoji se od domene RAM (engl. *RBP-J<sub>k</sub>-associated*

module, RAM), šest ponavljajućih motiva ankirina, 2 jezgrina lokalizacijska signala (engl. *Nuclear localization signal*, NLS), transaktivacijske domene (engl. *Transactivation domain*, TAD) i proteinske sekvence bogate prolinom, glutaminskom kiselinom, serinom i treoninom (engl. *proline (P), glutamate (E), serine (S), and threonine (T)*, PEST) (Lobry i sur. 2014). Ekspresija receptora Notch na staničnoj membrani ovisna je o lokalizaciji i vrsti stanica i tkiva. Receptori Notch 1 i 2 eksprimirani su u različitim tipovima stanica, Notch 3 primarno nalazimo u novonastajućim T stanicama, glatkim mišićima i pericitima, dok je prisutnost receptora Notch 4 karakteristična za endotel (Allen i Maillard 2021). Ligandi signalnog puta Notch također su transmembranski proteini i sastoje se od domene DSL (engl. *Delta/Serrate/Lag-2*, DSL) na N-terminalnom kraju i ponavljajućeg slijeda EGF (Lobry i sur.2014).



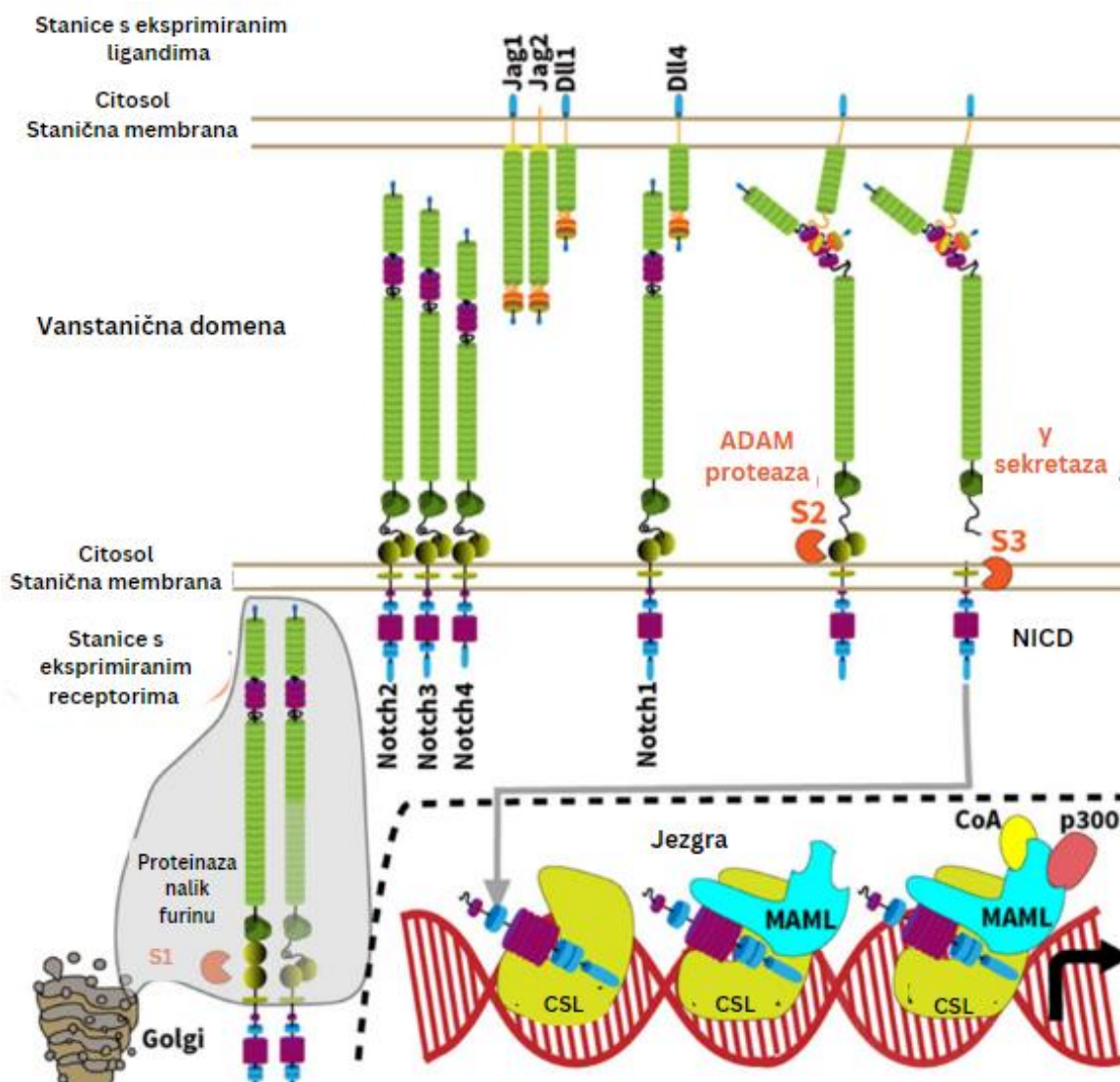
Slika 3. Ligandi (lijevo) i receptori (desno) signalnog puta Notch. Ligandi signalnog puta Notch sastoje se od domene DSL (engl. *Delta/Serrate/Lag-2*, DSL) na N-terminalnom kraju i ponavljajućeg slijeda EGF (engl. *Epidermal growth factor*, EGF). Svi receptori sastoje se od izvanstanične, transmembranske i unutarstanične domene. Izvanstanična domena sadrži 29-36 ponavljanja motiva EGF, ponavljajući motiv LIN (engl. *cysteine-rich Lin12/Notch repeats*, LIN) i heterodimerizacijsku domenu. Unutarstanični dio receptora sastoji se od domene RAM (engl. *RBP-J $\kappa$ -associated module*, RAM), šest ponavljajućih motiva ankrina (engl. *ANK repeat*), 2 jezgrina lokalizacijska signala (NLS), transaktivacijske domene (TAD) i sekvence bogate prolinom, glutaminskom kiselinom, serinom i treoninom (PEST). Preuzeto iz Lobry i sur. (2014).

Kako su receptori i ligandi signalnog puta Notch transmembranski proteini, uvjet za početak signalizacije je kontakt između dviju susjednih stanica. Prvi korak u aktivaciji signalnog puta Notch je proteolitičko cijepanje receptora. Prije vezanja liganda, receptori Notch se na putu transporta prema staničnoj membrani u Golgijevom aparatu furinskom proteazom (engl. *Furin like protease*) cijepaju na mjestu S1.



Proteolizom nastaje nekovalentno vezani heterodimer sa mjestom cijepanja S2 unutar NRR. Djelovanjem mehaničke sile nastale vezanjem liganda i receptora, dolazi do konformacijskih promjena u NRR te mjesto S2 postaje dostupno za cijepanje metaloproteazama ADAM (engl. *A Disintegrin and Metalloprotease*, ADAM). Uslijed aktivacije metaloproteaza ADAM10 i ADAM17 oslobađa se mjesto cijepanja S3 koje prepoznaje enzim  $\gamma$  sekretaza. Unutarstanična domena receptora Notch (engl. *Notch intracellular domain*, NICD) se oslobađa i iz citoplazme translocira u jezgru gdje se povezuje s kompleksom CSL (engl. *CBF1/supressor of hairless/Lag*, CSL). Novonastali kompleks veže transkripcijski koaktivator MAML1 (engl. *Mastermind like transcriptional coactivator 1*, MAML1), istovremeno uklanjajući represore transkripcije, što za posljedicu ima ekspresiju različitih ciljnih gena poput gena iz obitelji Hes/Hey (engl. *Hairy and Enhancer of split*, Hes), NF-Kb, p21, ciklin D, c-Myc, Nanog i dr. (Slika 4). Usprkos svojoj jednostavnosti, signalni put Notch ima pleiotropne učinke, pri čemu se u različitim vrstama stanica aktiviraju različiti specifični geni i kofaktori (Allen i Maillard 2021).

Ono što razlikuje signalni put Notch od većine ostalih signalnih puteva je nepostojanje signalnih kaskadnih intermedijera zaslužnih za amplifikaciju samog signala. Posljedično tome, razina transkripcije ciljnih gena određena je koncentracijom NICD u jezgri. Kako su ligandi i receptori signalnog puta transmembranski proteini, podložni su endocitozi, recikliranju i degradaciji. Navedeni procesi reguliraju njihovu koncentraciju i lokalizaciju u staničnoj membrani koja je neophodna za aktivaciju signalnog puta i time utječu na razinu NICD u jezgri. Uz koncentraciju i vrstu samih receptora i liganda, afinitet vezanja receptora i liganda i konačna transkripcija ciljnih gena ovise i o glikozilaciji EGF-a u izvanstaničnoj domeni, te o građi same stanične membrane pri čemu membranski lipidi mogu utjecati na vezanje liganda i receptora. Uz navedeno, jačina signalizacije ovisna je i o degradaciji unutarstanične domene. Nakon translokacije NICD u jezgru i povezivanja s kompleksom CSL, kinaza CDK8 (engl. *Cyclin dependent kinase 8*, CDK8) fosforilira NICD što dovodi do ubikvitinacije domene PEST i degradacije u proteasomu. Na taj način, održavajući razine NICD, postiže se optimalna regulacija jačine signalnog puta Notch. Koncentracija otpuštene NICD utječe i na kinetiku vezanja kompleksa CSL u jezgri, dimerizaciju same NICD, ali i na strukturu kromatina što su ključni koraci u regulaciji transkripcije gena (Shen i sur. 2021).



Slika 4. Shematski prikaz signalnog puta Notch. Nakon procesiranja u Golgijevom aparatu, heterodimerni protein Notch se transportira na staničnu membranu. Uslijed vezanja jednog od pet liganada (DLL1,3,4, JAG1,2) dolazi do konformacijske promjene i cijepanja heterodimernog proteina metaloproteazama ADAM na S2 mjestu. Proteolizom novonastalog heterodimera nastaje S3 mjesto cijepanja koje prepoznaje  $\gamma$  sekretaza i cijepanjem se odvaja unutarstanična domena (NICD). NICD u jezgri veže kompleks CSL i transkripcijski koaktivator MAML, uklanjaju se represori transkripcije te dolazi do prepisivanja ciljnih gena. Preuzeto i prilagođeno prema Allen i Maillard 2021.

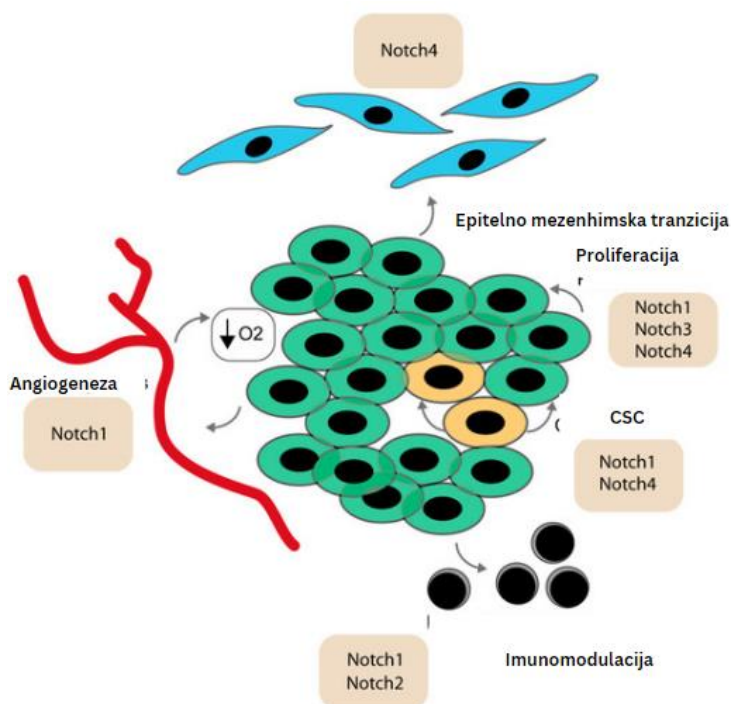
### 1.2.1. Signalni put Notch i karcinogeneza

Poznato je da signalni putevi, iako neophodni za normalan razvoj organizma i održavanje homeostaze, mogu imati i onkogeni potencijal. Razumijevanje stanične signalizacije u kontekstu nastanka i razvoja tumora omogućava razvoj efikasnijih ciljnih terapija. Promijenjena aktivnost signalnog puta Notch, kao i mutacija gena *NOTCH*, zaslužna je za inicijaciju i razvoj različitih tipova karcinoma (Slika 5). Ovisno o vrsti karcinoma i tkiva, interakciji liganda i receptora i genetskim promjenama (mutacije), aktivacija ovog signalnog puta može biti smanjena ili povećana (Meisel i sur. 2020). Tumori u kojima je zabilježena promijenjena regulacija signalnog puta Notch su karcinom dojke, jetre, glave i vrata, glioblastomi, medulloblastomi, akutne limfoblastične leukemije T-stanica, sarkomi i drugi (Takebe i sur. 2014).

Mehanizmi kojima promijenjena signalizacija Notch dovodi do nastanka karcinoma su različiti. Onkogeni potencijal signalnog puta Notch prvi put je zabilježen kod pacijenata oboljelih od akutne limfoblastične leukemije T-stanica i baziran je na kromosomskim aberacijama i mutacijama gena *NOTCH*. Recipročne translokacije kromosoma 7 (pojačivačka regije gena za beta lanac receptora T-stanica ) i 9 (3' sekvenca gena koji kodira NICD) dovode do konstitutivne signalizacije uslijed nemogućnosti razgradnje NICD, a posljedično tome i do razvoja leukemije (Siebel i Leindahl 2017). Nadalje, do nastanka tumora može doći uslijed prekomjerne ekspresije receptora i liganda, ali i promijenjenog afiniteta vezanja istih, što pojačava aktivnost signalnog puta. Primjerice, kod nekih vrsta astrocitoma, zabilježena je povećana ekspresija liganda DLL1 što dovodi do prekomjerne ekspresije onkogenog *Hes6* (engl. *Hes Family BHLH Transcription Factor 6*, *Hes6*) (Meisel i sur. 2020).

Izuzev uloge u inicijaciji nastanka tumora, signalni put Notch održava i tumorski mikrookoliš koji promovira rast i razvoj karcinoma. Notch je direktno uključen u proces angiogeneze tijekom koje se iz već postojećih krvnih žila stvaraju nove kapilare. Poznato je da je razvoj tumorske vaskulature jedan od ključnih procesa za rast tumorskog tkiva. Pod utjecajem VEGF-a na migratornoj vršnoj stanici (engl. *tip cell*) koja je zaslužna za inicijaciju i grananje endotela dolazi do povećane ekspresije liganda DLL-4, dok susjedne stanice ekspimiraju receptore Notch. Susjedne stanice nisu migrirajuće (engl. *stalk cells*), nego tvore stijenku novonastalih kapilara potičući njihovu elongaciju. Aktivacija Notch signalizacije u susjednim stanicama smanjuje ekspresiju receptora VEGF na njihovoj površini, što uzrokuje razvoj nemigrirajućeg

fenotipa i onemogućuje grananje. Suprotno tome, ligand JAG-1 eksprimiran na nemigrirajućim stanicama uzrokuje inhibiciju signalnog puta Notch u vršnim stanicama održavajući njihov migrirajući potencijal. Na taj način ovaj antagonistički odnos dvaju liganada signalnog puta Notch određuje funkciju endotelnih stanica u novonastajućoj vaskulaturi i kontrolira njezin razvoj, a njegova promijenjena regulacija može dovesti do abnormalne angiogeneze u različitim patološkim stanjima. S obzirom da je u tumorskoj vaskulaturi zabilježena visoka ekspresija liganda DLL-4, istraživanja su pokazala da primjena antitijela anti-DLL-4 inhibira rast solidnih tumora miševa (Gridley 2010, Meisel i sur. 2020). Angiogeneza tijekom karcinogeneze može uzrokovati i hipoksične uvjete u tumorskom mikrookolišu. Aktivacijom transkripcijskog faktora HIF-1 (engl. *Hypoxia-inducible factor 1*, HIF-1) tijekom hipoksije dolazi do metaboličkog reprogramiranja, proliferacije, epitelno-mezehnijske tranzicije i invazije tumorskih stanica, kao i rezistencije na kemoterapeutike. U uvjetima smanjene razine kisika dolazi do hiperaktivacije signalnog puta Notch koji smanjuje razinu E-kadherina povećavajući ekspresiju njegovih inhibitora, transkripcijskih faktora SNAI1 i 2 (engl. *Snail family transcriptional repressor 1, 2*). Ovaj događaj promovira epitelno-mezehnijsku tranziciju, a time i invaziju tumorskih stanica i stvaranje metastaza (Meisel i sur. 2020). Također, signalni put Notch sudjeluje u samoobnavljanju tumorskih matičnih stanica (Takebe i sur. 2014). U kontekstu karcinogeneze proučavan je i receptor Notch2 te njegova uloga.



Slika 5. Uloga signalnog puta Notch u karcinogenezi. Pojedini receptori signalnog puta Notch uključeni su u različite procese koji doprinose tumorigenezi, poput epitelno-mezenhimske tranzicije, proliferacije, održavanja sposobnosti samoobnavljanja tumorskih matičnih stanica, imunomodulacije i angiogeneze. Preuzeto i prilagođeno prema Meisel i sur. (2020).

### 1.2.2. NOTCH2 i karcinogeneza

Protein NOTCH2 sastoji se od 2471 aminokiseline i kodiran je 34 eksoma dugačkim genom *NOTCH2* na kromosomu 1. Njegova specifična aktivnost zabilježena je u razvoju jetre, bubrega, jajnika, glatkih mišića i limfocita B. Mutacije koje dovode do prekomjerne ekspresije NOTCH2 uzrokuju pojavu sindroma i različitih patoloških stanja poput Allagileovog sindroma i neuroloških poteškoća. Iako su mehanizmi uključenosti proteina NOTCH2 u karcinogenezu i dalje uvelike neistraženi, poznato je da njegova jaka ekspresija ima ulogu u razvoju različitih tipova karcinoma, kao i u progresiji bolesti (Xiu i Liu 2019).

Tako je, primjerice, aktivni NOTCH2 neophodan za hepatogenezu, ali i za hepatokarcinogenezu. Stanice hepatocelularnog karcinoma pozitivne su na NOTCH2, a njegovo utišavanje uništava sposobnost samoobnavljanja tumorskih stanica i povećava osjetljivost na kemoterapeutik fluorouracil (Lee i Lee 2020).

U zdravim stanicama epitelnog tkiva želuca, NOTCH2 je zaslužan za diferencijaciju stanica i održavanje homeostaze tkiva. Ipak, njegova pojačana

ekspresija dovodi do pojačane proliferacije i dediferencijacije što u konačnici pogoduje nastanku karcinoma. U usporedbi sa zdravim tkivom, u premalignim lezijama zabilježena je pet puta veća ekspresija proteina NOTCH2, što upućuje na njegovu ulogu u početnim koracima razvoja tumora (Demitrack i Samuelson 2017). U stanicama adenokarcinoma želuca uočena je konstitutivna aktivacija NICD što dovodi do povećane ekspresije COX2 (engl. *Cyclooxygenase 2*, COX2). COX2 potiče ekspresiju prostaglandina i time promovira epitelno-mezenhimsku tranziciju (Tseng i sur. 2012). Osim uloge NOTCH2 u nastanku i razvoju karcinoma želuca, zabilježena je i njegova uloga u regulaciji otpornosti tumorskog tkiva na lijekove. Tumorsko tkivo nakon izlaganja kemoterapiji pokazuje povećanu ekspresiju *NOTCH2* na razini mRNA, kao i na proteinskoj razini što ukazuje na centralnu ulogu ovog proteina u regulaciji rezistencije na kemoterapeutike (Tseng i sur. 2012).

Receptor NOTCH2, iako normalno eksprimiran u hipokampusu i cerebelumu, pokazuje onkogeni potencijal u različitim tumorima mozga (Xiu i Liu 2019). Njegova prekomjerna ekspresija zabilježena je u glioblastomima i meduloblastomima. Aktivacija signalnog puta Notch potiče ekspresiju transkripcijskog faktora HES1 što je zabilježeno u svim gradusima meningeoma. Sam mehanizam deregulacije signalizacije Notch u meningeomima još uvijek nije poznat, no povezuje se s genomskom nestabilnošću (Lee i Lee 2020).

Potrebno je naglasiti kako NOTCH2 može imati i ulogu tumor supresora. Primjerice, u 70% tumora pločastih stanica kože zabilježena je mutacija koja dovodi do gubitka funkcije proteina NOTCH2 i time do razvoja tumora, a iste su uočene i u tumorima pločastih stanica pluća, glave i vrata (Wang i sur. 2011). U nekim slučajevima, NOTCH unutar tumora može imati dvojnu ulogu – tumor supresora i onkogen, a ona ovisi o samom stadiju razvoja karcinoma. Iako se spomenuta dvojna uloga čini paradoksalnom, može se reći da je povezana s njegovom ulogom u razvoju. U organima gdje tijekom razvoja NOTCH2 blokira diferencijaciju, u nastanku karcinoma ima ulogu onkogen, dok u tumorigenezi u organima u kojima u razvoju promovira diferencijaciju, NOTCH2 ima ulogu tumor supresora (D'Assoro i sur. 2022). Molekularni mehanizmi koji su uzrok oprečne uloge su vrlo kompleksni i još uvijek nisu dovoljno istraženi. Uloga NOTCH2 kao tumor supresora ili onkogen u meningeomima i dalje nije istražena.

Jedan od načina za ispitivanje ranije spomenute dvojne uloge ovog gena u tumorigenezi je proučavanje epigenetskih modifikacija. Promotor gena *NOTCH2* sastoji se od 600 parova baza i sadrži jedan CpG otok dugačak 332 para baza koji se proteže od 214. do 545. nukleotida promotorske sekvence (Sharma i sur. 2022). U kontekstu regulacije ekspresije gena i transkripcije proučavana je njegova metilacija, pri čemu metilacijska mjesta unutar CpG otoka mogu biti hipermetilirana ili hipometilirana. Primjerice, hipometilacija promotorskog mjesta gena *NOTCH2* zabilježena je u kolorektalnom karcinomu što dovodi do pojačane transkripcije gena i progresije same bolesti (Sharma i sur. 2022). Metilacija CpG otoka promotora gena *NOTCH2* u meningeomima nije ispitana i predmet je istraživanja ovog diplomskog rada.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada je koristeći metodu lančane reakcije polimerazom ovisne o metilaciji istražiti metilacijski status promotora gena *NOTCH2* te imunohistokemijski analizirati ekspresiju proteina NOTCH2 u uzorcima tkiva intrakranijalnih meningeoma različitih gradusa.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Uzorci tumorskog tkiva

Za izradu diplomskog rada koristila sam 46 uzoraka tkiva meningeoma različitih gradusa i njima pripadajućih parafinskih rezova prikupljenih od pacijenata Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Kliničke bolnice Dubrava. Od 46 uzoraka, njih 28 pripadalo je osobama ženskog spola (60,9%), dok je preostalih 18 pripadalo osobama muškog spola (39,1%). Srednja životna dob prilikom postavljanja dijagnoze iznosila je 54,7 godina za žene i 65,5 godina za muškarce. Odabir pacijenata se zasnivao na primjenjenoj terapiji te su u istraživanje ušli samo pacijenti koji prethodno nisu podvrgnuti radioterapiji ili kemoterapiji. Pacijenti uključeni u ovo istraživanje dali su pristanak da se dio njihovog tumorskog tkiva koristi u znanstvene svrhe. U istraživanju je svim pacijentima osigurana anonimnost, te se njihovi osobni podaci ne iznose u rezultatima. Patohistološkom analizom od strane patologa određeni su gradusi prikupljenih uzoraka meningeoma. Prikupljeni uzorak je uključivao sva tri gradusa gdje je najviše uzoraka gradusa I (n=24) i II (n=17), dok je gradus III zastupljen sa n=5, što odgovara i prirodnoj incidenciji ovih tumora u populaciji. Uzorci tumorskog tkiva prije postupka izolacije DNA pohranjeni su pri temperaturi od -80 °C, a pripadajući rezovi za imunohistokemijsku analizu su uklopljeni u parafin od strane bolničkog tehničara. Provedba analiza na prikupljenim uzorcima odobrena je od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Ur. Br.:380-59-10106-22-111/180, Klasa:641-01/22-02/01, Zagreb, 24.11.2022. i Ur. Broj: 380-59-10106-20-111/126, Klasa:641-01/20-02/01, Zagreb, 29.9.2020).

#### 3.2. Izolacija DNA iz tumorskog tkiva fenolom i kloroformom

Uzorke tumorskog tkiva pohranjene pri temperaturi od -80 °C otopila sam i iz njih, prema protokolu Pećina-Šlaus i sur. (2009), metodom fenol/kloroform izolirala genomsku DNA. Za potrebe izolacije dovoljne količine DNA, uzela sam oko 500 mg tkiva, odvojila sam sterilnim škaricama i stavila u sterilnu epruvetu *Eppendorf* volumena 1,5 mL. U epruvetu sam prethodno dodala 1 mL pufera za lizu stanica (10 mM TrisHCl, 0,5% Tween; pH 8,0). Nakon mehaničkog usitnjavanja tkiva u uzorak sam dodala 15 mL proteinaze K (Promega, SAD) koncentracije 20 mg/mL. Zatim sam uzorke inkubirala u vodenoj kupelji pri temperaturi od 37°C u trajanju od minimalno 24

sata. Ako je tkivo nakon inkubacije bilo konzistentno, inkubaciju sam produljila za još 24 sata.

Nakon inkubacije sadržaj svake epruvete razdijelila sam u dvije nove sterilne epruvete *Eppendorf* volumena 1,5 mL. Zbog praktičnosti, za prijenos uzoraka, korištena je pipeta sa sterilnim nastavkom kojem je odrezan vrh. Na uzorke sam potom u digestoru dodala jednak volumen fenola nakon čega su epruvete stavljene na rotacijsku mješalicu Stuart SB2 (Stuart Equipment (part of Cole-Parmer), Vernon Hills, Illinois, SAD) na 10 minuta. Nakon miješanja, uzorke sam centrifugirala na 10 000 rpm pri sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta u uređaju Centrifuge 5415D (Eppendorf, rotor 100 mm). Kao rezultat centrifugiranja, u epruveti su vidljiva tri sloja; gornja vodena faza, srednja proteinska faza i donja fenolna faza. Gornju vodenu fazu s otopljenom genomskom DNA odvojila sam pipetom i prebacila u novu epruvetu *Eppendorf* volumena 1,5 mL. Na volumen otpipetirane vodene faze dodala sam pola volumena kloroforma i pola volumena fenola. Epruvete sam ponovno stavila na rotacijsku mješalicu na 10 minuta i potom centrifugirala 10 minuta na 10 000 rpm i sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja, ponovno sam gornju vodenu fazu pažljivo prebacila u novu sterilnu epruvetu *Eppendorf* i dodala jednaki volumen kloroforma. Ponovila sam proces miješanja sadržaja epruvete 10 minuta na rotacijskoj mješalici te centrifugiranja pri 10 000 rpm u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Ovaj put su dobivene dvije faze, gornja vodena i donja organska nakon čega sam vodenu fazu iznova pažljivo otpipetirala i prebacila u čistu epruvetu *Eppendorf* volumena 1,5 mL. Na dobiveni volumen vodene faze dodala sam 2,5 volumena hladnog apsolutnog etanola pri čemu se, nakon okretanja epruvete i vorteksiranja, pojavio precipitat genomske DNA u obliku paučinastog bijelog klupka. Epruvete s DNA pohranila sam pri temperaturi od -20 °C.

Sljedeći dan sadržaj epruvete centrifugirala sam 20 minuta pri 14 000 rpm pri temperaturi od 4°C u uređaju Centrifuge 5415D (rotor 100 mm, Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Nakon centrifugiranja u epruveti su bili vidljivi bijeli talog DNA i supernatant. Supernatant sam otpipetirala, a epruvete s preostalim talogom stavila sam u termomikser (Thermomixer compact, Eppendorf) kako bi etanol potpuno ispario procesom sušenja pri temperaturi od 37°C tijekom 15 minuta. Nakon sušenja u epruvete sam dodala 50 µL TE pufera (10 mM TRIS; 1 mM EDTA, pH 7,6) i pohranila ih pri temperaturi od 4°C.

### 3.3. Mjerenje koncentracije i čistoće tumorske DNA

Nakon izolacije, koncentraciju i čistoću DNA provjerila sam na spektrofotometru (*ND 1000*, NanoDrop, Wilmington, DE, SAD) mjereći apsorbanciju pri valnim duljinama 230, 260 i 280 nm. Pri valnoj duljini od 230 nm mjeri se apsorpcijski minimum nukleinskih kiselina i apsorpcijski maksimum peptidnih veza, fenola, ugljikohidrata i EDTA. Maksimum apsorpcije nukleinskih kiselina je pri 260 nm, dok je maksimalna apsorpcija aromatskih aminokiselina, proteina, peptida i fenola pri 280 nm. Čistoća izolirane DNA provjerava se određivanjem omjera  $A_{260}/A_{280}$  i  $A_{260}/A_{230}$ . Očekivana vrijednost omjera  $A_{260}/A_{280}$  iznosi između 1,8 i 2. Vrijednosti iznad tih upućuju na prisutnost RNA, dok niže vrijednosti ukazuju na kontaminaciju fenolima, peptidima ili proteinima. Ukoliko je DNA čista, vrijednosti omjera  $A_{260}/A_{230}$  su između 2 i 2,2, a manje vrijednosti su znak prisutnosti ugljikohidrata, peptida, fenola ili EDTA. Zadovoljavajuća čistoća DNA preduvjet je za provedbu osjetljivijih metoda, poput MS PCR-a (engl. *Methylation-specific PCR*, MS PCR) (Pećina- Šlaus i sur. 2009).

### 3.4. Bisulfitna konverzija tumorske DNA

Kako bih istražila metilaciju promotora gena *NOTCH2*, najprije sam izoliranu tumorsku DNA bisulfitno konvertirala koristeći komercijalni paket *The MethyEdge™ Bisulfite Conversion System* (Promega, Madison, SAD). U reakciju sam ušla s 800 ng tumorske DNA otopljene u 20  $\mu$ L TE pufera. U epruvetu Eppendorf s tumorskom DNA najprije sam dodala 130  $\mu$ L reagensa za bisulfitnu konverziju (engl. *Bisulfite ME Conversion Reagent*, Promega, Madison, SAD) i sadržaj resuspendirala pipetom. Uzorak sam potom stavila u uređaj za lančanu reakciju polimerazom (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, SAD) gdje se reakcija bisulfitne konverzije odvijala prema sljedećem programu: 8 minuta pri temperaturi od 98°C, 60 minuta pri temperaturi od 54°C i hlađenje pri temperaturi od 4°C. Nakon konverzije, uzorke sam desulfonirala i pročistila. Na kolonicu s membranom za pročišćavanje nanijela sam 600  $\mu$ L pufera za vezanje (engl. *ME Binding Buffer*, Promega, Madison, SAD) te na istu kolonicu otpipetirala prethodno konvertirani uzorak. Kolonicu s membranom za pročišćavanje, zajedno s kolekcijском epruvetom izokrenula sam nekoliko puta kako bi se sadržaj izmiješao te stavila na centrifugiranje (Centrifuge 5415D, rotor 100 mm, Eppendorf, Hamburg, Njemačka) 30 sekundi pri maksimalnoj brzini od 13 000 rpm i sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja, izlila sam filtrat iz kolekcijske epruvete, a na kolonicu za pročišćavanje s vezanom DNA dodala sam 100  $\mu$ L pufera za ispiranje

(engl. *ME Wash Buffer*, Promega, Madison, SAD). Uzorke sam ponovno centrifugirala 30 sekundi pri maksimalnoj brzini. Potom sam na kolonicu za pročišćavanje nanijela 200 µL desulfonacijskog pufera (engl. *ME Desulfonation Buffer*, Promega, Madison, SAD) i inkubirala na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 minuta. Nakon inkubacije, uzorke sam centrifugirala 30 sekundi pri maksimalnoj brzini. Ispraznila sam kolekcijisku epruvetu i na kolonicu dodala 200 µL pufera za ispiranje (engl. *ME Wash Buffer*, Promega, Madison, SAD) i centrifugirala 30 sekundi pri maksimalnoj brzini. Ovaj korak ponovila sam dva puta. Nakon prebacivanja kolonice za pročišćavanje u novu epruvetu *Eppendorf* volumena 1,5 mL, dodala sam 22 µL pufera za eluciju (engl. *ME Elution Buffer*, Promega, Madison, SAD) te sam sadržaj centrifugirala 30 sekundi pri maksimalnoj brzini. U epruveti se nakon centrifugiranja nalazila eluirana konvertirana DNA te sam njezinu koncentraciju i čistoću provjerila na spektrofotometru (ND 1000, NanoDrop, Wilmington, DE, SAD). Epruvete s bisulfitno konvertiranom tumorskom DNA sam umotala u aluminijsku foliju i pohranila pri temperaturi od -20 °C do analize uzoraka metodom MS PCR.

### 3.5. Određivanje metilacijskog statusa promotorskog mjesta gena *NOTCH2* metodom lančane reakcije polimerazom ovisne o metilaciji

Za provjeru metilacijskog statusa promotora gena *NOTCH2*, nakon bisulfitne konverzije, uzorke sam analizirala metodom MS PCR primjenom komercijalnog paketa *TaKaRa EpiTaq<sup>TM</sup> HS* (for bisulfite-treated DNA) (Takara Bio Inc., Kusatsu, Shiga, Japan). Koristila sam dvije reakcijske smjese (Tablica 1) koje se razlikuju u odgovarajućim početnicama za metiliranu, odnosno nemetiliranu promotorsku regiju gena *NOTCH2* (Tablica 2). Početnice za metiliranu DNA korištene su za umnažanje sekvence između 219. i 338. nukleotida unutar CpG otoka promotorske sekvence, dok su nemetilirane početnice umnažale regiju između 221. i 341. nukleotida. Izuzev uzoraka bisulfitno konvertirane tumorske DNA, u reakcije su ulazile i pozitivne i negativne kontrole. Za pozitivnu kontrolu nemetilirane reakcije koristila sam običnu ljudsku DNA (engl. *Human Genomic DNA*, Promega, Madison, SAD), dok sam za pozitivnu kontrolu metilirane reakcije koristila komercijalno dostupnu metiliranu ljudsku DNA (engl. *Methylated Human Control*, Promega, Madison, Wisconsin, SAD). Kao negativnu kontrolu obje reakcije koristila sam vodu bez nukleaza. Metilirana i nemetilirana reakcija su se odvijale u PCR uređaju *2720 Thermal Cycler* (Applied Biosystems, SAD) prema programu prikazanom u Tablici 3.

Tablica 1. Sastav reakcijske smjese za MS PCR. U tablici su prikazani sastojci, njihova koncentracija i volumen. Ukupni volumen za jednu reakciju je iznosio 25  $\mu$ L.

Sastojak reakcijske smjese	Koncentracija	Volumen ( $\mu$ L)
TaKaRa EpiTaq HS	5 U/ $\mu$ L	0,125
EpiTaq pufer	10X	2,5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5
dNTP Mix	2,5 mM	3
početnica <i>Forward NOTCH2</i>	10 $\mu$ M	1
početnica <i>Reverse NOTCH2</i>	10 $\mu$ M	1
DNA kalup	25 ng/ $\mu$ L	1
H <sub>2</sub> O	/	13,875

Tablica 2. Sekvence početnica promotorske regije gena *NOTCH2* za metiliranu i nemetiliranu reakciju.

Reakcija	Početnica	Sekvenca
Metilirana	<i>NOTCH2 forward</i>	5' TTTGTATTGGTTAAGTTAGCGAGTC 3'
	<i>NOTCH2 reverse</i>	5' GCGCGAAAAAATCTACTACGA 3'
Nemetilirana	<i>NOTCH2 forward</i>	5' TGTATTGGTTAAGTTAGTGAGTTGT 3'
	<i>NOTCH2 reverse</i>	5' TCCACACAAAAAATCTACTACAAA 3'

Tablica 3. Optimizirani uvjeti za MS PCR reakciju umnažanja promotora gena *NOTCH2*. Uvjeti su bili jednaki za metiliranu i nemetiliranu reakciju.

Temperatura	Vrijeme trajanja	Broj ciklusa
98 °C	3 min	1
95 °C	30 sec	30
57,5 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	7 min	1

### 3.6. Elektroforeza u agaroznom gelu

Rezultate MS PCR-a analizirala sam metodom elektroforeze na 2%-tnom agaroznom gelu. Gel sam pripremila na način da sam otopila 1g agaroze u 50 mL pufera TAE (40 mM Tris-acetat; 1 mM EDTA; pH 8) te dodala boju za vizualizaciju vrpce SYBR Safe (*ThermoFisher Scientific, USA*). Elektroforeza se provodila 20 minuta pri naponu od 120 V u uređaju Compact XS/S Biometra, An Analytik Jena Company (Jena, Njemačka). Za određivanje veličine produkata nastalih umnažanjem MS PCR-om koristila sam standard 50 bp DNA Ladder (Amresco, SAD). Veličina metiliranog produkta je 120 pb, a nemetiliranog 121 pb. Vrpce na gelu vizualizirala sam pomoću UV transiluminatora i imagera UVdoc-HD6 (Clever Scientific, Rugby, Ujedinjeno Kraljevstvo).

### 3.7. Imunohistokemijska analiza proteina NOTCH2 u tumorskom tkivu

Metodom imunohistokemije na parafinskim rezovima tumorskih tkiva debljine 4  $\mu\text{m}$  analizirala sam ekspresiju i lokalizaciju proteina NOTCH2 u meningeomima različitih gradusa. Prvo sam deparafinizirala rezove tumorskog tkiva. Stakalca s rezovima stavila sam u kadicu s organskim otapalom ksilenom dva puta po pet minuta. Zatim sam stakalca uranjala u različite gradijente etanola; apsolutni, 96 i 70 %-tni etanol pri čemu su stakalca u svakoj kadici stajala 2 puta po 3 minute. Nakon toga stakalca sam ispirala u destiliranoj vodi 5 minuta.

Nakon deparafinizacije, stakalca sam stavila u plastičnu kadicu u koju sam ulila svježe pripremljeni 6 M citratni pufer (1,05 g limunske kiseline, 0,5 L destilirane vode, pH 6). Kadicu sa stakalcima stavila sam u mikrovalnu pećnicu i postepeno zagrijavala najprije pri 450 W, a nakon što je tekućina prokuhala, postupno sam smanjivala snagu mikrovalne pećnice; najprije na 350 W, a nakon ponovnog prokuhavanja na 250 W. Uzorke sam potom ohladila na sobnoj temperaturi, a postupak zagrijavanja sam ponovila još dva puta, pri čemu sam prije svakog novog zagrijavanja u kadicu ulila novi volumen citratnog pufera. Rezove sam potom isprala u 1X PBS-u (engl. *Phosphate-buffered saline*; 1X PBS = 80 g NaCl, 2 g KCl, 23 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O, 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, destilirana voda do 1 L, pH 7,4) tri puta po 5 minuta.

U sljedećem koraku sam blokirala stanične peroksidaze. Višak PBS-a uklonila sam prislanjanjem stakalaca na papirnati ručnik i potom ih stavila u plastičnu komoru čije je dno prekriveno vodom. Kako bih blokirala djelovanje staničnih peroksidaza, na

rezove sam nakapala 3%-tni vodikov peroksid i inkubirala na sobnoj temperaturi u mraku u trajanju od 20 minuta. Nakon toga, uzorke sam isprala u 1X PBS-u tri puta po 10 minuta.

Kako ne bi došlo do nespecifičnog vezanja antitijela za stanične proteine, odnosno lažno pozitivnih rezultata, uzorke tkiva tretirala sam serumom *Protein block* (Dako, Glostrup, Denmark). Serum sam nakapala na stakalca tako da cijeli uzorak tkiva bude prekriven i inkubirala 30 minuta pri temperaturi od 4°C. Uzorci se nakon inkubacije ne smiju ispirati, te sam višak seruma uklonila prislanjanjem ruba stakalca na papirnati ručnik.

Za detekciju ekspresije i lokalizacije željenog proteina koristila sam primarno monoklonsko antitijelo Anti-Notch2 antibody (ab8926) (Abcam, Cambridge, UK). Antitijelo je razrijeđeno u puferu 1X PBS u omjeru 1:600. Na uzorke i pozitivnu kontrolu pažljivo sam otpipetirala 100 µL otopine antitijela, a na negativnu kontrolu sam nanijela samo 1X PBS jednakog volumena. Sve sam inkubirala tijekom noći pri temperaturi od 4°C. Sljedeći dan uzorke sam isprala u 1X PBS-u tri puta po 5 minuta. Nakon ispiranja, stakalca s tumorskim tkivom inkubirala sam sekundarnim antitijelom *EnVision* (Dako REAL™, EnVision™, Dako Glostrup Denmark) u trajanju od 45 minuta na sobnoj temperaturi. Potom sam uzorke isprala četiri puta po 7 minuta u 1XPBS-u, uz miješanje.

Za vizualizaciju reakcije antigen/antitijelo koristila sam kromogen 3,3'-diaminobenzidin (DAB) (Dako REAL™, EnVision™, Dako Glostrup Denmark). 100 µL otopine kromogena DAB nakapala sam na stakalca i inkubirala 60 sekundi na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, stakalca sam isprala u destiliranoj vodi tri puta po 10 minuta.

Kako bih vizualizirala jezgre u tumorskom tkivu, uzorke sam kontrastirala hemalaunom (Dako, Carpinteria, CA, USA), koji jezgrama daje plavo obojenje. Inkubacija je trajala 3 minute, a stakalca sam potom ispirala 10 minuta u vodovodnoj vodi.

Prije uklapanja, stakalca s rezovima sam dehidrirala provlačeći ih kroz otopine etanola različitih gradijenata. Uzorke sam prvo uronila dva puta po 3 minute u 70 %-tni, zatim dva puta po 3 minute u 96%-tni i konačno dva puta po 3 minute u apsolutni etanol. Na kraju sam uzorke inkubirala dva puta po 5 minuta u ksilenu. Nakon

dehidracije, na stakalca sam nakapala medij za uklapanje Biomount DPX Low (BioGnost, Hrvatska) i rezove tumorskog tkiva poklopila pokrovnim stakalcima. Uzorci su se sušili na sobnoj temperaturi do sljedećeg dana, nakon čega sam rezultate analizirala pod mikroskopom.

### 3.8. Semikvantifikacija rezultata imunohistokemijske analize

Rezultate imunohistokemije analizirala sam promatranjem pod svjetlosnim mikroskopom Olympus BX53 (Tokyo, Japan) te primjenom softvera ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, SAD). Ukoliko je došlo do reakcije antigen/antitijelo, uočila sam smeđe obojenje i takve rezultate sam označila pozitivnima. Kako bih pronašla žarišta s najvećom ekspresijom, cijele preparate sam pregledala na povećanju od 200X. Ukoliko su bile vidljive samo plavo obojane jezgre, preparat sam označila kao negativan.

Za semikvantifikaciju ekspresije proteina NOTCH2 odabrala sam metodu izračuna indeksa obojenja (IRS, engl. *Immunoreactivity score*). IRS sam izračunala množenjem postotka stanica s pozitivnim signalom u tumorskom žarištu (engl. Positive Cells Proportion Score, PP) s intenzitetom signala (engl. Staining Intensity Score, SI). Pozitivitet signala podijeljen je u pet kategorija; (0) nema pozitiviteta u tumorskim stanicama, (1) imunopozitivitet se pojavljuje u 25% tumorskih stanica, (2) imunopozitivitet se pojavljuje u > 26-50 % tumorskih stanica, (3) imunopozitivitet se pojavljuje u 50-85 % tumorskih stanica, (4) imunopozitivitet se pojavljuje u > 85 % tumorskih stanica u vidnom polju pri povećanju mikroskopa od 200X. Jačina intenziteta ekspresije proteina (SI) podijeljena je u tri kategorije: (1) nema ekspresije/ slabi intenzitet obojenja – svijetlosmeđe/žućkasto obojenje, (2) umjeren intenzitet obojenja – smečkasto obojenje i (3) jaki intenzitet obojenja – tamno smeđe obojenje. Sukladno tome, semikvantifikacija IRS-om daje vrijednosti između 0 i 12. Za potrebe statističke analize IRS vrijednosti sam pretvorila u kategoričke vrijednosti: 1 (IRS=0-4), 2 (IRS=6, 8) i 3 (IRS=9, 12). Ukoliko je ekspresija zabilježena u jezgri, za svaki preparat određen je postotak pozitivnih jezgara u vidnom polju. Uzorci s detektiranom ekspresijom u jezgri kategorizirani su u tri skupine; (1) ekspresija prisutna u manje od 10% jezgara u vidnom polju, (2) ekspresija prisutna u 10-50% jezgara u vidnom polju, (3) ekspresija prisutna u više od 50% jezgara u vidnom polju.



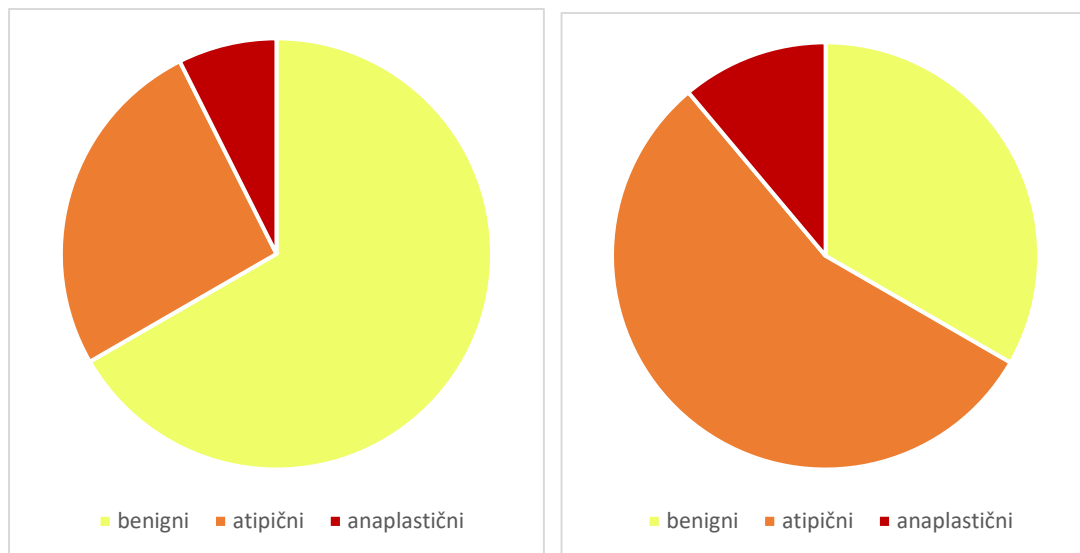
### 3.9. Statistička analiza podataka

Dobivene rezultate genetičkih i proteinskih analiza sam statistički obradila u programskom paketu SPSS v.19.0.1 (SPSS, Chicago, IL, SAD), uz razinu značajnosti od  $\alpha < 0,05$ . U statističku analizu sam uključila i prikupljene patohistološke i demografske (spol i dob) podatke. Sve varijable uključene u statističku obradu su bile kategoričke te sam značajnost razlika analizirala pomoću  $\chi^2$  – testa, a korelaciju pomoću Cramer V testa i Spearmanove korelacije koji se koriste u slučaju nenormalne distribucije varijabli. Za određivanje korelacije između nominalnih varijabli (metilacijski status, spol) i ordinalnih varijabli (gradus, dob, IRS vrijednost, postotak pozitivnih jezgara) koristila sam Cramer-V test, dok sam za ispitivanje korelacije dvaju ordinalnih varijabli koristila Spearmanov test korelacije.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Analiza demografskih i patohistoloških podataka

Istraživanje ekspresije proteina NOTCH2 i metilacijskog statusa promotora gena *NOTCH2* provedeno je na uzorcima tumora meningeoma. Od 46 bolesnika čiji su uzorci analizirani, 18 je bilo muškog (39,1%), a 28 ženskog spola (60,9%). U provedenom istraživanju, analizom demografskih podataka, pokazana je statistički značajna razlika između dobi obolijevanja žena i muškaraca ( $\chi^2=5,437$ ,  $df=1$ ,  **$p=0,020$** ;  $\phi_c=0,344$ ,  **$p=0,020$** ). Post hoc analizom je utvrđeno da su žene češće oboljevale u mlađoj životnoj dobi (prije 60. godine), a muškarci u starijoj životnoj dobi (nakon 60. godine). Nadalje, utvrđena je i statistički značajna povezanost spola i određenog patohistološkog gradusa ( $\chi^2=4,207$ ,  $df=1$ ,  **$p=0,040$** ;  $\phi_c=0,302$ ,  **$p=0,040$** ), pri čemu žene češće oboljevaju od benignih, a muškarci od atipičnih i anaplastičnih meningeoma (Slika 6). Od ukupno 24 izolirana benigna tumora, njih 18 (75%) dijagnosticirano je u žena. Atipični i anaplastični meningeomi dijagnosticirani su kod 22 pacijenta od kojih je njih 12 (54,6 %) pripadalo osobama muškog spola. Od 12 uzoraka tumora viših gradusa dijagnosticiranih u muškaraca, 10 je pripadalo skupini atipičnih meningeoma.  $\chi^2$  testom nije pokazana značajna povezanost dobi s gradusom ( $p=0,743$ ).



Slika 6. Grafički prikaz zastupljenosti različitih patohistoloških gradusa meningeoma unutar skupine oboljelih žena (lijevo) i muškaraca (desno). Među oboljelim ženama, njih 66,7% bolovalo je od benignog oblika meningeoma, 25,9% od atipičnog i 7,4% od anaplastičnog meningeoma. Unutar skupine oboljelih muškaraca, 33,3% muškaraca bolovalo je od benignog oblika, 55,6% od atipičnog i 11,1% od anaplastičnog meningeoma.

#### 4.2. Rezultati analize metilacijskog statusa promotora gena *NOTCH2* u uzorcima intrakranijalnih meningeoma različitih patohistoloških gradusa

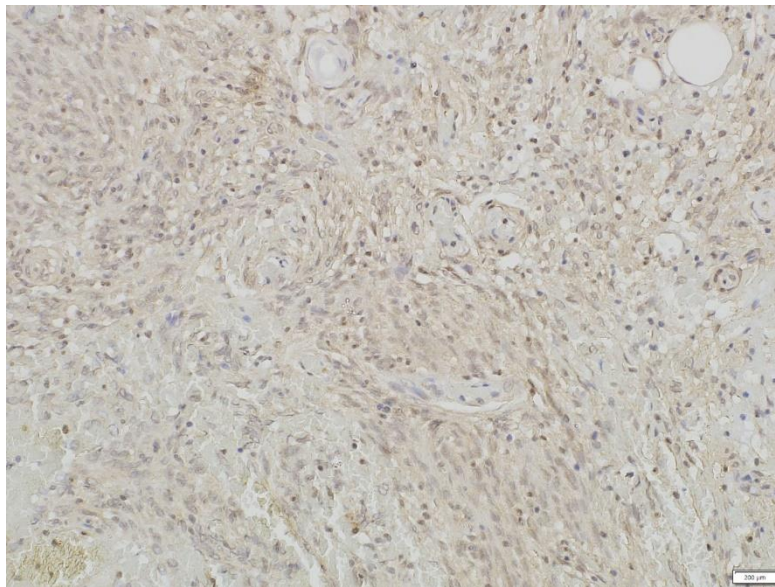
Metodom MS PCR analiziran je metilacijski status CpG otoka promotora gena *NOTCH2* u 46 uzoraka intrakranijalnih meningeoma. MS PCR-u je prethodila izolacija tumorske DNA iz smrznutog tkiva i bisulfitna konverzija. Metilacijski status promotora gena *NOTCH2* provjeren je elektroforezom na agaroznom gelu. Kada je vrpca na gelu vidljiva samo u nemetiliranoj reakcijskoj smjesi, promotor gena *NOTCH2* smatra se nemetiliranim, dok prisutnost vrpce u metiliranoj ili metiliranoj i nemetiliranoj reakcijskoj smjesi označava metilirani promotor gena *NOTCH2*. Rezultati metilacijskog statusa 46 uzoraka intrakranijalnih meningeoma su prikazani na Slici 7 i u Prilogu 1. Od ukupnog uzorka, 23,9% (11 uzoraka) imala su metilirani promotor gena *NOTCH2*. Od toga, 90,9% metiliranih uzoraka pripadalo je atipičnim meningeomima (10 uzoraka), dok je preostalih 9,1% (1 uzorak) pripadao benignom gradusu. DNA izolirana iz tkiva anaplastičnih meningeoma nije pokazala metilaciju promotorske regije gena *NOTCH2*.  $\chi^2$  testom pokazana je statistički značajna povezanost metilacije promotorske regije gena *NOTCH2* i atipičnog meningeoma ( $\chi^2 = 18,102$ ,  $df=2$ ,  $p=0,000$ ), što je potvrđeno i Cramer V testom ( $\phi_c=0,627$ ,  $p=0,000$ ). Metilacija promotora *NOTCH2* nije pokazala statistički značajnu povezanost sa spolom ( $\chi^2 = 1,442$ ,  $p=0,230$ ) kao ni sa dobi pacijenta ( $\chi^2 = 0,023$ ,  $p=0,880$ ).



Slika 7. Analiza metilacijskog statusa promotora gena *NOTCH2* metodom MS PCR u uzorcima intrakranijalnih meningeoma nakon provedene elektroforeze na 2%-tnom agaroznom gelu. U reakciji su korištene dvije vrste početnica; početnice za metiliranu i nemetiliranu DNA. Uzorci intrakranijalnih meningeoma pacijenata prikazani su pojedinačnim šiframa, a vrpce na gelu vizualizirane su bojom Sybr Gold. Crveno zaokružene šifre predstavljaju uzorke u kojima je detektirana metilacija promotora gena *NOTCH2*. L-standardna DNA (50 pb DNA Ladder); UMK – nemetilirana kontrola; MK – metilirana kontrola; UM – nemetilirana reakcija; M – metilirana reakcija; NKPCR – negativna kontrola PCR reakcije.

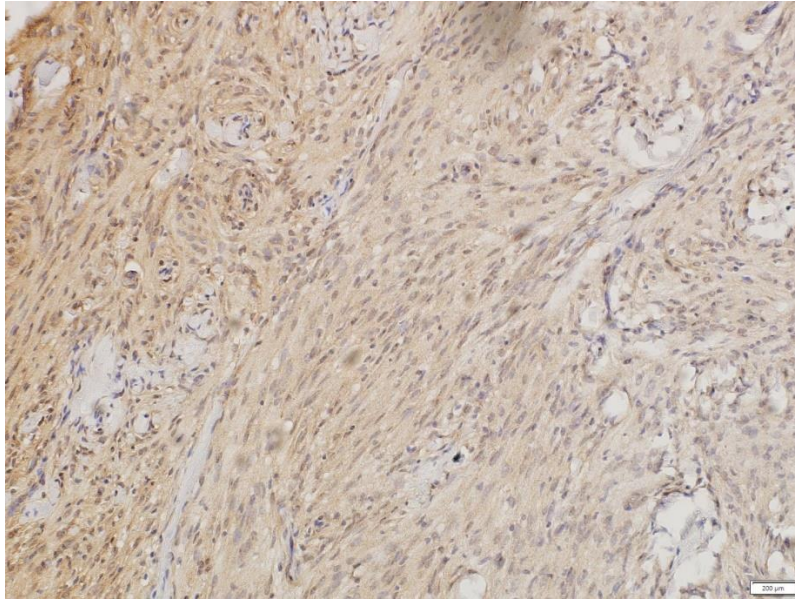
#### 4.3. Rezultati imunohistokemijske analize ekspresije i lokalizacije proteina NOTCH2 u uzorcima intrakranijalnih meningeoma

Ekspresija i lokalizacija proteina NOTCH2 u uzorcima tkiva meningeoma istražena je metodom imunohistokemije uz vizualizaciju kromogenom DAB. U tu svrhu su korišteni parafinski rezovi debljine 4  $\mu\text{m}$  te specifično monoklonalno antitijelo anti-Notch2 antibody (ab8926) (Abcam, Cambridge, UK). Za potrebe imunohistokemijske analize bili su dostupni rezovi 45 uzoraka, dok parafinska kocka jednog uzorka nije bila dostupna od strane patologa. Ekspresija proteina NOTCH2 zabilježena je u svim analiziranim uzorcima intrakranijalnih meningeoma. Svi uzorci su imali ekspresiju u citoplazmi i staničnoj membrani, a u 93,3% uzoraka ekspresija je zabilježena i u jezgri. Slaba ekspresija u citoplazmi i staničnoj membrani (Slika 8) detektirana je u 20 % uzoraka, dok su umjerena (Slika 9) i jaka ekspresija (Slika 10) zabilježene svaka u 40% uzoraka. U pozitivnoj kontroli, tj. uzorku kore velikog mozga detektirana je umjerena do jaka ekspresija proteina NOTCH2 (IRS=9) koja je bila prisutna samo u staničnoj membrani i citoplazmi, dok u jezgrama nije zabilježena. (Slika 11).

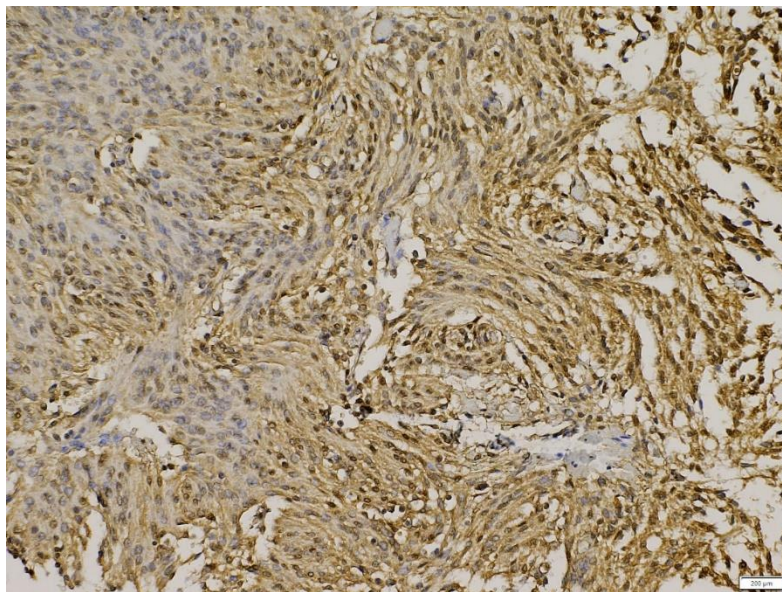


Slika 8. Imunohistokemijska analiza slabe ekspresije proteina NOTCH2 u uzorku tkiva intrakranijalnog meningeoma (uzorak T285, gradus I, nemetilirani promotor) pri povećanju od 200x. Za vizualizaciju ekspresije korišteno je antitijelo Anti-Notch2 antibody (ab8926) (Abcam, Cambridge, UK) i kromogen DAB koji daje smeđe obojenje. Jezgre su kontrastirane hematoksilinom koji daje plavo obojenje. Ekspresija proteina je detektirana na području jezgara, stanične membrane i citoplazme (IRS=4).

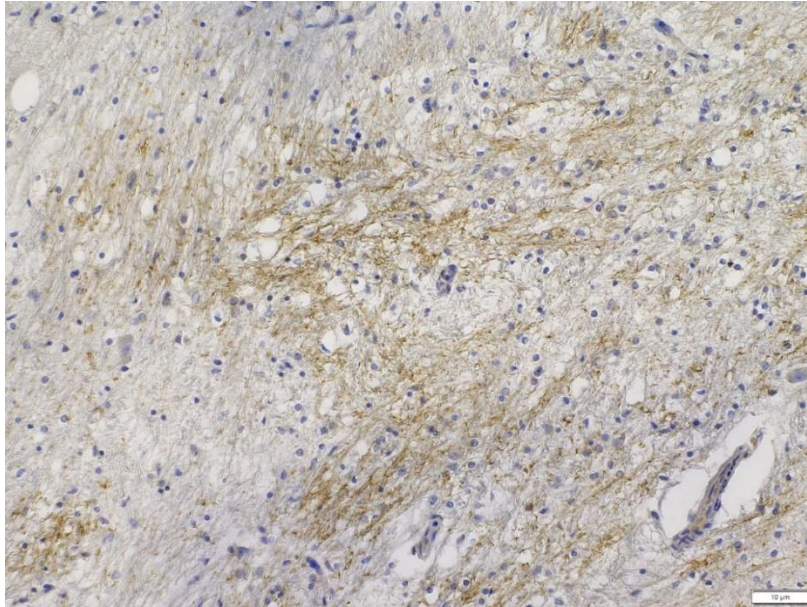




Slika 9. Imunohistokemijska analiza umjerene ekspresije proteina NOTCH2 u uzorku tkiva intrakranijalnog meningeoma (uzorak T437, gradus I, nemetilirani promotor) pri povećanju od 200x. Za vizualizaciju ekspresije korišteno je antitijelo Anti-Notch2 antibody (ab8926) (Abcam, Cambridge, UK) i kromogen DAB koji daje smeđe obojenje. Jezgre su kontrastirane hematoksilinom koji daje plavo obojenje. Ekspresija proteina je detektirana na području jezgara, stanične membrane i citoplazme (IRS=8).

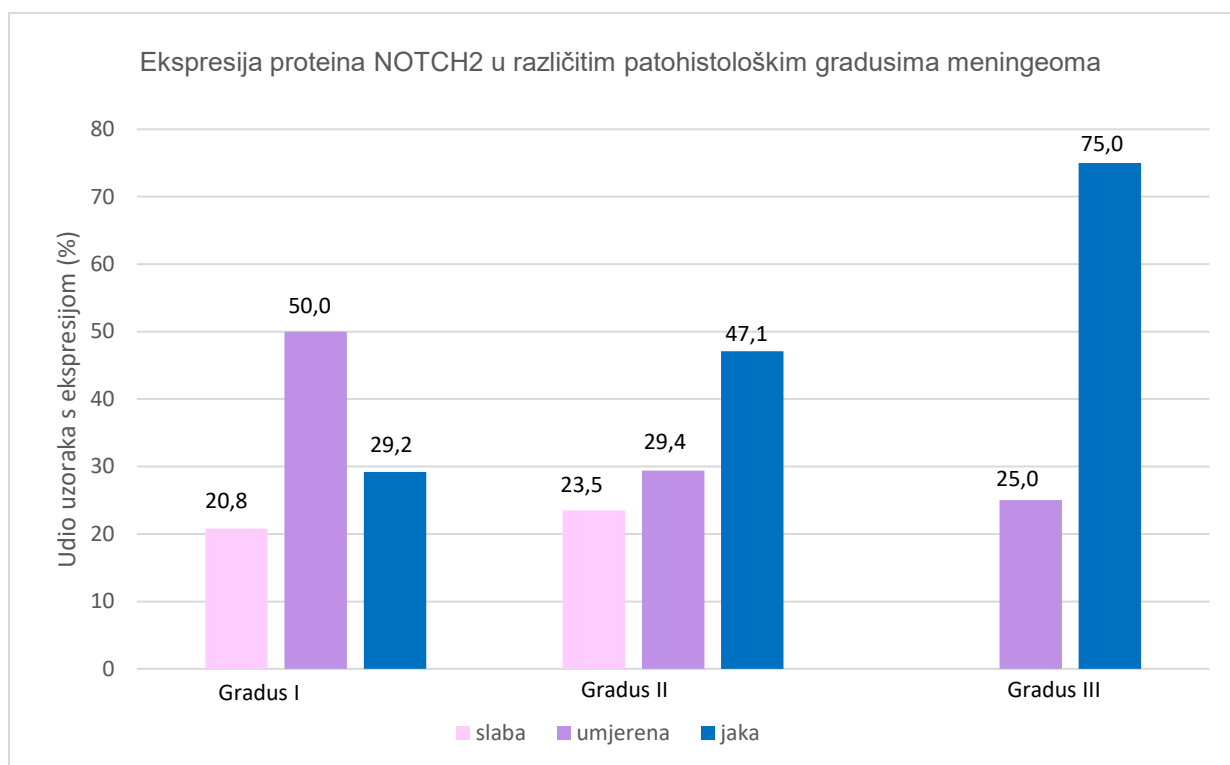


Slika 10. Imunohistokemijska analiza jake ekspresije proteina NOTCH2 u uzorku tkiva intrakranijalnog meningeoma (uzorak T452, gradus II, metilirani promotor) pri povećanju od 200x. Za vizualizaciju ekspresije korišteno je antitijelo Anti-Notch2 antibody (ab8926) (Abcam, Cambridge, UK) i kromogen DAB koji daje smeđe obojenje. Jezgre su kontrastirane hematoksilinom koji daje plavo obojenje. Ekspresija proteina je detektirana na području jezgara, stanične membrane i citoplazme (IRS=12).



Slika 11. Imunohistokemijska analiza ekspresije proteina NOTCH2 u kori velikog mozga (pozitivna kontrola) pri povećanju od 200X. Za vizualizaciju ekspresije korišteno je antitijelo Anti-Notch2 antibody (ab8926) (Abcam, Cambridge, UK) i kromogen DAB koji daje smeđe obojenje. Jezgre su kontrastirane hematoksilinom koji daje plavo obojenje. Ekspresija je jaka i detektirana na području stanične membrane i citoplazme (IRS=9).

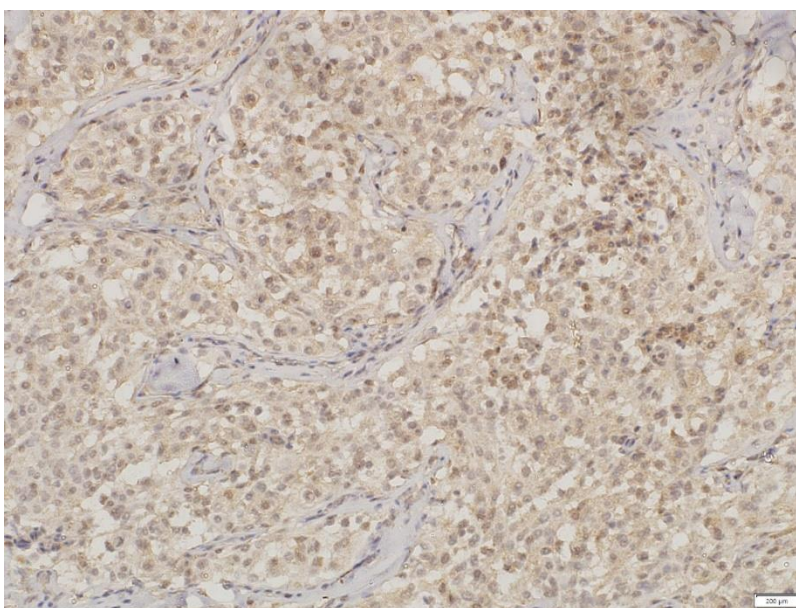
Citoplazmatska ekspresija proteina NOTCH2 u uzorcima različitih patohistoloških gradusa meningeoma prikazana je na Slici 12. U uzorcima gradusa I prevladava umjerena ekspresija (50,0%), dok je kod gradusa II najzastupljenija jaka ekspresija sa 47,1%. Najčešće jaku ekspresiju proteina NOTCH2 pokazuje i većina uzoraka gradusa III (75%), dok slaba ekspresija u anaplastičnim uzorcima nije zabilježena. Od 11 metiliranih uzoraka, njih 54,5% (6 uzoraka) pokazalo je jaku ekspresiju, 18,2% (2 uzorka) umjerenu, a 27,3% (3 uzorka) slabu ekspresiju. Statističkom analizom nije pokazana značajna korelacija intenziteta citoplazmatske ekspresije i patohistološkog gradusa meningeoma ( $p=0,221$ ,  $p=0,144$ ), dobi pacijenta ( $p=0,017$ ,  $p=0,913$ ), spola pacijenta ( $\phi c=0,112$ ,  $p=0,753$ ) ili metilacijskog statusa promotorske regije gena *NOTCH2* ( $\phi c=0,253$ ,  $p=0,236$ ).



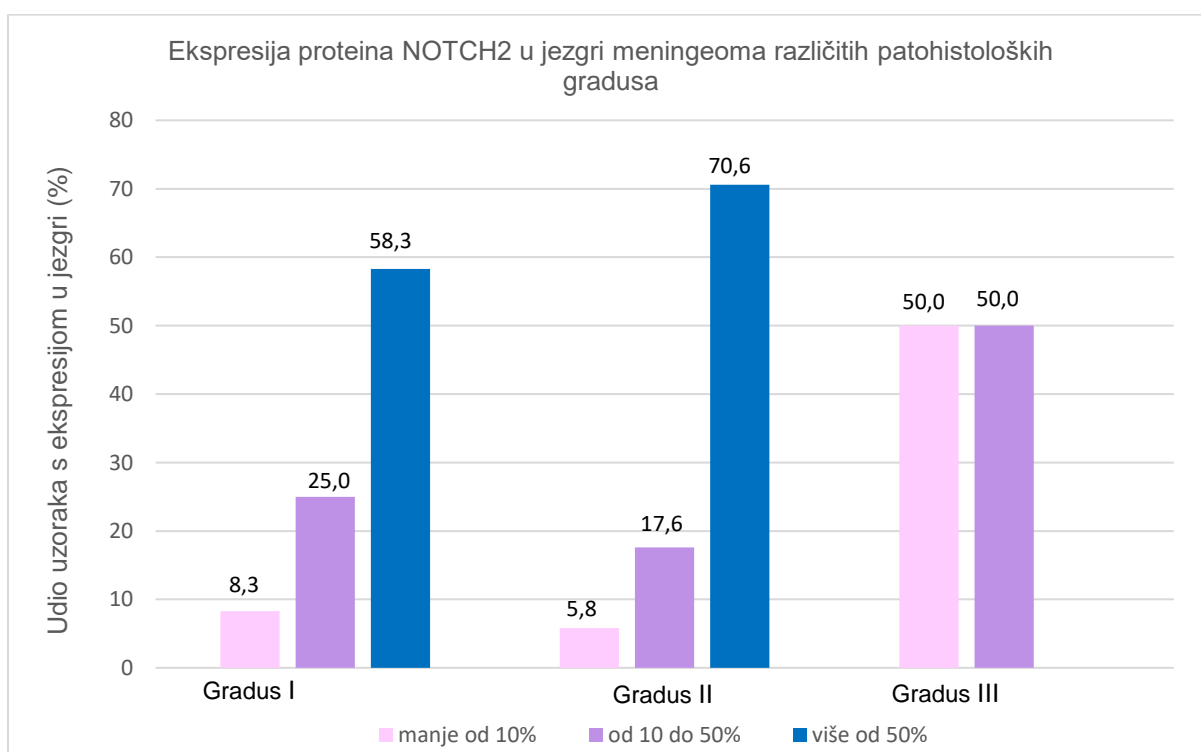
Slika 12. Intenzitet citoplazmatske ekspresije proteina NOTCH2 u uzorcima intrakranijalnih meningeoma različitih gradusa.

Ekspresija proteina NOTCH2 u jezgrama zabilježena je u 93,3 % analiziranih uzoraka. Kod uzoraka s ekspresijom u jezgri, u 11,1% uzoraka ekspresija je detektirana u manje od 10% jezgara u vidnom polju. Ekspresija u 10-50% jezgara u vidnom polju zabilježena je u 24,4% uzoraka, dok je u 57,8 % uzoraka ekspresija je detektirana u više od 50% jezgara u vidnom polju (Slika 13). Od ukupno 26 uzoraka s ekspresijom u više od 50% jezgara u vidnom polju, 14 uzoraka (53,8%) pripadalo je gradusu I, a 12 uzoraka (46,15%) pripadalo je gradusu II. Kod uzoraka gradusa III zabilježena je ekspresija u manje od 10% jezgara (2 uzorka) i ekspresija u 10-50% jezgara (2 uzorka). Ekspresija proteina NOTCH2 u jezgrama meningeoma različitih patohistoloških gradusa prikazana je na Slici 14. Nadalje, od 11 metiliranih uzoraka, njih 8 (72,7%) pokazalo je ekspresiju u više od 50% jezgara. Nije zabilježena statistički značajna povezanost između ekspresije proteina NOTCH2 u jezgri i patohistološkog gradusa ( $p=0,101$ ,  $p=0,509$ ), dobi pacijenata ( $p=0,023$ ,  $p=0,880$ ), spola pacijenata ( $\phi_c=0,258$ ,  $p=0,392$ ) ili metilacijskog statusa promotora gena *NOTCH2* ( $\phi_c=0,267$ ,  $p=0,362$ ). Statističkom analizom potvrđena je pozitivna korelacija između ekspresije proteina NOTCH2 u jezgri i citoplazmi ( $p=0,471$ ,  **$p=0,001$** ).





Slika 13. Imunohistokemijska analiza ekspresije proteina NOTCH2 u jezgrama (više od 50% jezgara pokazuje ekspresiju) u uzorku tkiva intrakranijalnog meningeoma (uzorak T452, metilirani promotor) pri povećanju od 200X. Za vizualizaciju ekspresije korišteno je antitijelo Anti-Notch2 antibody (ab8926) (Abcam, Cambridge, UK) i kromogen DAB koji daje smeđe obojenje. Jezgre su kontrastirane hematoksilinom koji daje plavo obojenje.



Slika 14. Intenzitet ekspresije proteina NOTCH2 u jezgri u uzorcima intrakranijalnih meningeoma različitih gradusa.

## 5. RASPRAVA

Ovaj diplomski rad obuhvatio je istraživanje 46 uzoraka intrakranijalnih meningeoma različitih patohistoloških gradusa, od čega je njih 24 pripadalo benignim, 17 atipičnim i 5 anaplastičnim meningeomima. Ovakva raspodjela unutar gradusa podudara se s činjenicom kako su meningeomi u većini slučajeva tumori benignog karaktera s niskom incidencijom razvoja u malignije oblike (Maggio i sur. 2021). Većina uzoraka (60,9%) pripadala je osobama ženskog spola, što odgovara podacima da žene češće obolijevaju od ove vrste tumora nego muškarci (Louis i sur. 2016). Srednja životna dob pacijentica iznosila je 54,7 godina, što je niže u odnosu na srednju životnu dob oboljelih muškaraca koja je iznosila 65,5 godina. Statistička analiza pokazala je i značajnu povezanost oboljevanja pacijentica u ranijoj životnoj dobi (<60.g.), dok su muškarci češće obolijevali nakon 60. godine života ( $p=0,020$ ). Smatra se kako je razlog češćeg oboljevanja žena, kao i oboljevanja u ranijoj životnoj dobi izloženost spolnim hormonima; estrogenu i progesteronu čiji se receptori nalaze na površini meningeoma (Wiemels i sur. 2010). Usprkos tome što obolijevaju češće i u ranijoj životnoj dobi, ovo istraživanje pokazalo je kako žene u većoj mjeri obolijevaju od benignih oblika meningeoma, dok je učestalost dijagnosticiranja anaplastičnih i atipičnih meningeoma bila veća u muškaraca ( $p=0,040$ ). Ovaj nalaz odgovara i prirodnoj incidenciji gdje muškarci češće oboljevaju od menigeoma viših gradusa (Louis i sur., 2016). Park i sur. (2014) su proveli analizu povezanosti dobi i patohistološkog gradusa na 1083 pacijenta s dijagnosticiranim meningeomom i pokazali kako je srednja dob osoba s dijagnosticiranim benignim oblikom meningeoma iznosila 55,5 godina, dok je za atipične i anaplastične oblike bila viša i iznosila 59, odnosno 64,7 godina. Odnosno, iz istraživanja je vidljivo kako mlađe osobe češće obolijevaju od benignih oblika. Usprkos tome što u ovom diplomskom radu nije zabilježena statistički značajna poveznica između dobi pacijenta i patohistološkog gradusa, podaci iz ovog rada se djelomično poklapaju s nalazima istraživanja Parka i sur. (2014), budući da je pokazana značajna povezanost oboljevanja žena u mlađoj životnoj dobi i od benignog oblika meningeoma.

U ovom istraživanju proučavana je metilacija promotorske regije gena *NOTCH2* i statističkom analizom pokazana je značajna povezanost metilacije promotora s atipičnim meningeomima ( $p=0,000$ ). Prije izrade ovog diplomskog rada nije pronađeno znanstveno istraživanje o metilaciji promotorske regije gena *NOTCH2* u intrakranijalnim meningeomima. Uz to, pretraživanjem literaturnih izvora, uočen je nedostatak istraživanja metilacijskog obrasca gena *NOTCH2* i u drugim vrstama tumora, kao i njegov utjecaj na samu progresiju. Ispitivanjem metilacijskog statusa promotora gena *NOTCH* u uzorcima biopsije raka grlića maternice Kadian i sur. (2020) zabilježili su hipermetilaciju promotorske regije *NOTCH1* i *NOTCH3*, dok metilacija promotora *NOTCH2* nije pokazala statističku značajnost u ovoj vrsti karcinoma. Kuang i sur. (2013) identificirali su postojanje CpG otoka, mjesta najpodložnija hipermetilaciji, u promotorskim regijama različitih molekula sudionika signalnog puta Notch; receptora Notch1, Notch2 i Notch3 kao i liganada Jag1, DLL1, DLL2 i DLL3. Uz to, istraživanje je pokazalo i hipermetilaciju promotora gena *NOTCH3* kod pacijenata oboljelih od akutne limfocitne leukemije B stanica. Iako navedena istraživanja nisu pokazala povezanost metilacijskog obrasca *NOTCH2* s progresijom samog tumora, upućuju na uključenost epigenetskih promjena gena Notch signalizacije u proces tumorigeneze. Nadalje, rezultati ovog diplomskog rada ukazuju da bi utišavanje gena *NOTCH2* mogao biti mehanizam koji dovodi do progresije intrakranijalnih meningeoma. Iako istraživani signalni put može imati dvojnu ulogu u razvoju tumora, hipermetilacija promotora gena *NOTCH2* u meningeomima višeg gradusa mogla bi ukazivati na ulogu ovog gena kao tumor supresora. Ranije je zabilježeno kako signalni put Notch može imati tumorsupresorsku funkciju u različitim karcinomima kao što su karcinom mjehura (Rampias i sur. 2014), karcinomi pločastih stanica glave i vrata (Stransky i sur. 2011), te karcinom malih stanica pluća (George i sur. 2015).

Za sve uzorke ovog istraživanja koji su imali metilirani promotor, signal je ujedno detektiran i u nemetiliranoj reakcijskoj smjesi. Takav obrazac metilacije mogao bi biti posljedica heterogenosti tumorske mase pri čemu neke stanice imaju metilirane promotorske regije, dok kod drugih ne dolazi do navedene epigenetske promjene. Također, prilikom izvođenja kirurškog zahvata kojim se tumor uklanja postoji mogućnost zahvaćanja tkiva meninge koje ne ispoljava promijenjene metilacijske obrasce promotora istraživanog gena (Pakdeethai i sur. 2012).

Kako metilacija promotorske regije gena može utjecati na proteinsku ekspresiju, metodom imunohistokemije analiziran je intenzitet ekspresije proteina NOTCH2 u tumorskom tkivu, kao i njegova lokacija unutar stanice. Protein NOTCH2 detektiran je u svim analiziranim uzorcima meningeoma, te je zabilježen u jezgri, staničnoj membrani i citoplazmi. U izoliranom tumorskom tkivu, kao i u pozitivnoj kontroli (uzorak kore velikog mozga zdrave osobe), prevladavaju umjerena (40%) i jaka ekspresija (40%). Umjerena do jaka ekspresija u kori velikog mozga i svim uzorcima intrakranijalnih meningeoma može biti posljedica njegove uloge i aktivnosti u zdravom odraslom mozgu. Signalni put Notch sudjeluje u održavanju ravnoteže između proliferacije i diferencijacije neuralnih matičnih i progenitorskih stanica, migraciji neurona moždane kore, grananju dendritičkih izdanaka neurona, a potencijalna je njegova uloga u aktivaciji matičnih stanica tijekom učenja ili kao posljedica ozljede. Navedeni procesi su strogo regulirani i ograničeni na pojedine dijelove mozga (Ables i sur. 2011). Aktivacija signalnog puta Notch dovodi do translokacije unutarstanične domene u jezgru. Stoga je detekcija unutarstanične domene proteina NOTCH2 u jezgrama stanica naših uzoraka meningeoma znak aktivnog signalnog puta. Zabilježena ekspresija proteina NOTCH2 u kori mozga zdravog čovjeka bila je isključivo u citoplazmi. Suprotno tome, 93,3% analiziranih uzoraka meningeoma pokazalo je ekspresiju u jezgri, pri čemu je u više od polovice uzoraka protein detektiran u preko 50% jezgara u vidnom polju. Iz toga je vidljivo kako je signalni put Notch, za razliku od zdravog tkiva, aktivan u tumorskom tkivu, a podjednaka detekcija proteina NOTCH2 na području jezgre u sva tri patohistološka gradusa mogla bi upućivati na to da je promjena u aktivaciji signalizacije Notch rani događaji u tumorigenezi meningeoma. Statistička analiza podataka ovog diplomskog rada pokazala je značajnu povezanost jačine intenziteta ekspresije proteina NOTCH2 u citoplazmi i jezgrama ( $p=0,001$ ), pri čemu je na preparatima s jakim citoplazmatskom ekspresijom uočen veći broj pozitivnih jezgara. Veći broj receptora na razini stanične membrane, omogućuje vezanje većeg broja liganada, aktivaciju signalnog puta što u konačnici dovodi do translokacije unutarstanične domene iz citoplazme u jezgru i transkripciju ciljnih gena. To odgovara činjenici kako koncentracija unutarstanične domene ovisi o interakciji receptora i liganda koja je povećana ukoliko je ekspresija receptora na površini veća (Shen i sur. 2021). Svi analizirani uzorci intrakranijalnih meningeoma, neovisno o patohistološkom gradu, pokazali su ekspresiju proteina NOTCH2 na razini citoplazme i stanične membrane. Slično našim rezultatima, Hayashi

i sur. (2016) u svojem istraživanju zabilježili su ekspresiju proteina NOTCH2 u citoplazmi i jezgrama stanica karcinoma mjehura, dok u jezgrama zdravog tkiva protein nisu detektirali. Ipak, Hayashi i sur. (2016) su ekspresiju NOTCH2 u jezgrama pripisali malignijim oblicima tumora, povećanju sposobnosti invazije i epitelno-mezenhimske tranzicije, što nije utvrđeno analizom našeg uzorka meningeoma. Povezanost ekspresije proteina NOTCH2 i gradusa pokazali su i Gan i sur. (2020) analizom uzoraka karcinoma jezika. U svom istraživanju Gan i sur. (2020) detektirali su ekspresiju u gotovo svim uzorcima tumorskog tkiva, ali i njezin porast s povećanjem gradusa. Imunohistokemijskom analizom uzoraka karcinoma želuca, Sun i sur. (2011) su detektirali protein NOTCH2 u premalignim lezijama, ali i u stanicama karcinoma, pri čemu je postotak stanica s pozitivnim signalom u citoplazmi i jezgri bio veći u tumorskim stanicama. Navedena istraživanja, karakteriziraju protein NOTCH2 kao onkogen i ističu njegov onkogeni potencijal u pojedinim vrstama tumora. Iako naši rezultati nisu pokazali statistički značajnu poveznicu patohistološkog gradusa i intenziteta ekspresije NOTCH2 na području citoplazme i stanične membrane, većina atipičnih (47,1%) i anaplastičnih (75%) tumora je pokazala jaku ekspresiju.

S druge strane, u istraživanju Zou i sur. (2019) posljedica povećane ekspresije proteina NOTCH2 u stanicama nazofaringealnog karcinoma bila je nemogućnost invazije i epitelno-mezenhimske tranzicije, a povezana je i s povećanim ukupnim preživljenjem pacijenata. Navedena istraživanja pokazuju kako uloga proteina NOTCH2 u karcinogenezi ovisi o vrsti tumora te da može potaknuti ili suprimirati njegov nastanak i progresiju. Također, Chu i sur. (2009) su u svome istraživanju signalizacije Notch u kolorektalnom karcinomu utvrdili kako sastavnice istog signalnog puta mogu imati različite uloge u karcinogenezi, pri čemu je NOTCH1 detektiran kao onkogen koji doprinosi progresiji tumora, dok je NOTCH2 opisan kao tumor supresor. Kako bi se detaljnije objasnila uloga signalnog puta Notch u karcinogenezi intrakranijalnih meningeoma, potrebno je proširiti istraživanje i analizirati ostale komponente ovog signalnog puta, odnosno proteine NOTCH1 i NOTCH3.

Iz dobivenih rezultata nije vidljiv utjecaj metilacije promotorske regije gena *NOTCH2* na ekspresiju istoimenog proteina. U većini uzoraka (80%), neovisno o metilacijskom statusu promotora prevladavale su umjerena i jaka proteinska ekspresija. Od metiliranih uzoraka, 54,5% pokazalo je jaku, a 18,2% umjerenu ekspresiju. Kao što je ranije opisano, zbog heterogenosti tumorske mase, različite stanice ispoljavaju različite

metilacijske obrasce promotorske regije. Aktivacija gena u stanicama s nemetiliranim promotorom mogla bi biti dostatna za proizvodnju dovoljne razine proteina pri čemu se usporedbom zdravog i tumorskog tkiva ne uočava razlika u ekspresiji. Nadalje, moguće objašnjenje je i kako hipermetilacija ne dovodi do utišavanja gena. Iako se hipermetilacija CpG otoka u promotoru gena uglavnom smatra mehanizmom njegova utišavanja, poneka istraživanja pokazuju suprotno. Analizom i usporedbom metilacijskog obrasca i ekspresije različitih gena u uzorcima karcinoma prostate Rauluseviciute i sur. (2020) pokazali su kako hipermetilacija promotora može dovesti do aktivacije i povećanog prepisivanja određenih gena. Epigenetska regulacija ekspresije gena u tumorima veoma je kompleksna i usprkos intenzivnom istraživanju, mehanizmi hipermetilacije DNA u različitim karcinomima, pa tako i u intrakranijalnim meningeomima, i dalje su uvelike nepoznati.

Prikupljanje podataka o pojavnosti epitelno-mezenhimske tranzicije, invazije tumorskog tkiva i ukupnom preživljenju pacijenata, kao i povećanje uzoraka atipičnih i anaplastičnih meningeoma te istraživanje ostalih sastavnica signalizacije Notch omogućilo bi detaljniju analizu složene funkcije proteina NOTCH2, ali i signalnog puta Notch u nastanku i progresiji intrakranijalnih meningeoma.

## 6. ZAKLJUČAK

Rezultati dobiveni analizom metilacijskog statusa gena *NOTCH2* pokazali su kako je metilacija promotora događaj karakterističan za atipične meningeome. Ovakvi nalazi upućuju na ulogu ovog gena u progresiji meningeoma.

Ekspresija proteina NOTCH2 detektirana je na razini citoplazme i stanične membrane u svim uzorcima meningeoma te u kori velikog mozga zdrave osobe. Ekspresija NOTCH2 na razini citoplazme i membrane je bila u većini slučajeva umjerena (40%) ili jaka (40%), ali nije pokazana statistički značajna poveznica između intenziteta ekspresije proteina i patohistološkog gradusa. Ekspresija proteina NOTCH2 na razini jezgre zabilježena je u 93,3% uzoraka intrakranijalnih meningeoma, no nije detektirana u kori velikog mozga zdrave osobe. Također, intenzitet ekspresija na razini jezgre u uzorcima meningeoma je bio povezan s intenzitetom ekspresije u citoplazmi ( $p=0,001$ ). Podjednaka detekcija proteina NOTCH2 na području jezgre u sva tri patohistološka gradusa mogla bi upućivati na to da je promjena u aktivaciji signalizacije Notch rani događaj u tumorigenezi meningeoma.

Nadalje, statistička analiza nije pokazala povezanost metilacije promotora gena i ekspresije proteina NOTCH2 što sugerira postojanje drugih epigenetskih mehanizama kontrole i održavanja ekspresije gena.

Rezultati ovog diplomskog pokazali su da je signalni put Notch aktivan tijekom procesa nastanka i progresije intrakranijalnih meningeoma. Kako bi se otkrila točna uloga NOTCH2 u intrakranijalnim meningeomima, potrebno je proširiti metodologiju i istraživanje na veći broj uzoraka viših gradusa te uvrstiti podatke o preživljenju pacijenata, pojavnosti recidiva i/ili metastaza. Također, od velikog značaja bi bilo i istraživanje metilacijskih obrazaca i ekspresije drugih molekula sastavnica signalnog puta Notch, posebice NOTCH1 i NOTCH2 koji su pokazali oprečne uloge u tumorigenezi različitih vrsta karcinoma.

## 7. LITERATURA

- Ables, J. L., Breunig, J. J., Eisch, A. J., & Rakic, P. (2011). Not(ch) just development: Notch signalling in the adult brain. *Nature Reviews. Neuroscience*, *12*, 269–283.
- Aggarwal, V., Tuli, H. S., Varol, M., Tuorkey, M., Sak, K., Parashar, N. C., Barwal, T. S., Sharma, U., Iqbal, A., Parashar, G., & Jain, A. (2021). NOTCH signaling: Journey of an evolutionarily conserved pathway in driving tumor progression and its modulation as a therapeutic target. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *164*, e103403.
- Allen, F., & Maillard, I. (2021). Therapeutic targeting of Notch signaling: from cancer to inflammatory disorders. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 649205
- Alruwaili, A. A., & De Jesus, O. (2022). Meningioma. U: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island, FL, United States of America.
- Barkhoudarian, G., Whitelegge, J. P., Kelly, D. F., & Simonian, M. (2016). Proteomics analysis of brain meningiomas in pursuit of novel biomarkers of the aggressive behavior. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, *9*(2), 53.
- Bi, W. L., Abedalthagafi, M., Horowitz, P., Agarwalla, P. K., Mei, Y., Aizer, A. A., Brewster, R., Dunn, G. P., Al-Mefty, O., Alexander, B. M., Santagata, S., Beroukhim, R., & Dunn, I. F. (2016). Genomic landscape of intracranial meningiomas. *Journal of Neurosurgery*, *125*, 525–535.
- Birzu, C., Peyre, M., & Sahm, F. (2020). Molecular alterations in meningioma: prognostic and therapeutic perspectives. *Current Opinion in Oncology*, *32*, 613–622.
- Buerki, R. A., Horbinski, C. M., Kruser, T., Horowitz, P. M., James, C. D., & Lukas, R. v. (2018). An overview of meningiomas. *Future Oncology*, *14*, 2161–217.
- Chu, D., Zheng, J., Wang, W., Zhao, Q., Li, Y., Li, J., Xie, H., Zhang, H., Dong, G., Xu, C., Li, M., Chen, D., & Ji, G. (2009). Notch2 expression is decreased in colorectal cancer and related to tumor differentiation status. *Annals of Surgical Oncology*, *16*, 3259–3266.
- D'assoro, A. B., Leon-ferre, R., Braune, E. B., & Lendahl, U. (2022). Roles of Notch signaling in the tumor microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences* *2022*, *23*, 6241.



- Delgado-López, P. D., Cubo-Delgado, E., González-Bernal, J. J., & Martí Alonso, J. (2020). A Practical Overview on the Molecular Biology of Meningioma. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 20, 1-12.
- Demitrack, E. S., & Samuelson, L. C. (2017). Notch as a driver of gastric epithelial cell proliferation. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 3323–330.
- Fathi, A. R., & Roelcke, U. (2013). Meningioma. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 13, 1-8.
- Gan, R. H., Wei, H., Xie, J., Zheng, D. P., Luo, E. L., Huang, X. Y., Xie, J., Zhao, Y., Ding, L. C., Su, B. H., Lin, L. S., Zheng, D. L., & Lu, Y. G. (2018). Notch1 regulates tongue cancer cells proliferation, apoptosis and invasion. *Cell Cycle*, 17, 216–224.
- George, J., Lim, J. S., Jang, S. J., Cun, Y., Ozretia, L., Kong, G., Leenders, F., Lu, X., Fernández-Cuesta, L., Bosco, G., Müller, C., Dahmen, I., Jahchan, N. S., Park, K. S., Yang, D., Karnezis, A. N., Vaka, D., Torres, A., Wang, M. S., Thomas, R. K. (2015). Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*, 524, 47–53.
- Gridley, T. (2010). Notch signaling in the vasculature. *Current Topics in Developmental Biology*, 92, 277–309.
- Hayashi, T., Gust, K. M., Wyatt, A. W., Goriki, A., Jäger, W., Awrey, S., Li, N., Oo, H. Z., Altamirano-Dimas, M., Buttyan, R., Fazli, L., Matsubara, A., & Black, P. C. (2016). Not all NOTCH Is Created Equal: The oncogenic role of NOTCH2 in bladder cancer and its implications for targeted therapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 22, 2981–2992.
- Kadian, L. K., Gulshan, G., Ahuja, P., Singhal, G., Sharma, S., Nanda, S., & Yadav, R. (2020). Aberrant promoter methylation of NOTCH1 and NOTCH3 and its association with cervical cancer risk factors in North Indian population. *American Journal of Translational Research*, 12, 2814-2826.
- Kuang, S. Q., Fang, Z., Zweidler-McKay, P. A., Yang, H., Wei, Y., Gonzalez-Cervantes, E. A., Bumber, Y., & Garcia-Manero, G. (2013). Epigenetic Inactivation of Notch-Hes Pathway in Human B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Plos one*, 8, e61807.
- Kulis, M., & Esteller, M. (2010). DNA methylation and cancer. *Advances in Genetics*, 70, 27–56.

- Lee, Y. S., & Lee, Y. S. (2020). Molecular characteristics of meningiomas. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, *54*, 45–63.
- Lobry, C., Oh, P., Mansour, M. R., Thomas Look, A., & Aifantis, I. (2014). Notch signaling: switching an oncogene to a tumor suppressor. *Blood*, *123*, 2451-2459.
- Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K. (Eds) (2016a): WHO classification of tumours of the central nervous system (Revised 4th edition). IARC, Lyon
- Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K., Ohgaki H. Wiestler O.D., Kleihues P., Ellison D.W. (2016b): The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathologica* *131*, 803–820.
- Maggio, I., Franceschi, E., Tosoni, A., Nunno, V. di, Gatto, L., Lodi, R., & Brandes, A. A. (2021). Meningioma: not always a benign tumor. A review of advances in the treatment of meningiomas. *CNS Oncology*, *10*, eISSN 2045-0915
- Meisel, C. T., Porcheri, C., & Mitsiadis, T. A. (2020). Cancer stem cells, quo vadis? The notch signaling pathway in tumor initiation and progression. *Cells*, *9*, 1–33.
- Ogasawara, C., Philbrick, B. D., & Adamson, D. C. (2021). Meningioma: A Review of Epidemiology, Pathology, Diagnosis, Treatment, and Future Directions. *Biomedicines*, *9*, 319-342.
- Pakdeethai, S., Fongchaiya, V., Pongtheerat, T., Iampenkhae, K.-P., & Sampatanukul, P. (2012). Relationship between promoter methylation and protein expression of glutathione S-transferase gene class P1 in breast cancer. *Asian Archives of Pathology*, *8*, 45–53.
- Park, J. S., Sade, B., Oya, S., Kim, C. G., & Lee, J. H. (2014). The influence of age on the histological grading of meningiomas. *Neurosurgical Review*, *37*, 425–429.
- Patel, N., & Kirmi, O. (2009). Anatomy and imaging of the normal meninges. *Seminars in Ultrasound, CT, and MR*, *30*, 559–564.
- Pawloski, J. A., Fadel, H. A., Huang, Y. W., & Lee, I. Y. (2021). Genomic biomarkers of meningioma: A focused review. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*, e10222

- Pećina-Šlaus N. (2009): Odabrane metode molekularne biologije – laboratorijski priručnik. Med. Nakl. d.o.o., Zagreb .
- Qiao, L., & Wong, B. C. Y. (2009). Role of Notch signaling in colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 30, 1979–1986.
- Rampias, T., Vgenopoulou, P., Avgeris, M., Polyzos, A., Stravodimos, K., Valavanis, C., Scorilas, A., & Klinakis, A. (2014). A new tumor suppressor role for the Notch pathway in bladder cancer. *Nature Medicine*, 20, 1199–1205.
- Rauluseviciute, I., Drabløs, F., & Rye, M. B. (2020). DNA hypermethylation associated with upregulated gene expression in prostate cancer demonstrates the diversity of epigenetic regulation. *BMC Medical Genomics*, 13, 1–15.
- Sahm F., Schrimpf D., Stichel D., Jones D.T.W., Hielscher T., Schefzyk S., Okonechnikov K., Koelsche C., Reuss D.E., Capper D., Sturm D., Wirsching H.G., Berghoff A.S., Baumgarten P., Kratz A., Huang K., Wefers A.K., Hovestadt V., Sill M., Ellis H.P., Kurian K.M., Okuducu A.F., Jungk C., Drueschler K., Schick M., Bewerunge-Hudler M., Mawrin C., Seiz-Rosenhagen M., Ketter R., Simon M., Westphal M., Lamszus K., Becker A., Koch A., Schittenhelm J., Rushing E.J., Collins V.P., Brehmer S., Chavez L., Platten M., Hänggi D., Unterberg A., Paulus W., Wick W., Pfister S.M., Mittelbronn M., Preusser M., Herold-Mende C., Weller M., von Deimling A. (2017): DNA methylation-based classification and grading system for meningioma: A multicentre, retrospective analysis. *Lancet Oncology*, 18, 682-694.
- Sharma, A.K., Kumar, A., Ali, A., Singh Saluja, S., & Prasad, B. (2022). Elevated Expression of Notch 2 & Notch 3 is associated with Disease Progression in Colorectal Cancer. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 13, 33-50.
- Shen, W., Huang, J., & Wang, Y. (2021b). Biological significance of NOTCH signaling strength. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, e652273
- Siebel, C., & Lendahl, U. (2017). Notch signaling in development, tissue homeostasis, and disease. *Physiological Reviews*, 97, 1235–1294.
- Stransky, N., Egloff, A. M., Tward, A. D., Kostic, A. D., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Kryukov, G. v., Lawrence, M. S., Sougnez, C., McKenna, A., Shefler, E., Ramos, A. H., Stojanov, P., Carter, S. L., Voet, D., Cortés, M. L., Auclair, D., Berger, M. F.,

- Saksena, G., Guiducci, C., Onforio, C.R., Parkin, M., Romkes, M., Weissfeld L. J., Seethala R. R., Wang, L., Rangel-Escareno, C., Fernandez-Lopez, J. C., Hidalgo-Miranda A., Melendez-Zajgla, J., Winckler, W., Ardile, K., Gabriel, B. S., Meyerson, M., Lander, E. S., Getz, G., Golub, T. J., Garraway A. L., Grandis, J. R. (2011). The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science*, 333, 1157–1160.
- Sun, Y., Gao, X., Liu, J., Kong, Q. Y., Wang, X. W., Chen, X. Y., Wang, Q., Cheng, Y. F., Qu, X. X., & Li, H. (2011). Differential Notch1 and Notch2 expression and frequent activation of Notch signaling in gastric cancers. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 135, 451–458.
- Takebe, N., Nguyen, D., & Yang, S. X. (2014). Targeting notch signaling pathway in cancer: clinical development advances and challenges. *Pharmacology & Therapeutics*, 141, 140–149.
- Tseng, Y. C., Tsai, Y. H., Tseng, M. J., Hsu, K. W., Yang, M. C., Huang, K. H., Li, A. F. Y., Chi, C. W., Hsieh, R. H., Ku, H. H., & Yeh, T. S. (2012). Notch2-induced COX-2 expression enhancing gastric cancer progression. *Molecular Carcinogenesis*, 51, 939–951.
- Wang, N. J., Sanborn, Z., Arnett, K. L., Bayston, L. J., Liao, W., Proby, C. M., Leigh, I. M., Collisson, E. A., Gordon, P. B., Jakkula, L., Pennypacker, S., Zou, Y., Sharma, M., North, J. P., Vemula, S. S., Mauro, T. M., Neuhaus, I. M., LeBoit, P. E., Hur, J. S., ... Cho, R. J. (2011). Loss-of-function mutations in Notch receptors in cutaneous and lung squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 17761-17766.
- Wiemels, J., Wrensch, M., & Claus, E. B. (2010). Epidemiology and etiology of meningioma. *Journal of Neuro-Oncology*, 99, 307–314.
- Xiu, M.-X., & Liu, Y.-M. (2019). The role of oncogenic Notch2 signaling in cancer: a novel therapeutic target. *American Journal of Cancer Research*, 9, 837-854.
- Yuzawa, S., Nishihara, H., & Tanaka, S. (2016). Genetic landscape of meningioma. *Brain Tumor Pathology*, 33, 237–247.
- Zou, Y., Yang, R., Huang, M. L., Kong, Y. G., Sheng, J. F., Tao, Z. Z., Gao, L., & Chen, S. M. (2019). NOTCH2 negatively regulates metastasis and epithelial-Mesenchymal

transition via TRAF6/AKT in nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38, 1-17.

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 19. ožujka 1999. godine u Sisku. U Zagrebu sam završila XI. gimnaziju. Iste godine upisujem preddiplomski studij Biologije na biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a 2020. godine započinjem diplomski studij Molekularne biologije na istom odsjeku. Tijekom studiranja sudjelovala sam na znanstveno popularnim radionicama „Noć biologije“ u sklopu manifestacije „Dan i noć na PMF-u“ i u organizaciji projekta „*Women in Science*“. Studentsku praksu u trajanju od tri mjeseca u sklopu *Erasmus +* projekta odradila sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Ljubljani pri Zavodu za biokemiju i molekularnu genetiku.

Prilog 1. Patohistološke karakteristike analiziranih uzoraka intrakranijalnih meningeoma te rezultati analize statusa metilacije promotora gena *NOTCH2* i ekspresije proteina NOTCH2 u stanicama analiziranih tumorskih žarišta.

Uzorak	Patohistološki gradus	Dob	Spol	Metilacija promotora	IRS vrijednost NOTCH2
T243	II	73	M	UM	12
T266	III	67	M	UM	/
T268	I	64	Ž	UM	12
T269	I	66	M	UM	9
T272	I	66	M	UM	8
T276	I	58	Ž	UM	6
T285	I	68	Ž	UM	4
T291	I	55	Ž	UM	8
T294	I	78	Ž	UM	8
T297	I	77	M	UM	12
T324	I	48	Ž	UM	8
T325	I	43	Ž	UM	8
T328	I	37	Ž	UM	6
T331	II	60	M	M	8
T334	I	59	Ž	UM	8
T430	II	40	M	M	4
T451	II	38	Ž	M	8
T452	II	64	Ž	M	12
T453	II	76	M	UM	8
T454	II	69	M	M	12
T455	II	57	M	M	12
T456	II	64	M	M	4
T458	II	70	Ž	M	12
T459	II	30	Ž	M	12
T460	II	67	M	UM	8
T461	II	73	M	UM	6
T462	II	58	Ž	M	12
T479	III	23	Ž	UM	12
T481	III	85	M	UM	9
T482	III	74	Ž	UM	12
T434	I	64	Ž	UM	12
T435	I	66	Ž	UM	4
T436	I	83	Ž	UM	8
T437	I	69	Ž	UM	8
T438	I	48	Ž	UM	3
T441	I	59	Ž	UM	12
T405	I	57	Ž	UM	8
T600	I	71	Ž	UM	4
T602	I	76	M	UM	12
T603	I	31	Ž	UM	12

<b>T604</b>	II	56	M	UM	12
<b>T605</b>	II	17	Ž	UM	2
<b>T606</b>	II	71	Ž	UM	2
<b>T607</b>	III	44	Ž	UM	8
<b>T608</b>	I	40	M	UM	8
<b>T439</b>	I	66	M	M	1