

# Utjecaj metilacijskog statusa promotora gena APC na aktivnost beta-ksenina u meningeomima različitih gradusa

---

Katić, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:217:244401>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-05**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Matea Katić

**Utjecaj metilacijskog statusa promotora gena  
*APC* na aktivnost  $\beta$ -katenina u  
meningeomima različitih gradusa**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.



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 magistra eksperimentalne biologije.

## **Zahvale**

*„La curiosidad es algo que todos tenemos de niños, un investigador es alguien que logra conservarla de adulto.”*

*Ervin Neher*

*U izradu ovog diplomskog rada, kao i u sve ove predivne godine provedene na fakultetu pokušala sam ugraditi najbolji dio sebe, a jesam li u tome uspjela pokazat će vrijeme. Svaki trenutak na ovom putu, bio radostan ili tužan, posvećujem svojim divnim roditeljima, Ivanu i Mariji, koji su oduvijek bili moja snaga i izvor bezuvjetne potpore. Hvala vam što postojite i što ste mi dali ljubav i obitelj, moje najdraže sestre, Martinu i Ivanu, koje su uvijek moje sigurno i najposebnije utočište u najtežim trenutcima.*

*Posebnu zahvalu dugujem mojoj najdražoj prijateljici Marini. Hvala ti što si me razumjela kada drugi to nisu znali niti mogli i hvala ti za svaki nezaboravni trenutak u proteklih 10 godina.*

*Dragoj strini Ines, stricu Buci i Mariji hvala na svojoj potpori i ljubavi tijekom svih godina mog obrazovanja.*

*Ovaj rad ne bi nastao bez entuzijazma i nepokolebljive volje moje komentorice dr. sc. Anje Bukovac, kojoj od svega srca zahvaljujem na uloženom trudu i potpori te svom znanju koje je srdačno dijelila sa mnom svaki dan.*

*Zahvaljujem se i prof. dr. sc. Nives Pećini-Šlaus na ukazanom povjerenju i mogućnosti za izradu ovog diplomskog rada u Laboratoriju za neuroonkologiju, kao i prof. dr. sc. Dubravki Hranilović na uloženom vremenu i svim savjetima koji su učinili ovaj rad boljim.*

*Dragi moj Prijatelju, hvala Ti što nikad ne puštaš moju ruku na ovom nepredvidivom putu.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Utjecaj metilacijskog statusa promotora gena *APC* na aktivnost $\beta$ -katenina u meningeomima različitih gradusa

Matea Katić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Meningeomi su primarni tumori središnjeg živčanog sustava klasificirani u 15 podgrupa unutar tri histološka gradusa. Najveći broj ovih tumora karakterizira spori rast i niska stopa pojavnosti recidiva, dok tek manji broj njih pokazuje agresivno ponašanje s višom stopom pojavnosti recidiva i manjim preživljenjem. Aktivacija kanonskog signalnog puta Wnt, koja vodi translokaciji  $\beta$ -katenina u jezgru gdje isti sudjeluje u aktivaciji transkripcije ciljnih onkogeni, smatra se važnim događajem u tumorigenezi meningeoma. Protein APC negativni je regulator signalnog puta Wnt/ $\beta$ -katenin, a sudjeluje u citoplazmatskom destruktivskom kompleksu čija je uloga fosforilacija  $\beta$ -katenina te njegovo usmjeravanje na proteasomalnu razgradnju. Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati ulogu metilacije promotora 1A gena *APC* na aktivaciju signalnog puta Wnt/ $\beta$ -katenin. U ovom istraživanju metilacija promotora 1A gena *APC* bila je kasni događaj u tumorigenezi meningeoma povezan s malignim oblikom, odnosno gradusom III ( $p=0,000$ ). Analiza unutarstanične ekspresije i lokalizacije proteina  $\beta$ -katenina nije otkrila povezanost metilacije promotora gena *APC* i ekspresije  $\beta$ -katenina. Ipak, translokacija  $\beta$ -katenina u jezgre bila je vezana uz atipične meningeome ( $p=0,002$ ). Rezultati ovog istraživanja sugeriraju aktivaciju i ulogu signalnog puta Wnt u progresiji meningeoma, u čijoj podlozi metilacija promotora tumor supresor gena *APC* nije nužno jedinstven događaj te upućuju na mogućnost sudjelovanja drugih mehanizama utišavanja njegove ekspresije.

Ključne riječi: intrakranijalni meningeomi, tumor supresor gen *APC*, signalni put Wnt/ $\beta$ -katenin, metilacija promotora 1A gena *APC*.

(48 stranica, 15 slika, 4 tablice, 62 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Dubravka Hranilović, prof. dr. sc.

Komentor: Anja Bukovac, dr. sc.

Ocjenitelji: Dubravka Hranilović, prof. dr. sc.

Biljana Balen, prof. dr. sc.

Nada Oršolić, prof. dr. sc.

Rad prihvaćen: 10.11.2022. godine

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

### Effect of *APC* promoter gene methylation on $\beta$ -catenin activity in different meningioma grades

Matea Katić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Meningioma are primary neoplasms of the central nervous system classified into 15 subgroups within three histological grades. Mostly these tumors are benign with low recurrence rates, but some might display aggressive behavior causing frequent relapse and lower rates of overall survival. Canonical Wnt signaling activation, which leads to  $\beta$ -catenin nuclear translocation where it acts as transcriptional coactivator, is found to be important oncogenic event in meningioma tumorigenesis. APC protein is a negative Wnt/ $\beta$ -catenin regulator, taking part in cytoplasmic destruction complex that phosphorylates and targets  $\beta$ -catenin for proteasomal destruction. The aim of this master thesis was to examine the role of *APC* gene promoter 1A hypermethylation in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling activation. The results indicate that *APC* gene promoter 1A methylation is event distinctive to anaplastic meningioma ( $p=0,000$ ), but no  $\beta$ -catenin was found in tumor cells of meningioma samples with previous determined methylation pattern. The results also indicate connection between atypical meningioma and  $\beta$ -catenin nuclear translocation ( $p=0,002$ ). These results presume the involvement of Wnt signaling pathway in meningioma progression but cannot confirm that *APC* gene promoter methylation is unique event in Wnt activation, suggesting the role of other mechanisms of gene silencing.

Keywords: intracranial meningioma, tumor suppressor gene *APC*, Wnt/ $\beta$ -catenin, *APC* gene promoter 1A methylation

(48 pages, 15 figures, 4 tables, 62 references, original in: Croatian)  
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Dubravka Hranilović, Prof. dr. sc.  
Co-mentor: Anja Bukovac, dr. sc.

Reviewers: Dubravka Hranilović, Prof. dr. sc.

Biljana Balen, Prof. dr. sc.

Nada Oršolić, Prof. dr. sc.

Thesis accepted: 10<sup>th</sup> November 2022

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Meningeomi- tumori središnjeg živčanog sustava.....	1
1.1.1. Populacijska statistika i etiologija meningeoma.....	2
1.1.2. Patohistološka obilježja i klasifikacija meningeoma.....	3
1.2. Genetske promjene u podlozi nastanka i progresije meningeoma.....	5
1.3. Epigenetske promjene u podlozi nastanka i progresije meningeoma.....	7
1.4. Signalni put Wnt u tumorigenezi meningeoma.....	10
1.4.1. Kanonski signalni put Wnt.....	10
1.4.2. $\beta$ -katenin.....	13
1.4.3. Tumor supresor gen <i>APC</i> .....	14
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	16
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	17
3.1. Uzorci intrakranijalnih meningeoma.....	17
3.2. Izolacija genomske DNA iz tkiva tumora meningeoma metodom fenol/kloroform.....	18
3.3. Određivanje čistoće i koncentracije genomske DNA izolirane iz tkiva tumora.....	19
3.4. Bisulfitna konverzija genomske DNA izolirane iz tkiva tumora.....	20
3.5. Umnažanje sekvence promotora 1A gena <i>APC</i> metodom lančane reakcije polimerazom ovisne o metilaciji.....	21
3.6. Analiza produkata MS-PCR reakcije elektroforezom u agaroznom gelu.....	23
3.7. Detekcija aktivne forme proteina $\beta$ -katenina metodom imunohistokemije.....	23
3.8. Analiza imunohistokemijske detekcije aktivne forme proteina $\beta$ -katenina.....	25
3.9. Statističke metode obrade rezultata.....	26
<b>4. REZULTATI</b> .....	27
4.1. Analiza demografskih i patohistoloških podataka uzoraka intrakranijalnih meningeoma..	27
4.2. Rezultati analize obrasca metilacije promotora 1A gena <i>APC</i> u uzorcima intrakranijalnih meningeoma različitih gradusa.....	28
4.3. Rezultati analize ekspresije i unutarstanične lokalizacije NON-P- $\beta$ u uzorcima intrakranijalnih meningeoma različitih gradusa.....	30
<b>5. RASPRAVA</b> .....	37
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	41
<b>7. LITERATURA</b> .....	42
<b>8. ŽIVOTOPIS</b> .....	48

## KRATICE

ABCs, engl. *Arachnoid border cells*, arahnoidalne granične stanice

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

APC, engl. *Adenomatous polyposis coli*, adenomatozna polipoza kolona

APC-1A, engl. *Adenomatous polyposis coli 1A promoter*, adenomatozna polipoza kolona promotor 1A

AXIN, engl. *Axis Inhibition Protein*, aksin

BRG-1, engl. *Brahma Related Gene-1*

CBP, engl. *CREB Binding Protein*

CK1, engl. *Casein kinase I*, kazein kinaza I

CTNNB1, engl. *Catenin beta 1*, katenin beta 1

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

DBCs, engl. *Dural border cells*, duralne granične stanice

DNMT, engl. *DNA methyltransferase*, DNA metiltransferaza

Dvl, engl. *Dishevelled*

EMT, engl. *epithelial - mesenchymal transition*, epitelno-mezenhimska tranzicija

Fzd, engl. *Frizzled*

GSK3 $\beta$ , engl. *Glycogen synthase kinase 3 $\beta$* , kinaza sintaze glikogena 3 $\beta$

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

HRP, engl. *Horseradish Peroxidase*, hrenova peroksidaza

IRS, engl. *Immunoreactivity Score*, indeks obojenja

KLF4, engl. *Kruppel like factor 4*

LRP5/6, engl. *Low density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6*, protein sličan receptoru LDL-a

MC, engl. *methylation class*, metilacijska grupa

miRNA, engl. *microRNA*, mikroRNA

mRNA, engl. *messenger RNA*, glasnička RNA

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

NF2, engl. *Neurofibromin 2*, neurofibromin 2



NGS, engl. *next generation DNA sequencing*, sekvenciranje nove generacije

NON-P- $\beta$ , nefosforilirani ili aktivni oblik  $\beta$ -katenina

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

PCR, engl. *polymerase chain reaction*, lančana reakcija polimerazom

PDGS, engl. *Prostaglandin D2 synthase*

RSC, engl. engl. *Remodel the Structure of Chromatin*

SAM, S-adenozil metionin

SMO, engl. *Smoothened*, frizzled class receptor

SZO, Svjetska zdravstvena organizacija

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

SWI/SNF, engl. *SWItch/Sucrose Non-Fermentable complex*

TAE, pufer engl. *Tris-acetate-EDTA buffer*

TCF/LEF, engl. *T-Cell-Specific Transcription Factor/Lymphoid Enhancer Binding Factor 1*

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

TIMP3, engl. *TIMP metalloproteinase inhibitor 3*

TET, engl. *Ten-Eleven Translocation*

TLE, engl. *transducin-like enhancer*

TRAF7, engl. *TNF receptor associated factor 7*

WHO, engl. *World Health Organization*, Svjetska zdravstvena organizacija

Wnt, engl. *Wingless*

XIAP, engl. *X-linked inhibitor of apoptosis*

$\beta$ -TrCP, engl.  *$\beta$ -transducin repeat containing protein*

# 1. UVOD

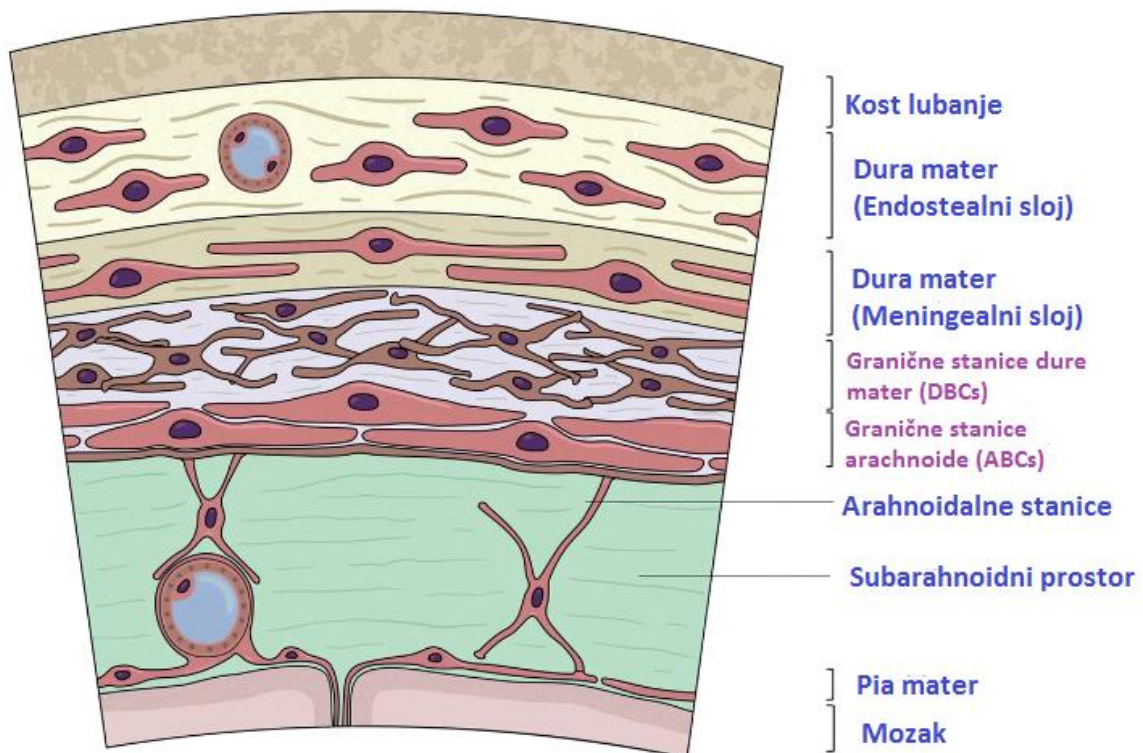
## 1.1. Meningeomi- tumori središnjeg živčanog sustava

Meningeomi su primarni tumori središnjeg živčanog sustava (SŽS, engl. *Central Nervous System*, CNS), a prema lokaciji u SŽS-u dijele se na intrakranijalne i spinalne. Najveći broj ovih neoplazija (80%) karakterizira spori rast i benignost, dok tek manji broj (20%) ispoljava obrasce brzog rasta uz značajnu stopu pojavnosti recidiva (Bi i sur. 2016b; Birzu i sur. 2020). Izraz „meningeomi“ prvi je upotrijebio Harvey Cushing 1922. godine kako bi opisao grupu patohistološki različitih neoplazija, ranije smatranih epiteliomima *dure mater* (tvrda moždana ovojnica). Tom prilikom Cushing zaključuje kako, usprkos vrlo velikoj patohistološkoj raznolikosti, meningeomi dijele zajedničko porijeklo, a njihova izvorišta nalaze se u nakupinama mezotelijalnih stanica paučinaste moždane ovojnice (arachnoidea), jedne od triju moždanih ovojnica (meningi) koje osiguravaju zaštitu središnjeg živčanog sustava (Cushing 1922).

Danas je poznato kako proces tumorigeneze, koji vodi nastanku meningeoma, najvjerojatnije započinje u progenitorskim stanicama iz kojih nastaju arahnoidalne (meningotelijalne) stanice (engl. *Arachnoidal cap cells*). Ove stanice smještene su na vanjskoj površini središnje paučinaste moždane ovojnice, a istraživanjem njihove biologije utvrđeno je kako pripadaju podgrupi arahnoidalnih stanica koje karakterizira visoka stopa staničnog metabolizma (Delgado-López i sur. 2020). Njihova osnovna uloga je reapsorpcija cerebrospinalne tekućine zbog čega su im potrebne jake međustanične veze, koje postižu obiljem dezmosoma, te fleksibilnost koju im omogućavaju adherentni spojevi i molekule E-kadherina (Pećina-Šlaus i sur. 2016a).

Ipak, novija *in vivo* istraživanja na mišjim modelima predlažu kako meningeomi nastaju iz meningealnih prekursorskih stanica koje eksprimiraju prostaglandin D2 sintetazu (engl. *Prostaglandin D2 synthase*, PDGS), enzim odgovoran za sintezu prostaglandina D2 u SŽS-u. Tijekom razvoja moždanih ovojnica kod miša zajednička prekursorska PDGS eksprimirajuća stanica može se diferencirati u arahnoidalne granične stanice (engl. *Arachnoid border cells*, ABCs) te u duralne granične stanice (engl. *Dural border cells*, DBCs) (Slika 1) (Boetto i sur. 2021). Istraživanjem na PDGS eksprimirajućim stanicama uočeno je kako inicijacija tumorigeneze, inaktivacijom gena *NF2* (engl. *neurofibromin 2*), dovodi do razvoja meningotelijalnog meningeoma (iz ABC stanica) te fibroznog meningeoma (iz DBC stanica) (Kalamarides i sur. 2011; Boetto i sur. 2021).

Međutim, do danas nije postignut konsenzus oko stanica u kojima se događa inicijacija tumorigeneze meningeoma, a nova istraživanja su okrenuta rasvjetljavanju ovog pitanja.



**Slika 1.** Shematski prikaz rasporeda moždanih ovojnica te pripadajućih slojeva stanica (preuzeto i prilagođeno prema Boetto i sur. 2021).

### 1.1.1. Populacijska statistika i etiologija meningeoma

Meningeomi čine 36% svih primarnih tumora središnjeg živčanog sustava kod odraslih, sa srednjom životnom dobi pri postavljanju dijagnoze od 65 godina i značajnim porastom incidencije u starijoj životnoj dobi (Louis i sur. 2016a; Delgado-López i sur. 2020). Dob u trenutku postavljanja dijagnoze ima značajan utjecaj na preživljenje. Petogodišnje preživljenje za pacijente u dobnoj skupini 22 – 44 godine iznosi 85,2% dok za pacijente starije od 75 godina ono iznosi tek 29,1%. Meningeomi su izuzetno rijetki kod djece i adolescenata s incidencijom od svega 2,8% (Louis i sur. 2016a; Pećina-Šlaus i sur. 2016a).

Učestalost pojavnosti ovih neoplazija veća je kod žena s omjerom 3:1 za intrakranijalne te 9:1 za spinalne meningeome, no s obzirom na učestalije obolijevanje muškaraca od meningeoma gradusa II i III ta dominacija nestaje kod dijagnoze viših gradusa meningeoma (Louis i sur. 2016a; Pećina-Šlaus i sur. 2016a). Smatra se kako su za veću učestalost pojavnosti meningeoma kod žena odgovorni spolni hormoni, estrogeni i progesteron, za koje tumorske stanice meningeoma eksprimiraju funkcionalne receptore (Pećina-Šlaus i sur. 2016a; Delgado-López i sur. 2020). Sukladno tomu, najveća učestalost

pojavnosti meningeoma zamijećena je kod žena u dobnoj skupini 35 – 44 godine, s omjerom od 15:1 u odnosu na muškarce (Louis i sur. 2016a). Utvrđeno je, također, kako dolazi do značajnog rasta tumorske mase tijekom trudnoće, lutealne faze menstruacijskog ciklusa te primanja zamjenske hormonske terapije. Usprkos ovim saznanjima, inhibicija steroidnih receptora, kao oblik liječenja meningeoma, nije pokazala klinički uspjeh (Wiemels i sur. 2010; Delgado-López i sur. 2020). Iako su spolni hormoni faktor rizika za razvoj meningeoma, ionizirajuće zračenje se smatra glavnim uzrokom razvoja ovih neoplazija. Najčešći izvor ionizirajućeg zračenja, povezan s većim rizikom za obolijevanje od meningeoma, je radioterapija (pogotovo u ranoj životnoj dobi), a period između prvog izlaganja ionizirajućem zračenju i pojave prvih simptoma ili postavljanja dijagnoze može iznositi između 20 i 30 godina (Wiemels i sur. 2010; Delgado-López i sur. 2020).

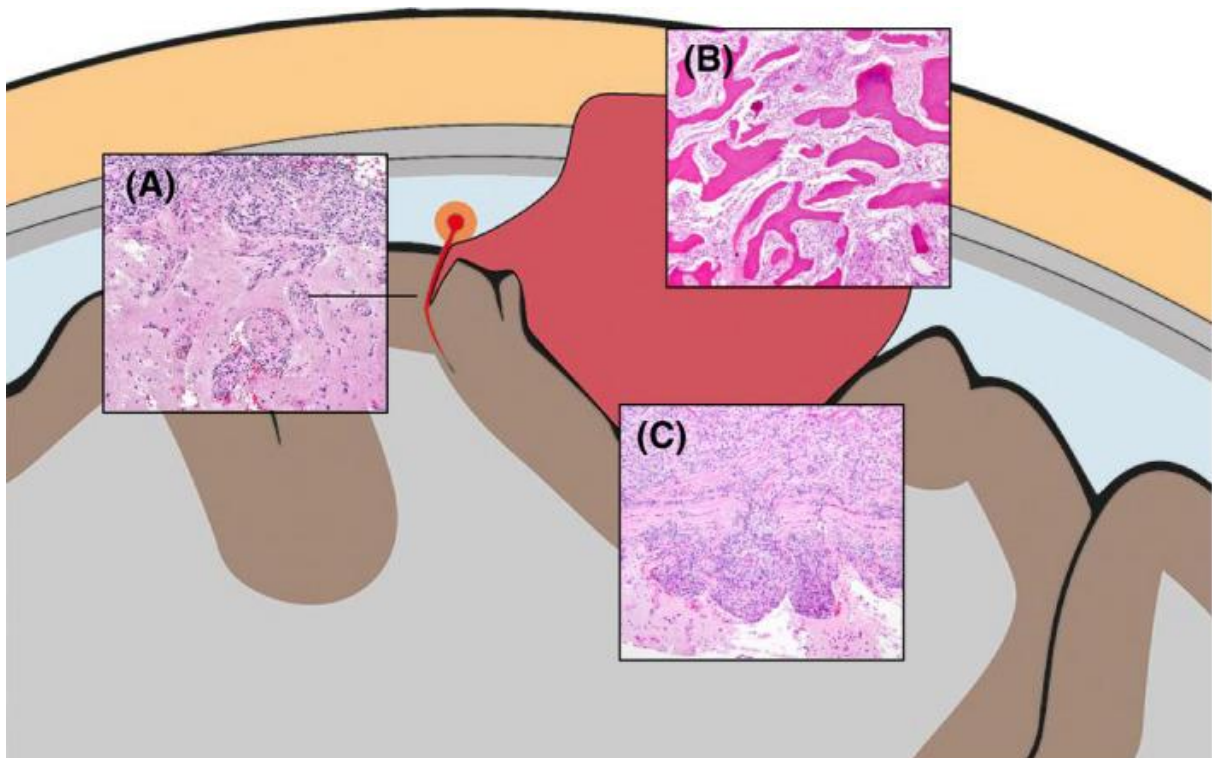
### 1.1.2. Patohistološka obilježja i klasifikacija meningeoma

Prema klasifikaciji primarnih tumora središnjeg živčanog sustava Svjetske zdravstvene organizacije (SZO, engl. *World Health Organization*, WHO) iz 2016. godine, meningeomi obuhvaćaju 15 patohistoloških podtipova raspoređenih u tri histološka gradusa (Louis i sur. 2016b).

Meningeomi gradusa I smatraju se benignim, spororastućim lezijama. Čine oko 90% svih meningeoma uz vrlo malu stopu pojavnosti recidiva (kod 7-25% pacijenata). U ovu skupinu meningeoma ubraja se devet patohistoloških podtipova: meningotelijalni, fibrozni, tranzicionalni (mješani), psamomatozni, angiomatozni, mikrocistični, sekretorni, metaplastični te meningeomi bogati limfoplazmacitima. Meningeome gradusa I karakterizira niski mitotički indeks, manje od četiri mitoze u 10 vidnih polja velikog povećanja (engl. *High power field*, HPF), te petogodišnje preživljenje od 92% (Bi i sur. 2016a; Louis i sur. 2016a; Pećina-Šlaus i sur. 2016a; Delgado-López i sur. 2020). Preporučeni oblik terapije uključuje kirurško odstranjivanje tumora, a radioterapija se koristi tek u slučajevima kada nije moguće odstraniti tumorsku masu u potpunosti ili u slučaju pojave recidiva (Marosi i sur. 2008).

Atipični meningeomi ili meningeomi gradusa II čine 20-25% svih meningeoma. U ovu skupinu meningeoma ubrajaju se tri patohistološka podtipa: atipični, hordoidni te meningeomi svijetlih stanica. Mitotički indeks za meningeome gradusa II iznosi 4-19 mitozu u 10 vidnih polja velikog povećanja, a prilikom klasificiranja meningeoma u gradus II važno je da isti zadovoljavaju barem tri od pet sljedećih patohistoloških obilježja: rast bez uočljivog uzorka, spontana nekroza, visoki odnos jezgra/citoplazma, uočljive jezgrice ili iznimno veliki broj malih stanica (engl. *cellularity*). Petogodišnje preživljenje za atipične meningeome iznosi 78% (Bi i sur. 2016a; Louis i sur. 2016a; Pećina-Šlaus i sur. 2016a; Delgado-López i sur. 2020). Učestalost pojavnosti recidiva znatno je veća u odnosu na benigne meningeome te iznosi 29-52% (Louis i sur. 2016a). Smatra se da je za značajnu stopu pojavnosti recidiva kod atipičnih

meningeoma odgovorna invazivnost u okolno tkivo (moždane ovojnice, kost ili tkivo mozga) (Slika 2). Klasifikacija primarnih tumora središnjeg sustava SZO-a iz 2016. godine, stoga, predlaže primjenu kriterija prema kojem je prisutnost invazije okolnog tkiva dostatan parametar za uvrštavanje meningeoma u gradus II (Louis i sur. 2016b; Banan i sur. 2021). Učestalija pojavnost recidiva često zahtijeva i primjenu radioterapije kao oblika adjuvantnog liječenja nakon kirurškog odstranjivanja tumorske mase (Marosi i sur. 2008).



**Slika 2.** Shematski prikaz mogućih mjesta invazije tumorske mase meningeoma u okolno tkivo. **(A)** invazija u područje perivaskularnog prostora (prostor Virchow-Robin), **(B)** invazija u tkivo kosti, **(C)** invazija u tkivo mozga (preuzeto iz von Spreckelsen i sur. 2022).

Premda najmanje zatupljeni, s tek 1-6%, meningeomi gradusa III (anaplastični) imaju puno zahtjevniju kliničku sliku koja može uključivati prisutnost intrakranijalnih metastaza, te izuzetno visoku pojavnost recidiva (kod 50-94% pacijenata). Ekstrakranijalne metastaze su izuzetno rijetke (0,1% meningeoma gradusa III), a najčešće se pojavljuju u tkivu pluća (Louis i sur. 2016a; Delgado-López i sur. 2020). Meningeomi gradusa III obuhvaćaju tri patohistološka podtipa: papilarni, rabdoidni te anaplastični, a karakterizira ih petogodišnje preživljenje od 47%. Patohistološki kriteriji važni za klasifikaciju meningeoma u gradus III uključuju više od 20 mitozu u 10 vidnih polja velikog povećanja,

postojanje jasne anaplazije uz citološke odlike koje odgovaraju karcinomima, melanomima ili sarkomima te invazivnost u okolno tkivo mozga (Bi i sur. 2016a; Pećina-Šlaus i sur. 2016a). Liječenje meningeoma gradusa III uključuje kirurško odstranjivanje tumorske mase nakon čega vrlo često slijedi radioterapija (Marosi i sur. 2008).

Klasifikacija meningeoma prema kriterijima SZO-a temelji se najvećim dijelom na određivanju patohistološke morfologije tumorskog tkiva što ne može učinkovito predvidjeti tijek bolesti, invaziju okolnog tkiva te pojavnost recidiva ili metastaza. Stoga, danas svjedočimo sve većoj tendenciji uvođenja i molekularne klasifikacije meningeoma, a dosadašnja saznanja o genetskim promjenama u podlozi nastanka i progresije meningeoma uvrštena su u klasifikaciju primarnih tumora središnjeg živčanog sustava SZO-a iz 2016. godine (Bi i sur. 2016a; Louis i sur. 2016b; Delgado-López i sur. 2020).

## 1.2. Genetske promjene u podlozi nastanka i progresije meningeoma

Istraživanja familijarnog sindroma neurofibromatoze tipa 2 ponudila su prvi uvid u ulogu genetskih promjena u nastanku meningeoma (Bi i sur. 2016b; Lee i sur. 2019). Neurofibromatoza tipa 2 je rijedak sindrom koji se nasljeđuje autosomalno dominantno s incidencijom od 1/33 000 novorođenčadi, a oboljeli u 50 – 70% slučajeva razvijaju višestruke (multiple) meningeome (Bi i sur. 2016a; Lee i sur. 2019). Uzrok ovog sindroma je gubitak funkcije tumor supresor gena *NF2* (engl. *neurofibromin 2*), koji se nalazi na dugom kraku kromosoma 22 (22q12.2). Funkcionalni gen *NF2* kodira protein merlin koji ima važnu ulogu u povezivanju stanične membrane s elementima citoskeleta, ali i u održavanju mehanizama kontaktne inhibicije, koji sprječavaju proliferaciju stanica (Bi i sur. 2016b; Bachir i sur. 2021).

Mutacije lokusa *NF2*, delecija alela, pogreške u posttranskripcijskom prekrajanju (engl. *splicing*) te gubitak segmenta ili cijelog kromosoma 22 s lokusom za gen *NF2* (22q12.2) prisutne su u 50 – 60% sporadičnih meningeoma (Bi i sur. 2016b; Delgado-López i sur. 2020). Ranije spomenuta istraživanja o staničnom porijeklu meningeoma pokazala su da inaktivacijom gena *NF2* u prekursorskim PDGS ekspimirajućim stanicama dolazi do razvoja meningotelijalnog meningeoma (gradus I) i fibroznog meningeoma (gradus I) što je još jedan dokaz njegove uloge kao pokretača tumorigeneze meningeoma (engl. *driver gene*) (Kalamarides i sur. 2011; Bi i sur. 2016b). Meningeomi s disfunkcionalnim genom *NF2* najčešće su u skupini atipičnih meningeoma (gradus II), a najčešća genska promjena, koja vodi ka gubitku funkcije gena, je gubitak kromosoma 22 (89% meningeoma s mutacijom gena *NF2*), a slijedi je delecija lokusa *NF2* (44% meningeoma s mutacijom gena *NF2*) (Cordova i Kurz 2020).

Metode sekvenciranja nove generacije (engl. *next generation DNA sequencing*, NGS) ponudile su uvid u genetske promjene uključene u nastanak i progresiju sporadičnih meningeoma koji nemaju utvrđenu mutaciju lokusa *NF2* ili gubitak kromosoma 22, što čini oko 40% svih meningeoma različitih

gradusa (Bi i sur. 2016b). Neke od najčešćih mutacija identificiranih u meningeomima različitih gradusa navedene su u nastavku.

Mutacije gena *TRAF* (engl. *Tumor necrosis factor receptor associated factor 7*) druge su najučestalije mutacije s pojavnošću u 25% meningeoma (Birzu i sur. 2020). Protein TRAF uključen je u humoralni stanični odgovor stečene i urođene imunosti, a djeluje kao citoplazmatska regulatorna molekula u kaskadi prijenosa signala signalnog puta TNF. Gen *TRAF* smješten je na kraćem kraku kromosoma 16 (16p13.3), a mutacije eksona 13 – 20 visoko su specifične za meningeome (Pereira i sur. 2019).

Tumor supresor gen *KLF4* (engl. *Kruppel-like factor 4*) smješten je na dugom kraku kromosoma 9 (9q31), a njegov protein uključen je u regulaciju transkripcijske aktivnosti te reprogramiranje diferenciranih somatskih stanica u pluripotentne stanice (Bi i sur. 2016b; Pereira i sur. 2019). Oko 15% meningeoma gradusa I ima mutaciju pogrešnog smisla (engl. *missense*) koja rezultira zamjenom lizina s glutaminskom kiselinom u kodonu 409 (K409Q), što za posljedicu ima pojačanu aktivnost signalnog puta HIF-1 $\alpha$  uključenog u kontrolu stanične hipoksije (Bi i sur. 2016b; von Spreckelsen i sur. 2020).

Kod 6,8% meningeoma identificirana je mutacija protoonkogeno *AKT1* (engl. *AKT serine/threonine kinase 1*). Ovaj gen, smješten na dužem kraku kromosoma 14 (14q32), kodira za enzim serin/treonin kinazu koji je uključen u regulaciju stanične proliferacije, rasta i apoptoze (Bi i sur. 2016b; Birzu i sur. 2020). Mutacija E17K gena *AKT1*, koja uzrokuje zamjenu glutaminske kiseline s lizinom u kodonu 17, poznata je aktivacijska onkogeno mutacija, a kod meningeoma se povezuje s nekontroliranim rastom i učestalijom pojavom recidiva (Bi i sur. 2016b; Birzu i sur. 2020). Navedena mutacija najčešća je u meningotelijalnom podtipu meningeoma (gradus I), a vrlo se rijetko pojavljuje kod meningeoma viših gradusa (Pereira i sur. 2019).

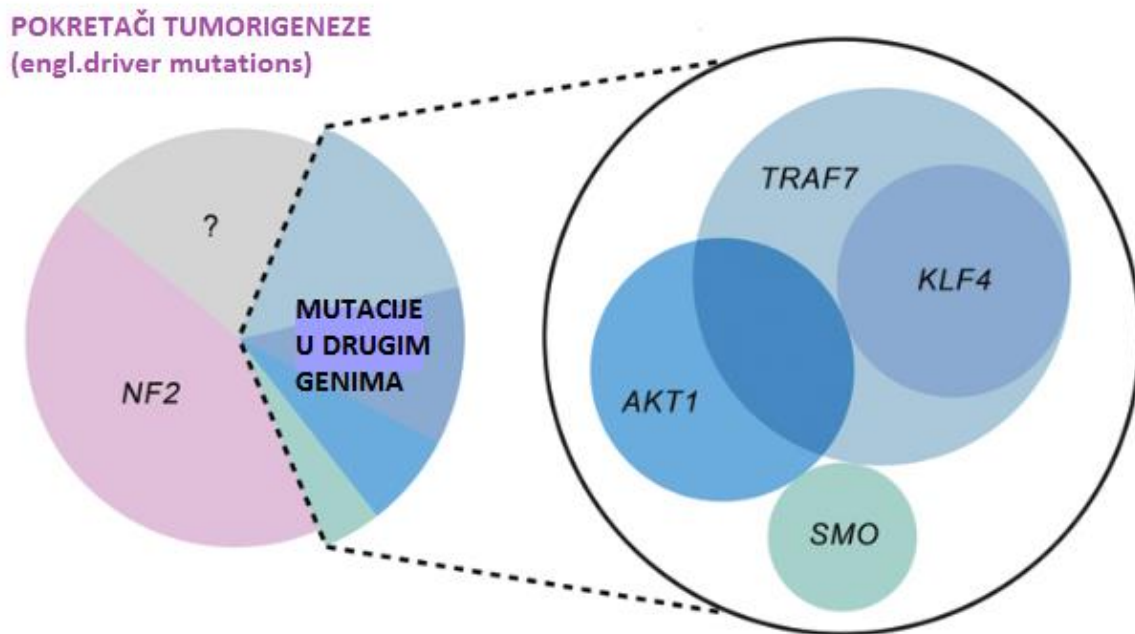
Gen *SMO* (engl. *smoothed, frizzled class receptor*), smješten na dugom kraku kromosoma 7 (7q32.1), kodira receptor iz porodice G-vezujućih proteina, a uključen je u Hedgehog signalni put. Ovaj signalni put uključen je u procese embriogeneze, proliferacije i angiogeneze, a mutacije gena *SMO* pojavljuju se u 3 – 5% svih meningeoma (Bi i sur. 2016b; Pereira i sur. 2019).

Mutacije spomenutih gena rijetko se pojavljuju pojedinačno u određenom patohistološkom tipu meningeoma (Bi i sur. 2016b), a shematski prikaz obrasca njihovog pojavljivanja kod meningeoma gradusa I prikazan je na Slici 3.

Istraživanjima viših gradusa meningeoma uočeno je kako dolazi do značajnih kromosomskih anomalija i aberacija koje se ponajviše odnose na veći ili manji broj kromosoma te gubitak segmenata kromosoma. Kod atipičnih i anaplastičnih meningeoma vrlo često dolazi do gubitka dugog kraka (q) kromosoma 1, 6, 14, 18 te viška dugog kraka kromosoma 1, 9, 12, 15, 17 i 20. Od navedenih aberacija najčešće su gubitak 1q i 14q, a iste su primijećene i kod meningeoma gradusa I nakon pojave recidiva. Kod anaplastičnih meningeoma vrlo često dolazi do gubitka 9q te amplifikacije 17q23. Još uvijek nije



rasvijetljeno jesu li navedene promijene tek pokretači tumorigeneze ili nastaju zbog velike genomske nestabilnosti koja raste progresijom u više graduse (Bi i sur. 2016b, 2016a).



**Slika 3.** Shematski prikaz distribucije različitih mutacija meningeoma gradusa I koji nemaju utvrđenu mutaciju gena *NF2*. Veličina Vennovog dijagrama proporcionalna je učestalosti pronalaska mutacije pojedinog gena kod meninegoma gradusa I. Mutacije gena *KLF4* i *AKT1* preklapaju se s mutacijama gena *TRAF7*, a udio meningeoma gradusa I u kojima se istovremeno pojavljuju navedene mutacije proporcionalan je području preklapanja Vennovih dijagrama (preuzeto i prilagođeno prema Bi i sur. 2016b).

### 1.3. Epigenetske promjene u podlozi nastanka i progresije meningeoma

Metilacija molekule DNA, kovalentne modifikacije N-terminalnih repova histona, remodeliranje kromatina, uvođenje histonskih varijanti kanonskih histona, interakcije nekodirajućih molekula RNA te efekt pozicije gena u interfaznoj jezgri („arhitektura jezgre“) šest je epigenetičkih mehanizama, a najviše istraživani mehanizam kod meningeoma je upravo metilacija DNA. Poznato je kako 77% meningeoma ima barem jedan metilirani gen, dok 25% meningeoma ima tri ili više metiliranih gena (Bi i sur. 2016b). Obrazac metilacije može biti dobar molekularni biljeg za određivanje viših gradusa meningeoma, a jedan od primjera je tumor supresor gen *TIMP3* (engl. *metaloproteinase inhibitor 3*). Ovaj gen odgovoran je za sintezu endogenog inhibitora metaloproteinaza, enzima uključenih u razgradnju proteina. Hipermetilacija gena *TIMP3*, smještenog na dugom kraku kromosoma 22 (22q12), prisutna je kod 67% meningeoma gradusa III, 22% meningeoma gradusa II te 17% meningeoma gradusa I (Bi i sur. 2016b).



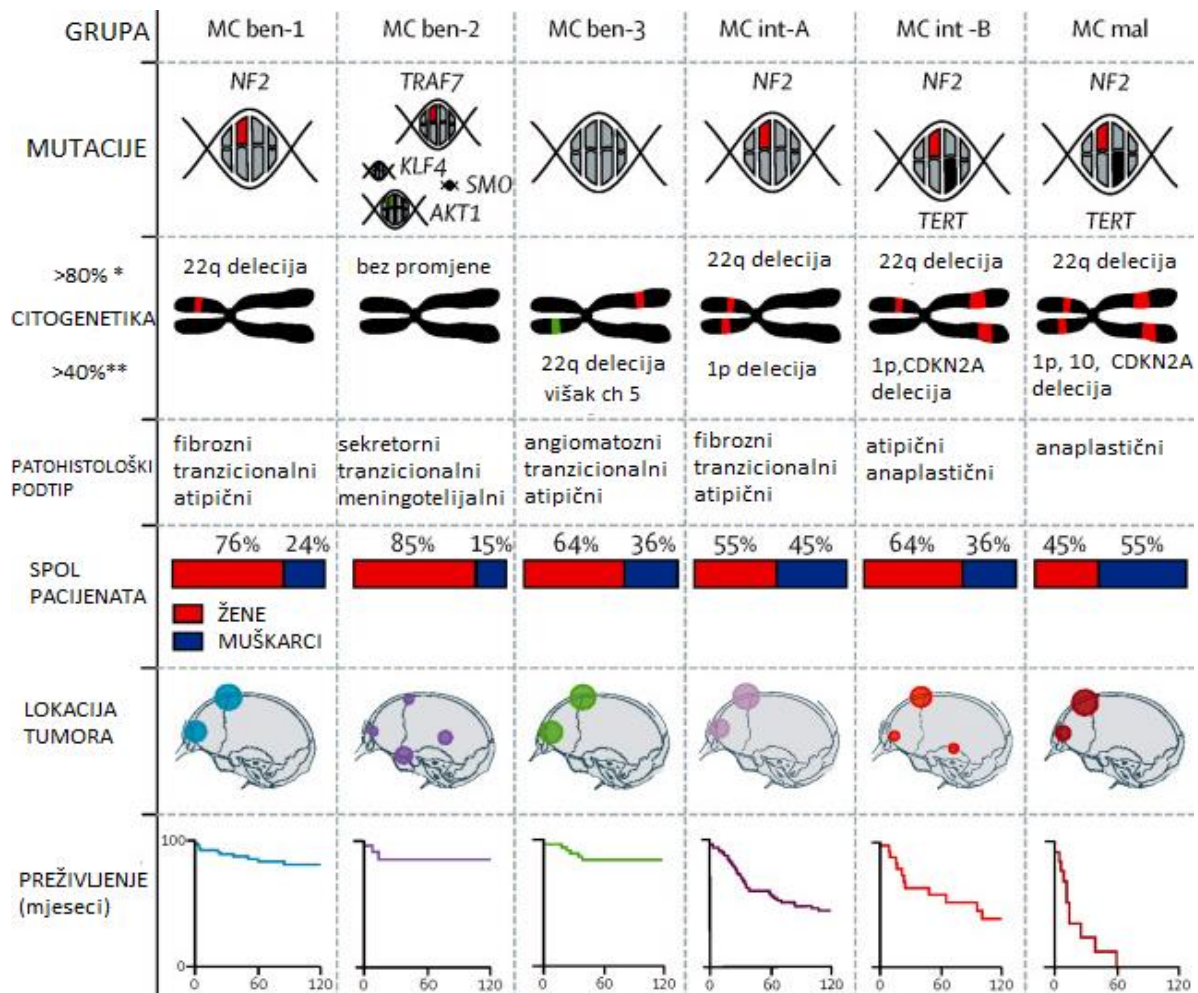
Sahm i sur. (2017), u studiji provedenoj na 497 uzoraka meningeoma različitih histoloških gradusa i patohistoloških podtipova, ispitali su obrazac metilacije, kromosomskih aberacija i mutacije gena za koje je do tada utvrđena povezanost s tumorigenezom meningeoma te predložili podjelu meningeoma u šest metilacijskih grupa (engl. *methylation class*, MC) (Slika 4). Tri metilacijske grupe pripadaju benignim (MC ben-1, MC ben-2, MC ben-3), dvije umjerenim (MC int-A, MC-int-B), a jedna malignim meningeomima (MC mal). Ovakva stratifikacija meningeoma omogućava učinkovitije predviđanje tijeka bolesti i vjerojatnosti pojave recidiva posebno kod pacijenata kod kojih je dijagnosticiran meningeom gradusa I i II, ovisno o klasifikaciji istih u pojedinu metilacijsku grupu (Cordova i Kurz 2020; Delgado-López i sur. 2020).

Iako je metilacija molekule DNA najbolje proučen mehanizam regulacije ekspresije gena, ne smiju se zanemariti i uloge kovalentnih modifikacija histona u ovom procesu. Disregulacija trimetilacije na lizinu (pozicija 27) u histonu H3 (H3K27me3) identificirana je kod brojnih tumora poput karcinoma dojke, karcinoma prostate, karcinoma jajnika te adenokarcinoma debelog crijeva (Pereira i sur. 2019). Kod meninegoma disregulacija H3K27me3 identificirana je u tumorima koji imaju utvrđenu mutaciju gena *AKT1* i *NF2*, a povezuje se s nepovoljnim tijekom bolesti, ali ne nužno s meningeomima gradusa III. Detekcija H3K27me3 imunohistokemijskom analizom pokazala se kao koristan alat prilikom klasifikacije meningeoma u gradus II te kod onih meningeoma čije su patohistološke karakteristike na granici između gradusa I i gradusa II (Pereira i sur. 2019).

Interakcije malih endogenih nekodirajućih molekula RNA (engl. *microRNAs*, miRNA, miRs) s glasničkom molekulom RNA (engl. *messenger RNA*, mRNA) omogućavaju regulaciju ekspresije gena na posttranskripcijskoj razini. Dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je kako miRNA molekule imaju značajnu biološku ulogu u tumorigenezi, regulaciji proliferacije, metastaziranju, invaziji u okolno tkivo te pojavi recidiva kod meningeoma različitih gradusa (Wang i sur. 2020). Katar i sur. (2017) ispitali su povezanost četiri različite miRNA (miR-21, miR-107, miR-137, miR-29b) s meningeomima različitih gradusa. Od četiri istraživane miRNA samo je za miR-21 pokazana značajno veća ekspresija u meningeomima gradusa II i III u usporedbi s meningeomima gradusa I, dok je za miR-107 utvrđena značajno veća ekspresija u meningeomima gradusa I. Za ekspresiju miR-137 i miR-29b nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji kod meningeoma višeg gradusa u odnosu na gradus I. Wang i sur. (2015) identificirali su miR-224 kao potencijalni molekularni biljeg za predviđanje ukupnog preživljenja te vjerojatnosti pojave recidiva kod pacijenata oboljelih od meningeoma. Autori pretpostavljaju kako znatno povećana ekspresija miR-224 suprimira signalni put ERG2-BAK uključen u iniciranje stanične smrti apoptozom, a *in vitro* rezultati inhibicije miR-224 pokazali su kako dolazi do značajnog smanjenja rasta tumorske mase te povećane apoptoze.

Dosadašnja istraživanja genetskih i epigenetskih promjena ponudila su uvid u molekularne mehanizme koji uzrokuju tumorigenezu meningeoma ili kumulativno doprinose progresiji u više

graduse. Ipak, važno je otkriti nove genetske i epigenetske biljege uključene u patogenezu meningeoma, rasvijetliti njihovu ulogu u nastanku i progresiji meningeoma različitih gradusa te ispitati njihov klinički potencijal u predviđanju tijeka bolesti i izboru adekvatne terapije.



**Slika 4.** Klasifikacija meningeoma u metilacijske grupe (MC) prema Sahm i sur. (2017). Klasifikacija uključuje šest grupa od kojih tri pripadaju benignim (MC ben-1, MC ben-2, MC ben-3), dvije umjerenim (MC int-A, MC-int-B) te jedna malignim meningeomima (MC mal). Za svaku grupu određena je prisutnost najučestalijih mutacija i kromosomskih aberacija. U svaku grupu raspodijeljeni su i patohistološki podtipovi meningeoma prema klasifikaciji SZO-a iz 2016. godine. Važno je primijetiti kako su podtipovi gradusa II raspoređeni u svim metilacijskim grupama osim u MC mal, dok su podtipovi gradusa I uglavnom zastupljeni u prve tri skupine (benigni meningeomi) i skupini MC int-A (umjereni meningeomi). Meningeomi gradusa III zastupljeni su samo u skupini MC mal koja obuhvaća maligne meningeome. Za svaku grupu moguće je iščitati i podatke o zastupljenosti spola u pojedinoj grupi, najčešćoj lokaciji tumora te ukupnom preživljenju. \* mutacije su pronađene u više od 80% uzoraka meningeoma; \*\*mutacije su pronađene u više od 40% uzoraka; ch- kromosom; p- kraći krak kromosoma; q- duži krak kromosoma (preuzeto i prilagođeno prema Sahm i sur. 2017).

## 1.4. Signalni put Wnt u tumorigenezi meningeoma

Signalni put Wnt evolucijski je konzerviran signalni put uključen u kontrolu procesa stanične proliferacije, diferencijacije i migracije što ga čini jednim od glavnih medijatora embriogeneze i organogeneze (Sharma i sur. 2021). Osim uloge u navedenim procesima, signalni put Wnt uključen je i u održavanje homeostaze matičnih stanica te proces regeneracije i zacjeljivanja tkiva, a važnu ulogu ima i tijekom razvoja SŽS-a. Tako, komponente ovog signalnog puta djeluju kao medijatori u razvoju aksona i morfogenezi dendrita tijekom ranih faza razvoja mozga (Pećina-Šlaus i sur. 2016a; Parsons i sur. 2021). Mutacije molekula uključenih u kompleksnu kaskadu ovog signalnog puta dovode do aberantnog signaliziranja koje može biti karakteristično za sve faze tumorigeneze: inicijaciju, progresiju ili malignu transformaciju (Yu i sur. 2021). Prvi dokaz uključenosti signalnog puta Wnt u proces tumorigeneze datira iz 1982. godine kada je otkriven protoonkogen *int1* (*Wnt1*) čija je aberantna ekspresija u stanicama dojke miša, uzrokovala pojavu hiperplazije i tumorskih tvorbi (Zhan i sur. 2016; Sharma i sur. 2021). Do danas, aberantna aktivnost signalnog puta Wnt identificirana je u brojnim tumorima poput karcinoma debelog crijeva, karcinoma dojke, karcinoma jetre i pluća, melanoma, leukemije te meningeoma (Pećina-Šlaus i sur. 2016a; Zhan i sur. 2016; Parsons i sur. 2021).

Općenito, signalni put Wnt može biti ovisan o  $\beta$ -kateninu (kanonski) ili neovisan o  $\beta$ -kateninu (nekanonski), no oba oblika u konačnici rezultiraju pokretanjem transkripcije ciljnih gena. Kanonski signalni put Wnt (Wnt/ $\beta$ -katenin) najbolje je istražen oblik ovog važnog signalnog puta kako u zdravim tkivima tako i u tumorima (Zhan i sur. 2016), a njegovi glavni akteri predmet su istraživanja prikazanog u ovom diplomskom radu.

### 1.4.1. Kanonski signalni put Wnt

Aktivacija signalnog puta Wnt/ $\beta$ -katenin u zdravim stanicama postiže se preciznom koordinacijom triju faza: vezanje liganda Wnt za receptore u staničnoj membrani, inhibicija citoplazmatskog destruktivnog kompleksa uz nakupljanje  $\beta$ -katenina u citosolu i translokacija transkripcijskog koaktivatora  $\beta$ -katenina u jezgu (Slika 5) (Pećina-Šlaus i sur. 2016a).

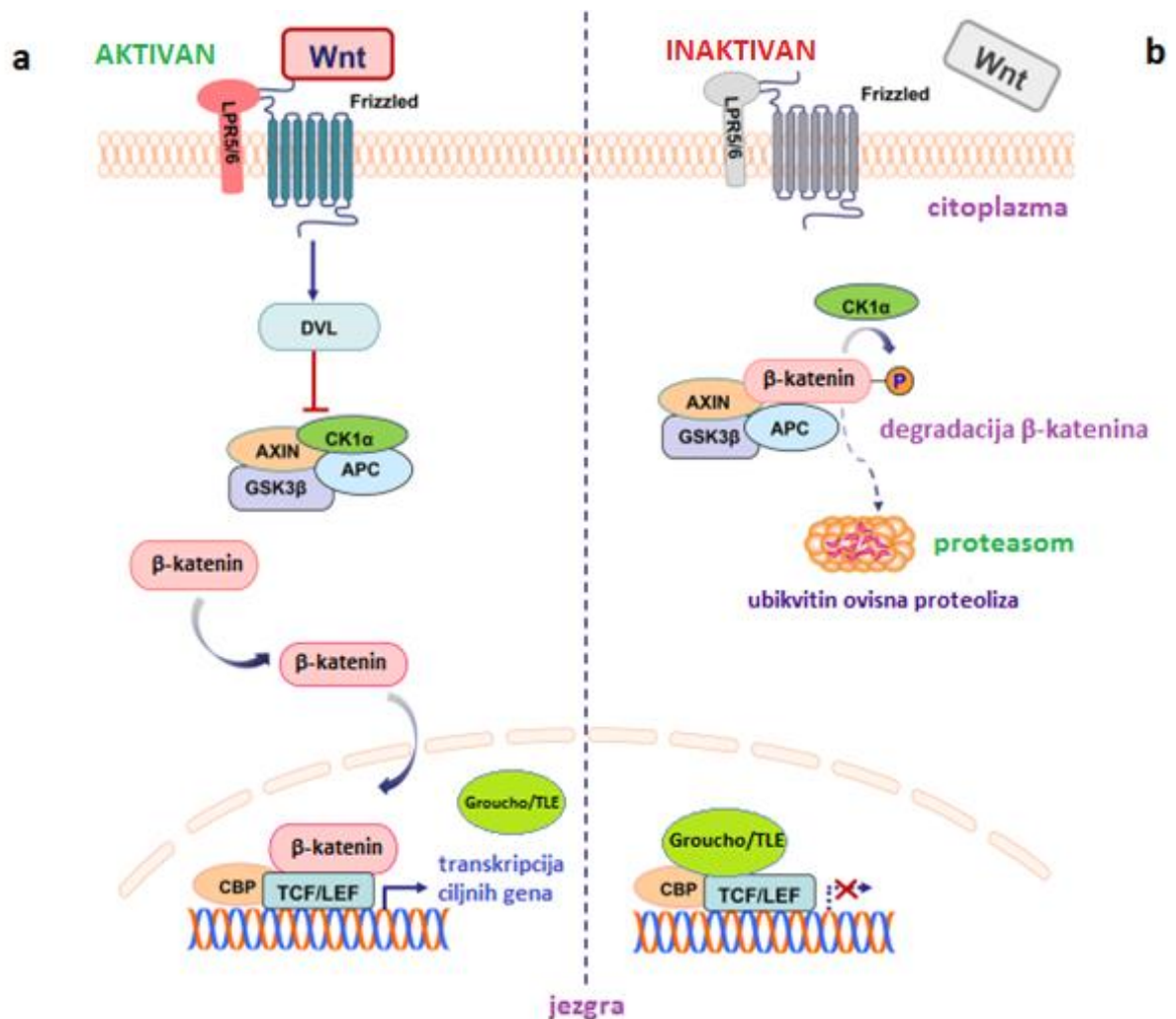
Kaskada signalizacije započinje vezanjem liganda Wnt za membranski receptor Frizzled (Fzd) združen s membranskim koreceptorom LRP5/6 (engl. *Low density lipoprotein Receptor-related Protein*). Do danas je identificirano 19 članova obitelji liganada Wnt od čega su najbolje istraženi ligandi Wnt1, 2, 3 i 3a, uključeni u signalni put Wnt/ $\beta$ -katenin. Navedeni ligandi imaju visoki afinitet za vezanje na N-terminalnu domenu receptora Fzd, što uzrokuje njegovu dimerizaciju s koreceptorom LRP5/6 i pokretanje kaskade unutarstaničnih signala uz fosforilaciju i aktivaciju proteina Dishevelled (Dvl). Aktivacijom proteina Dvl, uz njegovo premještanje u područje stanične membrane, postiže se inhibicija citoplazmatskog destruktivnog kompleksa  $\beta$ -katenina. Naime, protein Dvl sačinjen je od tri visoko konzervirane domene: aminoterminalne domene (DIX), centralne domene (PDZ) te karboksiterminalne

domene (DEP). Upravo DIX i PDZ domene regrutiraju protein aksin (engl. *Axis Inhibition Protein*, AXIN), glavnu proteinsku okosnicu citoplazmatskog destruktivnog kompleksa, te kinazu glikogen sintaze  $\beta$  (engl. *Glycogen Synthase Kinase-3 beta*, GSK3 $\beta$ ) i kazein kinazu 1 (engl. *Casein Kinase 1*, CK1) čime je aktivnost destruktivnog kompleksa inhibirana i dolazi do nakupljanja nefosforilirane forme  $\beta$ -katenina u citosolu. Posljedično dolazi do postepene translokacije proteina  $\beta$ -katenina u jezgru gdje isti djeluje kao transkripcijski koaktivator vežući se za transkripcijski faktor TCF/LEF (engl. *T-cell-specific Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer Binding factor 1*) kontroliran transkripcijskim represorom Groucho/TLE (engl. *Transducin-Like Enhancer*). Disocijacija transkripcijskog represora i vezanje  $\beta$ -katenina na transkripcijski faktor i proteinski kompleks CBP (engl. *CREB Binding Protein*), koji je zadužen za regrutiranje stanične transkripcijske mašinerije na mjesto inicijacije transkripcije ciljnih gena, potiče transkripciju gena za proteine poput ciklina D, MYC, FRA1, JUN, IGF1, CD44, MMP7 čija je onkogeno aktivnost identificirana kod brojnih tumora (Slika 5) (Pećina-Šlaus i sur. 2016a; Zhan i sur. 2016; Shang i sur. 2017; Parsons i sur. 2021; Sharma i sur. 2021; Yu i sur. 2021).

U odsustvu stimulacije Fzd receptora ligandima Wnt dolazi do fosforilacije  $\beta$ -katenina uz pomoć citoplazmatskog destruktivnog kompleksa te njegove proteasomalne razgradnje. Citoplazmatski destruktivni kompleks sastavljen je od već spomenute okosnice koju čine protein aksin, dvije serin/treonin kinaze, GSK3 $\beta$  i kazein kinaza 1, te protein APC (engl. *Adenomatous polyposis coli*). Fosfokinaza GSK3 $\beta$  uzrokuje fosforilaciju  $\beta$ -katenina na pozicijama serina 33 i 37, dok CK1 fosforilira  $\beta$ -katenin na treoninu 41 te serinu 45. Tako označene aminokiseline služe kao molekularni biljeg kojeg prepoznaje E3 podjedinica ubikvitin ligaze  $\beta$ -TrCP (engl.  *$\beta$ -Transducin repeat Containing protein*) što rezultira razgradnjom  $\beta$ -katenina u proteasomu. Opisani niz unutarstaničnih događaja koji rezultiraju degradacijom  $\beta$ -katenina onemogućava pokretanje transkripcije ciljnih gena u jezgri. U odsustvu koaktivatorskog učinka  $\beta$ -katenina na TCF/LEF, transkripcija je potisnuta represorom Groucho/TLE (Slika 5) (Pećina-Šlaus i sur. 2016a; Zhan i sur. 2016; Shang i sur. 2017; Parsons i sur. 2021; Sharma i sur. 2021; Yu i sur. 2021).

Mutacije središnjih molekula u kompleksnoj mreži signalnog puta Wnt/ $\beta$ -katenin uzrokuju nepravilnu regulaciju signaliziranja koja rezultira snažnom proliferacijom, dediferencijacijom te migracijom ranije zdravih stanica. Negativni utjecaj aberantnog signaliziranja kanonskog puta Wnt istražen je i u meningeomima. Watson i sur. (2002) utvrdili su kako dolazi do značajnog povećanja membranskih receptora Fzd kod tumorskih stanica meningeoma u odnosu na zdrave meningealne stanice, a Pećina-Šlaus i sur. (2016b) identificirali su gubitak heterozigotnosti gena *AXIN1* u 21,1% istraživanih meningeoma. Veliki broj istraživanja usredotočen je upravo na mutacije gena *CTNNB1* (engl. *Catenin beta 1*) koji kodira  $\beta$ -katenin, i mutacije gena *APC* čija disregulacija negativno utječe na ekspresiju i lokalizaciju  $\beta$ -katenina u tumorskim stanicama (Pećina-Šlaus i sur. 2016a). Detaljan opis

građe i uloge navedenih molekula signalnog puta Wnt/ $\beta$ -katenin, kao i istraživanja utjecaja njihove aberantne aktivnosti u tumorigenezi meningeoma prikazana su u daljnjem tekstu.



**Slika 5.** Shematski prikaz kanonskog signalnog puta Wnt. **(a)** Prilikom vezanja liganda Wnt za transmembranski receptor Fzd dolazi do dimerizacije Fzd i LRP5/6 i pokretanja kaskade unutarstaničnih signala. Aktivirani protein Dvl regrutira elemente citoplazmatskog destruktivnog kompleksa čime se isti inhibira uz nakupljanje nefosforiliranog  $\beta$ -katenina u citosolu. Premještanjem u jezgri,  $\beta$ -katenin djeluje kao koaktivator transkripcijskog faktora TCF/LEF te uz proteinski kompleks CBP regrutira bazalnu transkripcijsku mašineriju sudjelujući tako u aktivaciji transkripcije ciljnih gena. **(b)** U odsustvu vezanja liganda Wnt, kanonski put Wnt je inaktivan. Tada dolazi do djelovanja citoplazmatskog destruktivnog kompleksa koji specifično veže i ciljano fosforilira  $\beta$ -katenin usmjeravajući ga na razgradnju u proteasomu. Transkripcija ciljnih gena inhibirana je djelovanjem represorskog kompleksa Groucho/TLE (preuzeto i prilagođeno prema Zhang i Wang 2020).

### 1.4.2. $\beta$ -katenin

$\beta$ -katenin je multifunkcionalni protein kodiran genom *CTNNB1* (3p21) koji sadrži 16 eksona. Detaljnim istraživanjem primarne strukture  $\beta$ -katenina utvrđeno je kako se isti sastoji od tri domene: središnje armadilo domene (550 aminokiselina), N-terminalne domene ( $\approx$ 150 aminokiselina) i C-terminalne domene ( $\approx$ 100 aminokiselina). N-terminalna domena  $\beta$ -katenina predstavlja ciljno mjesto fosforilacije kinazama GSK3 $\beta$  i CK1, dok je C-terminalna domena ključna za vezanje na transkripcijski faktor TCF/LEF (Gao i sur. 2017). S obzirom da  $\beta$ -katenin nema u svojoj strukturi domene koje mogu direktno vezati molekulu DNA, isti djeluje kao transkripcijski koaktivator. Kada dođe do aktivacije signalnog puta Wnt/ $\beta$ -katenin, nefosforilirani  $\beta$ -katenin translocira se u jezgru gdje njegova C-terminalna domena djeluje kao transaktivirajuća domena proteina TCF, koji se direktno veže na molekulu DNA. Vezanju  $\beta$ -katenina na transkripcijski faktor TCF/LEF prethodi disocijacija represorskog kompleksa Groucho/TLE, koju pokreće monoubikvitinizacija represora proteinskim kompleksom XIAP (engl. *X-linked inhibitor of apoptosis*) (Shang i sur. 2017; Yu i sur. 2021).

Osim interakcije s TCF/LEF transkripcijskim faktorom, C-terminalna domena  $\beta$ -katenina reagira i s domenom CH3 transkripcijskog koaktivatora p-300/CBP (engl. *CREB Binding Protein*). p-300/CBP pripada obitelji histonskih acetiltransferaza te, osim ranije navedene uloge u pokretanju transkripcije, acetilira lizin na poziciji 345 u molekuli  $\beta$ -katenina što dodatno pojačava afinitet vezanja  $\beta$ -katenina za TCF. Osim toga,  $\beta$ -katenin stupa u interakciju i s kromatinskim remodelirajućim kompleksima iz porodice SWI/SNF (engl. *SWItch/ Sucrose Non-Fermentable*) i RSC (engl. *Remodel the Structure of Chromatin*). Naime, ova dva proteinska kompleksa sadrže domenu BRG-1 (engl. *Brahma Related Gene-1*) s ATP-aznom aktivnošću koja omogućava remodeliranje kromatina, izlažući time mjesta inicijacije transkripcije i promotorskih regija ciljnih gena transkripcijskoj mašineriji. Kroz interakciju s domenom BRG-1,  $\beta$ -katenin regrutira komplekse SWI/SNF i RSC na mjesta inicijacije transkripcije što je nužan preduvjet za uspješnu aktivaciju transkripcije (Shang i sur. 2017; Yu i sur. 2021).

Protein  $\beta$ -katenin uključen je i u kontrolu normalne stanične adhezije. Pri normalnim fiziološkim uvjetima  $\beta$ -katenin se uglavnom nalazi u području stanične membrane gdje svojom armadilo domenom stupa u interakciju s citoplazmatskom podjedinicom membranskog proteina E-kadherina. Kompleks E-kadherin/ $\beta$ -katenin izuzetno je važan za ispravnu adheziju stanica i održavanje normalne morfologije tkiva, a narušavanje stabilnosti ovog kompleksa dovodi do gubitka kontaktne inhibicije te nekontroliranog rasta stanica i invazije u okolna tkiva (Brunner i sur. 2006; Gao i sur. 2017). Gubitak ispravne stanične adhezije smatra se kritičnim događajem procesa epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT), normalno uključenog u embrionalni razvoj te remodeliranje i zacjeljivanje tkiva. Tijekom maligne transformacije, EMT narušava normalnu strukturu međustaničnih spojeva, a stanice



nakupljaju karakteristike slične fibroblastima te počinju migrirati invadirajući okolna tkiva (Pecina-Slaus i sur. 2012).

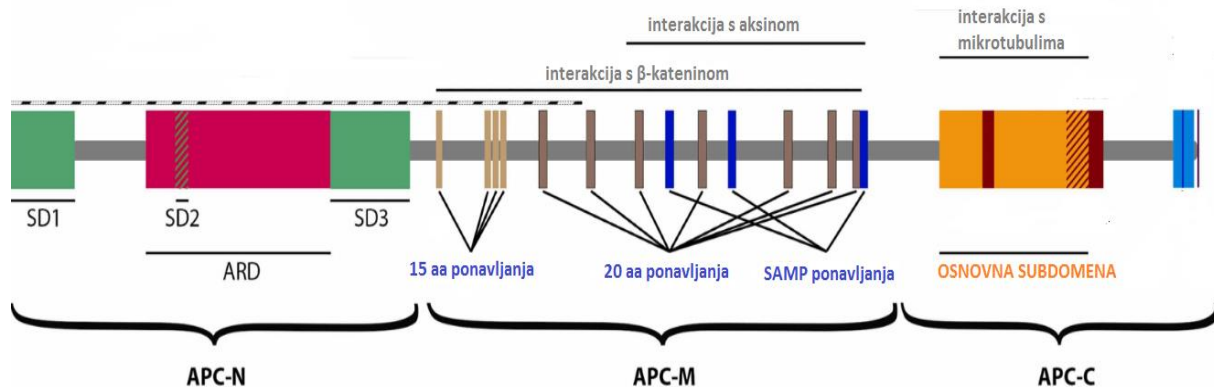
### 1.4.3 Tumor supresor gen *APC*

Tumor supresor gen *APC* (5q21) sadrži 21 ekson i kodira multifunkcionalni protein APC kojeg čine 2843 aminokiseline. Protein APC negativni je regulator signalnog puta Wnt/ $\beta$ -katenin, a djeluje kao jedan od ključnih elemenata citoplazmatskog destrukcijskog kompleksa  $\beta$ -katenina (Yu i sur. 2021). Zbog mogućnosti vezanja brojnih molekula i uloge u važnim staničnim procesima poput proliferacije, migracije stanica i održavanja morfologije stanica, protein APC sadrži brojne poddomene (Slika 6). Generalno, aminokiselinska sekvenca proteina APC može se podijeliti u tri domene, a u kontekstu uloge u kanonskom signalnom putu Wnt najvažnija je domena APC-M (engl. *APC-middle domain*) smještena u središnjoj regiji primarne proteinske strukture (Slika 6). Ova domena sastavljena je od četiri ponavljajuće poddomene koje karakterizira motiv od 15 aminokiselina, sedam ponavljajućih poddomena koje karakterizira motiv od 20 aminokiselina te tri poddomene SAMP odgovorne za vezanje na aksin, proteinsku okosnicu destrukcijskog kompleksa (Fang i Svitkina 2022). Tri ponavljajuće poddomene sastavljene od 15 aminokiselinskih ostataka predstavljaju mjesto vezanja proteina  $\beta$ -katenina, no sama interakcija dva proteina nije dostatan signal za upućivanje  $\beta$ -katenina na daljnju razgradnju. To se postiže tek nakon što se fosforilirana forma  $\beta$ -katenina veže i za jednu od sedam ponavljajućih poddomena sastavljenu od 20 aminokiselinskih ostataka. Za funkcionalnost proteina APC u procesu razgradnje  $\beta$ -katenina nužna je prisutnost barem tri od sedam ponavljajućih poddomena sastavljenih od 20 aminokiselina (Fearnhead i sur. 2001).

Do danas, identificirano je više od 1500 mutacija gena *APC* u brojnim tumorima, a najveći broj njih identificiran je kod kolorektalnog karcinoma. Mutacije najčešće pogađaju ekson 15 koji sadrži više od 75% kodirajuće sekvence za protein APC (Fearnhead i sur. 2001; Yu i sur. 2021). Pećina-Šlaus i sur. (2008) u studiji na 32 uzorka meningeoma istražili su utjecaj gubitka heterozigotnosti gena *APC* na tkivnu ekspresiju i staničnu lokalizaciju  $\beta$ -katenina. Istraživanje se fokusiralo na promjene u eksonima 11 i 15 gena *APC*, a rezultati ukazuju na pojavnost gubitka heterozigotnosti gena *APC* kod benignih meningeoma. U svim uzorcima u kojima je detektiran gubitak heterozigotnosti gena *APC*,  $\beta$ -katenin je identificiran isključivo u citoplazmi i jezgri stanice, što je dokaz važne uloge proteina APC u tumorigenezi meningeoma.

Važno je istaknuti kako je transkripcija gena *APC* kontrolirana dvama promotorima: 1A i 1B. Transkripcijom promotora 1A, nakon alternativnog prekrajanja, nastaje transkript 1A, dok promotor 1B producira tri transkripta: 1B1, 1B2 i 1B3. Pri normalnim fiziološkim uvjetima prisutna je transkripcija s oba promotora uz obrazac tkivne specifičnosti. Primjerice, u zdravoj sluznici debelog crijeva dolazi do

dominantne ekspresije promotora 1B gena *APC* u odnosu na ekspresiju promotora 1A, dok je u tkivu mozga obrnuti obrazac (Fearhead i sur. 2001; Zhu i sur. 2021).



**Slika 6.** Shematski prikaz aminokiselinske sekvence proteina APC. Protein APC sadrži tri funkcionalne domene: (1) domena **APC-N** (engl. *APC-N-terminal domain*) sadrži ardmadilo poddomenu (ARD) i poddomene s intrinzičnom aktivnošću koje su važne za postizanje ispravne native strukture proteina (SD1, SD2, SD3); (2) domena **APC-M** (engl. *APC-middle domain*) uključena je u regulaciju proteina β-katenina, a sastavljena je od četiri ponavljajuće poddomene s karakterističnim motivom od 15 aminokiselina, sedam ponavljajućih poddomena s karakterističnim motivom od 20 aminokiselina i tri ponavljajuće poddomene SAMP čija je uloga vezanje proteina APC za aksin; (3) domena **APC-C** (engl. *APC-C-terminal domain*) sadrži poddomenu odgovornu za interakciju s elementima citoskeleta (osnovna poddomena) (preuzeto i prilagođeno prema Fang i Svitkina 2022).

Narušeni obrasci metilacije, kroz hipermetilaciju promotora tumor supresor gena i globalnu hipometilaciju koja doprinosi aktivaciji mobilnih elemenata (transpozona, retrotranspozona) i dovodi do nestabilnosti genoma, značajno doprinose procesima inicijacije i progresije malignih bolesti (Delpu i sur. 2013; Dor i Cedar 2018). Hipermetilacija promotora gena *APC* potvrđena je kod karcinoma želuca, jetre i gušterače (Zhu i sur. 2021). Istraživanjem poveznice između hipermetilacije gena *APC* i karcinoma debelog crijeva, Li i sur. (2017) pokazali su kako dolazi do visoke stope hipermetilacije promotora gena *APC* što korelira s tumorskom masom, stupnjem diferenciranosti tumorskih stanica te metastazama u području regionalnih limfnih čvorova.

Prije početka istraživanja prikazanog u ovom radu nisu pronađeni literaturni izvori o obrascima metilacije tumor supresor gena *APC* kod meningeoma.



## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj diplomskog rada bio je ispitati status metilacije promotora 1A gena *APC* u uzorcima intrakranijlnih meningeoma različitih histoloških gradusa te utvrditi na koji način obrazac metilacije gena *APC* utječe na ekspresiju i unutarstaničnu lokalizaciju  $\beta$ -katenina.

Pretpostavka je da će utišavanje ekspresije tumor supresor gena *APC*, metilacijom promotora, uzrokovati aktivaciju kanonskog signalnog puta Wnt u uzorcima meningeoma viših gradusa što će dovesti do nakupljanja aktivnog  $\beta$ -katenina u jezgrama tumorskih stanica.

U tu sam svrhu u 46 uzoraka meningeoma, prethodno prikupljenih operativnim zahvatom na pacijentima oba spola i svrstanih u histološke graduse, analizirala prosječnu metiliranost CpG otoka u promotoru 1A gena *APC* metodom lančane reakcije polimerazom ovisne o metilaciji te staničnu lokalizaciju i razinu ekspresije aktivne forme  $\beta$ -katenina metodom imunohistokemije. Izmjerene parametre usporedila sam međusobno te u odnosu na patohistološku dijagnozu, dob i spol pacijenata uporabom prikladnih statističkih testova.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Uzorci intrakranijalnih meningeoma

Za potrebe ovog istraživanja koristila sam 46 uzoraka intrakranijalnih meningeoma različitih gradusa prikupljenih kirurškim zahvatom pacijenata Kliničkog bolničkog centra Zagreb te Kliničke bolnice Dubrava. Od ukupno 46 pacijenata, 28 je bilo ženskog spola (60,9%), a 18 muškog spola (39,1%) (Prilog 1). Srednja životna dob u trenutku postavljanja dijagnoze iznosila je 58,8 godina, a raspon dobi oboljelih od 17 do 85 godina. Srednja životna dob oboljelih žena iznosila je 54,7 godina, a muškaraca 65,5 godina. Od ukupno 18 oboljelih muškaraca 14 ih je bilo starijih od 60 godina (77,8%), dok je 57,1% (16/28) žena pripadalo dobnoj skupini mlađoj od 60 godina.

Prikupljanje, pohrana i analiza uzoraka odobrena je dozvolom Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Ur. Broj: 380-59-10106-20-111/126, Klasa:641-01/20-02/01, Zagreb, 29.9.2020). Svi pacijenti od kojih se uzimalo tumorsko tkivo potpisali su pristanak za operacijski zahvat i biopsiju te im se osigurala potpuna anonimnost (identitet je poznat samo istraživačima te se on ne iznosi u rezultatima ili publikacijama).

Svi uzorci koje sam koristila u istraživanju klasificirani su od strane patologa u graduse I, II i III prema kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije, a pacijenti čiji su uzorci korišteni u istraživanju nisu bili podvrgnuti drugim onkološkim metodama liječenja (radijacija, kemoterapija) koje bi mogle utjecati na ishod genskih analiza. Skup analiziranih meningeoma se sastojao od 24 uzorka (52,2%) klasificirana kao gradus I (benigni meningeomi), 17 (36,9%) kao gradus II (atipični meningeomi) te 5 (10,9%) kao gradus III (anaplastični meningeomi) (Prilog 1).

Kako bi se omogućila provedba molekularnih i imunohistokemijskih analiza tumorskog tkiva meningeoma uzorci su pohranjeni na dva načina. Uzorci tumorskog tkiva namijenjeni za molekularne analize, nakon kirurškog odstranjivanja smrznuti su u tekućem dušiku i pohranjeni pri -80°C do trenutka izolacije genomske DNA. Uzorci tumorskog tkiva potrebni za imunohistokemijsku analizu ekspresije specifičnog proteina fiksirani su u 4%-tnom formalinu i uklopljeni u parafin.

### 3.2. Izolacija genomske DNA iz tkiva tumora meningeoma metodom fenol/kloroform

Genomsku DNA iz uzoraka tkiva tumora, prethodno pohranjenih pri  $-80^{\circ}\text{C}$ , nakon otapanja na sobnoj temperaturi izolirala sam metodom fenol/kloroform koju su opisali Sambrook i sur. (1989). Ovisno o količini pojedinog uzorka tkiva tumora, izdvojila sam od 150 do 500 mg tkiva u sterilne epruvete (*Eppendorf*, Hamburg, Njemačka) volumena 1,5 mL u koje sam prethodno dodala 1 mL pufera za lizu stanica (10 mM TrisHCl, 0,5% Tween, 25 mM EDTA; pH 8,0). U svaku sterilnu epruvetu dodala sam, potom, 15  $\mu\text{L}$  proteinaze K (20 mg/mL). Prilikom izdvajanja tumorskog tkiva i premještanja istoga u sterilne epruvete, koristila sam laboratorijsko posuđe (škarice, pincete) sterilizirane u 70%-tnom etanolu, pazeći pritom da ne dođe do kontaminacije uzoraka. Epruvete s uzorcima tretiranim puferom za lizu stanica i proteinazom K postavila sam u vodenu kupelj prethodno zagrijanu pri  $37^{\circ}\text{C}$ , gdje su se inkubirali do sljedećeg dana. Ovisno o konzistenciji uzorka tumorskog tkiva, prilagodila sam trajanje inkubacije te, ako je bilo potrebno, produžila za još jedan dan. Intrakranijalni meningeomi kategorizirani su u pet kategorija ovisno o konzistenciji tumorske mase, a ljestvica se kreće od tumora koji su izrazito mekani do onih koji su izrazito čvrsti te imaju tendenciju stvaranja kalcifikata (Zada i sur. 2013). Važno je, stoga, prilagoditi vrijeme inkubacije kako bi se omogućila učinkovita degradacija tkiva.

Nakon inkubacije sadržaj svake epruvete razdijelila sam na dva jednaka dijela u sterilne epruvete (*Eppendorf*, Hamburg, Njemačka) volumena 1,5 mL te sam na smjesu dodala jednak volumen fenola čija je uloga ekstrakcija proteina, lipida i polisaharida (Pećina-Šlaus 2009). Epruvete sam zatim postavila na rotacijsku miješalicu (Stuart SB2, Stuart Equipment (part of Cole-Parmer), Vernon Hills, Illinois, SAD) gdje se laganom vrtnjom sadržaj istih miješao tijekom 10 minuta. Nakon miješanja uzorke sam postavila u centrifugu (Centrifuge 5415D, Eppendorf, rotor 100 mm) na 10 000 okretaja u minuti i sobnu temperaturu u trajanju od 10 minuta. Nakon centrifugiranja nastala su tri sloja, donji hidrofobni sloj sačinjen od fenola, ekstrahiranih lipida i ugljikohidrata, središnji proteinski sloj te gornji hidrofilni sloj s otopljenom genomskom DNA. U nove sterilne epruvete (*Eppendorf*, Hamburg, Njemačka) volumena 1,5 mL pažljivim pipetiranjem izdvojila sam gornji vodeni sloj. Na ukupni volumen izdvojene vodene faze dodala sam pola volumena kloroforma i pola volumena fenola. Tako pripremljene smjese uzoraka ponovno sam postavila na rotacijsku miješalicu na lagano miješanje tijekom 10 minuta. Nakon miješanja uslijedilo je centrifugiranje prema ranije navedenim uvjetima. Centrifugiranjem su ponovno nastala tri sloja, te sam pažljivim pipetiranjem ponovno izdvojila gornju vodenu fazu u nove sterilne epruvete (*Eppendorf*, Hamburg, Njemačka) volumena 1,5 mL. Na tako izdvojenu vodenu fazu dodala sam jednak volumen kloroforma čija je uloga, osim ekstrakcije lipida i ugljikohidrata, uklanjanje zaostalog fenola iz uzorka (Pećina-Šlaus 2009). S tako pripremljenim uzorcima ponovila sam proces miješanja na rotacijskoj miješalici i centrifugiranje kako bih ponovno izdvojila tri sloja. Izdvojenu gornju vodenu fazu sam prebacila u nove sterilne epruvete (*Eppendorf*, Hamburg, Njemačka) volumena 1,5 mL i dodala 2,5 volumena hladnog apsolutnog etanola ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Sadržaj sam miješala do pojave

paučinstog bijelog klupka. Epruvete sa precipitiranom genomskom DNA pohranila sam u zamrzivač pri temperaturi od  $-20^{\circ}\text{C}$  do sljedećeg dana.

Sljedeći dan postavila sam uzorke u centrifugu (Centrifuge 5415D, rotor 100 mm, Eppendorf, Hamburg, Njemačka) na proces centrifugiranja pri 13 000 okretaja u minuti i sobnoj temperaturi u trajanju od 20 minuta. Tijekom centrifugiranja na dnu epruvete izdvojio se mali bijeli talog genomske DNA, od kojeg sam pažljivim pipetiranjem odstranila etanol. Za dodatno pospješivanje uklanjanja etanola iznad taloga, epruvete s talogom postavila sam u termomikser (Thermomixer compact, Eppendorf) na proces sušenja pri  $37^{\circ}\text{C}$  tijekom 15 minuta. Nakon isparavanja zaostalog etanola, u epruvete s talogom dodala sam 50  $\mu\text{L}$  TE pufera (engl. *Tris-EDTA*: 10 mM Tris, 1mM EDTA; pH 7,6). Epruvete sam ostavila na sobnoj temperaturi do sljedećeg dana kako bi se talog što učinkovitije otopio. Sljedeći dan uzorke sam pohranila u banku tumorske DNA pri  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3. Određivanje čistoće i koncentracije genomske DNA izolirane iz tkiva tumora

Kako bih provjerila uspješnost izolacije genomske DNA iz tkiva tumora odredila sam vrijednosti koncentracije ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) i čistoće izolirane DNA pomoću mikrovolumnog spektrofotometra (ND 1000, NanoDrop, Wilmington, DE, USA). Tom prilikom mjerila sam apsorbanciju pri 230 nm, 260 nm i 280 nm. Valna duljina od 230 nm određuje apsorpcijski minimum nukleinskih kiselina te apsorpcijski maksimum peptidnih veza, fenola, ugljikohidrata i EDTA. Mjerenjem valne duljine pri 260 nm određuje se apsorpcijski maksimum nukleinskih kiselina, dok valna duljina od 280 nm daje uvid u maksimum apsorpcije aromatskih aminokiselina te spojeva s aromatskim prstenom poput fenola (Pećina-Šlaus 2009). Kako bi se procijenila čistoća pojedinog uzorka DNA određuju se omjeri apsorbancije pri 260 nm i 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) te 260 nm i 230 nm ( $A_{260}/A_{230}$ ). Za omjer  $A_{260}/A_{280}$  čije se vrijednosti kreću između 1,8 i 2 smatra se da sadrži čistu DNA, dok vrijednosti ispod 1,8 upućuju na kontaminaciju proteinima, a one iznad 2 na kontaminaciju s RNA. Optimalne vrijednosti omjera  $A_{260}/A_{230}$  kreću se od 2 do 2,2, a sve vrijednosti ispod optimalnih upućuju na kontaminaciju tvarima čiji je apsorpcijski maksimum pri 230 nm (Pećina-Šlaus 2009). S obzirom da prisutnost različitih kontaminanata može interferirati s metodama analize genomske DNA, za provedbu daljnjih molekularnih analiza odabrala sam uzorke zadovoljavajuće koncentracije ( $>200 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) te optimalnih vrijednosti apsorpcijskih omjera  $A_{260}/A_{280}$  i  $A_{260}/A_{230}$ .

### 3.4. Bisulfitna konverzija genomske DNA izolirane iz tkiva tumora

Genomsku DNA izoliranu ranije opisanim postupkom koristila sam za analiziranje prosječne metiliranosti promotora 1A gena *APC* (engl. *Adenomatous polyposis coli 1A promoter*, APC-1A), za kojeg je ranije utvrđeno kako ima 31 CpG (metilacijsko) mjesto (Pan i sur. 2009), a prije analiziranja metilacije promotora određenog gena, potrebno je uzorak DNA bisulfitno konvertirati. Proces bisulfitne konverzije uključuje tretman jednolančane molekule DNA natrijevim bisulfitom ( $\text{NaHSO}_4$ ) što dovodi do deaminacije nemetiliranih citozina (C) u uracile (U). Za metilirane citozine ( $\text{C}^m$ , 5-metilcitozin) dokazana je tek mala stopa konverzije 5-metilcitozina u timin, dok većina metiliranih citozina ostaje nepromijenjena nakon tretmana natrijevim bisulfitom (Frommer i sur. 1992). Za bisulfitnu konverziju uzoraka genomske DNA izolirane iz tkiva tumora koristila sam komercijalno dostupan paket The MethylEdge™ Bisulfite Conversion System (Promega, Madison, USA). Prije provođenja protokola za bisulfitnu konverziju DNA, pripremila sam potrebna razrjeđenja uzoraka genomske DNA izolirane iz tkiva tumora. Sve uzorke DNA razrijedila sam vodom bez nukleaza do koncentracije od 40 ng/ $\mu\text{L}$  (840 ng genomske DNA u ukupnom volumenu od 21  $\mu\text{L}$ ) te provjerila koncentraciju i čistoću istih spektrofotometrijskim mjerenjem u uređaju ND 1000, NanoDrop, Wilmington, DE, USA. Na 20  $\mu\text{L}$  pripremljenog uzorka DNA dodala sam 130  $\mu\text{L}$  reagensa za bisulfitnu konverziju (engl. *Bisulfite ME Conversion Reagent*, Promega, Madison, USA). Pripremljenu smjesu kratko sam promiješala na vorteks miješalici i postavila u PCR uređaj (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, SAD) na inkubaciju sljedećih uvjeta: 8 minuta pri 98°C, 60 minuta pri 54°C te hlađenje pri 4°C. Nakon inkubacije u PCR uređaju uzorke sam podvrgnula procesu desulfonacije i pročišćavanja. U prvom koraku svaki bisulfitno konvertirani uzorak prebacila sam u kolonu s membranom (engl. *ME Spin Column*), postavljenu na kolekcijsku epruvetu (engl. *Collection Tube*) u koju sam ranije dodala 600  $\mu\text{L}$  pufera za vezanje DNA (engl. *ME Binding Buffer*, Promega, Madison, USA). Smjesu sam, potom, pažljivo promiješala laganim invertiranjem i postavila u centrifugu (Centrifuge 5415D, rotor 100 mm, Eppendorf, Hamburg, Njemačka) na proces centrifugiranja u trajanju od 30 sekundi pri maksimalnoj brzini od 13 000 okretaja u minuti. Nakon centrifugiranja DNA je ostala vezana za membranu, a filtrat iz kolekcijske epruvete sam odstranila i ponovno postavila kolonu s membranom na kolekcijsku epruvetu. U kolonu s membranom dodala sam 100  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje (engl. *1x ME Wash Buffer*, Promega, Madison, USA), kojeg sam ranije pripremila dodatkom 24 mL 100%-tnog etanola u 6 mL koncentrirane otopine pufera za ispiranje (engl. *ME Wash Solution*, Promega, Madison, USA). Uslijedilo je ponovno centrifugiranje pri ranije navedenim uvjetima. Nakon otklanjanja filtrata iz kolekcijske epruvete u kolonu s membranom dodala sam 200  $\mu\text{L}$  desulfonacijskog pufera (engl. *ME Desulfonation Buffer*, Promega, Madison, USA). Tako pripremljene uzorke ostavila sam da se inkubiraju pri sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta. Nakon inkubacije uslijedilo je ponovno centrifugiranje pri gore navedenim uvjetima. Nakon centrifugiranja ispraznila sam kolekcijske epruvete i u kolone s

membranom dodala 200  $\mu$ L pufera za ispiranje (engl. *1x ME Wash Buffer*, Promega, Madison, USA). Nakon ponovnog centrifugiranja pri maksimalnoj brzini u trajanju od 30 sekundi, ispraznila sam kolekcijsku epruvetu te korak ispiranja i centrifugiranja ponovila još jednom. Kolone s membranom postavila sam potom u sterilne epruvete (*Eppendorf*, Hamburg, Njemačka) volumena 1,5 mL uz dodatak 22  $\mu$ L elucijskog pufera (engl. *Elution Buffer*, Promega, Madison, USA ) koji omogućava ispiranje DNA vezane za membranu kolone u filtrat, te ponovila korak centrifugiranja pri maksimalnoj brzini u trajanju od 30 sekundi. Koncentraciju i čistoću bisulfitno konvertirane DNA provjerila sam spektrofotometrijskim mjerenjem na mikrovolumnom spektrofotometru (ND 1000, NanoDrop, Wilmington, DE, USA). Važno je napomenuti kako se prilikom bisulfitnog tretmana uzoraka DNA te kasnijeg procesa desulfonacije i pročišćavanja uzoraka DNA upotrebljavaju puferi koji sadrže tvari organskog porijekla (poput etanola), što može dovesti do vrijednosti omjera  $A_{260}/A_{230}$  koje znatno premašuju optimalne. Epruvete s bisulfitno konvertiranom DNA obložila sam aluminijskom folijom, za sprječavanje negativnog utjecaja svjetlosti na konvertirane uzorke, i pohranila pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5. Umnazanje sekvence promotora 1A gena APC metodom lančane reakcije polimerazom ovisne o metilaciji

U svrhu analiziranja statusa metilacije CpG otoka u promotoru 1A gena *APC* koristila sam metodu lančane reakcije polimerazom ovisne o metilaciji (engl. *Methylation-specific PCR*, MS-PCR). Za izvedbu ove metode koristila sam komercijalno dostupan set reagensa *TaKaRa EpiTaq<sup>TM</sup> HS (for bisulfite-treated DNA)* (*Takara Bio Inc.*, Kusatsu, Shiga, Japan), a za svaki uzorak bisulfitno konvertirane DNA izolirane iz tkiva tumora pripremila sam dvije reakcijske smjese, metiliranu i nemetiliranu reakciju. Sastojci smjese, koncentracije istih i volumeni potrebni za jednu reakciju MS-PCR prikazani su u Tablici 1. Reakcijske smjese pripremila sam u ukupnom volumenu od 25  $\mu$ L, a razlikovale su se samo u specifičnim početnicama. Slijed nukleotida specifičnih početnica za metiliranu i nemetiliranu reakciju te očekivana duljina MS-PCR produkta prikazana je u Tablici 2. Obje reakcije MS-PCR-a izvela sam u PCR uređaju 2720 Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, SAD) tijekom 30 ciklusa, pri uvjetima navedenim u Tablici 3. Osim optimizacije uvjeta za odvijanje reakcije MS-PCR, potrebno je specifičnu reakcijsku smjesu potvrditi upotrebom pozitivnih i negativnih kontrola. Kao pozitivnu kontrolu metilirane reakcije koristila sam *Methylated Human Control* (*Promega*, Madison, USA), a za pozitivnu kontrolu nemetilirane reakcije koristila sam *Human Genomic DNA* (*Promega*, Madison, USA). Za negativnu kontrolu metilirane reakcije upotrijebila sam *Human Genomic DNA* (*Promega*, Madison, USA), a za negativnu kontrolu nemetilirane reakcije koristila sam *Methylated Human Control* (*Promega*, Madison, USA). Za provjeru čistoće PCR reakcije kao negativnu kontrolu koristila sam vodu bez nukleaza.

**Tablica 1.** Sastojci reakcijske smjese za metiliranu i nemetiliranu reakciju MS-PCR, koncentracije sastojaka reakcijske smjese i volumeni istih potrebni za jednu reakciju MS-PCR.

SASTOJAK SMJESE	POČETNA KONCENTRACIJA	KONAČNA KONCENTRACIJA	KONAČNI VOLUMEN ( $\mu\text{L}$ )
TAKARA EPITAQ HS	5 U/ $\mu\text{L}$	0,625 U/reakcija	0,125
EPITAQ PCR PUFER	10 X	1 X	2,5
MGCL <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM	2,5
DNTP MIX	2,5 mM	0,3 mM	3
APC UZVODNA POČETNICA (metilirana/nemetilirana)	10 $\mu\text{M}$	0,28 $\mu\text{M}$	0,7
APC NIZVODNA POČETNICA (metilirana/nemetilirana)	10 $\mu\text{M}$	0,28 $\mu\text{M}$	0,7
DNA KALUP	25 ng/ $\mu\text{L}$	25 ng	1
VODA	-	-	14,475
UKUPNO	-	-	25

**Tablica 2.** Prikaz slijeda nukleotida specifičnih početnica za metiliranu i nemetiliranu reakciju MS-PCR te očekivana duljina PCR produkta (slijed nukleotida za sintezu specifičnih početnica te podaci o duljini PCR produkta preuzeti su iz van Engeland i sur. 2003). F-UM i R-UM- set početnica za nemetiliranu reakciju MS-PCR; F-M i R-M- set početnica za metiliranu reakciju MS-PCR; pb- parovi baza

POČETNICE	SLIJED NUKLEOTIDA	DULJINA PCR PRODUKTA
APC F – UM	5'-GTGTTTTATTGTGGAGTGTGGGT-3'	108 pb
APC R – UM	5'-CCAATCAACAACTCCCAACAA-3'	
APC F – M	5'-TATTGCGGAGTGCGGGTC-3'	98 pb
APC R – M	5'-TCGACGAACTCCCGACGA-3'	

**Tablica 3.** Optimizirani uvjeti za odvijanje reakcije MS-PCR (metilirana/nemetilirana reakcija) umnažanja regije promotora 1A gena APC.

KORAK	TEMPERATURA	TRAJANJE
POČETNA DENATURACIJA LANCA DNA	95°C	5 min
DENATURACIJA	95°C	1 min
VEZANJE POČETNICA	59°C (za metiliranu reakciju)	30 s
	60°C (za nemetiliranu reakciju)	30 s
SINTEZA KOMPLEMENTARNOG LANCA	72°C	30 s
ZAVRŠNO PRODULJENJE LANCA	72°C	5 min
HLAĐENJE	4°C	$\infty$

### 3.6. Analiza rezultata reakcije MS-PCR elektroforezom u agaroznom gelu

Kako bih provjerila uspješnost reakcije MS-PCR te odredila status metiliranosti pojedinog uzorka bisulfitno konvertirane genomske DNA izolirane iz tkiva tumora, upotrijebila sam metodu horizontalne elektroforeze u 2%-tnom agaroznom gelu, kojeg sam pripremila otapanjem 1 g agaroze (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) u 50 mL TAE pufera (40 mM Tris – acetat, 1 mM EDTA; pH 8) . Reakcija elektroforeze odvijala se u TAE puferu u trajanju od 22 minute pri jakosti struje od 80 mA i naponu od 110 V u uređaju Compact XS/S Biometra, An Analytik Jena Company (Jena, Njemačka) . Za vizualizaciju produkata reakcije MS-PCR, u gel sam dodala boju Sybr Gold (0,5 µg/mL). Po završetku elektroforeze, gel sam prenijela na transiluminator i imager UVdoc-HD6 (Cleaver Scientific, Rugby, Ujedinjeno Kraljevstvo) kako bih vizualizirala umnožene fragmente DNA. Tijekom analiziranja rezultata, za određivanje veličine umnoženih fragmenata iste sam usporedila sa standardnom DNA (50 pb DNA Ladder, Amresco, USA). Elektroforetske pruge s umnoženim produktima obje reakcijske smjese (metilirane/nemetilirane) detektirala sam u području 100 pb. Reakcije MS-PCR-a smatrala sam uspješnima i optimiziranima kada je došlo do pravilnog umnažanja pozitivnih kontrola te izostanka umnažanja svih negativnih kontrola. Rezultate sam fotografirala i dokumentirala.

### 3.7. Detekcija aktivne forme proteina $\beta$ -katenina metodom imunohistokemije

Za utvrđivanje prisutnosti i lokalizacije nefosforilirane (aktivne) forme proteina  $\beta$ -katenina (engl. *Non phosphorylated  $\beta$ -catenin*, NON-P- $\beta$ ) koristila sam se tehnikom imunohistokemije. U tu svrhu sam koristila parafinske rezove tumorskog tkiva meningeoma debljine 4 µm te specifično monoklonsko antitijelo Non-phospho (Active)  $\beta$ -Catenin (Ser33/37/Thr41) (Cell Signaling Technology, Danvers, SAD). Kao pozitivnu kontrolu koristila sam prerez tkiva debelog crijeva i kore velikog mozga zdravog čovjeka, a kao negativnu kontrolu prerez jetre zdravog čovjeka.

U prvom koraku sam deparafinizirala uzorke tkiva. Stakalca sa prerezima tumorskog tkiva inkubirala sam u ksilenu (Kemika, Zagreb, Hrvatska) dva puta po pet minuta te u padajućem gradijentu etanola (apsolutni etanol, 95%-tni, 70%-tni) (Kemika, Zagreb, Hrvatska) dva puta po tri minute. U završnom koraku deparafinizacije, stakalca s rezovima isprala sam u destiliranoj vodi pet minuta. Sve korake deparafinizacije izvodila sam u digestoru pazeći, pritom, da ne dođe do isušivanja uzoraka.

Nakon deparafinizacije slijedi proces oporavljanja epitopa. Deparafinizirana stakalca sam tretirala s 6M citratnim puferom (1,05 g limunske kiseline; 0,5 L destilirane vode; pH 6) zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici 8 minuta, prvo pri 450 W do vrenja, potom pri 350 W do vrenja te pri 300 W do



vrenja. Za kraj, uzorke sam zagrijavala pri snazi od 200 W u trajanju od dvije minute. Nakon hlađenja pri sobnoj temperaturi, proces kuhanja i hlađenja ponovila sam još dva puta. Potom sam uzorke isprala u 1X PBS puferu (engl. *Phosphate-Buffered Saline*) (10X PBS = 80 g NaCl, 2 g KCl, 23 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> X 12 H<sub>2</sub>O, destilirana voda do 1 L; pH 7,4) dva puta, prvi put dvije minute te za kraj 30 sekundi.

Prije tretmana uzoraka specifičnim primarnim antitijelom potrebno je spriječiti nespecifična vezanja, što sam postigla tretmanom uzoraka 3%-tnim vodikovim peroksidom i serumom *Protein block* (Dako, Glostrup, Denmark). Stakalca s uzorcima postavila sam u vlažnu komoru i tretirala ih s 3%-tnim vodikovim peroksidom (Galenski laboratorij, Dugopolje, Hrvatska) u mraku 20 minuta. Ovim korakom spriječena je aktivnost endogenog enzima peroksidaze i pojava lažno pozitivnog signala. Nakon inkubacije isprala sam stakalca u 1X PBS-u tri puta po 10 minuta. Stakalca sam, potom, ponovno postavila u vlažnu komoru i tretirala serumom *Protein block* (Dako, Glostrup, Denmark) inkubirajući ih pri 4°C u trajanju od 30 minuta. Tretman serumom onemogućava nespecifična vezanja primarnog antitijela i pojavu lažno pozitivnog signala u tretiranom tkivu. Nakon inkubacije otklonila sam višak tekućine s uzorka laganim lupkanjem o papirnati ručnik (bez ispiranja u 1X PBS-u).

Uzorke rezova tumorskog tkiva i pozitivnu kontrolu tretirala sam specifičnim primarnim antitijelom Non-phospho (Active)  $\beta$ -Catenin (Ser33/37/Thr41) (Cell Signaling Technology, Danvers, SAD), koje prepoznaje aktivnu formu  $\beta$ -katenina. Prije tretmana, otopinu primarnog antitijela pripremila sam razrjeđivanjem 1,25  $\mu$ L antitijela u 998,75  $\mu$ L 1X PBS-a (razrjeđenje 1:800). Tako pripremljeno primarno antitijelo nanijela sam na uzorke i pozitivnu kontrolu u volumenu od 100  $\mu$ L. Na negativnu kontrolu nanijela sam 100  $\mu$ L 1X PBS-a. Sve uzorke pohranila sam na inkubaciju, u hladnjak, pri 4°C tijekom noći.

Sljedeći dan, uzorke tretirane primarnim antitijelom isprala sam u 1X PBS-u tri puta po pet minuta, nakon čega je uslijedio tretman sekundarnim antitijelom. Na sva stakalca nakapala sam nekoliko kapi sekundarnog antitijela *EnVision* (Dako REAL™, EnVision™, Dako Glostrup Denmark) te ih ostavila u vlažnoj komori na inkubaciju od 45 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon završene inkubacije, isprala sam uzorke u 1X PBS-u četiri puta po sedam minuta na tresilici. *EnVision* je polimerni konjugat koji se sastoji od velikog broja molekula enzima HRP (engl. *Horseradish peroxidase*) (do 100 molekula enzima) te sekundarnog antitijela (do 20 molekula) direktno vezanih na dekstransku okosnicu (Sabattini i sur. 1998). Tretman ovim polimerom omogućava detekciju vezanja primarnog antitijela nakon djelovanja 3,3'-diaminobenzidin (DAB) kromogena i stvaranja smeđeg netopljivog precipitata.

Otopinu DAB kromogena (Dako REAL™, EnVision™, Dako Glostrup Denmark) pripremila sam dodavanjem 20  $\mu$ L DAB-a u 1000  $\mu$ L *Substrate Buffer* pufera (Dako REAL™, EnVision™, Dako Glostrup Denmark). Na svako stakalce nanijela sam 100  $\mu$ L otopine kromogena te ostavila da djeluje dvije minute. Nakon tretmana DAB-om, isprala sam stakalca u destiliranoj vodi tri puta po 10 minuta.

Za lakšu interpretaciju lokalizacije eksprimiranog proteina u stanicama, kontrastirala sam uzorke inkubacijom od dvije minute u hematoksilinu (Dako, Carpinteria, CA, USA). Nakon kontrastnog bojanja, ispirala sam uzorke pod laganim mlazom vodovodne vode 10 minuta.

U posljednjem koraku tehnike imunohistokemije, uzorke sam dehidrirala u rastućem gradijentu etanola (70%-tni, 95%-tni, apsolutni etanol) te u ksilenu, dva puta po tri minute. Dehidrirane uzorke trajno sam uklopila nanošenjem dvije kapi Biomounta DPX Low (BioGnost, Hrvatska) na tkivne rezove i postavljanjem pokrovnog stakalca. Uklopljene uzorke pohranila sam u histološke kutije pri sobnoj temperaturi.

### 3.8. Analiza imunohistokemijske detekcije aktivne forme proteina $\beta$ -katenina

Preparate pripremljene tehnikom imunohistokemije analizirala sam pomoću svjetlosnog mikroskopa Olympus BX53. Svaki preparat pregledala sam na malom povećanju (40X) za utvrđivanje generalne ekspresije detektiranog proteina u tkivu, te na većem povećanju (200X) u svrhu pronalaska tumorskih žarišta (mjesto maksimalne ekspresije proteina u tkivu). Tumorska žarišta na pojedinom preparatu fotografirala sam te, potom, analizirala uz pomoć programa ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, SAD). Prilikom analiziranja tumorskih žarišta odredila sam mjesta ekspresije aktivne forme proteina  $\beta$ -katenina u stanici (membrana, citoplazma, jezgra) te intenzitet signala (engl. *Staining Intensity Score*, SI). U slučaju slabog intenziteta obojenja (žučkasto/svijetlo smeđe obojenje) tumorskom žarištu dodijelila sam vrijednost 1+, za umjereni intenzitet (smeđe) dodijelila sam vrijednost 2+, a za jaki intenzitet signala (tamno smeđe) dodijelila sam vrijednost 3+. U slučaju detekcije ekspresije aktivnog  $\beta$ -katenina u jezgrama analiziranih preparata iste sam kategorizirala u tri grupe dodjeljujući im numeričke vrijednosti od 1 do 3: (1) preparati s do 5% jezgara s ekspresijom  $\beta$ -katenina u vidnom polju, (2) preparati s do 50% jezgara s ekspresijom  $\beta$ -katenina u vidnom polju i (3) preparati s više od 50% jezgara s ekspresijom  $\beta$ -katenina u vidnom polju.

Za semikvantifikaciju imunopozitiviteta u stanicama koristila sam određivanje indeksa obojenja (engl. *Immunoreactivity Score*, IRS). IRS je numerička vrijednost (0-12) koja se dobije izračunavanjem umnoška intenziteta signala i postotka stanica s pozitivnim signalom u tumorskom žarištu (engl. *Positive Cells Proportion Score*, PP). Pet je kategorija koje označavaju postotak imunopozitiviteta preparata: (0) nema imunopozitiviteta u tumorskim stanicama, (1) imunopozitivitet u 1-25% tumorskih stanica, (2) imunopozitivitet u 26-50% tumorskih stanica, (3) imunopozitivitet u 51-85% tumorskih stanica, (4) imunopozitivitet u >85% tumorskih stanica. Za potrebe statističke obrade podataka, IRS vrijednostima dodijelila sam numeričke vrijednosti prema slijedećim kriterijima: (1) IRS= 0-4, (2) IRS= 6-8, (3) IRS= 9-12.

### 3.9. Statističke metode obrade rezultata

Za statističku obradu rezultata dobivenih genetičkim i proteinskim analizama koristila sam programski paket SPSS v.28.0.1 (SPSS, Chicago, IL, SAD) uz razinu značajnosti  $\alpha < 0,05$ . Prilikom statističke obrade podataka, analizirala sam odnos varijabli dobivenih genskom i proteinskom analizom uzoraka s varijablama prikupljenih patohistoloških i demografskih (spol i dob) parametara.

Istraživanje je obuhvatilo 46 uzoraka meningeoma različitih gradusa, a sve varijable (spol, dob, gradus, metilacijski status i imunopozitivitet) su bile kategoričke. Iz toga razloga statistička obrada podataka je uključivala  $\chi^2$ -test, Cramer V - test i Spearmanovu korelaciju.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Analiza demografskih i patohistoloških podataka uzoraka intrakranijalnih meningeoma

Raspodjela oboljelih prema spolu i gradusu te srednja životna dob pacijenata u svakoj kategoriji prikazana je u Tablici 4. Statistički značajna razlika između dobi obolijevanja žena i muškaraca u ovom istraživanju dokazana je  $\chi^2$  testom ( $\chi^2 = 5,437$ ,  $df=1$ ,  $p=0,020$ ) te Cramer V testom, koji je potvrdio umjerenu korelaciju između promatranih parametara ( $\phi_c=0,344$ ,  $p=0,020$ ).

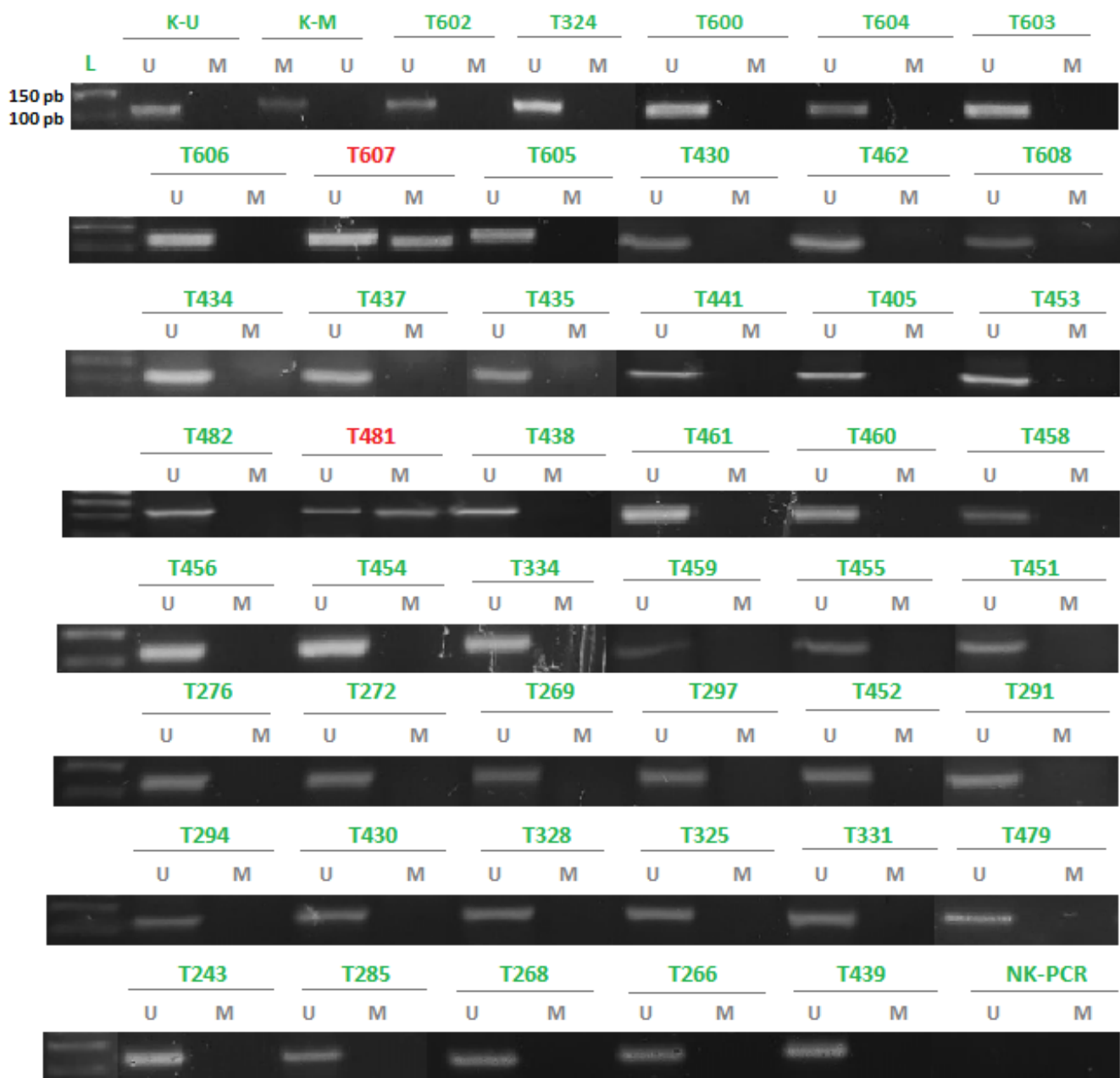
Od 24 pacijenta čiji su uzorci klasificirani u skupinu benignih meningeoma (gradus I) 18 ih je bilo ženskog spola (75%), dok je 12 od 22 uzoraka, klasificiranih u meningeome višeg gradusa (gradus II i III), pripadalo pacijentima muškog spola (54,6%). Češće obolijevanje žena od benignog oblika meningeoma, a muškaraca od meningeoma višeg gradusa dokazano je  $\chi^2$  testom ( $\chi^2=4,207$ ,  $df=1$ ,  $p=0,040$ ) te Cramer V testom, koji je potvrdio umjerenu korelaciju između promatranih parametara ( $\phi_c=0,302$ ,  $p=0,040$ ). Spearmanova korelacija nije pokazala povezanost histološkog gradusa s dobi pacijenta ( $p=0,656$ ).

**Tablica 4.** Prikaz broja oboljelih po spolu i histološkom gradusu te srednje vrijednosti dobi oboljelih po histološkom gradusu i spolu.

GRADUS MENINGEOMA	BROJ OBOLJELIH			DOB (srednja vrijednost) $\pm$ STANDARDNA DEVIJACIJA		
	ŽENE	MUŠKARCI	UKUPNO	ŽENE	MUŠKARCI	UKUPNO
<b>GRADUS I</b> (benigni meningeom)	18	6	24	58,78 $\pm$ 13,61	65,17 $\pm$ 13,36	60,38 $\pm$ 13,55
<b>GRADUS II</b> (atipični menigeom)	7	10	17	49,71 $\pm$ 21,34	63,5 $\pm$ 10,76	57,82 $\pm$ 16,88
<b>GRADUS III</b> (anaplastični meningeom)	3	2	5	47 $\pm$ 25,63	76 $\pm$ 12,73	58,6 $\pm$ 24,93
<b>UKUPNO</b>	28	18	46	55,25 $\pm$ 17,04	66,56 $\pm$ 12,83	59,24 $\pm$ 15,87

#### 4.2. Rezultati analize obrasca metilacije promotora 1A gena APC u uzorcima intrakranijalnih meningeoma različitih gradusa

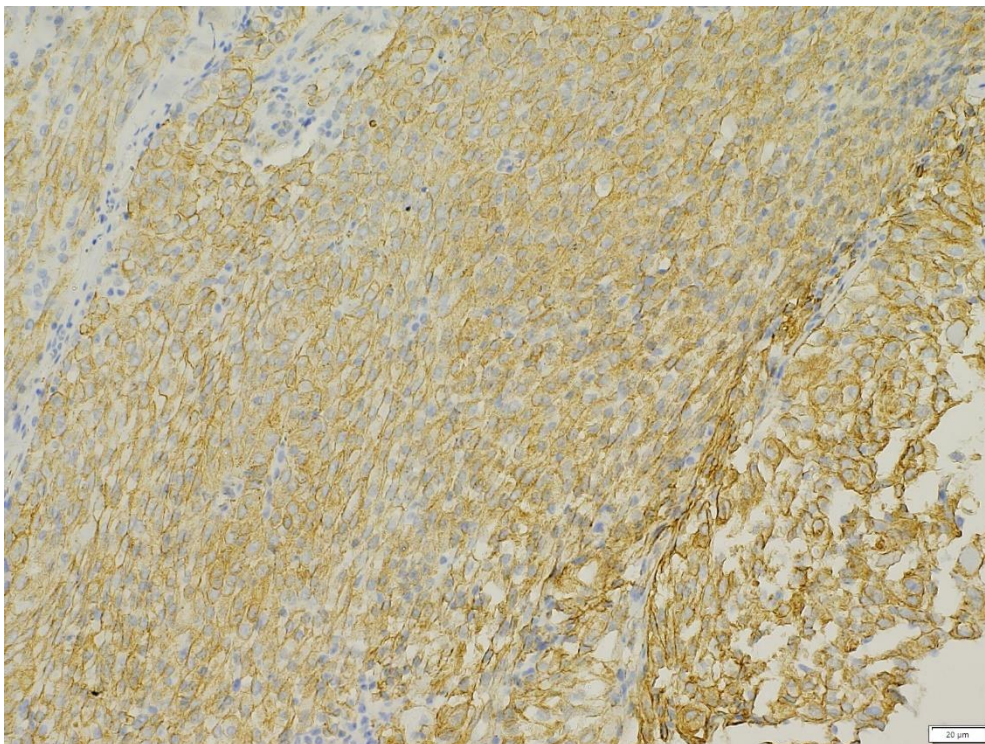
Promotor 1A gena APC se smatrao nemetiliranim ako je došlo do umnažanja samo u nemetiliranoj reakcijskoj smjesi, dok se smatrao metiliranim ako je došlo do umnažanja u metiliranoj ili obje reakcijske smjese. Od ukupno 46 uzoraka DNA izolirane iz tkiva tumora intrakranijalnih meningeoma, dva su uzorka (4,35%) imala metilirani promotor 1A gena APC. Oba uzorka su pripadali anaplastičnim meningeomima (40% meningeoma gradusa III bilo je metelirano). Primjenom  $\chi^2$  testa dobivena je statistički značajna povezanost metilacije promotora 1A gena APC s anaplastičnim oblikom intrakranijalnog meningeoma ( $\chi^2=17,145$ ,  $df=2$ ,  $p=0,000$ ), a Cramer V test potvrdio je snažnu korelaciju između promatranih parametara ( $\phi_c=0,611$ ,  $p=0,000$ ). Statistički značajna povezanost između obrasca metiliranosti i dobi oboljelih nije potvrđena ( $p=0,883$ ), kao niti povezanost spola oboljelih sa statusom metiliranosti promotora 1A gena APC ( $p=0,747$ ). Rezultati reakcije MS-PCR za svaki uzorak prikazani su u Prilogu 1 i na Slici 7.



**Slika 7.** Prikaz rezultata elektroforeze u 2%-tnom agaroznom gelu nakon reakcije MS-PCR. Na slici su prikazani rezultati analize metilacijskog statusa promotora APC-1A svih istraživanih uzoraka intrakranijalnih meningeoma (označenih pripadajućom šifrom). Crvenom bojom istaknuti nazivi uzoraka označavaju one uzorke kod kojih je identificirana metilacija u promotoru istraživanog gena. L- standardna DNA (50 pb DNA Ladder); K-M – kontrola metilirane reakcije; K-U – kontrola nemetilirane reakcije; U- nemetilirana reakcija; M- metilirana reakcija; NK-PCR – negativna kontrola PCR reakcije.

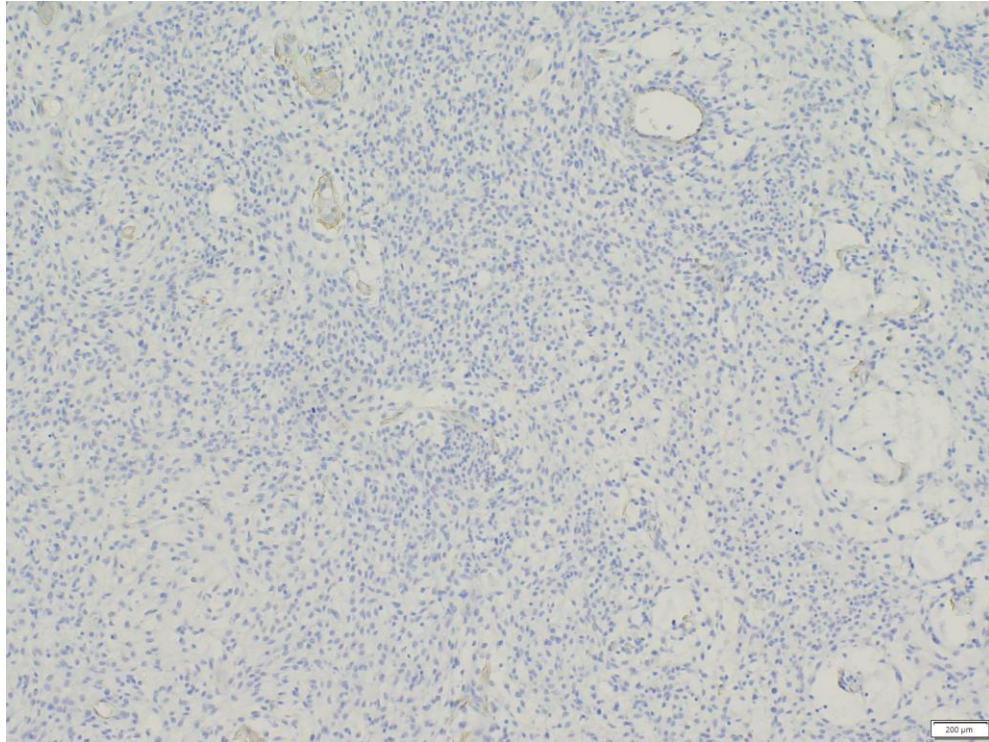
#### 4.3. Rezultati analize ekspresije i unutarstanične lokalizacije NON-P- $\beta$ u uzorcima intrakranijalnih meningeoma različitih gradusa

Rezultati analize unutarstanične lokalizacije i ekspresije aktivnog  $\beta$ -katenina prikazani su u Prilogu 1. Ekspresija aktivnog  $\beta$ -katenina u području stanične membrane i/ili citoplazme zabilježena je u 44 analizirana uzoraka (95,7%) intrakranijalnih meningeoma uključenih u ovo istraživanje. Kod uzoraka s membranskom i/ili citoplazmatskom lokalizacijom aktivnog  $\beta$ -katenina ekspresija je bila jaka u 65,9% uzoraka, umjerena u 25% uzoraka te slaba ili je izostala u 6,7% uzoraka (Slika 8; Slika 9). Analizom uzorka kore velikog mozga zdravog čovjeka identificirana je slaba ekspresija (IRS=4) aktivnog  $\beta$ -katenina u području stanične membrane i citoplazme (Slika 10).

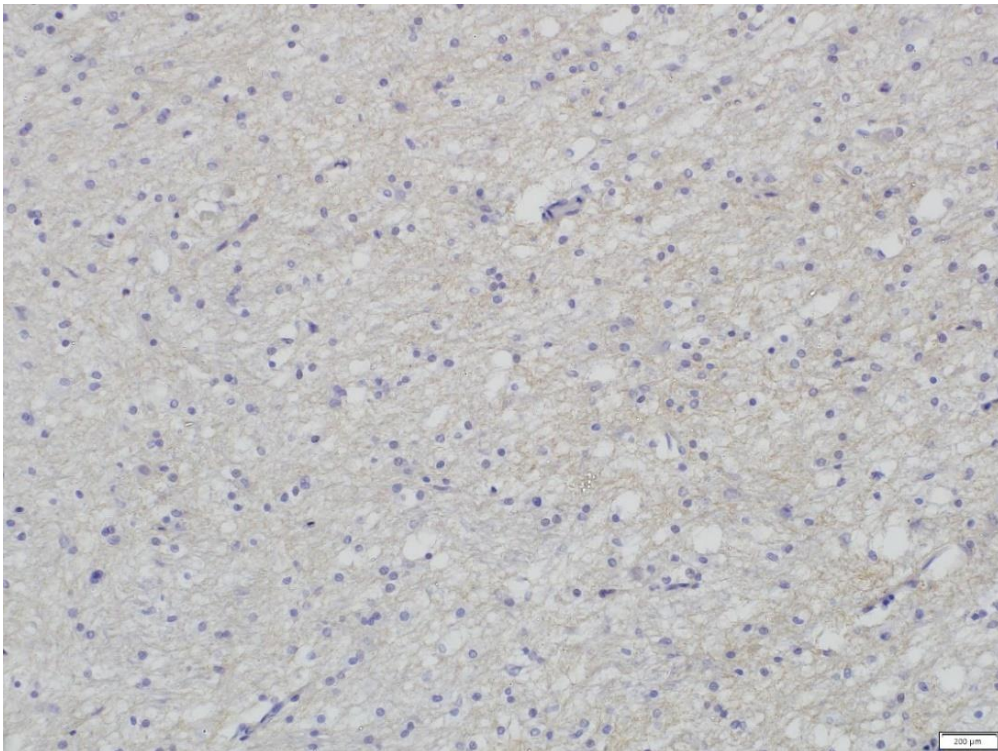


**Slika 8.** Prikaz rezultata detekcije aktivne forme proteina  $\beta$ -katenina metodom imunohistokemije (povećanje 200X). Primjer uzorka meningeoma s lokalizacijom aktivnog  $\beta$ -katenina u području stanične membrane i citoplazme (uzorak T430, gradus II, IRS=12, nemetilirani promotor 1A gena APC).





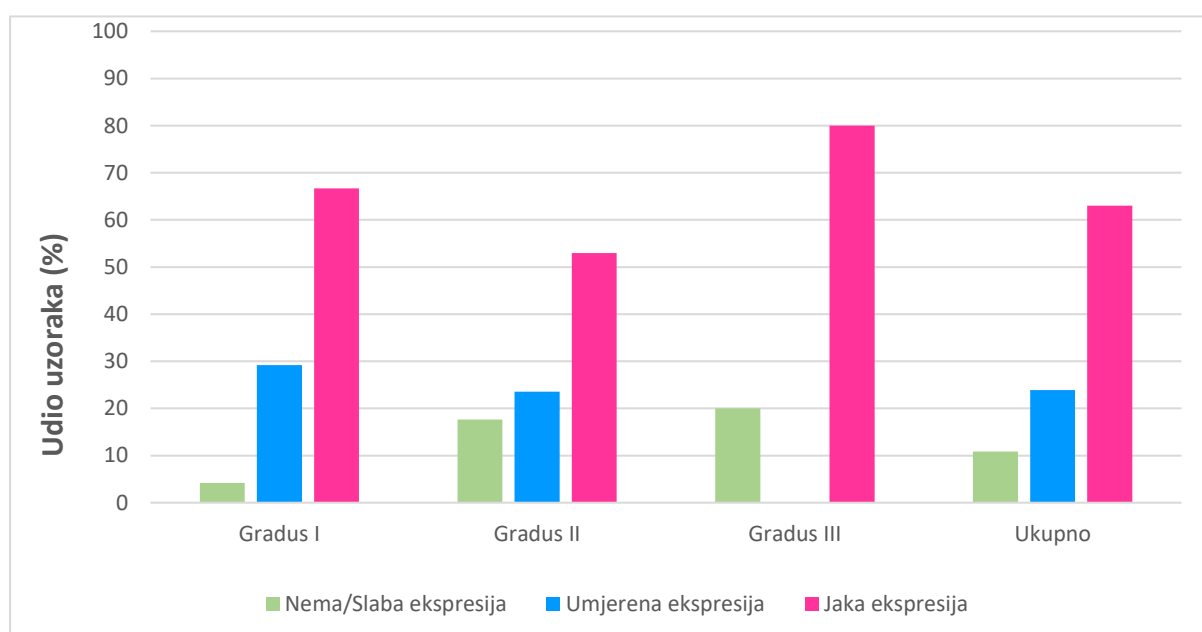
**Slika 9.** Prikaz rezultata detekcije aktivne forme proteina  $\beta$ -katenina metodom imunohistokemije (povećanje 200X). Primjer negativnog preparata bez ekspresije aktivnog  $\beta$ -katenina u tumorskim stanicama (uzorak T481, gradus III, IRS=0, metilirani promotor 1A gena *APC*).



**Slika 10.** Prikaz rezultata detekcije aktivne forme proteina  $\beta$ -katenina metodom imunohistokemije u tkivu kore velikog mozga zdravog čovjeka (povećanje 200X). Slaba ekspresija istraživanog proteina ograničena je na područje stanične membrane i citoplazme (IRS=4).

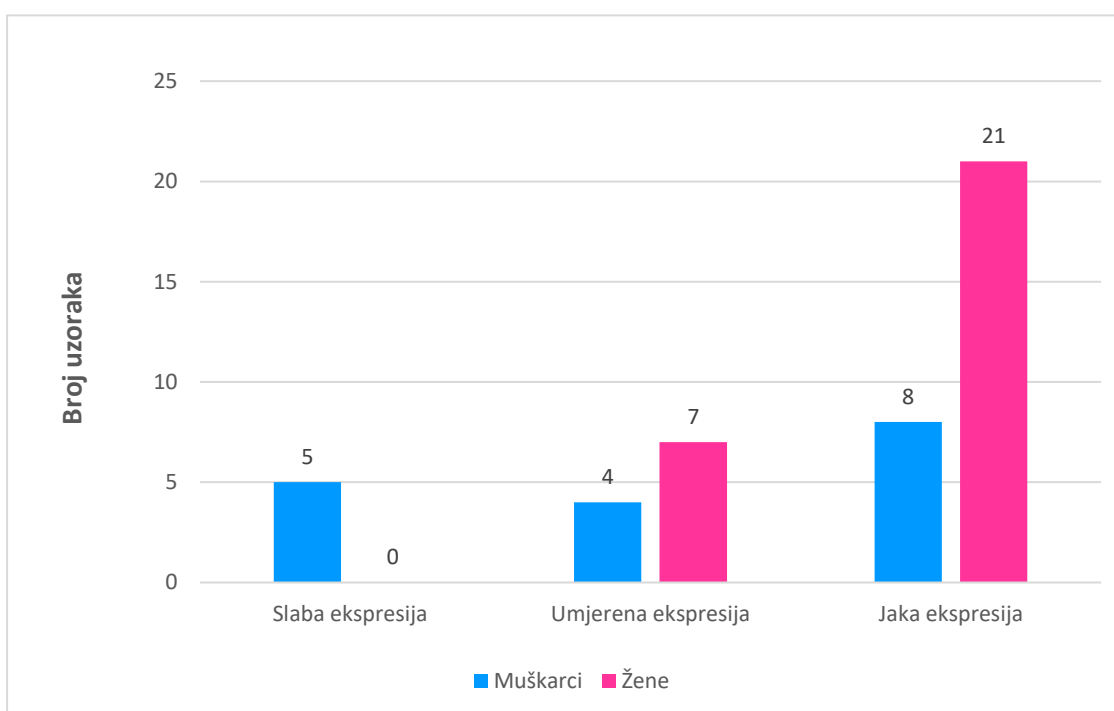


Ekspresija aktivne forme  $\beta$ -katenina u uzorcima tri histološka gradusa meningeoma prikazana je na Slici 11. Analizom ekspresije aktivnog  $\beta$ -katenina u staničnoj membrani i/ili citoplazmi, u uzorcima različitih gradusa intrakranijalnih meningeoma, zamijećena je dominantna zastupljenost jake ekspresije u uzorcima meningeoma sva tri gradusa (gradus I: 66,7%; gradus II: 56,3%; gradus III: 80%). Primjenom Spearmanovog korelacijskog testa nije otkrivena statistički značajna povezanost histološkog gradusa meningeoma i ekspresije  $\beta$ -katenina u citoplazmi i/ili membrani ( $p=0,543$ ).



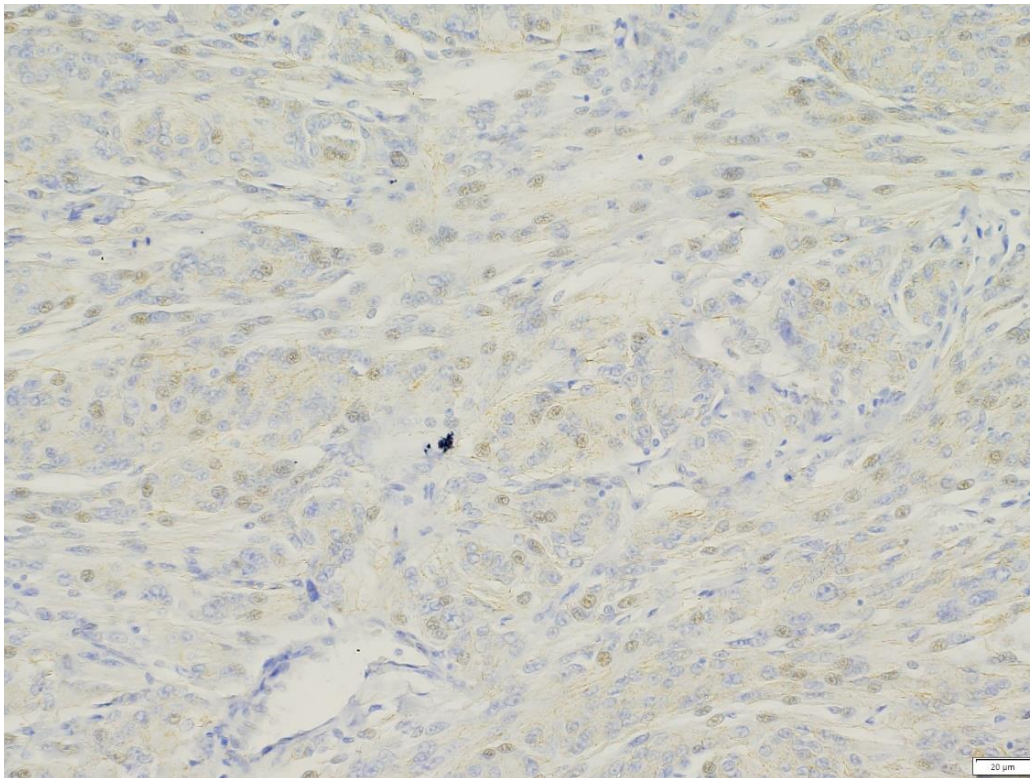
**Slika 11.** Raspodjela uzoraka s obzirom na intenzitet ekspresije aktivne forme proteina  $\beta$ -katenina u uzorcima različitih gradusa intrakranijalnih meningeoma. Analizom ekspresije aktivnog  $\beta$ -katenina u uzorcima različitih gradusa intrakranijalnih meningeoma zamijećena je dominantna zastupljenost jake ekspresije u uzorcima meningeoma sva tri gradusa. Jaka ekspresija aktivnog  $\beta$ -katenina identificirana je kod 63,1% svih uzoraka, umjerena kod 23,9% te slaba kod 10,9% svih uzoraka.

Podjela oboljelih prema spolu i kategoriji imunopozitiviteta prikazana je na Slici 12. Od uzoraka s jakom ekspresijom aktivne forme  $\beta$ -katenina u staničnoj membrani i/ili citoplazmi 72,4% uzoraka (21/29) je pripadalo meningeoma izoliranih iz pacijenata, dok je 27,6% (8/29) pripadalo meningeoma pacijenata muškog spola.  $\chi^2$  testom dokazana je statistički značajna razlika u ekspresiji aktivnog  $\beta$ -katenina u staničnoj membrani i/ili citoplazmi kod muškaraca i žena ( $\chi^2= 10,991$ ,  $df=2$ ,  $p=0,004$ ), a umjerena korelacija između promatranih parametara potvrđena je i Cramer V testom ( $\phi_c=0,489$ ,  $p=0,004$ ). Imunopozitivitet u staničnoj membrani i/ili citoplazmi tumorskih stanica meningeoma nije bio povezan s dobi pacijenta ( $p=0,933$ ).



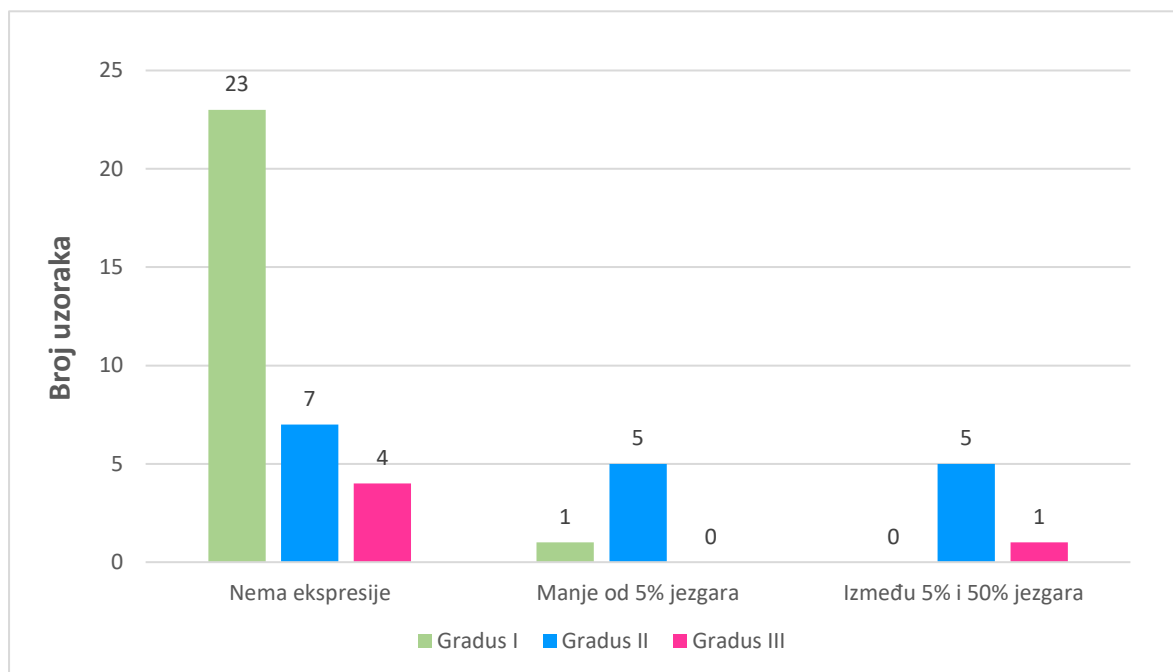
**Slika 12.** Podjela uzoraka meningeoma prema spolu i kategorijama imunopozitiviteta  $\beta$ -katenina. Brojke iznad pojedinog stupca označavaju broj uzoraka određenog spola u svakoj IRS kategoriji kod uzoraka s membranskom i/ili citoplazmatskom ekspresijom.

Ekspresija aktivnog  $\beta$ -katenina identificirana u jezgrama 26,1% analiziranih uzoraka (12/46) (Slika 13). Kod jednog od 46 analiziranih uzoraka tkivnih rezova meningeoma ekspresija je bila isključivo lokalizirana u jezgri (uzorak gradusa II). Kod šest uzoraka (50%) s lokalizacijom aktivnog  $\beta$ -katenina u jezgrama uočena je jaka ekspresija, kod tri uzorka (25%) umjerena te kod tri uzorka (25%) slaba ekspresija. Od uzoraka s ekspresijom aktivnog  $\beta$ -katenina u jezgrama tumorskih stanica 83,3% (10/12) pripadalo je uzorcima atipičnih meningeoma (gradus II), dok su ostala dva uzorka pripadala meningeomima histološkog gradusa I odnosno III. Pojavnost aktivnog  $\beta$ -katenina u jezgrama tumorskih stanica meningeoma nije povezana s dobi pacijenata ( $p=0,596$ ), spolom pacijenata ( $p=0,370$ ) i IRS kategorijom imunopozitiviteta aktivnog  $\beta$ -katenina u staničnoj membrani i/ili citoplazmi ( $p=0,169$ ).



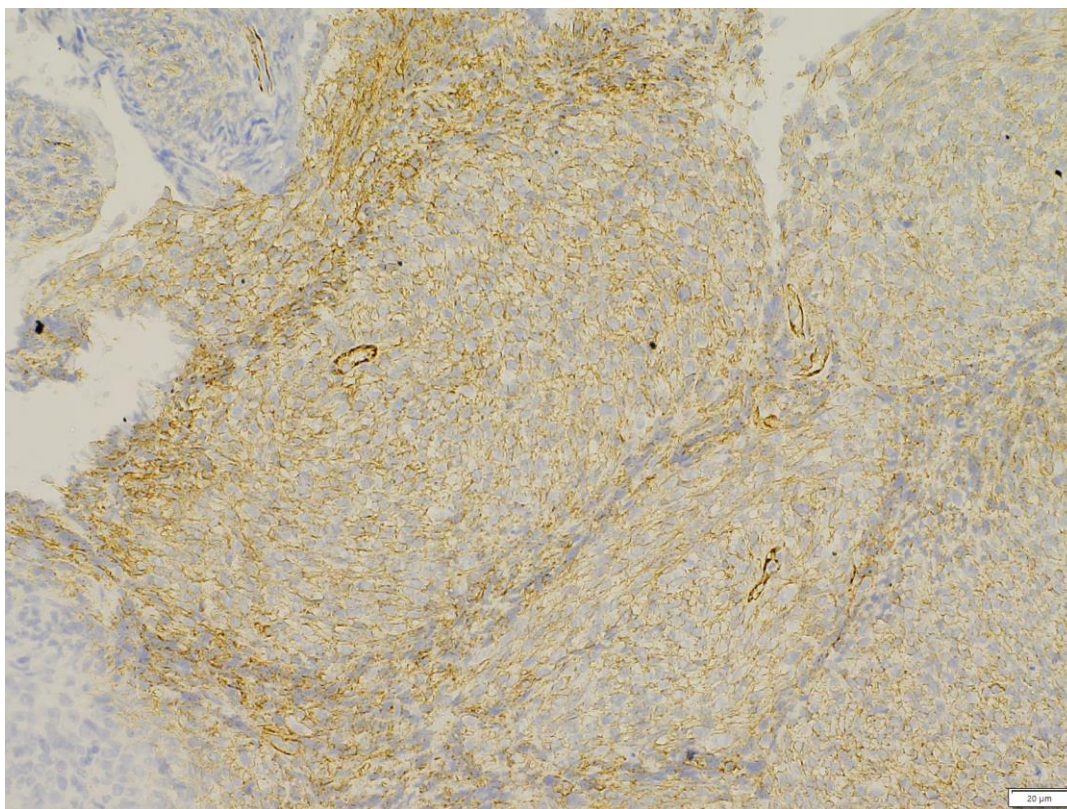
**Slika 13.** Prikaz rezultata detekcije aktivne forme proteina  $\beta$ -katenina metodom imunohistokemije (povećanje 200X). Primjer uzorka meningeoma s ekspresijom aktivnog  $\beta$ -katenina u citoplazmi i jezgrama tumorskih stanica (uzorak T482, gradus III, 5-50% pozitivnih jezgara, nemetilirani promotor 1A gena *APC*).

Za uzorke s ekspresijom aktivnog  $\beta$ -katenina u jezgrama određen je postotak pozitivnih jezgara u vidnom polju (Slika 14). Manje od 5% jezgara s ekspresijom u vidnom polju zabilježeno je kod šest uzoraka (50%), a isto je zabilježeno i za uzorke s do 50% pozitivnih jezgara (6/12). Niti jedan uzorak nije imao više od 50% pozitivnih jezgara u vidnom polju. Uzorci s više pozitivnih jezgara (>5%) pripadali su višim gradusima meningeoma (gradus II i III). Povezanost viših gradusa meningeoma s pojavnošću većeg broja jezgara koje ekspresiraju aktivni  $\beta$ -katenin dokazao je  $\chi^2$  test ( $\chi^2=12,839$ ,  $df=2$ ,  $p=0,002$ ), a umjerena korelacija promatranih parametara potvrđena je i Cramer V testom ( $\phi_c=0,528$ ,  $p=0,002$ ).



**Slika 14.** Raspodjela uzoraka meningeoma pojedinih gradusa s obzirom na ekspresiju aktivnog  $\beta$ -katenina u jezgrama tumorskih stanica. Brojevi iznad svakog stupca označavaju broj uzoraka pojedinog gradusa meningeoma u kategorijama ekspresije aktivnog  $\beta$ -katenina u jezgrama.

Uzorci s identificiranom metilacijom promotora APC-1A nisu imali ekspresiju aktivnog  $\beta$ -katenina u jezgrama tumorskih stanica. Jedan od uzoraka s metilacijom promotora APC-1A nije imao zabilježenu ekspresiju aktivnog  $\beta$ -katenina u tumorskim stanicama (IRS=0) (Prilog 1; Slika 9), dok je jedan uzorak imao jaku ekspresiju aktivnog  $\beta$ -katenina u području stanične membrane i citoplazme (IRS=12) (Prilog 1; Slika 15). Nije otkrivena povezanost imunopozitiviteta aktivnog  $\beta$ -katenina zabilježenog u staničnoj membrani i/ili citoplazmi s metilacijom promotora APC-1A ( $p=0,253$ ), kao niti imunopozitiviteta aktivnog  $\beta$ -katenina zabilježenog u jezgrama s metilacijom promotora APC-1A ( $p=0,390$ ).



**Slika 15.** Prikaz rezultata detekcije aktivne forme proteina  $\beta$ -katenina metodom imunohistokemije (povećanje 200X). Primjer ekspresije aktivnog  $\beta$ -katenina u području stanične membrane i citoplazme (uzorak T607, gradus III, IRS=12, metilirani promotor 1A gena APC).



## 5. RASPRAVA

Istraživanje je obuhvatilo 46 uzoraka intrakranijalnih meningeoma izoliranih iz 28 pacijentica te 18 pacijenata što odgovara prirodnoj incidenciji meningeoma u populaciji gdje žene češće obolijevaju od muškaraca (Louis i sur. 2016a). Svi uzorci klasificirani su u tri histološka gradusa, 24 uzorka su pripadala gradusu I, 17 uzoraka gradusu II te pet uzoraka gradusu III, što odgovara činjenici kako su meningeomi uglavnom benigni tumori uz malu incidenciju malignih oblika u populaciji (Louis i sur. 2016a). Od ukupno 28 pacijentica uključenih u ovo istraživanje 16 (57,1%) ih je prilikom dijagnoze bilo mlađe životne dobi (<60 godina). Životna dob 77,8% oboljelih muškaraca uključenih u ovo istraživanje kretala se od 60-85 godina. Srednja životna dob oboljelih iznosila je 58,8 godina što je niže od srednje životne dobi oboljelih navedene u klasifikaciji primarnih tumora središnjeg živčanog sustava SZO-a iz 2016. godine, a koja iznosi 65 godina (Louis i sur. 2016a). Razlog nižoj srednjoj životnoj dobi ovog uzorka može biti statistički značajna niža dob obolijevanja žena uključenih u ovo istraživanje u odnosu na muškarce ( $p=0,020$ ) koja je pri postavljanju dijagnoze iznosila 54,7 godina, a kod muškaraca 65,5 godina. Također, kao što je već spomenuto, pacijentice su činile veći dio uzorka meningeoma (60,8%). Nižu srednju životnu dob oboljelih pokazalo je i istraživanje Kamenova i sur. (2019) u kojem je ona iznosila 61,5 godina, a ukupan uzorak ispitanika je sadržavao veći udio pacijentica (70,1%). Smatra se da su za češće obolijevanje žena u mlađoj dobnoj skupini odgovorni spolni hormoni (estrogen i progesteron) za koje tumorske stanice izražavaju funkcionalne receptore, a omjer oboljelih žena u razdoblju prije menopauze u odnosu na muškarce iste životne dobi može iznositi 15:1 (Louis i sur. 2016a; Pećina-Šlaus i sur. 2016a). S dijagnozom viših gradusa (atipični i anaplastični meningeomi) pada incidencija obolijevanja u ženskoj populaciji (Louis i sur. 2016a) što je bio slučaj i u ovom istraživanju, u kojem je otkrivena statistički značajna povezanost ( $p=0,040$ ) obolijevanja žena od benignog oblika meningeoma, a muškaraca od meningeoma višeg histološkog gradusa. Još uvijek nije potpuno razjašnjen ovakav obrazac obolijevanja u populaciji, a smatra se da značajan utjecaj imaju spolni hormoni čemu u prilog ide i činjenica kako kod anaplastičnih meningeoma do danas nisu identificirani progesteronski receptori (Krayenbühl i sur. 2007; Louis i sur. 2016a).

Analiza metilacije promotora 1A tumor supresor gena *APC* u ovim istraživanju pokazala je snažnu korelaciju utišanosti gena s anaplastičnim, odnosno malignim oblicima meningeoma ( $p=0,000$ ). Istraživanja pokazuju da je utišavanje promotorskog mjesta gena *APC* rani događaj u tumorigenezi kolorektalnog karcinoma i karcinoma endometrija (Ignatov i sur. 2010; Liang i sur. 2017), dok je u ovom istraživanju utišavanje gena bio kasniji događaj u tumorigenezi povezan s najvišim gradusom, odnosno malignim oblikom meningeoma. Povezanost metilacije gena *APC* s agresivnijim oblicima tumora pokazali su i Brabender i sur. (2001) u svojem istraživanje gdje je utvrđen lošiji klinički ishod kod dijagnoze karcinoma ne-malih stanica pluća s metiliranim promotorom gena *APC*. Istraživanje Van Der Auwera i sur. (2008) na uzorcima upalnog karcinoma dojke također pokazuje korelaciju obrasca metiliranosti gena *APC* s višim gradusima karcinoma, no pojačana metiliranost promotora nije povezana s porastom dobi pacijenata. Takav rezultat odgovara i rezultatima u ovom istraživanju gdje također nije zamijećena korelacija između obrasca metiliranosti i dobi oboljelih. Ipak, takav rezultat djelomično se može pripisati malom broju uzoraka anaplastičnih meningeoma uključenih u ovo istraživanje. U našim uzorcima benignih i atipičnih meningeoma nije identificirana metiliranost promotora gena *APC*, a kod dva uzorka anaplastičnih meningoema s utvrđenom metilacijom promotora signal je bio prisutan u metiliranoj i nemetiliranoj reakcijskoj smjesi. Takvi rezultati mogu se objasniti heterogenošću tumorske mase ili inaktivacijom samo jednog alela gena *APC*. Naime, tumori su heterogene nakupine stanica, a pojedini stanični klonovi progresijom mogu steći dodatne mutacije što najčešće prati rast tumorske mase, pojačana invazivnost i tendencija metastaziranja u okolna tkiva i udaljene organe (McGranahan i Swanton 2017). Važno je također istaknuti kako su uzorci tumorskog tkiva namijenjeni za izolaciju genomske DNA prikupljeni tijekom kirurških zahvata, što može rezultirati djelomičnim odstranjivanjem i okolnog zdravog tkiva s normalnom ekspresijom gena *APC*. Istraživanje hipermetilacije promotora 1A gena *APC* Fu i sur. (2009) u uzorcima nazubljenih (engl. *serrated*) kolorektalnih polipa pokazalo je prisutnost signala u obje reakcijske smjese kod 33,3% uzoraka što autori smatraju posljedicom prisutnosti utvrđene monoalelne inaktivacije promotora 1A gena *APC* u okolnom zdravom tkivu, dok je bialalna inaktivacija gena *APC* otkrivena u 41,7% uzoraka. Iako istraživanje prikazano u ovom diplomskom radu nije obuhvatilo određivanje razine proteinskog produkta gena *APC* te nije moguće raspravljati o prisutnosti monoalelne ili bialelne inaktivacije promotora gena metilacijom, važno je istaknuti kako i monoalelno utišavanje tumor supresor gena može biti važan preduvjet za razvoj tumorigeneze. Primjerice, poznato je kako oboljeli od Li-Fraumenijevog sindroma, nositelji nasljedne mutacije jedne kopije tumor supresor gena *p53*, imaju znatno povećanu vjerojatnost razvoja tumora tijekom života (75% za muškarce; gotovo 100% za žene) (Guha i Malkin 2017).

Budući da metilacija promotora gena *APC* može dovesti do pojačane ekspresije aktivnog  $\beta$ -katenina napravljena je imunohistokemijska analiza detekcije nefosforiliranog  $\beta$ -katenina u tumorskim žarištima. Ovo istraživanje je pokazalo da je ekspresija aktivnog  $\beta$ -katenina prisutna u 97,8% uzoraka, najčešće s jakom ekspresijom (jaka ekspresija kod 63,1% svih uzoraka; umjerena ekspresija kod 23,9% svih uzoraka; slaba kod 13% svih uzoraka), dok je u uzorku kore zdravog čovjeka identificirana slaba ekspresija, sugerirajući aktivaciju  $\beta$ -katenina u meningeomima. Umjerena korelacija između spola oboljelih i intenziteta ekspresije aktivnog  $\beta$ -katenina ( $p=0,004$ ) u ovom istraživanju sugerirala je veći intenzitet aktivacije kanonskog signalnog puta Wnt kod žena, no takav rezultat može se djelomično objasniti većim brojem pacijentica uključenih u ovo istraživanje. Utvrđena ekspresija u području stanične membrane i citoplazme odgovara činjenici da su meningeomi u najvećem broju slučajeva benignog karaktera te slabe tendencije ka invaziji okolnog tkiva u čemu važnu ulogu igraju adherentni spojevi čiju molekularnu strukturu čine E-kadherin i  $\beta$ -katenin (Gao i sur. 2005; Pecina-Slaus i sur. 2012). Iako intenzitet citoplazmatske ekspresije aktivnog  $\beta$ -katenina nije bio povezana s gradusom, prelazak aktivnog  $\beta$ -katenina u jezgru se pokazao važnim događajem za meningeome viših gradusa, posebice atipične meningeome ( $p=0,002$ ). Translokacija  $\beta$ -katenina u jezgre i aktivacija kanonskog signalnog puta Wnt poznati je onkogeni događaj u tumorigenezi skoro trećine (29%) adenokarcinoma želuca s utvrđenom mutacijom gena *CTNNB1* (Clements i sur. 2002). S obzirom da lokalizacija aktivnog  $\beta$ -katenina u jezgrama tumorskih stanica ukazuje na aktivnost kanonskog signalnog puta Wnt, a time i na ekspresiju gena s poznatom onkogenom aktivnošću (ciklin D, c-myc, VEGF, MMP-7) (Sharma i sur. 2021) moguće je da su uzorci atipičnih meningeoma u ovom istraživanju podložniji većoj invazivnosti okolnog tkiva, a time i učestalijoj pojavi recidiva. Ipak, za potvrdu takvog obrasca potrebno je uključiti i podatke o invazivnosti u okolno tkivo te stupnju pojavnosti recidiva nakon kirurškog zahvata, a takvi podaci nisu bili dostupni prilikom provođenja ovog istraživanja.

Statistička obrada pokazala je da metilacija promotora gena *APC* nije nužno utjecala na ekspresiju aktivne forme  $\beta$ -katenina, a  $\beta$ -katenin translociran u jezgre zabilježen je i u uzorcima koju su imali nemetiliran promotor gena *APC*. Moguće objašnjenje je da je mehanizam utišavanja gena *APC* posredovan miRNA interakcijama, a ne metilacijom. miR-135a i miR-135b identificirane su kao male nekodirajuće RNA molekule čije interakcije s 3' krajem tumor supresor gena *APC* uzrokuju smanjenje proteinskog produkta u uzorcima kolorektalnog karcinoma (Nagel i sur. 2008), a njihova uloga u tumorigenezi menigeoma još uvijek nije ispitana. Osim toga, važno je uzeti u obzir mogući izostanak bialelne inaktivacije promotora gena *APC* što može rezultirati normalnim ili nešto nižim endogenim razinama proteinskog produkta, no dovoljnim za održavanje normalnih staničnih procesa. Takav obrazac potvrđen je istraživanjem Van Der Auwera i sur. (2008) u kojem nije zamijećena razlika u udjelu mRNA transkripta gena *APC* između uzoraka upalnog karcinoma dojke s visokom stopom metilacije te uzoraka s niskom ili bez utvrđene metilacije promotora gena *APC*. Nadalje, istraživanje Bläker i sur.



(2003) na uzorcima 10 adenomatoznih polipa iz pacijentice s nasljednom mutacijom gena *APC* pokazuje kako usprkos utvrđenoj somatskoj mutaciji, a time i bialalenoj inaktivaciji gena *APC* u svim uzorcima, izostaje translokacija  $\beta$ -katenina u jezgre stanica u 90% uzoraka uključenih u istraživanje. Takav rezultat sugerira kako inaktivacija obje kopije gena *APC* nije dovoljna za aktivaciju kanonskog signalnog puta Wnt kao i moguću ulogu mutacija u drugih molekula sudionika destruktivnog kompleksa u aktivaciji signalnog puta Wnt/ $\beta$ -katenin. Istraživanje Farago i sur. (2005) pokazuje kako indukcija GSK3 $\beta$  bez kinazne aktivnosti dovodi do stabilizacije  $\beta$ -katenina i njegove translokacije u jezgre stanica što dovodi do inicijacije tumorigeneze u tkivu dojke. Nadalje, poznato je kako mutacije gena *AXIN1* i *AXIN2* koreliraju s translokacijom aktivnog  $\beta$ -katenina u jezgri tumorskih stanica karcinoma želuca sudjelujući tako u aktivaciji kanonskog signalnog puta Wnt (Pan i sur. 2008). S obzirom na rezultate ovog istraživanja, ispravno je pretpostavljati kako aktivaciji signalnog puta Wnt i oblikovanju tumorskog fenotipa anaplastičnih meningeoma, izuzev utišavanja gena *APC* metilacijom, doprinose genetske i/ili epigenetske promjene drugih molekularnih aktera citoplazamskog destruktivnog kompleksa.

Prije provođenja ovog istraživanja nisu pronađeni literaturni izvori o obrascu metilacije promotorskog mjesta tumor supresor gena *APC* u intrakranijalnim meningeomima čovjeka. Najvažniji ograničavajući parametar ovog istraživanja bio je broj uzoraka intrakranijalnih meningeoma višeg histološkog gradusa zbog njegove slabe incidencije u populaciji. Kako bi se potvrdili rezultati ovog istraživanja potrebno je uzorak anaplastičnih meningeoma dodatno proširiti.

Istraživanje prikazano u ovom diplomskom radu nije obuhvatio podatke o pojavnosti recidiva ili metastaza te tumorskoj masi i stupnju invazivnosti okolnog tkiva kao ni podatke o preživljenju oboljelih. Prikupljanje takvih podataka uz proširenje broja uzoraka meningeoma višeg histološkog gradusa te proširenje metodologije istraživanja na otkrivanje lokacije proteina APC u stanici te endogene količine proteinskog produkta kao i proširenje istraživanja na druge molekule destruktivnog kompleksa može biti vrijedno u daljem istraživanju aktivacije signalnog puta Wnt i njegove uloge u progresiji intrakranijalnih meningeoma.

## 6. ZAKLJUČAK

Rezultati analize obrasca metilacije promotora 1A gena *APC* pokazali su da metilacija predstavlja kasni događaj u tumorigenezi meningeoma te je isključivo povezana s malignim oblikom, odnosno gradusom III ( $p=0,000$ ). Takav rezultat u skladu je s pretpostavkom o povezanosti hipermetilacije promotora tumor supresor gena *APC* s meningeomima višeg gradusa, postavljenoj na početku istraživanja.

Analizom ekspresije i unutarstanične lokalizacije  $\beta$ -katenina utvrđena je ekspresija aktivnog  $\beta$ -katenina u 97,8% meningeoma, najčešće s jakim ekspresijom (63,1% uzoraka), dok je u uzorku kore zdravog čovjeka identificirana slaba ekspresija što sugerira aktivaciju  $\beta$ -katenina u meningeomima. Ekspresija aktivnog  $\beta$ -katenina češće je vezana uz citoplazmu i/ili membranu što odgovara činjenici da su meningeomi u najvećem broju slučajeva benignog karaktera te slabe tendencije ka invaziji okolnog tkiva. Osim toga, utvrđen je različit intenzitet ekspresije  $\beta$ -katenina u muškaraca i žena ( $p=0,004$ ). Žene češće imaju jaku ekspresiju aktivnog  $\beta$ -katenina u tumorskim žarištima dok je kod muškarca češća slabija ekspresija, a takav rezultat može se djelomično objasniti većim brojem pacijentica uključenih u ovo istraživanje. Otkriveno je također kako je prelazak aktivnog  $\beta$ -katenina u jezgre događaj vezan uz više graduse, posebice atipične meningeome ( $p=0,002$ ), sugerirajući aktivaciju signalnog puta Wnt i njegovu ulogu u progresiji meningeoma. Premda prelazak aktivnog  $\beta$ -katenina u jezgre nije povezan s metilacijom, ovakav rezultat djelomično se poklapa s očekivanom aktivacijom kanonskog signalnog puta Wnt u meningeomima višeg gradusa.

Istraživanje prikazano u ovom diplomskom radu pokazalo je aktivaciju signalnog puta Wnt u višim gradusima meningeoma (posebice gradusu II), međutim metilacija gena *APC*, otkrivena isključivo u anaplastičnim meningeomima, nije nužno jedinstveni događaj u pozadini aktivacije signalnog puta Wnt/ $\beta$ -katenin. Iz navedenog možemo zaključiti kako metilacija promotora gena *APC* nije nužno povezana s aktivnošću i lokalizacijom aktivnog  $\beta$ -katenina te je moguće da je u podlozi transporta aktivnog  $\beta$ -katenina u jezgre tumorskih stanica inaktivacija gena *APC* mehanizmima drugačijima od onog ispitanog u ovom istraživanju.

## 7. LITERATURA

- Van der Auwera I., Van Laere S.J., Van den Bosch S.M., van den Eynden G.G., Trinh B.X., Van dam P.A., Colpaert C.G., van Engeland M., Van Marck E.A., Vermeulen P.B., Dirix L.Y. (2008): Aberrant methylation of the Adenomatous Polyposis Coli (APC) gene promoter is associated with the inflammatory breast cancer phenotype. *Br. J. Cancer* **99**: 1735–1742.
- Bachir S., Shah S., Shapiro S., Koehler A., Mahammedi A., Samy R.N., Zuccarello M., Schorry E., Sengupta S. (2021): Neurofibromatosis type 2 (NF2) and the implications for vestibular schwannoma and meningioma pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **22**: 690.
- Banan R., Abbetmeier-Basse M., Hong B., Dumitru C.A., Sahm F., Nakamura M., Krauss J.K., Hartmann C. (2021): The prognostic significance of clinicopathological features in meningiomas: Microscopic brain invasion can predict patient outcome in otherwise benign meningiomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **47**: 724–735.
- 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. (2016a): Genomic landscape of intracranial meningiomas. *J. Neurosurg.* **125**: 525–535.
- Bi W.L., Mei Y., Agarwalla P.K., Beroukhim R., Dunn I.F. (2016b): Genomic and Epigenomic Landscape in Meningioma. *Neurosurg. Clin. N. Am.* **27**: 167–179.
- Birzu C., Peyre M., Sahm F. (2020): Molecular alterations in meningioma: Prognostic and therapeutic perspectives. *Curr. Opin. Oncol.* **32**: 613–622.
- Bläker H., Scholten M., Sutter C., Otto H.F., Penzel R. (2003): Somatic mutations in familial adenomatous polypos. Nuclear translocation of beta-catenin requires more than biallelic APC inactivation. *Am. J. Clin. Pathol.* **120**: 418–423.
- Boetto J., Peyre M., Kalamarides M. (2021): Meningiomas from a developmental perspective: exploring the crossroads between meningeal embryology and tumorigenesis. *Acta Neurochir. (Wien)*. **163**: 57–66.
- Brabender J., Usadel H., Danenberg K.D., Metzger R., Schneider P.M., Lord R. V., Wickramasinghe K., Lum C.E., Park J.M., Salonga D., Singer J., Sidransky D., Hölscher A.H., Meltzer S.J., Danenberg P. V. (2001): Adenomatous polyposis coli gene promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer is associated with survival. *Oncogene* **20**: 3528–3532.

- Brunner E.C., Romeike B.F.M., Jung M., Comtesse N., Meese E. (2006): Altered expression of  $\beta$ -catenin/E-cadherin in meningiomas. *Histopathology* **49**: 178–187.
- Clements W.M., Wang J., Sarnaik A., Kim O.J., MacDonald J., Fenoglio-Preiser C., Groden J., Lowy A.M. (2002): beta-Catenin mutation is a frequent cause of Wnt pathway activation in gastric cancer. *Cancer Res.* **62**: 3503–3506.
- Cordova C., Kurz S.C. (2020): Advances in Molecular Classification and Therapeutic Opportunities in Meningiomas. *Curr. Oncol. Rep.* **22**: 84.
- Cushing H. (1922): The meningiomas (dural endotheliomas): Their source, and favoured seats of origin. *Brain* **45**: 282–316.
- Delgado-López P.D., Cubo-Delgado E., González-Bernal J.J., Martín-Alonso J. (2020): A Practical Overview on the Molecular Biology of Meningioma. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **20**: 62.
- Delpu Y., Cordelier P., Cho W.C., Torrisani J. (2013): DNA methylation and cancer diagnosis. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 15029–15058.
- Dor Y., Cedar H. (2018): Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. *Lancet (London, England)* **392**: 777–786.
- van Engeland M., Weijnenberg M.P., Roemen G.M.J.M., Brink M., De Bruïne A.P., Goldbohm R.A., van den Brandt P.A., Baylin S.B., de Goeij A.F.P.M., Herman J.G. (2003): Effects of dietary folate and alcohol intake on promoter methylation in sporadic colorectal cancer: The Netherlands cohort study on diet and cancer. *Cancer Res.* **63**: 3133–3137.
- Fang X., Svitkina T.M. (2022): Adenomatous Polyposis Coli (APC) in cell migration. *Eur. J. Cell Biol.* **101**: 151228.
- Farago M., Dominguez I., Landesman-Bollag E., Xu X., Rosner A., Cardiff R.D., Seldin D.C. (2005): Kinase-inactive glycogen synthase kinase 3 $\beta$  promotes Wnt signaling and mammary tumorigenesis. *Cancer Res.* **65**: 5792–5801.
- Fearnhead N.S., Britton M.P., Bodmer W.F. (2001): The ABC of APC. *Hum. Mol. Genet.* **10**: 721–733.
- Frommer M., McDonald L.E., Millar D.S., Collis C.M., Watt F., Grigg G.W., Molloy P.L., Paul C.L. (1992): A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 1827–1831.

- Fu X., Li J., Li K., Tian X., Zhang Y. (2009): Hypermethylation of APC promoter 1A is associated with moderate activation of Wnt signalling pathway in a subset of colorectal serrated adenomas. *Histopathology* **55**: 554–563.
- Gao C., Wang Y., Broaddus R., Sun L., Xue F., Zhang W. (2017): Exon 3 mutations of CTNNB1 drive tumorigenesis: a review. *Oncotarget* **9**: 5492–5508.
- Gao S., Eiberg H., Kroghdal A., Liu C.J., Sørensen J.A. (2005): Cytoplasmic expression of E-cadherin and beta-Catenin correlated with LOH and hypermethylation of the APC gene in oral squamous cell carcinomas. *J. Oral Pathol. Med.* **34**: 116–119.
- Guha T., Malkin D. (2017): Inherited TP53 Mutations and the Li–Fraumeni Syndrome. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **7**: a026187.
- Ignatov A., Bischoff J., Ignatov T., Schwarzenau C., Krebs T., Kuester D., Costa S.D., Roessner A., Semczuk A., Schneider-Stock R. (2010): APC promoter hypermethylation is an early event in endometrial tumorigenesis. *Cancer Sci.* **101**: 321–327.
- Kalamarides M., Stemmer-Rachamimov A.O., Niwa-Kawakita M., Chareyre F., Taranchon E., Han Z.Y., Martinelli C., Lusi E.A., Hegedus B., Gutmann D.H., Giovannini M. (2011): Identification of a progenitor cell of origin capable of generating diverse meningioma histological subtypes. *Oncogene* **30**: 2333–2344.
- Kamenova M., Guzman R., Soleman J. (2019): Demographics and Outcome of Histologically Confirmed Intracranial Meningiomas. *Clin. Transl. Neurosci.* **3**: 21.
- Katar S., Baran O., Evran S., Cevik S., Akkaya E., Baran G., Antar V., Hanimoglu H., Kaynar M.Y. (2017): Expression of miRNA-21, miRNA-107, miRNA-137 and miRNA-29b in meningioma. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **156**: 66–70.
- Krayenbühl N., Pravdenkova S., Al-Mefty O. (2007): De novo versus transformed atypical and anaplastic meningiomas: comparisons of clinical course, cytogenetics, cytokinetics, and outcome. *Neurosurgery* **61**: 495–503.
- Lee S., Karas P.J., Hadley C.C., Bayley V. J.C., Basit Khan A., Jalali A., Sweeney A.D., Klisch T.J., Patel A.J. (2019): The role of merlin/NF2 loss in meningioma biology. *Cancers (Basel)*. **11**: 1633.
- Li B.Q., Liu P.P., Zhang C.H. (2017): Correlation between the methylation of APC gene promoter and colon cancer. *Oncol. Lett.* **14**: 2315–2319.

- Liang T.J., Wang H.X., Zheng Y.Y., Cao Y.Q., Wu X., Zhou X., Dong S.X. (2017): APC hypermethylation for early diagnosis of colorectal cancer: A meta-analysis and literature review. *Oncotarget* **8**: 46468–46479.
- 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 Neuropathol.* **131**: 803–820.
- Marosi C., Hassler M., Roessler K., Reni M., Sant M., Mazza E., Vecht C. (2008): Meningioma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **67**: 153–171.
- Nagel R., le Sage C., Diosdado B., van der Waal M., Oude Vrielink J.A.F., Bolijn A., Meijer G.A., Agami R. (2008): Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. *Cancer Res.* **68**: 5795–5802.
- Pan K.F., Liu W.G., Zhang L., You W.C., Lu Y.Y. (2008): Mutations in components of the Wnt signaling pathway in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* **14**: 1570–4.
- Pan S., Zhang L., Gao L., Gu B., Wang F., Xu J., Shu Y., Yang D., Chen Z. (2009): The property of methylated APC gene promotor and its influence on lung cancer cell line. *Biomed. Pharmacother.* **63**: 463–468.
- Parsons M.J., Tammela T., Dow L.E. (2021): WNT as a Driver and Dependency in Cancer. *Cancer Discov.* **11**: 2413–2429.
- Pećina-Šlaus N. (2009): *Odabrane metode molekularne biologije – laboratorijski priručnik*. Med. Nakl. d.o.o., Zagreb .
- Pecina-Slaus N., Cicvara-Pecina T., Kafka A. (2012): Epithelial-to-mesenchymal transition: Possible role in meningiomas. *Front. Biosci. - Elit.* **4**: 889–896.
- Pećina-Šlaus N., Kafka A., Lechpammer M. (2016a): Molecular genetics of intracranial meningiomas with emphasis on canonical Wnt signalling. *Cancers (Basel)*. **8**: 4–23.

- Pećina-Šlaus N., Kafka A., Vladušić T., Pećina H.I., Hrašćan R. (2016b): AXIN1 Expression and Localization in Meningiomas and Association to Changes of APC and E-cadherin. *Anticancer Res.* **36**: 4583–4594.
- Pećina-Šlaus N., Nikuševa Martić T., Tomas D., Beroš V., Zeljko M., Čupić H. (2008): Meningiomas exhibit loss of heterozygosity of the APC gene. *J. Neurooncol.* **87**: 63–70.
- Pereira B.J.A., Oba-Shinjo S.M., de Almeida A.N., Marie S.K.N. (2019): Molecular alterations in meningiomas: Literature review. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **176**: 89–96.
- Sabattini E., Bisgaard K., Ascani S., Poggi S., Piccioli M., Ceccarelli C., Pieri F., Fraternali-Orcioni G., Pileri S.A. (1998): The EnVision++ system: A new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. *J. Clin. Pathol.* **51**: 506–511.
- Sahm F., Schrimpf D., Stichel D., Jones D.T.W., Hielscher T., Scheffy 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., Drieschler 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. Oncol.* **18**: 682–694.
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harb. Lab. Press. New York .
- Shang S., Hua F., Hu Z.W. (2017): The regulation of  $\beta$ -catenin activity and function in cancer: Therapeutic opportunities. *Oncotarget* **8**: 33972–33989.
- Sharma A., Mir R., Galande S. (2021): Epigenetic Regulation of the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway in Cancer. *Front. Genet.* **12**: 681053.
- von Spreckelsen N., Kessler C., Brokinkel B., Goldbrunner R., Perry A., Mawrin C. (2022): Molecular neuropathology of brain-invasive meningiomas. *Brain Pathol.* **32**: e13048.

- von Spreckelsen N., Waldt N., Poetschke R., Kessler C., Dohmen H., Jiao H.K., Nemeth A., Schob S., Scherlach C., Sandalcioglu I.E., Deckert M., Angenstein F., Krschek B., Stavrinou P., Timmer M., Remke M., Kirches E., Goldbrunner R., Chiocca E.A., Huettelmaier S., Acker T., Mawrin C. (2020): KLF4 K409Q-mutated meningiomas show enhanced hypoxia signaling and respond to mTORC1 inhibitor treatment. *Acta Neuropathol. Commun.* **8**: 41.
- Wang L., Chen S., Liu Y., Zhang H., Ren N., Ma R., He Z. (2020): The biological and diagnostic roles of MicroRNAs in meningiomas. *Rev. Neurosci.* **31**: 771–778.
- Wang M., Deng X., Ying Q., Jin T., Li M., Liang C. (2015): MicroRNA-224 targets ERG2 and contributes to malignant progressions of meningioma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **460**: 354–361.
- Watson M.A., Gutmann D.H., Peterson K., Chicoine M.R., Kleinschmidt-DeMasters B.K., Brown H.G., Perry A. (2002): Molecular characterization of human meningiomas by gene expression profiling using high-density oligonucleotide microarrays. *Am. J. Pathol.* **161**: 665–672.
- Wiemels J., Wrensch M., Claus E.B. (2010): Epidemiology and etiology of meningioma. *J. Neurooncol.* **99**: 307–314.
- Yu F., Yu C., Li F., Zuo Y., Wang Y., Yao L., Wu C., Wang C., Ye L. (2021): Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in cancers and targeted therapies. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**: 307.
- Zada G., Yashar P., Robison A., Winer J., Khalessi A., Mack W.J., Giannotta S.L. (2013): A proposed grading system for standardizing tumor consistency of intracranial meningiomas. *Neurosurg. Focus* **35**: E1.
- Zhan T., Rindtorff N., Boutros M. (2016): Wnt signaling in cancer. *Oncogene* 2017 3611 **36**: 1461–1473.
- Zhang Y., Wang X. (2020): Targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in cancer. *J. Hematol. Oncol.* **13**: 165.
- Zhu L., Li X., Yuan Y., Dong C., Yang M. (2021): APC Promoter Methylation in Gastrointestinal Cancer. *Front. Oncol.* **11**: 653222.



## 8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 9. svibnja 1997. godine u Splitu. Osnovnu školu završila sam u Otoku, a srednjoškolsko obrazovanje nastavila sam u Splitu gdje sam 2016. godine završila III. gimnaziju. Iste godine započela sam preddiplomski studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a 2020. godine upisala sam diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija, na istom fakultetu. Tijekom studiranja sudjelovala sam na dvije znanstveno-popularne manifestacije Noć biologije. Uz hrvatski jezik aktivno se služim engleskim i španjolskim jezikom.

**Prilog 1.** Patohistološke karakteristike analiziranih uzoraka intrakranijalnih meningeoma te rezultati analize statusa metilacije promotora 1A gena *APC* i ekspresije NON-P- $\beta$  proteina u stanicama analiziranih tumorskih žarišta.

REDNI BROJ	BROJ BANKE	HISTOLOŠKI GRADUS	DOB	SPOL	LOKALIZACIJA PROTEINA NON- P-B U STANICI	IRS VRIJEDNOST NON-P-B U STANICI	METILACIJA PROMOTORA
1	T268	GI	64	Ž	C	8	UM
2	T269	GI	66	M	SM+C	4	UM
3	T272	GI	66	M	SM+C	6	UM
4	T276	GI	58	Ž	SM+C	8	UM
5	T285	GI	68	Ž	SM+C	12	UM
6	T291	GI	55	Ž	C	6	UM
7	T294	GI	78	Ž	SM+C	9	UM
8	T297	GI	77	M	SM+C	12	UM
9	T324	GI	48	Ž	SM+C	6	UM
10	T325	GI	43	Ž	SM+C	12	UM
11	T328	GI	37	Ž	SM+C+J	6	UM
12	T334	GI	59	Ž	SM+C	9	UM
13	T434	GI	64	Ž	SM+C	12	UM
14	T435	GI	66	Ž	SM+C	12	UM
15	T436	GI	83	Ž	SM+C	12	UM
16	T437	GI	69	Ž	SM+C	12	UM
17	T438	GI	48	Ž	SM+C	9	UM
18	T441	GI	59	Ž	SM+C	12	UM
19	T405	GI	57	Ž	SM+C	9	UM
20	T600	GI	71	Ž	SM+C	12	UM
21	T602	GI	76	M	SM+C	8	UM
22	T603	GI	31	Ž	SM+C	12	UM
23	T608	GI	40	M	SM+C	12	UM
24	T439	GI	66	M	SM+C	9	UM
25	T243	GII	73	M	SM+C	8	UM
26	T331	GII	60	M	SM+C	4	UM
27	T430	GII	40	M	SM+C	12	UM
28	T451	GII	38	Ž	SM+C+J	6	UM
29	T452	GII	64	Ž	SM+C+J	12	UM
30	T453	GII	76	M	J	2	UM
31	T454	GII	69	M	SM+C+J	4	UM
32	T455	GII	57	M	SM+C+J	4	UM
33	T456	GII	64	M	SM+C	12	UM
34	T458	GII	70	Ž	SM+C	12	UM
35	T459	GII	30	Ž	C	12	UM
36	T460	GII	67	M	SM+C+J	12	UM

## Prilog 1. Nastavak

37	T461	GII	73	M	SM+C+J	12	UM
38	T462	GII	58	Ž	SM+C+J	12	UM
39	T604	GII	56	M	SM+C+J	6	UM
40	T605	GII	17	Ž	SM+J	8	UM
41	T606	GII	71	Ž	SM+C	12	UM
42	T607	GIII	44	Ž	SM+C	12	ME
43	T266	GIII	67	M	SM+C	12	UM
44	T479	GIII	23	Ž	SM+C	9	UM
45	T481	GIII	85	M	-	0	ME
46	T482	GIII	74	Ž	C+J	12	UM

**Legenda:** GI – gradus I (benigni meninegom); GII – gradus II (atipični menigeom); GIII – gradus III (anaplastični menigeom); Ž – žensko; M – muško; SM – stanična membrana; C – citoplazma; J – jezgra; UM – nemetilirani promotor; ME – metilirani promotor