

# Utjecaj izmjene E- i N-kadherina na fosforilacijski status beta-katenina i epitelno-mezenhimsku tranziciju u intrakranijalnim meningeomima

---

**Bukovac, Anja**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2020**

*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:217:459234>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-21**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Anja Bukovac

**Utjecaj izmjene E- i N-kadherina na fosforilacijski status beta-katenina i epitelno-mezenhimsku tranziciju u intrakranijalnim meningeomima**

DOKTORSKI RAD

Mentor:  
Prof. dr. sc. Nives Pećina-Šlaus

Zagreb, 2020.



University of Zagreb

Faculty of Science  
Department of Biology

Anja Bukovac

**The impact of E- and N-cadherin switch  
on phosphorylation status of beta-catenin  
and the epithelial-mesenchymal transition  
in intracranial meningiomas**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:  
Prof. dr. sc. Nives Pećina-Šlaus

Zagreb, 2020.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Laboratoriju za neuroonkologiju na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Nives Pećine-Šlaus, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ekperimentalni postupci, analiza preparata i troškovi izrade ove disertacije su financirani sredstvima Hrvatske zaklade za znanost, istraživački projekt HRZZ6625 „Uloga signalnog puta Wnt u epitelno-mezenhimske tranziciji“ (WNT4EMT), voditeljica prof.dr.sc. Nives Pećina-Šlaus, te sredstvima Znanstvenog centra izvrsnosti za temeljnu, kliničku i translacijsku neuroznanost (ZCI - Neuro), istraživački projekt GA KK01.1.1.01.0007 “Ekperimentalna i klinička istraživanja hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga u perinatalnoj i odrasloj dobi”, voditelj prof. dr. sc. Miloš Judaš, koji se provode na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.



**Research was funded/This publication was co-financed by the Scientific Centre of Excellence for Basic, Clinical and Translational Neuroscience (project “Experimental and clinical research of hypoxic-ischemic damage in perinatal and adult brain”; GA KK01.1.1.01.0007 funded by the European Union through the European Regional Development Fund).**

Nives Pećina-Šlaus rođena je 29.09.1966. u Zagrebu. Diplomirala je 1990. godine, magistrirala 1992. na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a doktorirala 1998. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 1994. je zaposlena na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, 2012. izabrana je u redovitu profesoricu, a 2018. redovitu profesoricu u trajnom zvanju na Katedri za biologiju. Godine 2004. postaje voditeljicom Laboratorija za neuroonkologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Sudjeluje na dodiplomskoj nastavi za studente Medicine i Stomatologije uključujući i nastavu na Studiju na engleskom jeziku Medicinskog fakulteta. Uz to je osnivačica i voditeljica jednog izbornog kolegija na dodiplomskoj nastavi i tri kolegija na poslijediplomskoj nastavi Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Autorica je brojnih nastavnih tekstova za dodiplomsku i poslijediplomsku nastavu uključujući i knjigu Pećina-Šlaus Nives i sur. Odabrane metode molekularne biologije. Medicinska naklada, Zagreb, 2009. Mentorica je jedanaest obranjenih diplomskih radova, tri obranjena magisterija, četiri obranjena doktorata i pet studentskih radova nagrađenih Rektorovom i Dekanovom nagradom. Do sada je vodila 7 projekata uključujući i projekt HRZZ-a „Uloga signalnog puta Wnt u epitelno-mezenhimske tranziciji“ (HRZZ 6625) u sklopu kojeg je izrađena ova disertacija. Sudjelovala je i na dva međunarodna projekta FP7–REGPOT GlowBrain i ZCI-Neuro. Nagrađena je 2000. godine nagradom “Borislav Nakić” Akademije medicinskih znanosti Hrvatske za najbolji znanstveni rad, i nagradom Hrvatskog liječničkog zbora za mlade članove Zbora u području temeljnih medicinskih znanosti. 2011.g. dobitnica je Državne nagrade za znanost za 2010. godinu za značajno znanstveno dostignuće i nagrade za iznimnu znanstvenu produktivnost Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Recenzentica je za MZOŠ, Slovensku agenciju za znanost, Fonda za razvoj Sveučilišta, te brojnih međunarodnih časopisa. 2010. godine imenovana je urednicom časopisa *Frontiers in Bioscience*, časopisa *Cancer Cell International* i *Acta Clinica Croatica*, a 2011-2018 članicom uredničkog odbora *Croatian Medical Journala*. Istraživanja u kojima je sudjelovala rezultirala su s ukupno preko 100 publikacija od čega je prema bazi WoS 56 znanstvenih radova objavljenih u časopisima s međunarodnom recenzijom. Prema bazi WoS do sada je citirana 921 puta, a h-indeks joj iznosi 16. Sudjelovala je na brojnim međunarodnim i domaćim konferencijama, gdje je često bila pozvana kao plenarni predavač. Članica je nekoliko međunarodnih i domaćih znanstvenih i stručnih organizacija za neuroznanost i istraživanje karcinoma.

## ZAHVALE

*Ova doktorska disertacija je nastala zahvaljujući potpori i entuzijazmu moje mentorice prof. dr. sc. Nives Pećine-Šlaus. Uvijek je našla razumijevanja za moje probleme i zajedno samnom ušla u koštac sa svakim od njih. Želim joj zahvaliti na povjerenju kojeg mi je ukazala i na nesebičnom vodstvu kroz ove četiri godine. Uz prof. dr. sc. Pećinu-Šlaus, veliko hvala i mojoj kolegici dr. sc. Anji Kafki koja je te iste četiri godine pretvorila u jedno prekrasno iskustvo, vrlo često uskočivši s prijedlozima i rješenjima kod eksperimentalnih nedoumica. Hvala na stručnoj pomoći i mojim kolegama „neurokemičarima“: dr. sc. Katarini Ilić, mag. biol. mol. Mariu Stojanoviću, mag. biol. mol. Borni Puljku, doc. dr. sc. Kristini Mlinac-Jerković i dr. sc. Marti Balog uz koje su svi sati provedeni u laboratoriju bili popraćeni smijehom i vedrinom. Nadam se budućim suradnjama i novim eksperimentalnim izazovima našeg malog laboratorija u sobi 113. Zahvaljujem i Katerini Zrinski Petrović i Sandri Grgić čije veliko iskustvo je doprinijelo mom eksperimentalnom radu.*

*Hvala i brojnim kliničarima koji su marljivo skupljali uzorke za moj rad, prvenstveno dr. sc. Marini Raguž koja je izdvojila vrijeme u svojem ionako prenatrpanom rasporedu kako bi mi prikupila dovoljan broj rijetkih uzoraka meningeoma. Također zahvaljujem i patologu doc. dr. sc. Davoru Tomasu koji je uvijek bio na raspolaganju te u rekordnom roku odgovarao na sva moja pitanja i dijelio svoje znanje. Veliko hvala i patologinji dr. med. Sanji Cesarec Augustinović koja je bila moja kontrola u imunohistokemijskoj analizi.*

*U trenucima kada je bilo vremenski najgušće, veliku pomoć su mi pružili i moji prekrasni studenti Petar Brlek, Katarina Dragičević i Emilija Brglez.*

*Na kraju, veliko hvala i mojoj obitelji, prijateljima i boljoj polovici Igoru na beskrajnoj ljubavi i podršci koju su pokazali kroz sve moje uspone i padove ovih četiri godina.*

UTJECAJ IZMJENE E- I N-KADHERINA NA FOSFORILACIJSKI STATUS BETA-KATENINA I EPITELNO-MEZENHIMSKU TRANZICIJU U INTRAKRANIJALNIM MENINGEOMIMA

ANJA BUKOVAC

Hrvatski institut za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta u Zagrebu

Epitelno-mezenhimska tranzicija (EMT) koju karakterizira kadherinska izmjena, odnosno smanjena ekspresija E-kadherina, a pojačana N-kadherina, ima važnu ulogu u mehanizmima invazivnosti i metastaziranja tumorskih stanica. Klasični signalni put Wnt usko je povezan s procesima EMT, te je poznato da prijelaz  $\beta$ -katenina u jezgru može dovesti do EMT. U ovom istraživanju pokazano je da geni sudionici kadherinske izmjene, *CDH1* i *CDH2* imaju ulogu u progresiji meningeoma te je zabilježena viša ekspresija N-kadherina u odnosu na E-kadherin. Ekspresija transkripcijskih faktora *SNAIL*, *SLUG* i *TWIST1* u meningeomima bila je izrazito jača od E- i N-kadherina, a *SNAIL* i *SLUG* su bili značajno povezani s višim gradusima ( $p=0,001$ ) ukazujući na njihovu ulogu u progresiji. Viši gradusi bilježe i porast ekspresije ukupnog  $\beta$ -katenina koju prati i porast ekspresije njegovog aktivnog oblika ( $p=0,000$ ). Istraživanje ove disertacije donosi prve rezultate genetičkih i proteinskih analiza važnih molekula signalnog puta Wnt i EMT te otkiva njihovu ulogu u intrakranijalnim meningeomima. Također, rezultati istraživanja nude smjernice i nove biljege progresije za buduća istraživanja te otkrivaju nove molekularne mete terapeutskih intervencija.

(110 stranica, 33 slike, 22 tablice, 158 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: intrakranijalni meningeomi, epitelno-mezenhimska tranzicija, signalni put Wnt, E-kadherin, N-kadherin,  $\beta$ -katenin

Mentor: Nives Pećina-Šlaus, prof. dr. sc.

Ocjenjivači:

1. Petra Korać, prof. dr. sc.
2. Dubravka Hranilović, prof. dr. sc.
3. Ljiljana Šerman, prof. dr. sc.



University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Doctoral thesis

THE IMPACT OF E- AND N-CADHERIN SWITCH ON PHOSPHORYLATION STATUS OF  
BETA-CATENIN AND THE EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION IN  
INTRACRANIAL MENINGIOMAS

ANJA BUKOVAC

Croatian Institute for Brain Research, School of Medicine, University of Zagreb

Epithelial to mesenchymal transition (EMT), which is characterized by reduced expression of E-cadherin and increased expression of N-cadherin, plays an important role in the tumor invasion and metastasis. Classical Wnt pathway has a tight link with EMT and it has been shown that nuclear translocation of  $\beta$ -catenin can induce EMT. This research has showed that genes involved in cadherin switch, *CDH1* and *CDH2*, play a role in meningioma progression. Also, increased expression of N-cadherin in relation to E-cadherin was recorded. In meningiomas, transcription factors *SNAIL*, *SLUG*, and *TWIST1* demonstrated strong expression in relation to E- and N-cadherin. Expression of *SNAIL* and *SLUG* was significantly associated with higher grades ( $p=0,001$ ) indicating their role in meningioma progression. Higher grades also recorded an increased expression of total  $\beta$ -catenin followed by an increased expression of its active form ( $p=0,000$ ). This dissertation research brings the first results of genetic and protein analyzes of important molecules involved in WNT and EMT signaling pathways and reveals their role in intracranial meningiomas. Results of this research offer guidelines and new markers of progression for future research and reveal new molecular targets of therapeutic interventions.

(110 pages, 33 figures, 22 tables, 158 references, original in Croatian)

Keywords: intracranial meningioma, epithelial-mesenchymal transition, Wnt signaling pathway, E-cadherin, N-cadherin,  $\beta$ -catenin

Supervisor: Nives Pećina-Šlaus, prof. dr. sc.

Reviewers:

1. Petra Korać, prof. dr. sc.
2. Dubravka Hranilović, prof. dr. sc.
3. Ljiljana Šerman, prof. dr. sc.

# Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Meningeomi .....	1
1.1.1. Patohistološki tipovi meningeoma.....	2
1.1.2. Dijagnoza i liječenje meningeoma.....	6
1.1.3. Genetske promjene u razvoju i progresiji meningeoma .....	8
1.1.4. Epigenetske promjene u razvoju i progresiji meningeomima.....	12
1.2. Signalni putovi u tumorigenezi meningeoma .....	14
1.2.1. Signalni put Wnt.....	14
1.3. Epitelno-mezenhimska tranzicija .....	20
1.3.1. Regulacija epitelno-mezenhimske tranzicije.....	22
1.3.2. Kadherini.....	24
1.3.3. TWIST1 .....	26
1.3.4. SNAIL i SLUG.....	26
1.4. Uzajamno djelovanje signalnog puta Wnt i epitelno-mezenhimske tranzicije i njihova uloga u meningeomima .....	27
2. HIPOTEZA.....	29
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	30
4. MATERIJAL I METODE.....	31
4.1. Prikupljanje uzoraka intrakranijalnih meningeoma .....	31
4.2. Izolacija DNA iz tumorskog tkiva metodom fenol/kloroform.....	32
4.3. Izolacija DNA iz krvi metodom isoljavanja .....	32
4.4. Umnažanje gena od interesa metodom lančane reakcije polimerazom.....	33
4.5. Analiza genetskih promjena elektroforezom DNA na gelovima Spreadex .....	34
4.6. Pretraživanje mutacija eksona 3 gena <i>CTNNB1</i> pomoću analize taljenja visoke rezolucije .....	35
4.7. Sekvenciranje eksona 3 gena <i>CTNNB1</i> .....	36
4.8. Imunohistokemijska detekcija analiziranih proteina .....	36
4.9. Statističke metode obrade rezultata .....	38
5. REZULTATI .....	39
5.1. Genetske promjene .....	39
5.1.1. Genetičke analize mikrosatelitne nestabilnosti i gubitka heterozigotnosti gena <i>CDH1</i> pomoću mikrosatelitnih biljega D16S752 i D16S3025.....	39
5.1.2. Genetičke analize mikrosatelitne nestabilnosti i gubitka heterozigotnosti gena <i>CDH2</i> pomoću mikrosatelitnih biljega D18S66 i D18S819.....	44

5.1.3. Usporedba genetičkih analiza mikrosatelitne nestabilnosti i gubitka heterozigotnosti gena <i>CDH1</i> i <i>CDH2</i> .....	49
5.1.4. Mutiranost eksona 3 $\beta$ -katenina ( <i>CTNNB1</i> ) i predikcija njenog učinka .....	49
5.1.5. Genetske promjene u različitim podtipovima meningeoma.....	54
5.2. Rezultati proteinske ekspresije i lokalizacije .....	55
5.2.1. Ekspresija proteina E-kadherina u intrakranijalnim meningeomima .....	55
5.2.2. Ekspresija proteina N-kadherina u intrakranijalnim meningeomima .....	58
5.2.3. Ekspresija ukupnog proteina $\beta$ -katenina u intrakranijalnim meningeomima .....	61
5.2.4. Ekspresija proteina nefosforiliranog $\beta$ -katenina u intrakranijalnim meningeomima ..	64
5.2.5. Ekspresija proteina TWIST1 u intrakranijalnim meningeomima .....	67
5.2.6. Ekspresija proteina SNAIL i SLUG u intrakranijalnim meningeomima.....	69
5.2.7. Usporedba rezultata imunohistokemijskih analiza proteinskih ekspresija .....	73
6. RASPRAVA .....	75
6.1. Uloga E- i N-kadherina u intrakranijalnim meningeomima .....	75
6.2. Uloga transkripcijskih faktora SNAIL, SLUG i TWIST1 u intrakranijalnim meningeomima.....	82
6.3. Uloga fosforilacijskog statusa $\beta$ -katenina i signalnog puta Wnt u intrakranijalnim meningeomima.....	85
6.4. Uzajamno djelovanje signalnog puta Wnt i epitelno-mezenhinske tranzicije u intrakranijalnim meningeomima.....	89
7. ZAKLJUČCI.....	91
8. LITERATURA .....	93
9. ŽIVOTOPIS.....	104
PRILOG 1 Pregled patohistoloških parametara prikupljenih uzoraka meningeoma.....	105
PRILOG 2 Rezultati genetičkih analiza mikrosatelitne nestabilnosti i gubitka heterozigotnosti gena <i>CDH1</i> i <i>CDH2</i> .....	107
PRILOG 3 Rezultati analize proteinske ekspresije.....	109

## **POPIS KRATICA**

AKT1 engl. *AKT serine/threonine kinase 1*

APC engl. *Adenomatous polyposis coli*, adenomatozna polipoza kolona AXIN1

BAP1 engl. *BRCA1 associated protein 1*

BCL-2 engl. *BCL2 apoptosis regulator*

CDH1 engl. *Cadherin 1*, kadherin 1

CDH2 engl. *Cadherin 2*, kadherin 2

CDKN2A engl. *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, inhibitor kinaze ovisne o ciklinu 2A

CDKN2B engl. *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B*, inhibitor ciklin ovisne kinaze 2B

CHEK2 engl. *Checkpoint kinase 2*

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

CSC engl. *cancer stem cells*, tumorske matične stanice

CT engl. *computed tomography*, kompjutorizirana tomografija

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

SŽS središnji živčani sustav

DAB engl. *3,3'-Diaminobenzidine*, 3,3'-diamino benzidin tetraklorid

DAL-1 engl. *E3 Ubiquitin ligase family protein*

DKK engl. *Dickkopf*

Dvl engl. *Dishevelled*

EANO engl. *European Association of Neuro-Oncology*, Europsko neuroonkološko društvo

EBRT engl. *external beam radiotherapy*, radioterapija s vanjskim snopom

EDTA engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, etilendiamintetraoctena kiselina

EGFR engl. *Epidermal growth factor receptor*, receptor epidermalnog faktora rasta

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

ERCC1 engl. *Excision repair 1 endonuclease noncatalytic subunit*

FAP engl. *Familial adenomatous polyposis*, familijarna adenomatozna polipoza

FBW1 engl. *F-box/WD-40 repeat-containing protein 1*

FGF engl. *fibroblast growth factors*, faktora rasta fibroblasta

FN1 engl. *fibronectin 1*, fibronektin 1

FOXC1/ FOXC2 engl. *forkhead box C1/ forkhead box C2*

FSP1 engl. *Fibroblast-specific protein 1*, fibroblast specifičnog proteina 1

FSRT engl. *hypofractionated stereotactic radiotherapy*, frakcionirana stereotaktička radioterapija

Fz engl. *Frizzled*

FZD2 engl. *Frizzled class receptor 2*

GSH engl. *glutathione*, glutation

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

GSTP1 engl. *Glutathione S-Transferase Pi 1*

HGF engl. *Hepatocyte growth factor*, hepatocitni faktora rasta

HIF engl. *Hypoxia-Inducible Factor*, faktor indukcije hipoksije

HOXA5/ HOXA6/ HOXA9/ HOXA11 engl. *Homeobox A5/ Homeobox A6/ Homeobox A9/ Homeobox A11*

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

HRM engl. *high resolution melting*, metoda analize taljenja visoke rezolucije

H-score engl. *Histoscore*

IGFR engl. *Insulin-like growth factor*

IL-6/ IL-8 engl. *Interleukin 6*, interleukin 6/ *Interleukin 8*, interleukin 8

KLF4 engl. *Kruppel like factor 4*

lncRNA engl. *long non-coding RNA*, duge nekodirajuće RNA

LOH engl. *loss of heterozygosity*, gubitak heterozigotnosti

LRP5/ LRP6 engl. *Low density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6*, protein sličan receptoru LDL-a

MAPK engl. *Mitogen-activated protein kinase*, mitogenom aktivirana proteinska kinaza

MEG3 engl. *Maternally expressed gene 3*

MET engl. *mesenchymal–epithelial transition*, mezenhimsko-epitelna tranzicija

miRNA engl. *microRNA*, mikroRNA

MMP9 engl. *Matrix metalloproteinase 9*

MMR engl. *mismatch repair*, sustav za popravak pogrešno sparenih parova baza

MRI engl. *magnetic resonance imaging*, magnetska rezonanca

MSI engl. *microsatellite instability*, mikrosatelitna nestabilnost

NCCN engl. *National Comprehensive Cancer Network*, Nacionalna sveobuhvatna mreža za rak

NCI engl. *National Cancer Institute*, Nacionalnog instituta za rak

ncRNA engl. *non-coding RNA*, nekodirajuća RNA

NDRG2 engl. *N-Myc Downstream-Regulated Gene 2*

NF2 engl. *Neurofibromin 2*, neurofibromin 2

NF- $\kappa$ B engl. *Nuclear Factor Kappa B Subunit 1*, jezgrin faktor kappa B

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

NOTCH2 engl. *Notch receptor 2*

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

PCP engl. *planar cell polarity*, nekanonski put planarne stanične polarnosti

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

PDGFR $\beta$  engl. *Platelet-derived growth factor receptor beta*, receptor za trombocitni faktor rasta

PENK engl. *Proenkephalin*

PKD1 engl. *Polycystin 1, transient receptor potential channel interacting*

PIK3CA engl. *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*

POLR2A engl. *RNA polymerase II subunit A*

Porcn engl. *Porcupine*

PTEN engl. *Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*

RB engl. *Retinoblastoma*, retinoblastom

RCLB engl. *red blood cell lysis buffer*

RPB1 engl. *DNA-directed RNA polymerase II subunit*, podjedinica RPB1 RNA-polimeraze II

SDS-a engl. *sodium-dodecylsulphate*, natrij dodecil sulfat

SE pufer engl. *sodium EDTA buffer*

SFRP engl. *Secreted Frizzled-Related Protein*

SMARCB1 engl. *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1*

SMARCE1 engl. *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1*

SMO engl. *Smoothened, frizzled class receptor*

SNAI1 engl. *Snail family transcriptional repressor 1*

SNAI2 engl. *Snail family transcriptional repressor 2*

SRS engl. *stereotactic radiosurgery*, stereotaktična radiokirurgija

SSR somatostatinski receptor

STAT3 engl. *Signal transducer and activator of transcription 3*

SUFU engl. *Suppressor of fused homolog*

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

SZO engl. *World Health Organization (WHO)*, Svjetska zdravstvena organizacija

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

TE pufer engl. *Tris-EDTA buffer*

TERT engl. *Telomerase reverse transcriptase*

TGF $\beta$  engl. *Transforming growth factor beta*, transformirajući faktor rasta  $\beta$

TIMP3 engl. *TIMP metalloproteinase inhibitor 3*

TLE engl. *transducin-like enhancer*

TNF- $\alpha$  engl. *Tumour Necrosis Factor alpha*

TP53 engl. *Tumor protein p53*

TP73 engl. *Tumor protein p73*

TRAF7 engl. *TNF receptor associated factor 7*

TWIST1 engl. *Twist family bHLH transcription factor 1*

UPK3A engl. *Uroplakin 3A*

VIM engl. *vimentin*, vimentin

VEGF engl. *vascular endothelial growth factor*, vaskularni faktor rasta endotela

WNK2 engl. *WNK Lysine Deficient Protein Kinase 2*

Wnt engl. *Wingless*

ZEB1/ZEB2 engl. *Zinc finger E-box binding homeobox 1/ Zinc finger E-box binding homeobox 2*

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

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

# 1. UVOD

Primarni tumori mozga su heterogena skupina tumora benignog ili malignog karaktera koji predstavljaju vrlo teško liječive bolesti. Njihov rast i progresija su najčešće ograničeni na središnji živčani sustav (SŽS), a u vrlo rijetkim slučajevima mogu metastazirati i na druge organe. Najučestalije primarne tumore mozga kod odraslih ljudi čine meningeomi koji se prema klasifikaciji tumora središnjeg živčanog sustava Svjetske zdravstvene organizacije (SZO, engl. *World health organisation* - WHO) iz 2016.g. definiraju kao: "grupa uglavnom benignih, spororastućih neoplazmi koje najvjerojatnije potječu iz meningotelijanih stanica arahnoidalnog sloja". Radi se o tumorima koje s obzirom na njihove histološke karakteristike SZO klasificira u tri glavne grupe – benigni (gradus I), atipični (gradus II) i anaplastični (gradus III).

## 1.1. Meningeomi

Termin meningeom je iskovao neurokirurg Harvey Williams Cushing opisujući tumore mozga koji su porijeklom iz meninga, odnosno ovojnice mozga i leđne moždine (Rogers i sur., 2015; Buerki i sur., 2018). Danas je najzastupljenija teorija koja predlaže da meningeomi potječu iz arahnoidalnih (meningotelijalnih) stanica i arahnoidalnih resica vanjskog sloja središnje paučinaste ovojnice (*arachnoidea mater*), čija je uloga apsorpcija likvora (Mawrin i Perry, 2010).

Nastanak meningeoma se veže uz ionizirajuće zračenje ili u sklopu nasljednog sindroma, najčešće neurofibromatoze tipa 2. Ionizirajuće zračenje može biti okolišni faktor, ali je zamijećeno da pacijenti koji su bili podvrgnuti terapijama radijacijom, posebno na području vrata i glave imaju veći rizik razviti meningeome i to agresivnog karaktera s velikom stopom recidiva (Galani i sur., 2017; Buerki i sur., 2018; Jordan i Plotkin, 2018; Preusser i sur., 2018; Wang i Osswald, 2018). Neurofibromatoza tipa 2 je sindrom koji nastaje kao posljedica mutacija u genu *NF2*, te polovica pacijenata s ovim sindromom razvije meningeome (Jordan i Plotkin, 2018; Coy i sur., 2020). Povrh toga potencijalni rizični faktori razvoja meningelanih tumora smatraju se ženski hormoni, povećani indeks tjelesne mase, dijabetes i pušenje (Preusser i sur., 2018). Iako još nije u potpunosti razjašnjena uzročna povezanost ženskih spolnih hormona i nastanka meningeoma, na ovu vezu upućuje nekoliko činjenica: pojavnost meningeoma je češća u žena, veliki broj meningeoma ima progesteronske (70-80%) ili estrogenske receptore, promjena veličine tumora u trudnoći i za vrijeme lutealne faze menstrualnog ciklusa te povezanost s karcinomom dojke (Galani i sur., 2017;



Buerki i sur., 2018). S druge strane, rizik od razvoja meningeoma je smanjen kod osoba s alergijama (Preusser i sur., 2018).

Iako je incidencija meningeoma dva puta veća kod žena, veća pojavnost meningeoma viših gradusa (II ili III) nađena je kod muškaraca (Buttrick i sur., 2016). Meningeomi s estrogenskim receptorima ili oni koji nemaju receptore za spolne hormone pokazuju recidive u 30% slučajeva dok meningeomi s progesteronskim receptorima pokazuju recidive u 5% slučajeva (Fathi i Roelcke, 2013). Meningeomi su prvenstveno tumori starije dobi, čija se incidencija povećava kod pacijenata starijih od 65 godina (Louis i sur., 2016; Preusser i sur., 2018).

Većina meningeoma (90%) je smještena unutar lubanje (intrakranijalni meningeomi) te o njihovoj lokaciji ovisi koji simptomi će se javljati kod pacijenta, iako izostanak svih simptoma nije neuobičajen (Preusser i sur., 2018). Spektar simptoma je širok i uključuje glavobolje, neurološke napadaje, fokalne neurološke deficite, malaksalost u udovima, gubitak pamćenja ili promjene u osobnosti (Buttrick i sur., 2016; Buerki i sur., 2018). Intrakranijalni meningealni tumori, iako u većini slučajeva benigni, pokazuju veću stopu recidiva od meningeoma leđne moždine. Razlog tomu je lokacija tumora koji se može nalaziti na nedostupnom mjestu u lubanji ili okružen funkcionalno važnim neurovaskularnim strukturama. U tom slučaju je operacija tumora izuzeta ili tumor nije moguće u potpunosti odstraniti zahvatom. Ostalih 10% meningeoma razvija se iz meninga leđne moždine i češće se razvijaju kao gradusi II i III. Atipični meningeomi koji se razvijaju unutar lubanje imaju manje recidiva od onih iste patohistološke dijagnoze koji nastaju u leđnoj moždini (Buttrick i sur., 2016). Izuzev lokacije, na recidive tumora utječu i spol, nedostatak kalcifikacije, smanjena ekspresija gena kromosoma 1p, ekspresija vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (engl. *vascular endothelial growth factor* – VEGF) i proliferacijskog markera MIB-1 (Mawrin i Perry, 2010; Buttrick i sur., 2016; Louis i sur., 2016)

### **1.1.1. Patohistološki tipovi meningeoma**

Meningeomi se dijele u tri histološke skupine i 15 podskupina (Slika 1, Tablica 1). Najzastupljeniju skupinu čine meningeomi gradusa I ili benigni meningeomi, pojavljujući se u oko 90% slučajeva (Fathi i Roelcke, 2013; Wang i Osswald, 2018). U ovu kategoriju ubrajamo 9 podskupina meningeoma: meningotelijalni, fibrozni, tranzicionalni (miješani), psamomatozni, angiomatozni, mikrocistični, sekretorni, metaplastični i meningeomi bogati limfoplazmacitima. Prema incidenciji, najčešći su meningotelijalni i fibrozni te tranzicionalni koji predstavljaju

mješovitu skupinu prvih dviju podskupina, dok su tipovi metaplastični meningeomi i meningeomi bogat limfoplazmicitima dosta rijetki. Meningeomi gradusa I su tumori vrlo sporog rasta, niskog rizika agresivnog ponašanja i invazije mozga te niskog rizika recidiva (zabilježeno u svega 7-25% pacijenata). Mitotički indeks benignih meningeoma iznosi <4 mitoze u 10 vidnih polja velikog povećanja (engl. *high power field* - HPF) (Louis i sur., 2016; Buerki i sur., 2018).

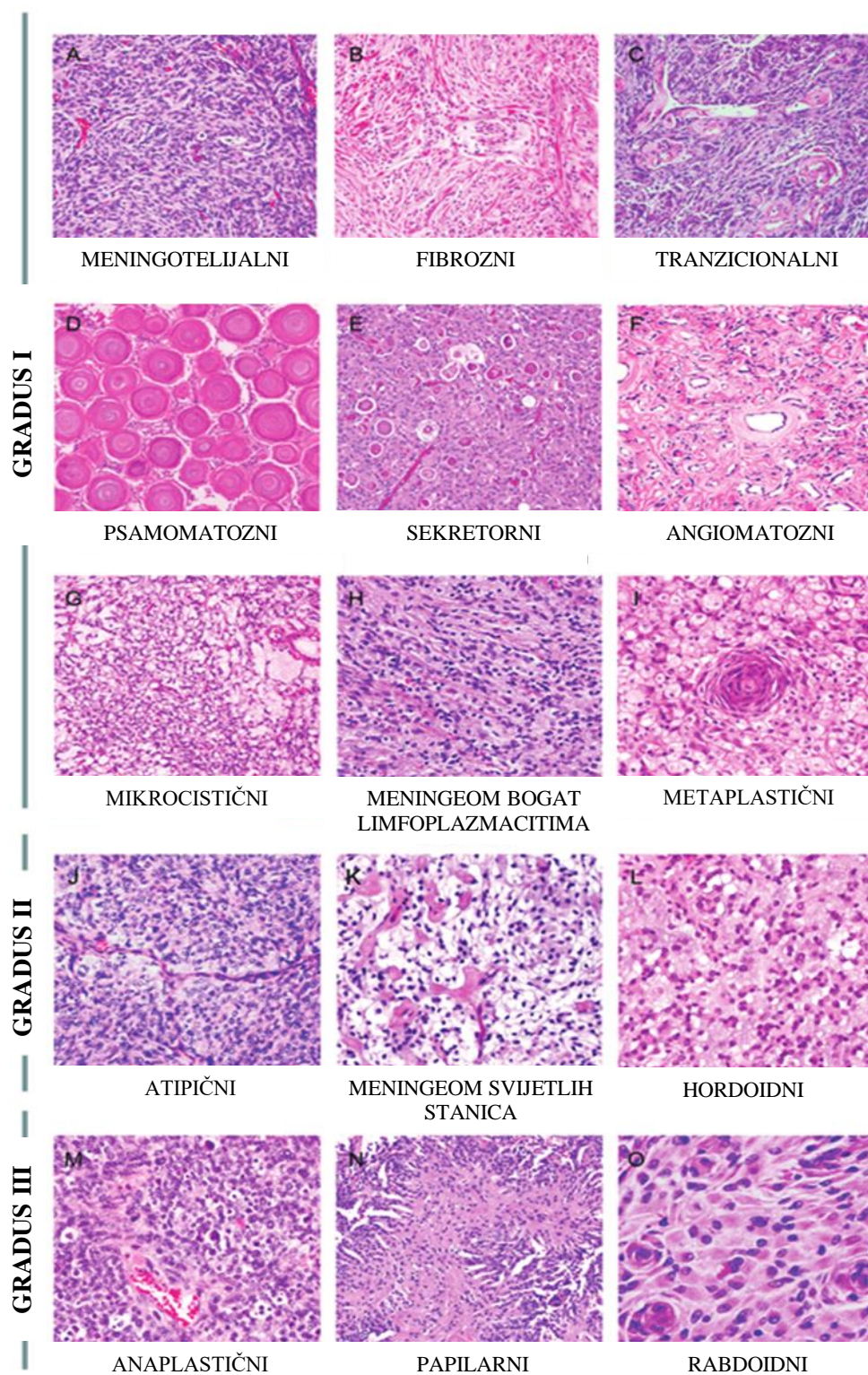
Agresivniji karakter pripisujemo meningeomima gradusa II (atipični meningeomi) čija je incidencija u populaciji 20-25%. Meningeome gradusa II čine tri podskupine: hordoidni, meningeomi svijetlih stanica i atipični meningeomi. Ove meningeome odlikuju spontane i nepravilne (geografske) nekroze, rast bez nekog uočljivog uzorka, povećana proliferacija i invazija, nuklearni pleomorfizam, male stanice s visokim odnosom jezgra/citoplazma, uočljivi nukleolusi te viši rizik od recidiva (29-52% pacijenata). Mitotički indeks atipičnih meningeoma je 4–19 mitozu u 10 vidnih polja velikog povećanja (Buttrick i sur., 2016; Louis i sur., 2016; Buerki i sur., 2018).

Zadnju skupinu čine maligni meningeomi gradusa III ili anaplastični meningeomi čija je incidencija vrlo niska i iznosi u populaciji 1-6%. Meningeomi gradusa III su vrlo agresivni tumori koje dijelimo u tri podskupine: papilarne, rabdoidne i anaplastične. Ova skupina meningeoma najčešće metastazira i infiltrira u okolno tkivo te pokazuje vrlo slabu stopu preživljenja. Sposobnost metastaziranja izvan središnjeg živčanog sustava je vrlo niska (0.1%) i najčešće uključuje područja pluća i pleure, ali se metastaze mogu naći i u jetri i kostima (Wang i Osswald, 2018). Njihovo liječenje predstavlja izazov te su recidivi vrlo česti, s pojavnošću u 50-94% pacijenata, a stopa preživljenja se drastično smanjuje s povećanjem dobi pacijenta (Buttrick i sur., 2016; Louis i sur., 2016; Buerki i sur., 2018).

Meningeomi viših gradusa (atipični i anaplastični) mogu nastati progresijom iz nižih gradusa, međutim česte su pojave i *de novo* nastanka ovih tumora (Buttrick i sur., 2016). Iako su metastaze vezane uglavnom uz malignu grupu meningeoma, zabilježene su i kod meningeoma gradusa I, ali se u tim slučajevima smatraju povoljnijim faktorom za liječenje pacijenata (Louis i sur., 2016).

**Tablica 1.** Histološki podtipovi meningeoma prema klasifikaciji SZO tumora centralnog živčanog sustava iz 2016.g.

Podtip meningeoma	Gradus	SZO definicija
Meningotelijalni	I	Klasični i uobičajeni podtip meningeoma, s epiteloidnim tumorskim stanicama srednje veličine koje tvore lobule od kojih su neki djelomično razdvojeni kolagenskim septama.
Fibrozni	I	Podtip meningeoma koji se sastoji od vretenastih stanica koje formiraju paralelne, storiformne i isprepletene snopove u matriksu bogatom kolagenom.
Tranzicionalni (miješani)	I	Uobičajeni podtip meningeoma koji uključuje meningotelijalne i fibrozne strukture kao i tranzicijske karakteristike.
Psamomatozni	I	Klasifikacija koja se dodjeljuje meningeomima (obično tranzicionalnog podtipa) koji pokazuju predominaciju psamomskih tjelešaca u odnosu na tumorske stanice.
Angiomatozni	I	Podtip meningeoma s brojnim krvnim žilama koje čine veći dio tumorske mase u odnosu na tumorske stanice meningeoma.
Mikrocistični	I	Podtip meningeoma kojeg karakteriziraju stanice tankih i izduženih procesa s mikrocistama stvarajući pozadinu nalik paučini.
Sekretorni	I	Podtip meningeoma kojeg karakterizira prisutnost fokalne epitelijalne diferencijacije u obliku intracelularnih lumina koje sadrže pseudopsamomska tjelešca.
Meningeom bogat limfoplazmacitima	I	Rijetki podtip meningeoma sa širokim kroničnim upalnim infiltratima kojeg zasjenjuju neprimjetne meningotelijalne komponente.
Metaplastični	I	Podtip meningeoma s upečatljivim žarišnim ili širokoraširenim mezenhimskim komponentama uključujući pojedinačno ili u kombinaciji koštano, hrskavično, lipomatozno, miksoidno i ksantomatozno tkivo.
Hordoidni	II	Rijetki podtip meningeoma koji histološki nalikuje hordomu i sadrži korde ili trabekule eozinofilnih, često vakuoliziranih stanica uronjenih u obilan mukoidni matriks.
Meningeom svijetlih stanica	II	Rijetki podtip meningeoma koji najčešće nema određen obrazac rasta ili ima slojevitost arhitekturu te sadrži okrugle do poligonalne stanice sa svijetlom, glikogenom bogatom citoplazmom i istaknutim perivaskularnim i intersticijskim kolagenom.
Atipični	II	Meningeomi srednjeg gradusa na prelazu između benignih i malignih formi s povećanom mitotičkom aktivnošću, histološkom invazijom mozga ili s barem tri od sljedećih karakteristika: povećana celularnost, male stanice s visokim omjerom jezgre/citoplazme, prominentni nukleolusi, slojevitost (npr. neprekinuti neodređeni obrazac ili slojevit rast) i žarišta spontanih nekroza.
Papilarni	III	Rijetki podtip meningeoma definiran prisutnošću perivaskularnog pseudopapilarnog uzorka u većem dijelu tumora.
Rabdoidni	III	Rijetki podtip meningeoma koji se primarno sastoji od rabdoidnih stanica: punih stanica s ekscentričnim jezgrama, otvorenim kromatinom, prominentnim jezgrama i eozinofilnim paranuklearnim inkluzijama, koje se pojavljuju kao uočljiva vrtložasta vlakna ili izgledaju kompaktno i voštano.
Anaplastični	III	Meningeom koji pokazuje izrazito malignu citologiju (podsjeća na citologiju karcinoma, melanoma ili sarkoma visokog gradusa) i/ili ima izrazito povećanu mitotsku aktivnost.



**Slika 1.** Histološki podtipovi meningeoma. (Preuzeto i prilagođeno iz: Bi WL, Abedalthagafi M, Horowitz P, i sur. Genomic landscape of intracranial meningiomas. *J Neurosurg.* 2016; 125(3): 525–535. doi:10.3171/2015.6.JNS15591).

### 1.1.2. Dijagnoza i liječenje meningeoma

Nakon pojave simptoma ili sumnje na razvoj meningeoma, dijagnoza tumora se potvrđuje slanjem pacijenta na magnetsku rezonancu (MRI) ili kompjutoriziranu tomografiju (CT) ako pacijent nije kandidat za MRI. Zahvaljujući magnetskoj rezonanci mogu se utvrditi karakteristike mekog tkiva dok tomografija otkriva moguću infiltraciju tumora u kosti, hiperostoza ili kalcifikaciju što ukazuje na sporiji rast tumora. Tomografijom utvrđujemo prisutnost somatostatinskih receptora (SSR) koji su nositelji povoljnije dijagnoze. Tada se može koristiti ciljana terapija uporabom receptor vezujućih liganada, pogotovo ako se radi o pacijentima nepovoljnih uvjeta za operaciju. Također, uz MRI i CT, može se koristiti i cerebralna angiografija koja ukazuje na rizik od intraoperativnog krvarenja te, ako taj rizik postoji, može se učiniti preoperativna embolizacija koja će ga smanjiti. Ipak, bez obzira na sve navedene dijagnostičke metode, konačna patohistološka dijagnoza donosi se tek analizom biopsije koja je učinjena za vrijeme operacije tumora (Fathi i Roelcke, 2013; Buttrick i sur., 2016; Buerki i sur., 2018; Jordan i Plotkin, 2018).

Danas ne postoje uniformne službene smjernice za liječenje meningeoma, iako postoji nekoliko prijedloga od strane američke Nacionalne sveobuhvatne mreže za rak (National Comprehensive Cancer Network – NCCN), Europskog neuroonkološkog društva (European Association of Neuro-Oncology – EANO) i Nacionalnog instituta za rak (National Cancer Institute – NCI). Smjernice ovih udruženje nisu u potpunosti usuglašene oko liječenja, a pojedino udruženje ne uzima uvijek iste kriterije u obzir (Buerki i sur., 2018).

Nakon postavljene dijagnoze, liječenje će ovisiti o nekoliko faktora koji uključuju lokaciju i veličinu tumora, stupanj njegove infiltracije, patohistološki tip i gradus, simptome te dob i zdravstveno stanje pacijenta (Wang i Osswald, 2018). Budući da se u većini slučajeva radi o benignima tvorevinama, pacijent se najčešće upućuje na redovito praćenje rasta magnetskom rezonancom. U slučaju da se razviju simptomi potrebna je kirurška intervencija te po potrebi radioterapija. Operacija i odstranjivanje tumorskog tkiva ostaje prvi izbor kod liječenja meningeoma. Ipak, faktori poput lokacije tumora, dobi i općeg zdravstvenog stanja pacijenta čine operaciju izazovnom ili potencijalno opasnijom od samog tumora. Opseg operacije meningeoma je opisan pomoću pet Simpsonovih stupnjeva. Ti stupnjevi pokazuju korelaciju između obuhvatnosti kirurškog odstranjivanja tumora i njegovog recidiva. Najbolja opcija je potpuno

odstranjivanje tumorskog tkiva (stupanj I) jer ima najbolju prognozu izlječenja s 10-godišnjim periodom recidiva u samo 9% pacijenata, ali ono je moguće u samo 50% slučajeva. Stupanj II uključuje uklanjanje cijelog tumora uz koagulaciju njegovog duralnog pripoja (10-godišnji recidivi u 19% slučajeva). Stupanj III su manji zahvati bez obrade duralnog pripoja gdje se 10-godišnji recidivi javljaju u 29% slučajeva, stupanj IV je parcijalna resekcija tumora (10-godišnji recidivi u 44% slučajeva), a stupanj V je oznaka za jednostavnu dekompresiju za koju su vezani vrlo česti recidivi (Fathi i Roelcke, 2013; Rogers i sur., 2015; Buerki i sur., 2018; Jordan i Plotkin, 2018; Wang i Osslwald, 2018).

Radioterapija se najčešće koristi kao dodatna terapija za tumore koji nisu u potpunosti odstranjeni ili koji imaju veliku učestalost recidiva i agresivno ponašanje. Obavezna je za meningeome gradusa III i predložena za meningeome gradusa II. Pokazalo se da liječenje koje uključuje operaciju i radioterapiju kod malignih meningeoma povećava petogodišnju stopu preživljenja s 15% na 80%. Radioterapija se ne koristi kao samostalna metoda liječenja, izuzev u slučajevima gdje nije moguće izvesti kirurški zahvat. Razlog tomu je što njome nije moguće u potpunosti ukloniti tumor već ga samo smanjiti i kontrolirati njegov rast, čime se produžuje stopa preživljenja pacijenata. Postoji nekoliko vrsta radioterapije koje se primjenjuju u liječenju meningeoma: stereotaktična radiokirurgija (engl. *stereotactic radiosurgery* – SRS), frakcionirana stereotaktička radioterapija (engl. *hypofractionated stereotactic radiotherapy* – FSRT) i radioterapija s vanjskim snopom (engl. *external beam radiotherapy* – EBRT). Kao posljedica liječenja radioterapijom može se javiti alopecija, neurološki ispadi i deficiti, glavobolje, edemi, radionekroze, paraliza kranijalnog živca, odgođena endokrinopatija hidrocefalusa te postoji mogućnost utjecaja na kognitivne funkcije ili razvoj sekundarnih malignih bolesti. Iz navedenih razloga radioterapija se izbjegava kod benignih meningeoma kao i većih tumora budući da su negativne posljedice kirurškog zahvata puno manje (Fathi i Roelcke, 2013; Rogers i sur., 2015; Buttrick i sur., 2016; Buerki i sur., 2018; Jordan i Plotkin, 2018; Wang i Osslwald, 2018).

U slučajevima malignih meningeoma, kada operativni zahvat i radioterapija nisu moguće ili dovoljne, a tumor pokazuje rezistenciju ili recidiv, pribjegava se još jednoj metodi liječenja, sistemskoj (ciljanoj) terapiji (Jordan i Plotkin, 2018; Wang i Osslwald, 2018). Ova vrsta terapije još uvijek zahtijeva opsežnija istraživanja, a trenutno se bazira na inhibiciji hormonskih receptora ili receptora somatostatina, inhibiciji angiogeneze ili signalizacije putem faktora rasta (inhibicijom

VEGF – vaskularnog endotelijalnog faktora rasta) (Fathi i Roelcke, 2013; Buttrick i sur., 2016; Buerki i sur., 2018; Shaikh i sur., 2018; Wang i Osswald, 2018). Za sada nisu zabilježeni zadovoljavajući rezultati u ciljanoj terapiji citostaticima te se radi na novim terapijskim ciljevima (Jordan i Plotkin, 2018). Jedna od najopsežnijih objavljenih studija koristila je liječenje hidroksiureom, ali je pokazala malu djelotvornost. Također je česta preporuka liječenje kemoterapeuticima alfa-interferonom ( $\alpha$ -IFN) (Buerki i sur., 2018; Wang i Osswald, 2018).

### **1.1.3. Genetske promjene u razvoju i progresiji meningeoma**

Somatske mutacije, odnosno genetske promjene i genomska nestabilnost su jedna od glavnih značajki tumora jer često rezultiraju neispravnim i nefunkcionalnim proteinskim produktima koji remete rad stanice (Hanahan i Weinberg, 2011). Genomska nestabilnost dolazi u različitim oblicima od kojih su najčešće kromosomska nestabilnost, te mikrosatelitna nestabilnost (MSI) (Negrini i sur., 2010). Mikrosatelitna nestabilnost je posljedica nepravilnog funkcioniranja sustava za postreplikacijski popravak DNA (engl. *DNA mismatch repair* – MMR), a karakterizira ju povećanje broja ponavljanja mikrosatelitnih sekvenci (Pećina-Šlaus i sur., 2016a). Prepoznavanje ovih događaja u pojedinim vrstama tumora je od velike važnosti zbog otkrića biomarkera koji mogu poslužiti za određivanje ciljane i personalizirane terapije. Nadalje, tumori istog patohistološkog tipa nemaju uvijek isti ishod ili mogu različito reagirati na terapije na osnovu razlike u molekularnim putovima ili genetskim profilima. Molekularni profil tumora danas je postao krucijalan prilikom dijagnoze i izbora terapije te ga je i SZO uvrstila u svoju klasifikaciju iz 2016.g.

Kod meningeoma je prepoznato nekoliko genetskih promjena od kojih se u 50% pacijenata pojavljuje gubitak kromosoma 22.q12.2, odnosno gena *NF2* koji je smješten u ovoj regiji (Fathi i Roelcke, 2013; Coy i sur., 2020). Druge najčešće promjene uključuju delecije kromosoma 1p, 6q, 9p, 10, 14q, 18q, 19 (Preusser i sur., 2018) ili dobitke na kromosomima 1q, 9q, 12q, 15q, 17q i 20q (Wrobel i sur., 2005; Mawrin i Perry, 2010; Pérez-Magán i sur., 2012; Galani i sur., 2017; Wang i Osswald, 2018). Povećanje gradusa meningeoma prati i povećanje broja genskih mutacija i kromosomskih aberacija od kojih neke mogu biti povezane s progresijom i recidivima (mutacije na 1p, 6q, i 14q) (Pérez-Magán i sur., 2012). Iako je u meningeomima najčešća mutacija ona gena *NF2*, prepoznato je još nekoliko odgovornih gena, posebice u meningeomima koji nemaju izmijenjen gen *NF2*. Ove mutacije se smatraju inicijalnim događajima razvoja meningeoma, a

pogađaju sljedeće gene: *TRAF7*, *TERTp*, *KLF4*, *AKT1*, *SMO*, *PIK3CA*, *BAP1*, *NOTCH2*, *SMARCB1*, *CHEK2*, *SMARCE1*, *POLR2A*. Određene mutacije mogu ukazivati na veću vjerojatnost pojave recidiva kao što je slučaj s mutacijama gena *SMO*, *AKT1* i *TERT* (Preusser i sur., 2018).

Gubitak kromosoma 22q12.2 na kojem se nalazi gen *NF2* (engl. *neurofibromin 2*) je najčešće zabilježena mutacija u meningeomima. U pola slučajeva mutacija nastaje *de novo*, dok je kod druge polovice ona naslijeđena od roditelja. Rezultat nasljedne mutacije je familijarni sindrom neurofibromatoza tipa 2. Kada su u sklopu sindroma oba alela mutirana, dolazi do razvoja benignih tumora, meningeoma i švanoma (Preusser i sur., 2018; Proctor i sur., 2018; Pereira i sur., 2019; Coy i sur., 2020). Budući da se meningeomi javljaju u 50% pacijenata s neurofibromatozom tipa 2, smatraju se i njenim dijagnostičkim kriterijem. Mutacije gena *NF2* su dijagnosticirane u 50% intrakranijalnih meningeoma i 20% meningeoma leđne moždine, a vjerojatnost njihove pojave veća je u fibroznim i tranzicionalnim patohistološkim podtipovima (Wrobel i sur., 2005; Wang i Osslwald, 2018; Pereira i sur., 2019). Neovisno o patohistološkom tipu, meningeomi s mutacijom *NF2* pokazuju povećanu stopu mutacija i kromosomske nestabilnosti u odnosu na meningeome u kojima taj gen nije mutiran. U 50% slučajeva pacijenti koji imaju mutaciju *NF2* će razviti tumor do 20. godine života, a gotovo svi pacijenti razviju tumor do 60. godine. Zbog toga, kod dijagnosticiranja pedijatrijskih tumora mozga, prvo se sumnja i testira na mutacije gena *NF2* (Coy i sur., 2020). Gen *NF2* je odgovoran za proizvodnju merlina (neurofibromina 2 ili švanomina) čija je uloga signalizacijska i koji regulira rast i mobilnosti stanice. Merlin posreduje u interakciji aktinskih filamenata i membranskih proteina. Gubitkom merlina se gubi i kontaktna inhibicija koja onemogućava proliferaciju i otvara put razvoju tumora. Budući da sudjeluje u signalizaciji, merlin je povezan s različitim signalnim putovima poput Hippo, Notch, Patched, PKA, FAK/SRC, PI3K/AKT, Rac/PAK/JNK, Rac/Rho, TOR, RTK, Ras, MAPK, YAP, p21-aktivirajućom kinazom, CD44, integrinima i najvažnije kanonskim putem Wnt (Preusser i sur., 2018; Coy i sur., 2020). S obzirom na njegovu isprepletenost s mnogim signalnim putovima, njegova uloga u staničnoj signalizaciji još nije u potpunosti razjašnjenja kao ni posljedice gubitka njegove ekspresije (Coy i sur., 2020).

Gen *TRAF7* (engl. *TNF receptor associated factor 7*) je involviran u imunološki odgovor, aktivnost ligaza, modificiranje i vezanje proteina te ako je jako eksprimiran inducira apoptozu.



Mutacija gena *TRAF7* obično zahvaća eksone 13-20 te je visoko specifična za meningeome i prisutna u 14.5–20% slučajeva (Buerki i sur., 2018; Preusser i sur., 2018; Proctor i sur., 2018; Pereira i sur., 2019).

Gen *KLF4* (engl. *Kruppel like factor 4*) ima ulogu u aktivaciji transkripcije, ali i represiji onkogeni i tumor supresora, a poznato je da inducira pluripotenciju. Najčešća mutacija gena *KLF4* u meningeomima je mutacija pogrešnog smisla (engl. *missense*) u eksonu 4 koja lizin na prvom od tri cinkova prsta zamjenjuje glutaminskom kiselinom (K409Q, c.1225A>c.p.K409D), na mjestu važnom za vezanje na DNA. *KLF4* je mutiran u oko 10% meningeoma, te se pojavljuje u 50% NF2-nemutiranih meningeoma. Čak 97% sekretornih meningeoma ima ili sadrži istovremene mutacije gena *KFLA* i *TRAF7*. Njegova ekspresija u anaplastičnim meningeomima u odnosu na sekretorne benigne meningeome je znatno manja, što znači da se u višim gradusima gubi njegova uloga kao tumor supresora (Buerki i sur., 2018; Preusser i sur., 2018; Proctor i sur., 2018; Wang i Osslwald, 2018; Pereira i sur., 2019).

Gen *AKT1* (engl. *AKT serine/threonine kinase 1*) kodira protein kinazu AKT1 koja sudjeluje u mnogim signalnim putovima i ima ulogu u proliferaciji, diferencijaciji i apoptozi. Mutacija gena *AKT1* je onkogeni aktivacijska mutacija na kodonu 17 (c.49G > A, p.E17K, p.Glu17Lys). Naziva se mutacijom AKT1E17K i aktivira mutirani protein AKT1, a time i signalni put PI3K/AKT/mTOR. Mutacija je nađena u oko 10-15% meningeoma, najčešće benignim meningotelijalnim i tranzicionalnim, dok u anaplastičnima nije zabilježena. Zbog toga meningeome koji nose mutaciju ovog gena povezujemo sa smanjenom stopom recidiva tumora. Nadalje, meningeomi s mutacijom na genu *AKT1* nemaju paralelne mutacije na genima *NF2*, *KLF4* i *SMO* (Buerki i sur., 2018; Preusser i sur., 2018; Proctor i sur., 2018; Wang i Osslwald, 2018; Pereira i sur., 2019).

Gen *SMO* (engl. *smoothed, frizzled class receptor*) sudjeluje u Hedgehog signalnom putu. Ima ulogu u embriogenezi, proliferaciji, angiogenezi te zajedno s genom *SUFU* (engl. *suppressor of fused homolog*) sudjeluje u aktivaciji ciljanih gena. Mutacije gena *SMO* su zabilježene u 3-5% meningeoma (Buerki i sur., 2018; Preusser i sur., 2018; Proctor i sur., 2018; Wang i Osslwald, 2018; Pereira i sur., 2019).

Gen *TERT* (engl. *telomerase reverse transcriptase*) kodira komponentu enzima telomeraze koji održava telomerne strukture. U meningeomima su zabilježene mutacije g.228C > T i g.250C

> T koje promoviraju ekspresiju gena *TERT*, a time i održavanje telomeraznih krajeva dodavanjem TTAGGG telomernog ponavljanja. Kao posljedica ove mutacije, meningeomi često pokazuju progresiju i recidive. Zahvaljujući tome, mutacije na genu *TERT* služe kao predikcijski faktori viših gradusa. Aktivacijske mutacije gena *TERT* nađene su u 10% benignih, 50% atipičnih i 95% anaplastičnih meningeoma, ali su rijetko prisutne u gradusima II i III koji su nastali *de novo* (Buerki i sur., 2018; Preusser i sur., 2018; Proctor i sur., 2018; Pereira i sur., 2019).

Geni *SMARCB1* (engl. *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1*) i *SMARCE1* (engl. *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1*) kodiraju proteine uključene u kompleks odgovoran za epigenetsku regulaciju gena pomoću kromatinskog remodeliranja SWI/SNF. Smatra se da *SMARCB1* funkcionira kao tumor supresor koji onemogućava nekontrolirani rast stanica. Najviše mutacija gena *SMARCB1* nađeno je u konveksnim meningeomima, dok su mutacije na genu *SMARCE1* česte u meningeomima leđne moždine. Nadalje, mutacije gena *SMARCE1* su specifične za meningeome svijetlih stanica, a smatraju se i visoko senzitivnim markerom za atipične meningeome budući da nedostatak proteinskog produkta ima ulogu u njihovoj progresiji (Galani i sur., 2017; Jordan i Plotkin, 2018; Preusser i sur., 2018; Proctor i sur., 2018; Wang i Osslwald, 2018; Pereira i sur., 2019; Scheie i sur., 2019).

Gen *POLR2A* (engl. *RNA polymerase II subunit A*), poznat i pod nazivom *RPB1* (podjedinica RPB1 RNA polimeraze II) je odgovoran za aktivnost polimeraze. Mutacije ovog gena su nađene isključivo u benignim meningeomima, bez prisutne kombinacije s drugim mutacijama (Preusser i sur., 2018; Proctor i sur., 2018; Pereira i sur., 2019).

Gen *PIK3CA* (engl. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*) kodira podjedinicu kinaze PI3K koja sudjeluje u signalnom putu PI3K-AKT-mTOR i ima ulogu u proliferaciji, mobilnosti stanica, staničnom preživljenju, sintezi proteina i komunikaciji među stanicama. Zabilježeno je pet različitih mutacija gena *PIK3CA* u meningeomima: E110del, N345K, E453K, E545K i H1047R. Mutacije su najčešće prisutne u meningotelijalnim ili tranzicionalnim meningeomima. Poznato je da meningeomi s *PIK3CA* mutacijama nemaju mutacije u genima *AKT1*, *SMO* i *NF2*, ali s druge strane često sadrže mutacije na genu *TRAF7* (Preusser i sur., 2018; Proctor i sur., 2018; Wang i Osslwald, 2018).

Gen *BAP1* (engl. *BRCA1 associated protein 1*) je tumor supresorski gen koji kodira protein s funkcijom deubikvitinaze. Sudjeluje u regulaciji funkcija različitih proteina, odnosno kontrolira rast (proliferaciju) i smrt stanice. Najčešće mutacije ovog gena su pridružene rabdoidnim meningeomima, a izostanak njegovog proteinskog produkta je prognostički marker za recidiv (Jordan i Plotkin, 2018; Preusser i sur., 2018; Proctor i sur., 2018; Scheie i sur., 2019).

Progresija meningeoma se često pripisuje mutacijama tumor supresorskih gena poput *DAL-1*, *PTEN*, *CDKN2A*, *CDKN2B* i *CHEK2* ili onkogeni poput *Myc*, *fos*, *mos*, *ras*, *sis*, *TP73*, *STAT3* i *BCL-2* (Pham i sur., 2011; Galani i sur., 2017). Također je poznato da povećana aktivacija gena *MMP9* (engl. *matrix metalloproteinase 9*) dovodi do angiogeneze koja pospješuje invaziju tumora i pojavu recidiva (Pereira i sur., 2019). Zbog toga se ovaj gen smatra dobrim prognostičkim markerom recidiva benignih tumora. *DAL-1* je tumor supresorski gen koji je promijenjen u čak 60% sporadičnih meningeoma (Mawrin i Perry, 2010; Pham i sur., 2011; Galani i sur., 2017). Mutacije gena *CHEK2* (engl. *checkpoint kinase 2*) su odgovorne za povećanje genomske nestabilnosti u meningeomima, budući da gen sudjeluje u popravku DNA (Pećina-Šlaus i sur., 2016a; Pereira i sur., 2019). Iako se smatralo da mutacije gena *TP53*, karakteristične za karcinome, nisu učestale u meningeomima, one su zabilježene u stalnoj frekvenciji (Mawrin i Perry, 2010). Novija istraživanja su pokazala veću frekvenciju mutacija na eksonu 4 gena *TP53* u intrakranijalnim meningeomima od prethodno objavljenih studija (u oko 60% uzoraka) (Bukovac i sur., 2019). Osim ovog gena, zabilježene su i mutacije gena *CDKN2A* (engl. *cyclin dependent kinase inhibitor 2A*) koji kodira tumor supresor p14ARF odgovoran za sprječavanje degradacije p53 (Negrini i sur., 2010; Pham i sur., 2011; Galani i sur., 2017).

#### **1.1.4. Epigenetske promjene u razvoju i progresiji meningeomima**

Katkada nastanak i progresiju meningeoma ne možemo pripisati genetskim promjenama. Tome ide u prilog činjenica da u čak 20% meningeoma nisu zabilježene mutacije gena (Shaikh i sur., 2018). U tim slučajevima meningeomi mogu biti posljedica epigenetske promjena poput modifikacije histona ili metilacije gena. Epigenetske promjene povezane su s progresijom i/ili malignošću tumora te pojavom njihovih recidiva (Mawrin i Perry, 2010; Proctor i sur., 2018; Shaikh i sur., 2018; Pereira i sur., 2019). U meningeoma su zabilježene hipermetilacije gena *TP73*, *GSTP1*, *TIMP3*, *PENK*, *WNK2*, *UPK3A*, *MEG3*, te grupe homeotičkih gena (*HOXA5*, *HOXA6*,

*HOXA9* i *HOXA11*) koji djeluju na smanjenu regulaciju tumor supresor gena (Galani i sur., 2017; Pereira i sur., 2019). Primjerice, u višim gradusima meningeoma zamijećeni su gubitci alela i ekspresije tumor supresor gena *MEG3* (engl. *Maternally expressed gene 3*) odgovornog za transaktivaciju *TP53* (Mawrin i Perry, 2010; Galani i sur., 2017).

Meningeomi se mogu podijeliti u šest metilacijskih kategorija koje su se pokazale kao bolji prediktori recidiva od patohistoloških klisifikacija i gradusa, posebice za meningeome gradusa II. Prve tri kategorije određuju benigni tijek razvoja bolesti, dok druge tri pokazuju lošiju prognozu i ishod bolesti (zadnja kategorija vezana uz agresivne tumore). Tako benigni meningeomi mogu pripadati određenoj metilacijskoj skupini koja će pokazivati sličnosti s meningeomima viših gradusa te će imati veću vjerojatnost pojave recidiva od benignih meningeoma koji ne pripadaju toj metilacijskoj skupini. Zahvaljujući metilacijskim grupama moguće je odrediti ciljanu terapiju i smanjiti mogućnost neadekvatnog liječenja (Buerki i sur., 2018; Scheie i sur., 2019).

Epigenetička istraživanja su usmjerena prema nekodirajućim RNA (engl. *non-coding RNA* – *ncRNA*) kojima pripadaju male molekule microRNA (miRNA) i duge nekodirajuće RNA (engl. *long non-coding RNA* – *lncRNA*) odgovorne za epigenetsku, transkripcijsku i posttranslacijsku regulaciju ekspresije gena. Tako miRNA i lncRNA mogu odigrati veliku ulogu u tumorigenezi djelujući kao onkogeni ili tumor supresorski geni te njihovo profiliranje može dati uvid u signalne putove uključene u razvoj tumora (Galani i sur., 2017; Yang i sur., 2018). Do sada su zabilježene povećane ekspresije miR-224, miR-21, miR-190a, miR-335 i smanjene ekspresije miR-34a, miR-218, miR-29c-3p, miR-219-5p, miR-200a, miR-18a, miR-145, miR-193b, miR-451 i miR-2 u progresiji meningeoma (El-Gewely i sur., 2016; Galani i sur., 2017; Pereira i sur., 2019). miR-200a ima ulogu višestrukog tumor supresora jer povećanjem njene ekspresije dolazi i do povećane ekspresije E-kadherina te smanjenja ekspresije  $\beta$ -katenina direktno utječući na glavne aktere i sprječavajući aktivaciju signalnog puta Wnt i epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT) (Saydam i sur., 2009). Ekspresija ncRNA je različita u različitim tipovima tumora te je ta osobina prepoznata u dijagnostici kao prognostički faktor i ciljana skupina personalizirane terapije. Tome doprinosi i činjenica da ncRNA igraju veliku ulogu u rezistenciji karcinoma na radioterapiju i kemoterapiju aktivirajući i regulirajući različite signalne putove poput signalnog puta Wnt.

## 1.2. Signalni putovi u tumorigenezi meningeoma

Poremećaji normalnog funkcioniranja signalnih putova mogu dovesti do razvitka različitih bolesti poput karcinoma. Pojedini signalni putovi imaju ulogu u održavanju matičnosti tumorskih stanica, transformaciji, sprječavanju apoptoze ili metastaziranju. Upravo je neispravnost signalnih putova u stanicama karcinoma odgovorna za njihovu rezistenciju na različite oblike liječenja, prvenstveno kemoterapiju. Zato su najnovija istraživanja okrenuta molekularnom profiliranju i funkcionalnoj analizi signalnih putova s ciljem pronalaska odgovarajućih molekularnih inhibitora signalizacije kao glavnih aktera ciljanih terapija.

Najčešći signalni putovi koji imaju ulogu u meningeomima su Ras/Raf/MEK, Rac/PAK/JNK, PI3K/AKT/mTOR, TGF $\beta$ /SMAD, RB i p53, signalni putovi uključeni u angiogenezu i apoptozu, Hedgehog, Notch te kanonski signalni put Wnt (Pérez-Magán i sur., 2012; Pećina-Šlaus i sur., 2016a; Galani i sur., 2017; Nasser i Mehdipour, 2017; Preusser i sur., 2018; Wang i Osswald, 2018; Pereira i sur., 2019). Signalni putovi mogu odigrati suprotne uloge u tumorima pa tako i intrakranijalnim meningeomima. Primjerice, u ranim stadijima razvoja karcinoma transformirajući faktor rasta  $\beta$  (TGF $\beta$ ) djeluje kao inhibitor rasta, dok u kasnijim stadijima doprinosi njegovom razvoju potičući epitelno-mezenhimsku tranziciju, angiogenezu te sudjelujući u imunosupresiji (Panda i Biswal, 2019). Nadalje, receptori faktora rasta poput EGFR, PDGFR $\beta$ , PDGFR $\beta$ , VEGFR i IGFR sudionici su signalnih putova i igraju važne uloge utječući na rast i razvoj meningeoma. (Pećina-Šlaus i sur., 2016a; Nasser i Mehdipour, 2017; Tompa i sur., 2018)

### 1.2.1. Signalni put Wnt

Signalni put Wnt predstavlja biološki konzervirani put međustanične komunikacije i igra važnu ulogu u razvoju organizma (embriogenezi) i održavanju matičnih stanica potičući proliferaciju, diferencijaciju, migraciju, polarnost, apoptozu i organogenezu (Becker i Wilting, 2019; Goldsberry i sur., 2019). U embriogenezi je odgovoran za diferencijaciju anteriorno-posteriorne osi središnjeg živčanog sustava i razvoj neuralnih matičnih stanica, odnosno mozga (Ghosh i sur., 2019). U odraslim fazama života ima ulogu u održavanju matičnih stanica i zacjeljivanju rana, ali poremećaji signalnog puta Wnt mogu dovesti do razvoja različitih metaboličkih, neuroloških i upalnih bolesti ili razvoja tumora. Poremećaj signalnog puta Wnt može potaknuti malignu transformaciju neuralnih matičnih stanica i time doprinijeti razvoju primarnih tumora mozga

(Kahn, 2014; Noelanders i Vleminckx, 2016; Matsui, 2016; Oliva i sur., 2018; El-Sahli i sur., 2019; Ng i sur., 2019).

Aktivacija signalnog puta Wnt započinje vezanjem jednog od 19 identificiranih liganada WNT na kompleks membranskih receptora (Becker i Wilting, 2019). Kako bi se odvijala pravilna sekrecija liganada, nakon što se sintetiziraju, oni se zadržavaju u endoplazmatskom retikulumu gdje se posttranslacijski N-glikoliziraju te prolaze palmitoilaciju uz pomoć enzima Porcupine (PORCN) (Ghosh i sur., 2019; Goldsberry i sur., 2019). Zahvaljujući tim modifikacijama, ligandi WNT su vrlo hidrofobni i imaju jaki afinitet za heparin sulfate proteoglikane koji se nalaze u membranama, te sudjeluju u komunikaciji između stanica (Sedgwick i D'Souza-Schorey, 2016). Uz tumore mozga je vezana neispravna ekspresija liganada WNT5a, WNT10b i WNT13 (Howng i sur., 2002).

Receptori za ligande WNT su sedmerostruki transmembranski proteini iz obitelji Frizzled (Fz) koja pripada skupini receptora vezanih s G-proteinima. Vezanjem liganda WNT na receptor Frizzled, signal se šalje unutarstaničnom proteinu Dishevelled nakon čega se kaskadna signalizacija može odvijati u tri smjera. Ovisno u kojem će smjeru signalizacija ići možemo govoriti o tri različita signalna puta Wnt: kanonski/ $\beta$ -kateninski ili  $\beta$ -katenin ovisni signalni put Wnt, nekanonski put planarne stanične polarnosti (engl. *planar cell polarity - PCP*) i nekanonski signalni put Wnt/ $Ca^{2+}$ . Kanonski put djeluje na transkripciju gena dok nekanonski putovi imaju uloge u regulaciji citoskeleta i regulaciji kalcija unutar stanice (Pećina-Šlaus i sur., 2016a; Oliva i sur., 2018; Tompa i sur., 2018; Ghosh i sur., 2019; Goldsberry i sur., 2019). Kada se govori o neispravnosti funkcioniranja signalnog puta Wnt u tumorigenezi, obično se radi o kanonskom smjeru signalnog puta Wnt budući da on može potaknuti transkripciju onkogeni. Međutim, postoje dokazi da i nekanonski oblici signalnog puta Wnt mogu imati ulogu u razvoju tumora, ali su njihove uloge manje istražene.

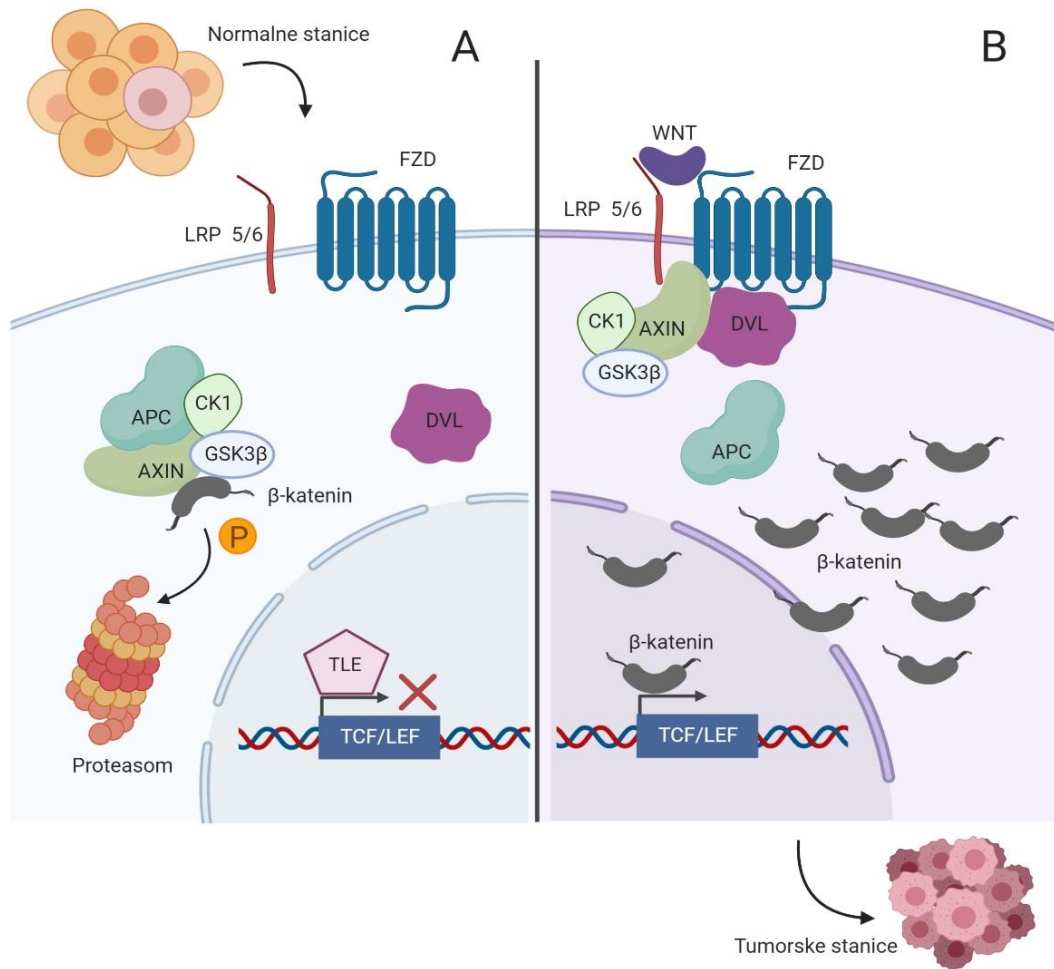
Kako bi došlo do aktivacije kanonskog signalnog puta Wnt (Slika 2), ligandi (najčešće WNT1, WNT2, WNT3 i WNT8) se moraju vezati na N-terminalnu, cistein bogatu izvanstaničnu domenu jednog od 10 mogućih receptora iz obitelji Frizzled (FZD). Frizzled receptori djeluju zajedno sa svojim koreceptorima LRP5 i LRP6 (engl. *low density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6*) (Becker i Wilting, 2019). Time se fosforilira i aktivira citoplazmatski protein Dishevelled (DVL) koji se veže na citoplazmatski rep Frizzled receptora. Fosfoproteini DVL kod čovjeka

kodirani su s tri homologna gena – *DVL1*, *DVL2* i *DVL3*, koja pokazuju visok stupanj sličnosti. Svi DVL imaju tri visoko konzervirane domene: aminoterminalnu domenu DIX, centralnu domenu PDZ i karboksiterminalnu domenu DEP. Ako se aktivacija DVL proteina odvija putem domena DIX i DPZ, on će se vezati na citoplazmatski protein AXIN1 (AXIN) koji je dio destruktivnog kompleksa odgovornog za razgradnju  $\beta$ -katenina. Osim DVL, AXIN će se vezati i na koreceptor LRP 5/6 kao posljedica njegove fosforilacije prilikom vezanja DVL na FZD. Za fosforilaciju koreceptora LRP5/6 odgovorne su fosfokinaze GSK3 $\beta$  (engl. *Glycogen synthase kinase-3 beta*; glikogen sintaza kinaza 3 beta) i CK1 (engl. *Casein kinase I*; kazein kinaza 1) koje ujedno modificiraju  $\beta$ -katenin. Ovako izmješten kompleks koji sadrži još protein APC (adenomatozna polipoza kolona) i dvije serin/treonin kinaze GSK3 $\beta$  i CK1 naziva se signalosom i nema više funkciju razgradnje  $\beta$ -katenina u citoplazmi. Posljedica toga je nakupljanje  $\beta$ -katenina u citoplazmi te njegov postupni prijelaz u jezgru gdje se veže na faktore transkripcije TCF/LEF (engl. *T-Cell-Specific Transcription Factor/Lymphoid Enhancer Binding Factor 1*). Time posredno sudjeluje u pojačanoj transkripciji ciljnih gena poput c-Myc, N-Myc, c-jun i ciklin D1 s poznatim onkogenim učinkom (Zhang i sur., 2012; Kahn, 2014; Pećina-Šlaus i sur., 2016a; Oliva i sur., 2018; Tompa i sur., 2018; Wiese i sur., 2018; Ghosh i sur., 2019; Goldsberry i sur., 2019; Ng i sur., 2019).

U slučaju kada signalni put Wnt nije aktiviran ligandima, destruktivski kompleks fosforilacijom citoplazmatskog  $\beta$ -katenina održava njegovu koncentraciju u stanici niskom. Za fosforilaciju  $\beta$ -katenina odgovorne su kinaze iz destruktivnog kompleksa. GSK3 $\beta$  dodaje fosfatne skupine na serine 33 i 37, dok CK1 fosforilira treonin 41 i serin 45  $\beta$ -katenina. Posljedično tome fosforilirana mjesta  $\beta$ -katenina su prepoznata od strane E3 podjedinice ubikvitin ligaze  $\beta$ -TrCP (engl.  *$\beta$ -transducin repeat containing protein*) koja modificira  $\beta$ -katenin i dovodi do razgradnje viška  $\beta$ -katenina u 26S proteasomu. Time je izgubljena njegova uloga kao transkripcijskog faktora ciljanih gena signalnog puta Wnt. U nedostatku  $\beta$ -katenina u jezgri, na transkripcijske faktore TCF/LEF vezan je represor Groucho/TLE (engl. *transducin-like enhancer*) koji blokira njihovu aktivnost (Pećina-Šlaus i sur., 2016a; Tompa i sur., 2018; Wiese i sur., 2018; Yang i sur., 2018; Ghosh i sur., 2019; Goldsberry i sur., 2019; Vallee i sur., 2019).

Postoje mnogi inhibitori signalnog puta Wnt od kojih treba izdvojiti već spomenuti GSK-3 $\beta$  i obitelj proteina DKK (engl. *Dickkopf*) i SFRP (engl. *Secreted Frizzled-Related Protein*). GSK-3 $\beta$  smanjuje nakupljanje i stabilizaciju  $\beta$ -katenina u citoplazmi te njegovo premještanje u jezgru.

DKK i SFRP ulaze u reakciju s Frizzled receptorima. DKK se veže na koreceptor LRP5/6, a SFRP na C-terminalnu domenu receptora Frizzled (Zhang i sur., 2012; Goldsberry i sur., 2019; Vallée i sur., 2019). Također, poznato je da mnoge miRNA sudjeluju u regulaciji kanonskog signalnog puta Wnt. Primjer je miRNA-34 koja suprimira transkripcijsku aktivnost kompleksa  $\beta$ -katenin/TCF (Gao i sur., 2018).



**Slika 2.** Signalni put Wnt. A) Prikaz neaktivnog signalnog puta u kojem destruktivski kompleks sastavljen od molekula AXINA, APC, GSK3 $\beta$  i CK1 fosforilira citoplazmatski  $\beta$ -katenin te ne dolazi do transkripcije ciljanih gena. B) Prikaz aktivnog signalnog puta u kojem je destruktivski kompleks privučen na membranu stanice te ne dolazi do razgradnje  $\beta$ -katenina već se on stabilizira u citoplazmi i posljedično prelazi u jezgru. U jezgri zajedno s transkripcijskim faktorima TCF/LEF sudjeluje u transkripciji ciljanih gena. (Izrađeno pomoću BioRender.com)



### 1.2.1.1. Uloga signalnog puta Wnt u tumorigenezi

Kao što je već spomenuto, Wnt igra važnu ulogu u ranim fazama života, odnosno embriogenezi, potičući transformaciju, proliferaciju i migraciju stanica. Iste mehanizme ovog biološkog puta mogu iskoristiti tumori za svoj nastanak u odraslim fazama života. Prvi put je razvoj karcinoma povezan s Wnt signalnim putem kada su otkrivene mutacije gena *APC* u 80% pacijenata s familijarnom adenomatoznom polipozom (FAP) (Kahn, 2014; Sedgwick i D'Souza-Schorey, 2016; Oliva i sur., 2018; Tompa i sur., 2018; Wiese i sur., 2018; Yang i sur., 2018; Ghosh i sur., 2019; Ng. i sur., 2019).

Signalni put Wnt u tumorima može imati različite uloge omogućavajući im reprogramiranje metabolizma, sudjelujući u kroničnoj upali, oksidativnom stresu ili čak rezistenciji na imunoterapiju (Vallée i sur., 2019). U reprogramiranju metabolizma tumora, signalni put Wnt sudjeluje preko aktivacije transkripcijskih faktora TCF/LEF,  $\beta$ -katenina, onkogeno *c-myc* ili signalnog puta AKT-mTOR. Transkripcijski faktori TCF/LEF transkribiraju gene odgovorne za aerobnu glikolizu inducirajući tako sekreciju VEGF i promičući angiogenezu u tumorima. Geni aktivirani  $\beta$ -kateninom iz signalnog puta Wnt povećavaju unos glutamina čiji je produkt glutation (GSH) koji doprinosi rezistenciji tumorskih stanica na kemoterapiju. *C-MYC* kodira protein koji omogućava pojačanu glikolizu i shodno tomu veći dotok tvari potrebnih tumoru za proliferaciju. Naposljetku, proliferaciji tumora doprinosi i signalni put AKT-mTOR koji pojačava unos glukoze u stanice tumora povećavajući broj transportera glukoze. (Zhang i sur., 2012; El-Sahli i sur., 2019; Ghosh i sur., 2019; Mo i sur., 2019).

Također je poznato da kanonski signalni put Wnt potiče metastaziranje, proliferaciju i preživljavanje tumorskih stanica stimulirajući signalni put NF- $\kappa$ B (Matsui, 2016; Vallée i sur., 2019; VanderVorst i sur., 2019). Osim toga,  $\beta$ -katenin pojačava ekspresiju gena *TERT* odgovornu za održavanje telomeraza u matičnim stanicama tumora. Signalni put Wnt je usko povezan s imunosupresijom jer utječe na smanjenu mogućnost infiltracije T limfocita u tumore (Ghosh i sur., 2019; Goldsberry i sur., 2019).

### 1.2.1.2. Signalni put Wnt u meningeomima

Poznato je da je signalni put Wnt u meningeomima aktiviran te ima ulogu u progresiji (Pham i sur., 2011). Zabilježene su genetske promjene, odnosno gubitak heterozigotnosti molekula *AXIN*, *APC* i *CDH1* (E-kadherin) odgovornih za održavanje normalnih koncentracija  $\beta$ -katenina u

citoplazmi tumorskih stanica meningeoma. Promjene gena *APC* su značajno povezane s manjkom ekspresije ili prisutnošću mutiranih proteina APC te posljedično tome s povećanom ekspresijom  $\beta$ -katenina i njegovim prelaskom u jezgru (Nikuševa-Martić i sur., 2007; Pećina-Šlaus i sur., 2016b). Osim toga, nađena je i smanjena ekspresija E-kadherina u anaplastičnim meningeomima (Wrobel i sur., 2005). Nadalje meningeomi pokazuju povećanu ekspresiju gena *FZD2* u odnosu na leptomeningealne stanice (Pereira i sur., 2019).

Smatra se da i epigenetski događaji koji pogađaju gene signalnog puta Wnt mogu utjecati na progresiju meningeoma. Primjerice, anaplastični meningeomi su pokazali smanjenu ekspresiju tumor supresora *NDRG2* zbog hipermetilacije njegovog promotora (Mawrin i Perry, 2010). *NDRG2* (engl. *N-Myc Downstream-Regulated Gene 2*) sudjeluje u regulaciji signalnog puta Wnt smanjujući aktivaciju ciljanih gena poput ciklina D1 (*CCND1*) čija je transkripcija potaknuta  $\beta$ -kateninom. Drugi primjer je *SFRP1* (engl. *Secreted Frizzled-Related Protein1*) koji inhibira signalni put Wnt stvarajući inhibitorni kompleks s Frizzled receptorima. Manje razine njegove mRNA u recidivima u odnosu na primarne meningeome, ukazuje na uključenost SFRP1 u razvoj recidiva (Pećina-Šlaus i sur., 2016a).

### 1.2.1.3. $\beta$ -katenin

Ključna molekula kanonskog signalnog puta Wnt je  $\beta$ -katenin kojeg kodira gen *CTNNB1* smješten na kromosomu 3p22.1. Osim svoje uloge kao faktora transkripcije u signalnom putu,  $\beta$ -katenin je i važna adhezijska molekula stanica koja sudjeluje u povezivanju stanica (Kahn, 2014; Gao i sur., 2018). Nalazi se u prijanjajućim spojevima (engl. *adherens junction*) gdje je vezan za E-kadherin preko njegovog citoplazmatskog repa. Kompleks E-kadherina i  $\beta$ -katenina održava strukturu epitelnog tkiva i kontakt između stanica, te ako dođe do njegovog narušavanja gubi se kontaktna inhibicija te se stanice i tkiva morfološki mijenjaju. Time stanice postaju mobilne što je karakteristika ponašanja tumorskih stanica (Howng i sur., 2002; Gao i sur., 2018). Osim s E-kadherinom,  $\beta$ -katenin u prijanjajućim spojevima ulazi u interakciju i s  $\alpha$ -kateninom koji je povezan s aktinskim filamentima, odnosno citoskeletom stanice (Gao i sur., 2018).

Polipeptidni lanac  $\beta$ -katenina sastavljen je od tri domene: središnje ili armadilo, N-terminalne i C-terminalne domene. Pomoću C-terminalne domene  $\beta$ -katenin se veže na transkripcijske faktore TCF/LEF, dok N-terminalnu domenu prepoznaju kinaze destrukcijskog kompleksa. Središnjom

domenom  $\beta$ -katenin se veže za E-kadherin u membrani čime se inhibira njegova uloga u transkripciji ciljanih gena (Gao i sur., 2018).

Smatra se da su mutacije gena *CTNNB1* odgovorne za onkogeni potencijal  $\beta$ -katenina. Zabilježene su u različitim tumorima te su povezane s proliferacijom stanica, pojačanom imunosupresijom i lošom stopom preživljenja. Najčešće se radi o mutacijama pogrešnog smisla (engl. *missense*). Gen *CTNNB1* sastoji se od 16 eksona, od kojih je u tumorima najčešće mutiran ekson 3 zbog čega se smatra mutacijskim žarištem. Dokazano je da su preko 90% mutacija  $\beta$ -katenina vezanih uz karcinome upravo mutacije u eksonu 3 gena *CTNNB1* (Çelen i sur., 2015). Mutacije u ovom eksonu dovode do inhibicije fosforilacije  $\beta$ -katenina čime omogućavaju njegovu stabilizaciju i posljedično moguću aktivaciju signalnog puta Wnt. Frekvencija mutacija je najčešća na serinu 45 (S45) koji je fosforilacijsko mjesto za CK1 ili na serinu 33 (S33), serinu 37 (S37) i treoninu (T41) koji su fosforilacijska mjesta za GSK3 $\beta$  (Çelen i sur., 2015, Dar i sur., 2017; Kumar i Bashyam, 2017; Sakai i sur., 2017; Akyol i sur., 2019). Česte su i mutacije na D32 i G34 eksona 3, a radi se o mjestu važnom za interakciju  $\beta$ -katenina i komponente ubikvitinske ligaze FBW1 (Gao i sur., 2018). Budući da uslijed mutacija ova vezna mjesta nisu više funkcionalna,  $\beta$ -katenin se stabilizira u citoplazmi te prelazi u jezgru gdje transkripcijom ciljanih gena potiče tumorigenezu (Howng i sur., 2002; Nasser i Mehdipour, 2017).

### **1.3. Epitelno-mezenhimska tranzicija**

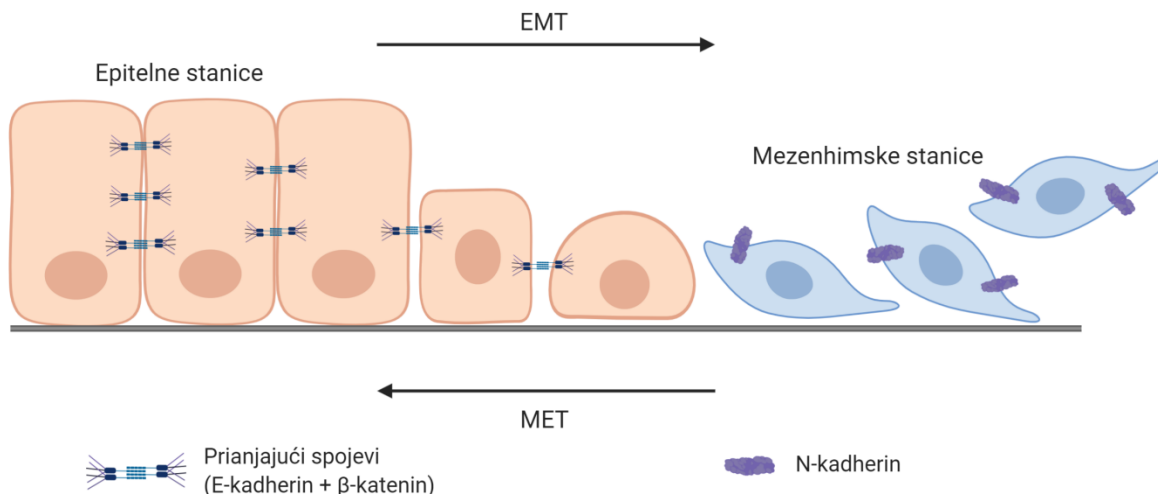
Epitelno-mezenhimska tranzicija (EMT), predstavlja konzervirani biološki put koji ima važnu ulogu u embriogenezi, ali i u razvoju tumora (Nieto, 2011). Zahvaljujući EMT stanice gube epitelna svojstva te poprimaju karakteristike mezenhinskog fenotipa čime im je omogućeno kretanje, odnosno širenje u okolna tkiva (Slika 3). Glavna karakteristika EMT je takozvana kadherinska izmjena (engl. *cadherin switch*) koja označava djelomičan ili potpuni gubitak ekspresije E-kadherina kao biljega epitelnog tkiva te pojavu ili pojačanu ekspresiju N-kadherina kao biljega mezenhinskog tkiva. Posljedica smanjene ekspresije E-kadherina je reorganizacija aktinskog citoskeleta, gubitak međustaničnih veza i adhezije te posljedično apikobazalne polarnosti i stanične stabilnosti, dok pojačana ekspresija N-kadherina omogućava pokretljivost i potiče invazivan karakter stanica (Wheelock i sur., 2008; Pećina-Šlaus i sur., 2012; Rai i Ahmed, 2014; Chen i sur., 2017; Mrozik i sur., 2018; Das i sur., 2019; Loh i sur., 2019). Stanice koje su

prošle EMT, mogu ponovno prijeći u kohezivne epitelne stanice i izgubiti svoju pokretljivost zahvaljujući reverznom procesu zvanom mezenhimsko-epitelna tranzicija (MET) (Aiello i Kang, 2019; Loh i sur., 2019).

Ovisno o ulozi u specifičnim biološkim razvojnim procesima, postoje tri različita tipa EMT. Tip 1 je vezan uz rane stadije razvoja organizma, odnosno embriogenezu za vrijeme gastrulacije i organogeneze. Na povezanost signalnog puta Wnt i EMT u embriogenezi ukazuje činjenica da je za vrijeme gastrulacije EMT potaknuta zahvaljujući koordinaciji signalizacije Wnt s beta transformirajućim faktorom rasta (TGF $\beta$ ) i faktorom rasta fibroblasta (FGF). Tip 2 uključen je u regeneraciju tkiva, odnosno zacjeljivanje rana i fibrozu organa. Epitelne ili endotelne stanice mogu putem EMT prijeći u stanice fibroblasta koje imaju potpunu ulogu u tkivima. Tip 3 odgovoran je za razvoj i progresiju primarnih tumora te formiranje metastaza. Zahvaljujući EMT primarni tumori zadobivaju karakteristike mezenhinskog tkiva čime se povećava njihova mobilnost i shodno tome sposobnost izbjegavanja apoptoze te prodiranja u okolna tkiva. Nakon što metastazirajuće stanice dospiju na drugu lokaciju, prolaze proces MET jer izostaju EMT inducirajući signali primarnog tumora. Tako metastaze mogu ponovno zadobiti karakteristike epitelnog tkiva i formirati sekundarne tumore (Kalluri i Weinberg, 2009; Rai i Ahmed, 2014; Nantajit i sur., 2015; Diepenbruck i Christofori, 2016; Chen i sur., 2017; Liao i Yang, 2017; Aiello i Kang, 2019; Das i sur., 2019; Zaňudo i sur., 2019).

Poznato je da je uspješna invazija tumora češće rezultat djelomične EMT koju odlikuje istovremena ekspresije biljega epitelnih i mezenhinskih karakteristika ili gubitka epitelnih karakteristika koje se ne zamjenjuju mezenhinskim (Nieto, 2011; Saitoh, 2018; Loh i sur., 2019). Zahvaljujući djelomičnoj EMT tumori razvijaju plastičnost koja omogućava prilagodbu na novi mikrookoliš dovodeći do razvoja sekundarnog tumora. Djelomična EMT također može biti uzrokom neučinkovitosti terapije i recidiva (Aiello i Kang, 2019; Pastushenko i Blanpain, 2019). Drugim riječima, potpuna EMT okidač je invazivnosti, ali nije dovoljna za formiranje sekundarnih tumora. Pokazalo se da cirkulirajuće tumorske stanice koje su prošle EMT imaju sposobnost invazije, ali ne mogu uspostaviti metastatske nakupine, za razliku od cirkulirajućih tumorskih stanica koje nisu prošle potpunu EMT i koje nemaju sposobnost invazivnosti, ali mogu uspostaviti sekundarne tumore. Ako se radi o mješavini ovih tipova cirkulirajućih tumorskih stanica ili komplementarnoj EMT, primarni tumori mogu uspješno razviti metastaze koje će biti inicijatori

sekundarnih tumora (Nantajit i sur., 2015). Upravo je sposobnost invazivnosti i metastaziranja uzrokom 90% smrtnosti uzrokovane tumorima (Diepenbruck i Christofori, 2016; Das i sur., 2019)



**Slika 3.** Prikaz epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT) i reverznog procesa mezenhimsko-epitelne tranzicije (MET). Zahvaljujući EMT epitelne stanice gube polarnost i međusobnu povezanost te prelaze u mezenhimski tip stanica koje imaju sposobnost migracije, odnosno metastaziranja. Glavna karakteristika EMT je kadherinska izmjena koja označava djelomičan ili potpuni gubitak ekspresije E-kadherina, glavne komponente prianjajućih spojeva i markera epitelnog tkiva, te pojačanu ekspresiju N-kadherina kao markera mezenhimske stanice. Stanice koje su prošle EMT, mogu ponovno postati kohezivne epitelne stanice i izgubiti svoju pokretljivost zahvaljujući reverznom procesu zvanom mezenhimsko-epitelna tranzicija (MET). (Izrađeno pomoću BioRender.com)

### 1.3.1. Regulacija epitelno-mezenhimske tranzicije

EMT je regulirana na više razina od kojih je najizraženija razina transkripcije. Transkripcijski faktori iz obitelji proteina SNAIL (SNAI1, SNAI2/SLUG, SNAI3/SMUC), ZEB (ZEB1/TCF8, ZEB2/SIP1), TWIST (TWIST1, TWIST2), FOXC<sub>s</sub> (FOXC1, FOXC2) i E12 (E47, TCFE2A) suprimiraju ekspresiju E-kadherina (*CDH1*) tako da se vežu na njegovo promotorsko mjesto i zaustavljaju transkripciju (Wheelock i sur., 2008; Chen i sur., 2017; Wallesch i sur., 2017; Das i sur., 2019; Loh i sur., 2019). Transkripcijski faktori mogu i potaknuti ekspresiju mezenhimskih gena poput N-kadherina (*CDH2*), vimentina (VIM), fibronektina (FN1) i fibroblast specifičnog proteina 1 (FSP1). Nadalje, navedeni transkripcijski faktori imaju ulogu u održavanju tumorskih matičnih stanica (engl. *cancer stem cells* – CSC), popravku dvolančane DNA, izbjegavanju

apoptoze te potiču ekspresiju proinflamatornih i imunosupresivnih citokina u tumorskim stanicama (Kalluri i Weinberg, 2009; Brabletz i sur., 2018). Zahvaljujući EMT i tumorskim matičnim stanicama, tumori razvijaju plastičnost koja ima omogućava metastaziranje, otpornost na terapiju te posljedično recidive (Aiello i Kang, 2019; Das i sur., 2019). Transkripcijski faktori EMT su regulirani faktorima rasta poput TGF- $\beta$ , epitelnog (EGF), fibroblastnog (FGF), hepatocitnog (HGF) faktora rasta ili faktora indukcije hipoksije (HIF) te citokinima poput IL-8, IL-6 i TNF- $\alpha$ . Signalni putovi koji reguliraju EMT su Wnt, Notch, Hedgehog, PDGFR tirozin kinaze, PI3K-AKT-mTOR, EGFR-RAS-MAPKs i JAK/STAT (Nieto, 2011; Diepenbruck i Christofori, 2016; Nasser i Mehdipour, 2017; Aiello i Kang, 2019; Loh i sur., 2019). TGF- $\beta$  potiče EMT djelujući na transkripciju SNAIL, SLUG i TWIST1 te zajedno s različitim signalnim putovima potiče razvoj mezenhinskog fenotipa tumorskih stanica (Das i sur., 2019; Zaňudo i sur., 2019), dok FGF u zametnom štitu potiče aktivaciju *SNAIL* i posljedično EMT (Aiello i Kang, 2019).

Osim transkripcijskih faktora, u regulaciji EMT sudjeluju i nekodirajuće RNA, epigenetski modulatori i egzogeni faktori. Za negativnu regulaciju EMT odgovorne su različite nekodirajuće RNA poput miR-30, miR-34, miR-138, miR-192, miR-194 i miR-205 te nekodirajuće RNA iz već spomenute obitelji miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 i miR-429) (Saydam i sur., 2009; Nantajit i sur., 2015; Aiello i Kang, 2019; Das i sur., 2019; Loh i sur., 2019). Nekodirajuće RNA održavaju epitelni fenotip što u incijalnim koracima sprječava EMT, ali ujedno promiče MET i uspostavu matastatske kolonizacije. Ovi događaji najčešće se odvijaju putem supresije N-kadherina, TGF- $\beta$ , transkripcijskih faktora SNAIL i ZEB1/ZEB2. Tako miR-34 suprimira ekspresiju *SNAIL*, dok obitelj miR-200 potiče epitelna svojstva kroz supresiju  $\beta$ -katenina, ZEB1, ZEB2 i faktora matičnih stanica SOX-2 i KLF4 (Saydam i sur., 2009; Diepenbruck i Christofori, 2016; Galani i sur., 2017; Pastushenko i Blanpain, 2019; Soundararajan i sur., 2019; Zaňudo i sur., 2019). Osim regulacije na razini transkripcije, moguća je i posttranslacijska regulacija EMT. Tako primjerice, p300 modulira stabilnost EMT i interakciju s proteinima SNAIL1 i TWIST1. GSK3 $\beta$  i PKD1 fosforiliraju SNAIL i SLUG obilježavajući ih za degradaciju, a MAPK fosforilira TWIST1 i ZEB1 i time ih stabilizira (Aiello i Kang, 2019). S druge strane, transkripcijski faktori mogu potisnuti ekspresiju E-kadherina regrutirajući enzime koji modificiraju histone ili pomoću DNA metilacije njegovog promotorskog mjesta (Nieto, 2011).

### 1.3.2. Kadherini

Fenotip tkiva, komunikaciju, polarnost i integritet stanica određuju različiti kompleksi međustaničnih spojeva. Najvažniji takvi spojevi su prijanjajući spojevi čije glavne adhezijske molekule čine kadherini. Kadherini održavaju adheziju stanica zahvaljujući izvanstaničnoj  $\text{Ca}^{2+}$  vezujućoj domeni koja im omogućava otpornost na proteaze. U klasične kadherine, transmembranske proteine tipa 1, koji imaju pet sekvenci u izvanstaničnoj domeni ubrajamo E-kadherine (epitelijalni), N-kadherine (neuralni), P-kadherine (placentalni), M-kadherine (miotubularni) i R-kadherine (retinalni). Naziv klasični su dobili zbog sposobnosti da se preko citoplazmatske domene vežu za  $\beta$ -katenin tj. njegovu armadilo ponavljajuću domenu. Nastali katenin-kadherin kompleks putem aktinskih filamenata se usidruje na citoskelet stanice. Osim navedenih uloga u održavanju adhezije stanica, kadherini su važni tijekom embriogeneze kao modulatori stanične migracije te pravilnog pozicioniranja stanica i razvoja specifičnih tkiva (Shimada i sur., 2005; Stemmler, 2008; Wheelock i sur., 2008; Loh i sur., 2019).

E-kadherin je transmembranski glikoprotein veličine 120 kDa. Kodira ga gen *CDH1* koji se nalazi na kromosomu 16q22.1. Gen se sastoji od 16 eksona i 15 introna. E-kadherin ima značajnu ulogu već u samim počecima embriogeneze održavajući adheziju blastomera. Kasnije održava epitelna svojstva tkiva omogućavajući adheziju lateralnom dimerizacijom izvanstanične domene i polarnost stanica. Sudjeluje u homeostazi tkiva kao jedan od aktera signalnih putova. E-kadherin se kod tumora često smatra prognostičkim faktorom jer je gubitak njegove ekspresije karakterističan za malignost i invazivnost. Na ekspresiju E-kadherina mogu utjecati različiti genetski i epigenetski faktori. Često su u različitim tumorima nađene kromosomske delecije te mutacije ili genetske promjene koje uključuju gubitak heterozigotnosti ili mikrosatelitnu nestabilnost gena *CDH1*. Na epigenetskoj razini su česte hipermetilacije promotora gena, histonske modifikacije ili neispravne miRNA (Pećina-Šlaus i sur.; 2012; Wong i sur., 2018; Loh i sur., 2019). S druge strane, neke studije pokazuju da pojačana ekspresija E-kadherina može pogodovati formaciji sekundarnog tumora. Jedno od objašnjenja dualne uloge E-kadherina u tumorima (supresija tumora i poticanje međustaničnih veza u sekundarnom tumoru) razmatra prisutnost dvaju oblika E-kadherina u stanicama. Prvi oblik je E-kadherin vezan za membranu dok je drugi oblik topivi E-kadherin. Nakon gubitka membranskog E-kadherina, ulogu preuzima topivi oblik čija akumulacija interferira s prijanjajućim spojevima. Time je potaknuta invazivnost tumora kroz proliferaciju, migraciju i preživljenje stanica (Loh i sur., 2019).

Korelacija ekspresije E-kadherina i stupnja malignosti meningeoma za sada nailazi na suprotna zapažanja. Dok su neka istraživanja pokazala jasno smanjenje ekspresije E-kadherina povećanjem gradusa ili u recidivima, druga istraživanja demantiraju njihovu povezanost. Razlog tome je što je često zabilježena smanjena ekspresija E-kadherina i u benignim tipovima meningeoma te se ona ne može pridružiti isključivo agresivnijim tipovima gradusa II i III (Shimada i sur., 2005; Panagopoulos i sur., 2008; Pećina-Šlaus i sur., 2010; Pećina-Šlaus i sur.; 2012; Arsene i sur., 2014; Backer-Grøndahl i sur., 2014; Wallesch i sur., 2017).

N-kadherin je transmembranski, homofilični glikoprotein veličine 130 kDa. Kodira ga gen *CDH2* koji se nalazi na kromosomu 18q12.1 i sastoji se od 16 eksona (Rai i Ahmed, 2014). U embriogenezi, N-kadherin igra važnu ulogu u formaciji srčanog i živčanog tkiva te u osteogenezi i miogenezi. Za razliku od E-kadherina, ekspresija ovog proteina karakteristična je za mezenhimski fenotip i može se naći u neuralnom, endotelijalnom i stromalnom tkivu ili u osteoblastima (Pećina-Šlaus i sur.; 2012; Mrozik i sur., 2018; Rutkowski i sur., 2018). U odraslom organizmu igra ulogu u funkcioniranju sinapsi, homeostazi kostiju i vaskularnoj stabilnosti. Ekspresija N-kadherina je odsutna ili vrlo niska u epitelnom tkivu. Povećana, neprirodna razina može ukazivati na EMT i potaknuti agresivan karakter tumora, odnosno razvoj metastaza. Također, promiče angiogenezu te stimulira rast i suprimira apoptotske signale osiguravajući preživljenje tumorskih stanica (Wheelock i sur., 2008; Loh i sur., 2019). N-kadherin omogućava metastaziranje putem tri različita mehanizma. Prvi je poticanje efikasne usmjerene kolektivne migracije za čije vrijeme stanice održavaju kolektivnu polarnost, fizičku povezanost i koordiniranu citoskeletnu aktivnost. Druga dva mehanizma su vezana uz modulaciju signalnih putova Wnt i receptora fibroblastnog faktora rasta (FGFR). N-kadherin može modulirati transkripciju gena posredovanih TCF/LEF transkripcijskim faktorima potičući individualnu migraciju stanice. (Mrozik i sur., 2018). Također, N-kadherin pojačava signal FGFR i aktivira signalne putove poput MAPK/ERK i PI3K (uz posredovanje faktora rasta PDGFR) u stanicama gdje je ovaj protein glavna molekula prijanjajućih spojeva, a rezultat je migracija stanica i stanično preživljavanje (Das i sur., 2019; Loh i sur., 2019).

Proučavajući korelaciju ekspresije N-kadherina s histološkim gradusom meningeoma, ističe se značajna ekspresija N-kadherina u višim gradusima (Rutkowski i sur., 2018).



### 1.3.3. TWIST1

TWIST1 je evolucijski konzerviran bazični heliks-petlja-heliks (bHLH) transkripcijski faktor. Kodira ga gen *TWIST1* koji se nalazi na kromosomu 7q21.2. Iako se gen sastoji od dva eksona i jednog introna, samo ekson 1 kodira TWIST1 protein. TWIST1 ima važnu ulogu za vrijeme embriogeneze regulirajući gastrulaciju i specifikaciju mezoderma. Mutacije gena *TWIST1* dovode do sindroma Saethre-Chotzen, dok povećana ekspresija proteinskog produkta igra ulogu u tumorigenezi promičući kromosomsku nestabilnost, angiogenezu, invaziju, metastaziranje i rezistenciju na kemoterapiju. Također, može inhibirati tumor supresore RB i p53 potičući preživljavanje tumorskih stanica. TWIST1 potiče agresivan karakter tumora kroz aktivaciju EMT i povećanu ekspresiju mezenhimalnih markera poput N-kadherina, fibronektina, vimentina i aktina (Zhu i sur., 2016; Liao i Yang, 2017; Zhao i sur., 2017). Zahvaljujući svojoj bHLH domeni, TWIST1 može prepoznati cis-regulatorne E-box elemente (CANNTG) u genima, vezati se na njih kao dimer te djelovati kao transkripcijski represor ili aktivator. TWIST1 ima ulogu transkripcijskog represora ekspresije E-kadherina kada se veže na njegovo promotorsko mjesto ili inducirajući *SNAIL1*. S druge strane, u slučaju ekspresije N-kadherin, TWIST1 će djelovati kao transkripcijski aktivator. Aktivaciju proteina TWIST1 omogućava veliki broj različitih signalnih putova poput STAT3, MAPK, NF- $\kappa$ B, DLX4, MYCN, MYC, SOX2, SRC, TGF- $\beta$ , Akt, Ras i Wnt (Khan i sur., 2013; Tang i sur., 2016; Zhu i sur., 2016; Zhao i sur., 2017).

Visoka ekspresija TWIST1 je povezana s visokim gradusima odnosno invazivnošću tumora te se može koristiti kao prognostički faktor u prognozi recidiva i odgovora na terapiju. Poznato je međutim da sekundarni tumori imaju smanjene razine ovog proteina jer da bi se odvila uspješna kolonizacija tkiva i formirao sekundarni tumor, mora doći do supresije proteina TWIST1 čime se potiče proces MET (Khan i sur., 2013; Tang i sur., 2016; Zhu i sur., 2016; Zhao i sur., 2017; Pastushenko i Blanpain, 2019).

### 1.3.4. SNAIL i SLUG

SNAIL1 (SNAIL) i SNAIL2 (SLUG) pripadaju obitelji proteina s motivom cinkovih prstiju. SNAIL kodira gen *SNAIL1* koji se nalazi na kromosomu 20q13.2, dok SLUG kodira gen *SNAIL2* koji se nalazi na kromosomu 8q11.21. Oba proteina imaju domenu SNAG, te se razlikuju u broju cinkovih prstiju (SNAIL ima četiri cinkova prsta dok SLUG ima pet cinkovih prstiju). Njihova uloga je vezana uz preživljenje i diferencijaciju stanica. SNAIL održava mezenhimalne matične

stanice, a time i nediferencirani fenotip kroz kontrolu invazivnih i proangiogenetskih funkcija. Važni su za vrijeme embriogeneze jer sudjeluju u formaciji neuralnog grebena i mezoderma, a SNAIL još inhibira diferencijaciju stanica što je izuzetno važno kod formiranja tkiva. U odraslom organizmu mogu imati ulogu u tumorigenezi suprimirajući epitelna i promičući mezenhimska svojstva, potičući time EMT (Lamouille i sur., 2014; Herrera i sur., 2016; Liao i Yang, 2017). SNAIL i SLUG djeluju kao represori te se svojom C-terminalnom domenom cinkovih prstiju vežu za cis regulatorni element E-box E-kadherinskog gena (Liao i Yang, 2017). Ova poveznica je pogotovo primijećena u agresivnijim tumorima u kojima je bila pojačana ekspresija SNAIL i SLUG, a značajno smanjena ekspresija E-kadherina (Herrera i sur., 2016). Represiju ciljanih gena SNAIL i SLUG postižu i regrutacijom modifikatora histona. Osim što su represori transkripcije epitelnih markera, ovi proteini mogu biti i aktivatori ekspresije mezenhimskih gena poput interleukina 8 (IL8), fibronektina 1 (FN1), nekatalitičke podjedinice endonukleaze (engl. *excision repair 1 endonuclease noncatalytic subunit* – ERCC1). SNAIL također ulazi u interakciju s CREB vezujućim proteinom čime utječe na preinaku mikrookoliša tumora (Liao i Yang, 2017; Deng i sur., 2020). Zahvaljujući transkripcijskom represoru SNAIL, tumorske stanice zadobivaju svojstva slična matičnim stanicama. Posljedice toga su metastaze, recidivi i otpornost na terapiju zbog čega se ekspresija SNAIL i SLUG povezuje s manjom stopom preživljenja. Signalni putovi poput Notch, RTK, TGF $\beta$  ili Wnt mogu aktivirati ekspresiju gena *SNAIL* (Herrera i sur., 2016). Stabilizacija i nakupljanje  $\beta$ -katenina inducira epitelno-mezenhimsku tranziciju zato što potiče ekspresiju transkripcijskih represora SNAIL i SLUG.

#### **1.4. Uzajamno djelovanje signalnog puta Wnt i epitelno-mezenhimske tranzicije i njihova uloga u meningeomima**

Klasični signalni put Wnt usko je povezan s procesima EMT, te je poznato da prelazak  $\beta$ -katenina u jezgri može dovesti do EMT. Pretpostavka je da će tzv. kadherinska izmjena koju karakterizira smanjena ekspresija E-kadherina, a pojačana N-kadherina, biti povezana s fosforilacijskim statusom i aktivacijom  $\beta$ -katenina (Pećina-Šlaus i sur., 2016a). Signalni put Wnt može potaknuti proces EMT prvenstveno u embriogenezi (fazi gastrulacije), a poslije u tumorigenezi. Wnt zajedno sa signalnim putem TGF $\beta$  regulira ekspresiju različitih gena za vrijeme EMT. Tako TGF $\beta$  destabilizira prijanjajuće spojeve omogućavajući nakupljanje  $\beta$ -katenina i potiče transkripciju SNAIL, SLUG i TWIST1, dok signalni put Wnt onemogućava GSK3 $\beta$  da fosforilira

SNAIL1, što dovodi do njegove stabilizacije, a time i represije E-kadherina. (Gonzalez i Medici, 2014; Lamouille i sur., 2014). Isto tako, kadherini se smatraju jednim od glavnih regulatora signalnog puta Wnt budući da E-kadherin djeluje inaktivirajuće na Wnt signalizaciju vežući  $\beta$ -katenin u prijanjajućim spojevima (Kalluri i Weinberg, 2009). Proteinske kinaze CK1 i GSK3 $\beta$  mogu fosforilirati citoplazmatsku domenu kadherina na aminokiselinama Ser684, Ser686 i Ser692 čime ojačavaju kompleks E-kadherina i  $\beta$ -katenina i shodno tome sprječavaju aktivaciju signalnog puta Wnt (Loh i sur., 2019).

Brojni signalni putovi uključujući i put Wnt doprinose stvaranju i evoluciji meningeoma (Polakis, 2012). Međutim, molekularni mehanizmi invazije meningeoma još nisu u potpunosti razjašnjeni te se pretpostavlja da epitelno-mezenhimska tranzicija igra bitnu ulogu budući da meningeomi pokazuju i epitelne i mezenhimske karakteristike. S obzirom na nedovoljnu istraženost epitelno-mezenhimske tranzicije i signalnog puta Wnt u intrakranijalnim meningeomima, ovo istraživanje moglo bi doprinijeti otkrivanju novih komponenti njihovog molekularnog profila. Prepoznavanje molekularnih promjena odgovornih za kontrolu stanične invazivnosti odnosno određivanjem uloge molekula sudionika epitelno-mezenhimske tranzicije i signalnog puta Wnt (E-, N-kadherina i  $\beta$ -katenina), te biljega epitelno-mezenhimske tranzicije SNAIL, SLUG i TWIST1 pružit će osnove za razvoj novih meta za terapije i učinkovitiju strategiju liječenja. Otkrivanjem uloge epitelno-mezenhimske tranzicije u razvoju agresivnijih histopatoloških tipova meningeoma u konačnici doprinosi povećanju preživljena i boljoj perspektivi oboljelih od intrakranijalnih meningeoma.

## **2. HIPOTEZA**

Pretpostavka je da će kadherinska izmjena koju karakterizira smanjena ekspresija E-kadherina, a pojačana N-kadherina, biti povezana s fosforilacijskim statusom i aktivacijom  $\beta$ -katzenina, te da će molekularni biljezi mezenhimskog fenotipa (SNAIL, SLUG i TWIST1) biti pojačano izraženi u dijelu uzorka intrakranijalnih meningeoma i pridruženi višim gradusima meningeoma ili agresivnijim histopatološkim tipovima.

### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Cilj disertacije je istražiti promjene gena i proteina E- i N-kadherina, te utvrditi ima li kadherinska izmjena učinak na izraženost i fosforilacijski status  $\beta$ -katenina u intrakranijalnim meningeomima. Također, disertacija će utvrditi uključenost transkripcijskih faktora biljega epitelno-mezenhimske tranzicije: SNAIL1, SLUG i TWIST1 u nastanku i napredovanju meningeoma.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. Prikupljanje uzoraka intrakranijalnih meningeoma

Uzorci tumorskog tkiva i periferne krvi su prikupljeni od dobrovoljnih ispitanika koji boluju od tumora mozga specifičnog patohistološkog tipa, konkretno intrakranijalnog meningeoma. Za potrebe ovog doktorskog rada prikupljeno je 72 uzoraka iz Klinike za neurokirurgiju i Zavoda za patologiju „Ljudevit Jurak“ Kliničkog bolničkog centra “Sestre milosrdnice” u Zagrebu, Klinike za neurokirurgiju i Zavoda za neuropatologiju Kliničkog bolničkog centra “Zagreb” u Zagrebu te Zavoda za neurokirurgiju i Kliničkog zavoda za patologiju Kliničke bolnice Dubrava. Također, za ovo istraživanje ishođene su dozvole etičkih povjerenstava navedenih bolnica te je prikupljanje, pohrana i analiza uzoraka odobrena dozvolom Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Ur. Broj: 380-59-10106-17-100/98, Klasa: 641-01/17-02/01, datum: 23.3.2017). Svi pacijenti od kojih se uzimalo tkivo tumora potpisali su pristanak za operacijski zahvat, biopsiju i uzimanje 3-5 ml krvi, te im se osigurala anonimnost. Prije operacijskog zahvata, koji je preporučena metoda liječenja neovisno o ovom istraživanju, pacijenti nisu bili podvrgnuti drugim onkološkim metodama liječenja (radijacija, kemoterapija) koje bi mogle utjecati na rezultate genetičkih analiza. Svi uzorci tumora su klasificirani od strane patologa prema kriterijima SZO (Louis i sur., 2016), te su uz patohistološku dijagnozu prikupljeni i ostali klinički parametri – dob u trenutku kada im je dijagnosticiran tumor, spol i lokalizacija (Prilog 1).

Od 72 pacijenata, 43 su bila ženskog spola (59,7%), a 29 pacijenata je bilo muškog spola (40,3%). Što se tiče dobi pacijenata, prosječna dob svih pacijenata je iznosila 59,96 godina, s najmlađim pacijentom od 23 godine i najstarijim od 85 godina. Srednja dob muških pacijenata je iznosila 61,48 godina, dok je srednja dob ženskih pacijenata iznosila 58,93. Prikupljeni uzorak meningeoma se sastojao od 49 benignih ili meningeoma gradusa I (68,1%), 17 atipičnih ili meningeoma gradusa II (23,6%) i 6 anaplastičnih meningeoma koji odgovaraju gradusu III (8,3%). Prikupljeno je ukupno 7 podtipova meningeoma, od kojih 5 podtipova pripadaju benignim meningeomima (meningotelijalni, fibrozni, tranzicionalni, angiomatozni i psamomatozni). Od benignih podtipova najviše je prikupljeno meningotelijalnih (19 uzoraka) i tranzicionalnih (17 uzoraka). S obzirom na lokaciju, tumori su najčešće bili smješteni u frontalnom (16 uzoraka ili 22,2%) i parijetalnom dijelu mozga (10 uzoraka ili 13,9%).

Prilikom kirurškog zahvata, uzorci su prikupljeni na dva načina zbog dva tipa analiza. Za potrebe molekularnih analiza, operacijom je odstranjen jedan dio tkiva tumora te je smrznut u tekućem dušiku i potom pohranjen na  $-80^{\circ}\text{C}$  do izolacije DNA. Također, od istih pacijenata uzeti su uzorci krvi koji su također pohranjeni na  $-80^{\circ}\text{C}$  do izolacije. Za potrebe patohistoloških analiza, dio uzorka tumora je fiksiran u 4 %-tnom formalinu i uklopljeni u parafin.

#### **4.2. Izolacija DNA iz tumorskog tkiva metodom fenol/kloroform**

Izolacija DNA iz tumorskog tkiva je odrađena metodom fenol/kloroform prema Green i Sambrook, 2012. Za potrebe izolacije uzima se masa od 150-450 mg tkiva tumora koja se potom tretira s 1 ml pufera za lizu stanica (10mM TrisHCl, 0,5% Tween; pH 8,0) i s 15  $\mu\text{l}$  proteinaze K. Nakon inkubacije uzorcima se dodaje jednak volumen fenola te se smjesa homogenizira. Centrifugiranjem smjese se dobivaju dvije faze – gornja ili vodena faza i donja ili proteinska, fenolna faza. Vodenoj fazi koja sadrži DNA dodaje se pola volumena kloroforma i pola volumena fenola. Slijedi ponavljanje postupka s homogenizacijom i centrifugiranjem te ponovnim odvajanjem gornje faze. Na dobiveni volumen gornje faze dodaje se jednak volumen kloroforma te se ponavlja proces miješanja i centrifugiranja. Vodenoj fazi dodaje se 2,5 volumena apsolutnog etanola za precipitaciju DNA iz otopine koja se odvija preko noći na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Slijedi centrifugiranje i odvajanje bijelog taloga DNA kojem se dodaje 250  $\mu\text{l}$  deionizirane vode ili pufera TE (Tris-EDTA: 10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,6). Svi uzorci DNA se pohranjuju u banci tumorske DNA.

#### **4.3. Izolacija DNA iz krvi metodom isoljavanja**

Izolacija DNA iz krvi je odrađena metodom isoljavanja prema Miller i sur., 1988. Za potrebe izolacije uzima se 3-5 ml uzorka krvi istog pacijenta na koji se dodaje otprilike tri volumena pufera RCLB-a (engl. *red blood cell lysis buffer*; 0,16 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM  $\text{KHCO}_3$ , 10 mM EDTA, pH 7,6). Talog pročišćen od eritrocita se tretira s 2 ml pufera SE (engl. *sodium EDTA*; 75 mM NaCl, 25 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH 8,0), 200  $\mu\text{l}$  10% SDS-a (engl. *sodium-dodecylsulphate*) i 10  $\mu\text{l}$  proteinaze K. Nakon inkubacije, uzorci se tretiraju s 720  $\mu\text{l}$  5M NaCl. Dobivenom supernatantu se ulijeva jednak volumen 2-propanola za precipitaciju DNA iz otopine. Dobivenoj DNA se dodaje 100  $\mu\text{l}$  deionizirane vode ili pufera TE te se uzorci pohranjuju u banku krvne DNA.

#### 4.4. Umnažanje gena od interesa metodom lančane reakcije polimerazom

Za potrebe ovog istraživanja korištena su dva različita kompleta za izvedbu metode PCR – GoTaq GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, SAD) i PicoMaxx High Fidelity PCR System (Agilent, SAD). Odabir pojedinog kompleta ovisio je o koncentraciji uzorka budući da je hibridna polimeraza iz Piccomax kompleta puno osjetljivija i učinkovitija te joj je potrebna manja količina DNA za umnažanje gena od interesa. U oba slučaja reakcijska smjesa umnažanja je iznosila 25 µl reakcijskog volumena za uzorke koji će se kasnije analizirati pomoću gelova Spreadex ili 50 µl reakcijskog volumena za uzorke koji će se sekvencirati.

Za analize genetskih promjena E-kadherina i N-kadherina umnoženi su njihovi geni *CDH1* i *CDH2* pomoću seta poznatih i visoko polimorfnih mikrosatelitnih biljega koji su smješteni u blizini ili unutar samog gena. Mikrosatelitni biljezi su izabrani pretraživanjem javno dostupnih tzv. buildova humanog genoma koji sadrže informacije vezane uz lokuse pojedinih gena, a dostupne su putem humane banke gena Ensamble – (<http://www.ensembl.org>) i NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Za analize gena su odabrani mikrosatelitni biljezi s visokim postotkom heterozigotnosti u populaciji koji će dati tzv. informativne ili heterozigotne osobe s različitim brojem ponavljanja alela. Za istraživanje promjena na genu *CDH1* korištena su sljedeća dva biljega – D16S752 i D16S3025, dok su za gen *CDH2* korišteni biljezi - D18S66 i D18S819 (Tablica 2). Također, za potrebe sekvenciranja i analize mutacija u mutacijskom žarištu za β-katenin (*CTNNB1*) dizajnirane su početnice pomoću kojih se umnaža njegov ekson 3.

**Tablica 2.** Početnice za analizirane mikrosatelitne biljege i ekson 3 β-katenina.

Početnice	Slijed nukleotida	Produkt
D16S752	5' AATTGACGGTATATCTATCTGTCTG 3'	101 - 129 pb
	5' GATTGGAGGAGGGTGATTCT 3'	
D16S3025	5' TCCATTGGACTTATAACCATG 3'	99 - 110 pb
	5' AGCTGAGAGACATCTGGG 3'	
D18S66	5' AGAGCAAGTCCCTGCC 3'	244 - 262 pb
	5' CAGCCTCGGAGAAACG 3'	
D18S819	5' ACCACAGTTACTAAGATGTAA 3'	~253 pb
	5' GCCTCCAGAAAAAATTTCCA 3'	
Ekson 3 β-katenina	5' CCAATCTACTAATGCTAATACTG 3'	315 pb
	5' CTGCATTCTGACTTTCAGTAAGG 3'	



Za svaki set početnica i umnažanje određenog gena ili eksona optimizirani su uvjeti metode lančane reakcije polimerazom čija se reakcija odvijala u termokružniku (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems, SAD). Uvjeti za pojedini mikrosatelitni biljeg i gen ili ekson od interesa su prikazani u Tablici 3.

**Tablica 3.** Uvjeti lančane reakcije polimerazom za umnažanje mikrosatelitnih biljega i eksona 3 gena *CTNNB1* nakon optimizacije.

Geni	(pred) Denaturacija	Denaturacija	Prianjanje početnica	Sinteza DNA	Br. ciklusa	Završna sinteza DNA
D16S752 ( <i>CDH1</i> )	96°C / 3 min	96°C / 30 s	55°C / 35 s	72°C / 30+1 s	35	72°C / 10 min
D16S3025 ( <i>CDH1</i> )	95°C / 10 min	95°C / 45 s	48°C / 30 s	72°C / 1 min	30	72°C / 10 min
D18S66 ( <i>CDH2</i> )	95°C / 5 min	95°C / 35 s	56°C / 35 s	72°C / 30+1 s	35	72°C / 10 min
D18S819 ( <i>CDH2</i> )	95°C / 5 min	95°C / 35 s	56°C / 35 s	72°C / 30+1 s	35	72°C / 10 min
<i>CTNNB1</i> (ekson 3)	96°C / 3 min	96°C / 30 s	55°C / 35 s	72°C / 30+1 s	40	72°C / 10 min

Uspješnost reakcije PCR i umnoženost ciljanih gena se provjeravala na 1,5%-tnom agaroznom gelu bojenim pomoću boje SYBR Safe (TermoFisher Scientific, USA), a elektroforeza se odvijala na uvjetima 120 V, 10 min.

#### 4.5. Analiza genetskih promjena elektroforezom DNA na gelovima Spreadex

Elektroforezom na gelovima visoke razlučivosti Spreadex analizirane su genetske promjene gubitka heterozigotnosti (LOH) ili mikrosatelitne nestabilnosti (MSI). Za analizu genetskih promjena gena *CDH1* korišteni su komercijalni gelovi Spreadex EL400 Mini (Elchrom Scientific, Švicarska), dok su za genetičke analize gena *CDH2* korišteni gelovi Spreadex EL600 Mini. Spreadex EL400 Mini gelovi visoku razlučivost zahvaljuju mogućnosti da razdvajaju svega 1 pb, dok Spreadex EL600 Mini gelovi imaju razlučivost od 4 pb. Na gelove su se nanosili uzorci DNA tumora i pacijentove DNA iz krvi. Elektroforeza na gelovima Spreadex se odvijala pomoću sustava

ORIGINS by Elchrom™ Scientific (AL-Labortechnik, AL-Diagnostic GmbH, Austrija) pri temperaturi od 55 °C, pod stalnim naponom od 120 V, 60 min za gelove EL400 i 90 min za gelove EL600. Nakon elektroforeze uslijedilo je bojanje gela bojom Sybr gold (Molecular probes, SAD) koja se u količini od 5 µL dodaje u 50 mL pufera TAE (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA; pH 8,0). Nakon toga gel se je tretirao otopinom za odbojavanje (ABC Biopply, Švicarska), u sastavu 20 mL pufera TAE i 29,5 mL dH<sub>2</sub>O. Rezultati su se analizirali usporedbom vrpce tumorske DNA i DNA iz krvi istog pacijenta. Gubitak vrpce u tumoru prikazivao je gubitak heterozigotnosti (LOH), dok pojava dodatnih vrpce ili vrpce na različitim pozicijama u tumoru u odnosu na krv je ukazivala na mikrosatelitnu nestabilnost (MSI).

#### 4.6. Pretraživanje mutacija eksona 3 gena *CTNNB1* pomoću analize taljenja visoke rezolucije

Za brzo pretraživanje mutacija na eksonu 3 *CTNNB1* u uzorcima meningeoma korištena je analiza taljenja visoke rezolucije (engl. *high resolution melting*, HRM). Svako analizi HRM prethodilo je umnažanje gena od interesa iz tumorske DNA i DNA krvi pacijenata pomoću PCR metode i dsDNA interkalirajuće boje (LightCycler® 480 ResoLight Dye, Roche). Rezultat analize taljenja dvolančane DNA je prikazan u obliku krivulje taljenja koje se razlikuju u slučaju kada posjeduju mutaciju odnosno drugačiji udio pojedinih baza. Analiza HRM uzoraka meningeoma se vršila na uređaju Roche Light Cycler® Nano System koji objedinjuje metode PCR i HRM u jedan sukcesivni postupak. Pri tome je korišten LightCycler® 480 High Resolution Melting Master. Nakon pripreme smjese s uzorcima za analizu, pokrenut je softver u programskoj podršci LightCycler® Nano 1.1 s uvjetima za PCR i HRM prikazanih u Tablici 4.

**Tablica 4.** Uvjeti analize taljenja visoke rezolucije na uređaju Roche Light Cycler® Nano System

Roche Light Cycler® Nano System		
Održavanje temperature		96°C/ 200 s / povećanje temperature: 5
Umnažanje (45 ciklusa)		96°C/ 35 s / povećanje temperature: 4
		55°C/ 35 s / povećanje temperature: 4
		72°C/ 35 s / povećanje temperature: 4
Održavanje temperature prije taljenja I		95°C/ 60 s / povećanje temperature: 4
Održavanje temperature prije taljenja II		40°C/ 60 s / povećanje temperature: 4
HRM	Početna faza	65°C/ 1 s / povećanje temperature: 4
	Završna faza	90°C/ 1 s / ramp: 0,02

Nakon završetka programiranih uvjeta na uređaju HRM uslijedila je analiza krivulja taljenja DNA. Kada su se krivulje uzoraka DNA iz tumora i krvi razlikovale, odnosno kada je postojala sumnja na mutacije u tumoru, uzorci su poslani na daljnje analize sekvenciranjem koje potvrđuju nalaz mutacije te daju detaljnije informacije o kakvoj se genetskoj promjeni radi.

#### **4.7. Sekvenciranje eksona 3 gena *CTNNB1***

Za potvrdu mutacija indiciranih metodom HRM te za preciznije određivanje tipa mutacija eksona 3 gena *CTNNB1* uzorci su analizirani klasičnim Sangerovim sekvenciranjem. Svi uzorci DNA tumora i krvi prvo su umnoženi PCR metodom (uvjeti za ekson 3  $\beta$ -katenina prikazani su u Tablici 3), a sekvenciranju koje se provodilo s početnicama za ekson 3 gena *CTNNB1* prethodilo je enzimatsko čišćenje PCR produkata kompletom FastAP (ThermoFisher Scientific, Waltham, SAD). Sekvenciranje je odrađeno pomoću kompleta BigDyeTerminator v3.1 Cycle Sequencing na uređaju ABI 3730XL s 96 kapilara (Applied Biosystems, Foster City, SAD) koji je u posjedu tvrtke Macrogen Europe (Amsterdam, Nizozemska). Detekcija mutacija je vršena usporedbom sekvenci DNA iz tumora sa sekvencama krvi istog pacijenta te javno dostupnom sekvencom eksona 3  $\beta$ -katenina preuzetom iz baze podataka NCBI ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG\\_013302.2?&feature=any](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_013302.2?&feature=any)). Evaluacija učinka pronađenih mutacija eksona 3 gena *CTNNB1* na proteinski produkt duljine 76 aminokiselina napravljena je pomoću programa „Porter 5.0: Prediction of protein secondary structure“ (<http://distilldeep.ucd.ie/porter/>) (Torrise i sur., 2019).

#### **4.8. Imunohistokemijska detekcija analiziranih proteina**

Za potrebe metode imunohistokemije korišteni su uzorci tumora uklopljeni u parafinske blokove čiji su rezovi debljine 4  $\mu$ m. Imunohistokemijskom metodom je analizirana ekspresija i lokalizacija proteina E-kadherina, N-kadherina,  $\beta$ -katenina, nefosforiliranog oblika  $\beta$ -katenina, TWIST1 te SNAIL i SLUG u tkivu tumora.

Rezovi tumorskih tkiva su se deparafinizirali ksilenom i rehidrirali uranjanjem u različite koncentracije etanola. Nakon deparafinizacije rezovi su se tretirali 6 M citratnim puferom ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ; pH 6,0). Kako bi se blokirala nespecifična vezanja koristio se 3%-tni vodikov

peroksid i Protein Block Serum Free (Dako, Danska). Na tako tretirane rezove nanosila su se primarna antitijela s određenim koncentracijama prikazanim u Tablici 5. te ostavljala na inkubaciji preko noći na 4°C.

**Tablica 5.** Karakteristike primarnih antitijela.

Antigen	Tip antitijela	Razrjeđenje	Inkubacija DAB-om	Specifikacije proizvoda
E-kadherin	monoklonsko	1:100	5 min	Dako, kataloški br. M3612
N-kadherin	monoklonsko	1:200/1:50*	5 min	Santa Cruz Biotechnology, kataloški br. (D-4): sc-8424
β-katenin	monoklonsko	1:200	5 min	Dako, kataloški br. M3539
Non-phospho (Active) β-Catenin (Ser33/37/Thr41)	monoklonsko	1:800	2 min	Cell Signaling Technology, kataloški br. D13A1
TWIST1	monoklonsko	1:400	4 min	Abcam, kataloški br. [10E4E6] ab175430
SNAIL i SLUG	poliklonsko	1:200	1 min	Abcam, kataloški br. ab180714

- prilikom ponovne kupovine antitijela od istog proizvođača, zbog slabijeg titra korišteno je manje razrjeđenje

Nakon inkubacije rezovi su se pri sobnoj temperaturi tretirali sekundarnim antitijelom (EnVision™, Dako REAL™) koje sadrži polimer dekstrana s vezanih 70 molekula peroksidaza i 10 sekundarnih antitijela. Vizualizacija kompleksa primarnog i sekundarnog antitijela je postignuta dodavanjem kromogena DAB (EnVision™, Dako REAL™). Rezovi su se bojali i hematoksilinom (Dako, Carpinteria, CA, USA) te dehidrirali ispiranjem u različitim koncentracijama etanola, ovaj put krećući od najniže prema najvišoj koncentraciji i ksilenu. Obojeni rezovi su se potom trajno uklapali pomoću Biomounta DPX Low (BioGnost, Hrvatska).

Rezultati imunohistokemijske metode su analizirani svjetlosnim mikroskopima BH-2 i IX83 Olympus pomoću kojih je pretraživana prisutnost i intenzitet obojenja. Preparati na kojima je zabilježen imunopozitivitet skenirani su pomoću digitalnog skenera (NanoZoomer 2.0 RS; Hamamatsu Photonics, Japan). Na dijelu preparata koji je definiran kao žarište tumora s najvećom ekspresijom (povećanje na mikroskopu od 20X) prebrojane su stanice (minimalni broj od 200 stanica) i analizirana je ekspresija proteina pomoću programske podrške ImageJ (National Institutes of Health, SAD). Za kvantifikaciju imunopozitiviteta korišten je tzv. H-zbroj (engl. *Histocore* ili *H-score*) koji daje veću vrijednost višim intenzitetima ekspresije proteina:

$$H = [1 \times (\% \text{ stanica } 1+) + 2 \times (\% \text{ stanica } 2+) + 3 \times (\% \text{ stanica } 3+)]$$

Pri čemu 1+ označava slab imunopozitivitet – žućkasto/svijetlo smeđe obojenje, 2+ umjeren – svijetlo smeđe i 3+ jak imunopozitivitet – tamno smeđe. Izračunom H-zbroja se dobije raspon vrijednosti proteinske ekspresije na ljestvici od 0-300 (Mazières i sur., 2013).

#### **4.9. Statističke metode obrade rezultata**

Statistička obrada rezultata dobivenih genetičkim i proteinskim analizama učinjena je u programskom paketu SPSS v.19.0.1 (SPSS, Chicago, IL, SAD), uz odabranu razinu značajnosti od  $\alpha \leq 0.05$ . U statističkoj obradi, analiziran je odnos varijabli dobivenih genetičkim i proteinskim analizama s varijablama prikupljenih patohistoloških i demografskih (spol, dob) parametara.

Prije odabira prikladnih statističkih postupaka za obradu podataka, provedeno je testiranje normaliteta distribucije uključenih varijabli Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Za obradu podataka korišteni su parametrijski postupci, koji u načelu imaju veću statističku snagu, kad god je to bilo moguće. U slučaju da je utvrđeno statistički značajno odstupanje korištenih varijabli od normalne distribucije, dobiveni zaključci su dodatno provjereni ekvivalentnim neparametrijskim postupkom.

Kod testiranja značajnosti razlike između dviju skupina korišten je t-test za nezavisne uzorke (odnosno Mann-Whitneyev U test kao njegova neparametrijska zamjena), kod testiranja značajnosti razlike između više od dviju skupina korištena je jednosmjerna analiza varijance (odnosno Kruskal-Wallisov test kao neparametrijska zamjena). Za testiranje povezanosti u raspodjelama dviju ili više varijabli korišten je  $\chi^2$  test i pripadajući koeficijenti korelacije ( $\Phi$  koeficijent u slučaju  $2 \times 2$  tablica ili Cramerov V koeficijent u slučaju nesimetričnih tablica). Za testiranje povezanosti između dviju kontinuiranih varijabli ili jedne kontinuirane i jedne prirodno dihotomne varijable korišten je Pearsonov r koeficijent korelacije.

## 5. REZULTATI

U poglavlju su prikazani rezultati genetičkih i proteinskih analiza 72 uzorka intrakranijalnih meningeoma različitih patohistoloških podtipova i stupnjeva malignosti (Prilog 1-3). Demografski i patohistološki podaci su povezani s rezultatima na razini gena i proteina te korelirani pomoću odgovarajućih statističkih metoda. Također, utvrđeni su učinci genetskih promjena na ekspresiju pojedinih proteina i analizirana je međusobna korelacija različitih proteina.

### 5.1. Genetske promjene

#### 5.1.1. Genetičke analize mikrosatelitne nestabilnosti i gubitka heterozigotnosti gena *CDHI* pomoću mikrosatelitnih biljega D16S752 i D16S3025

Za potrebe analize genetskih promjena regije u kojoj se nalazi gen *CDHI* korištena su dva markera odnosno polimorfna mikrosatelitna biljega s visokom stopom heterozigotnosti. Na ukupnom uzorku od 72 intrakranijalna meningeoma oba markera su se pokazala vrlo informativnim, marker D16S752 pokazao je heterozigotnost u čak 95,8% slučajeva, dok je marker D16S3025 pokazao heterozigotnost u 90,3% slučajeva. Analiza za MSI je rađena na cjelokupnom uzorku, dok je LOH moguće detektirati samo u heterozigotnim uzorcima. Stoga, kod izračuna postotka MSI on je izražen na cjelokupnom uzorku, dok je postotak LOH-a izražen samo na heterozigotnim uzorcima. Rezultati genetičkih analiza gena *CDHI* za pojedini uzorak prikazani su u Prilogu 2.

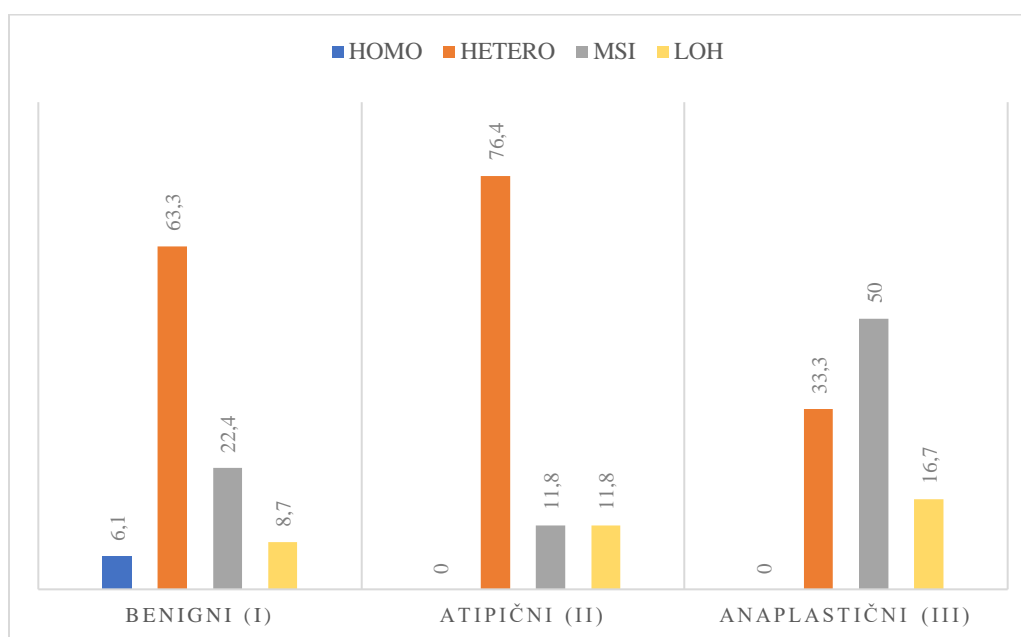
U uzorcima ove disertacije markerom D16S752 zabilježeno je 16 uzoraka s mikrosatelitnom nestabilnošću (22,2%) i 7 uzoraka s gubitkom heterozigotnosti (10,1%). Raspodjela genetskih promjena s obzirom na gradus meningeoma je prikazana u Tablici 6. i na Slici 4. Najveći postotak MSI i LOH opažen je u anaplastičnim meningeomima gradusa III. Primjeri genetskih promjena vizualiziranih pomoću gelova Spreadex su prikazani na Slici 5.

Postojanje povezanosti između učestalosti genetskih promjena detektiranih markerom D16S752 i gradusa ( $p=0,849$ ) ili demografskih varijabli spola i dobi ( $p=0,790$  i  $p=0,147$ ). provjereno je korištenjem hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) testa, Cramerovog V koeficijenta korelacije i t-testa te nisu zabilježene statističke povezanost.

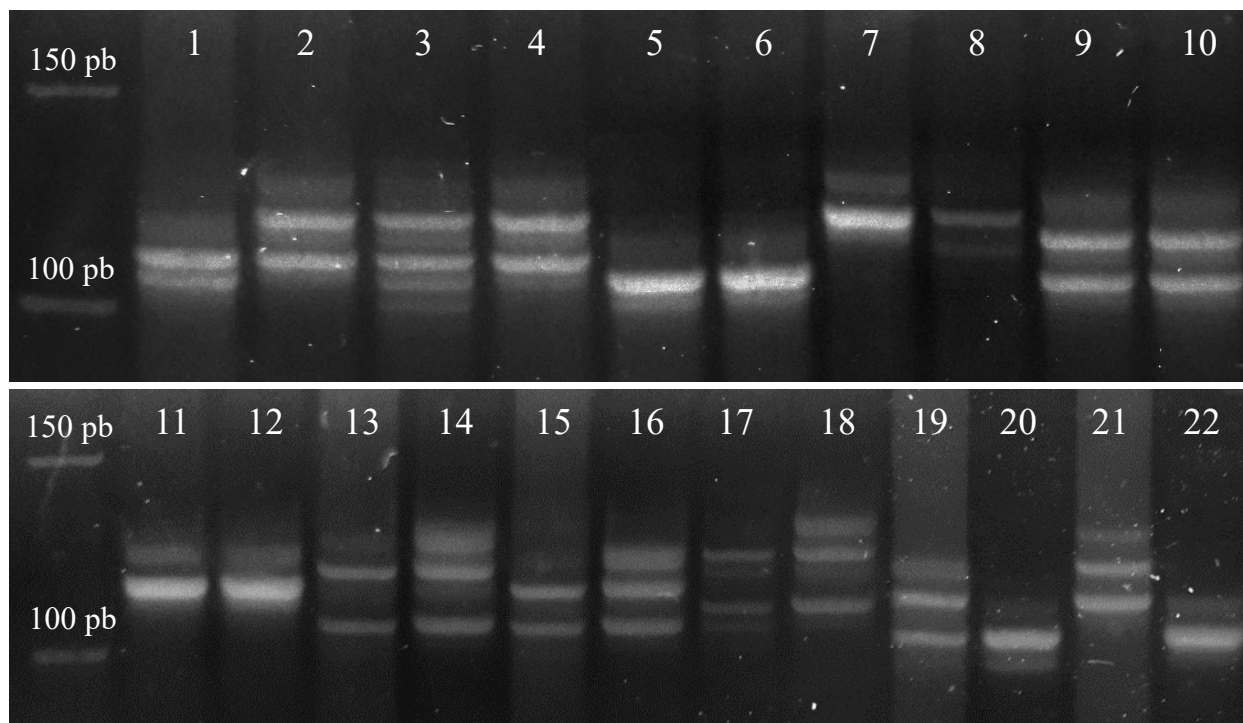
**Tablica 6.** Prikaz zabilježenih genetskih promjena MSI i LOH pomoću mikrosatelitnog biljega D16S752 kroz različite graduse meningeoma. Napomena: izračun postotka homozigotnih uzoraka (HOMO), heterozigotnih uzoraka koji nemaju genetsku promjenu (HETERO) te MSI je računat na cjelokupnom uzorku, dok je postotak LOH-a računat samo za heterozigotne uzorke.

	Benigni (I)	Atipični (II)	Anaplastični (III)	Ukupno
	(N=49)	(N=17)	(N=6)	(N=72)
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<b>D16S752</b>				
<b>HOMO</b>	3 (6,1)	0 (0)	0 (0)	3 (4,2)
<b>HETERO</b>	31 (63,3)	13 (76,4)	2 (33,3)	46 (63,9)
<b>MSI</b>	11 (22,4)	2 (11,8)	3 (50,0)	16 (22,2)
<b>LOH</b>	4 (8,7)	2 (11,8)	1 (16,7)	7 (10,1)

HETERO – heterozigot koji nema genetsku promjenu; HOMO – homozigot; MSI – mikrosatelitna nestabilnost; LOH – gubitak heterozigotnosti



**Slika 4.** Prikaz rezultata (u postotcima) genetičkih analiza dobivenih pomoću mikrosatelitnog markera D16S752 u različitim gradusima meningeoma. Legenda: HETERO – heterozigot koji nema genetsku promjenu; HOMO – homozigot; MSI – mikrosatelitna nestabilnost; LOH – gubitak heterozigotnosti.



**Slika 5.** Prikaz genetskih promjena gena *CDH1* zabilježenih mikrosatelitnim biljegom D16S752 u uzorcima meningeoma na gelovima Spreadex (Elchrom Scientific). Neparni brojevi predstavljaju tumorsku DNA dok parni brojevi predstavljaju DNA krvi istog pacijenta. Pruge 1 i 2 – uzorak pokazuje MSI; pruge 3 i 4 – uzorak pokazuje MSI; pruge 5 i 6 – heterozigotni uzorak bez promjena; pruge 7 i 8 – uzorak pokazuje MSI; pruge 9 i 10 – heterozigotni uzorak bez promjena; pruge 11 i 12 – heterozigotni uzorak; pruge 13 i 14 – uzorak pokazuje LOH; pruge 15 i 16 – uzorak pokazuje LOH; pruge 17 i 18 – uzorak pokazuje LOH; pruge 19 i 20 – uzorak pokazuje MSI; pruge 21 i 22 – uzorak pokazuje MSI.

Marker D16S3025, iako nešto manje stope heterozigotnosti u uzorcima ove disertacije, je pokazao da značajan broj uzoraka ima jednu ili više istraživanih genetskih promjena. Analizom genetskih promjena pomoću ovog markera je utvrđena mikrosatelitna nestabilnost u 6 uzoraka (8,3% od ukupnog broja analiziranih uzoraka), gubitak heterozigotnosti u 5 uzoraka (7,7% od informativnih heterozigotnih uzoraka), a čak 2 uzorka (3,1%) su pokazali obje vrste genetskih promjena (Tablica 7, Slika 6 i 7). Primjeri genetskih promjena vizualiziranih pomoću gelova Spreadex su prikazani na Slici 7.

Statističkom obradom nije zabilježena statistički značajna razlika između pojavnosti genetskih promjena s obzirom na demografske varijable ( $p=0,978$  za spol i  $p=0,968$  za dob) niti s obzirom na gradus ( $p=0,166$ ). Ovim markerom nije zabilježena niti jedna genetska promjena na

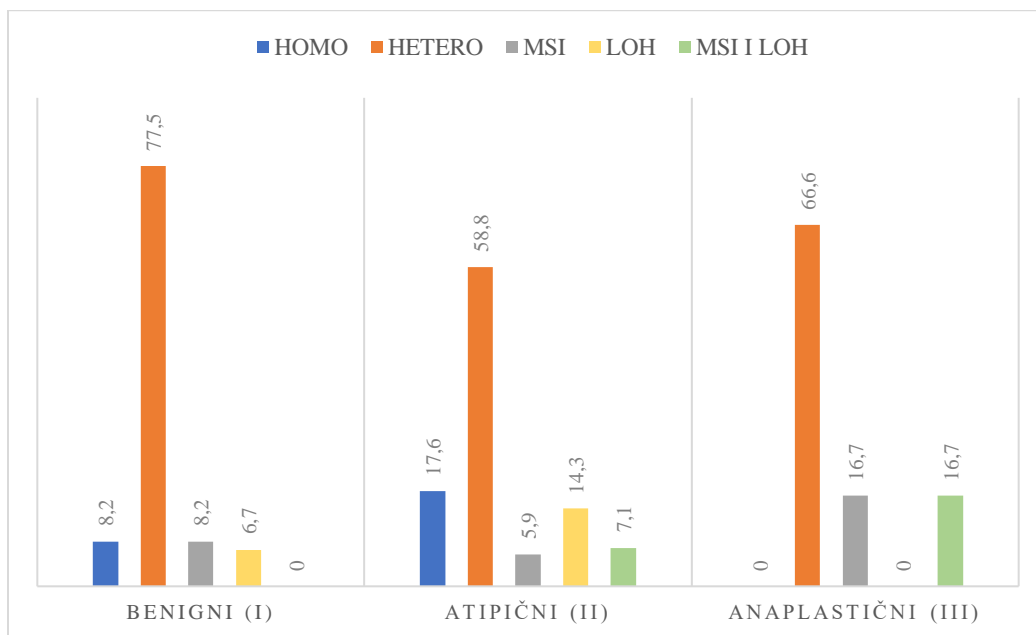


drugom najčešćem podtipu benignih meningeoma – tranzicionalnim meningeomima, dok su se u drugim podtipovima pojavljivale različitom frekvencijom.

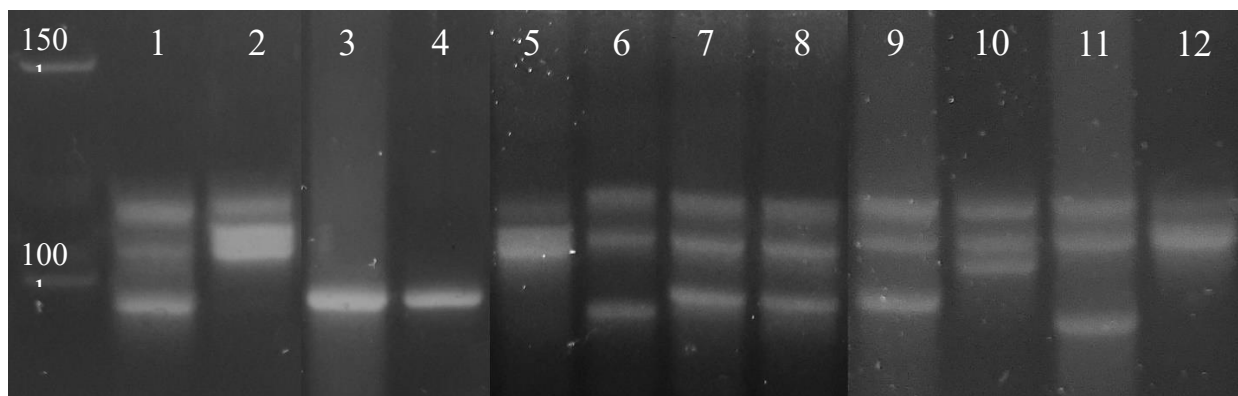
**Tablica 7.** Prikaz zabilježenih genetskih promjena MSI i LOH pomoću mikrosatelitnog biljega D16S3025 kroz različite graduse meningeoma. Napomena: izračun postotka homozigotnih uzoraka (HOMO), heterozigotnih uzoraka koji nemaju genetsku promjenu (HETERO) te MSI je računat na cjelokupnom uzorku, dok je postotak LOH-a kao i kategorije MSI I LOH računat samo za heterozigotne uzorke.

	Benigni (I)	Atipični (II)	Anaplastični (III)	Ukupno
	(N=49)	(N=17)	(N=6)	(N=72)
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<b>D16S3025</b>				
<b>HOMO</b>	4 (8,2)	3 (17,6)	0 (0)	7 (9,7)
<b>HETERO</b>	38 (77,5)	10 (58,8)	4 (66,6)	52 (72,2)
<b>MSI</b>	4 (8,2)	1 (5,9)	1 (16,7)	6 (8,3)
<b>LOH</b>	3 (6,7)	2 (14,3)	0 (0)	5 (7,7)
<b>MSI I LOH</b>	0 (0)	1 (7,1)	1 (16,7)	2 (3,1)

HETERO – heterozigot koji nema genetsku promjenu; HOMO – homozigot; MSI – mikrosatelitna nestabilnost; LOH – gubitak heterozigotnosti



**Slika 6.** Prikaz rezultata (u postocima) genetičkih analiza dobivenih pomoću mikrosatelitnog markera D16S3025 za gen *CDHI* u različitim gradusima meningeoma. Legenda: HETERO – heterozigot koji nema genetsku promjenu; HOMO – homozigot; MSI – mikrosatelitna nestabilnost; LOH – gubitak heterozigotnosti.



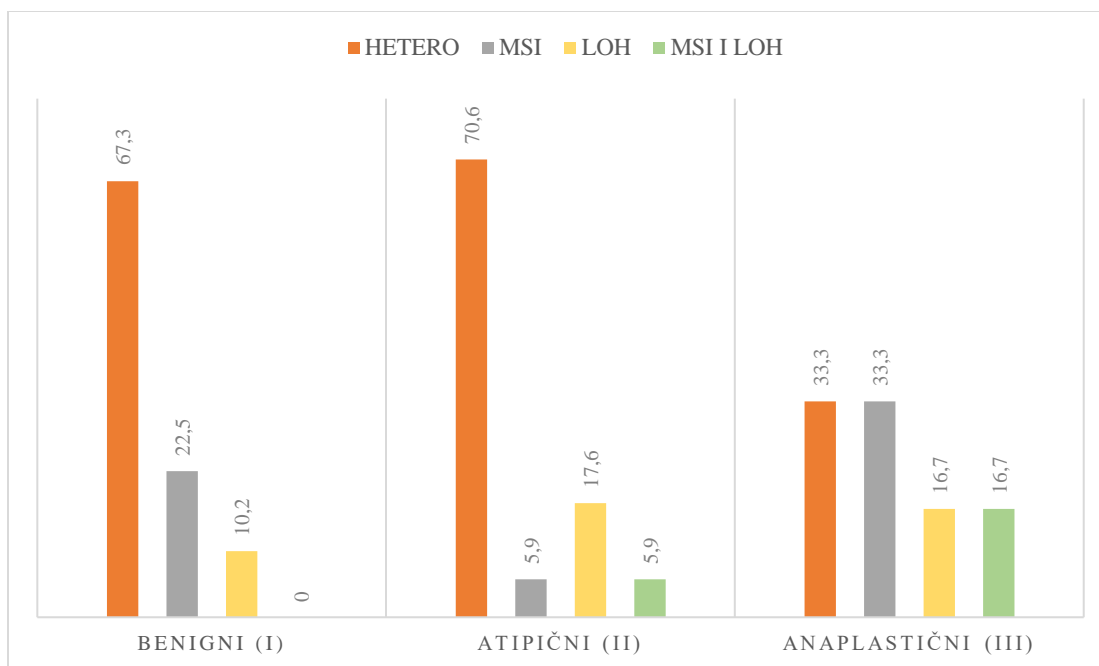
**Slika 7.** Prikaz genetskih promjena gena *CDHI* zabilježenih mikrosatelitnim biljegom D16S3025 u uzorcima meningeoma na gelovima Spreadex (Elchrom Scientific). Neparni brojevi predstavljaju tumorsku DNA dok parni brojevi predstavljaju DNA krvi istog pacijenta. Pruge 1 i 2 – uzorak pokazuje MSI; pruge 3 i 4 –homozigotni ili neformativni uzorak; pruge 5 i 6 – uzorak pokazuje MSI; pruge 7 i 8 – heterozigotni uzorak bez promjena; pruge 9 i 10 – uzorak pokazuje MSI; pruge 11 i 12 – uzorak pokazuje MSI.

Učinjena je i zbirna analiza dvaju markera za gen *CDHI* te je ona pokazala da je svaki uzorak u barem jednom markeru informativan. Mikrosatelitna nestabilnost je zabilježena u 14 uzoraka (19,4%), gubitak heterozigotnosti u 9 uzoraka (12,5%), a 2 su uzorka (2,8%) pokazala obje genetske promjene (Tablica 8, Slika 8). I ova analiza je pokazala da anaplastični meningeomi sadrže najveći postotak MSI i LOH. Statistička obrada nije pokazala statistički značajnu razliku, odnosno nije pokazala povezanost pojavnosti zbirne analize genetskih promjena s demografskim varijablama (spol  $p=0,960$  i dob  $p=0,584$ ) niti gradusom ( $p=0,126$ ).

**Tablica 8.** Prikaz zabilježenih genetskih promjena mikrosatelitne nestabilnosti i gubitka heterozigotnosti pomoću mikrosatelitnog biljega D16S752 i D16S3025 kroz različite graduse meningeoma.

	Benigni (I)	Atipični (II)	Anaplastični (III)	Ukupno
	(N=49)	(N=17)	(N=6)	(N=72)
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<b>D16S752 i D16S3025</b>				
<b>HETERO</b>	33 (67,3)	12 (70,6)	2 (33,3)	47 (65,3)
<b>MSI</b>	11 (22,5)	1 (5,9)	2 (33,3)	14 (19,4)
<b>LOH</b>	5 (10,2)	3 (17,6)	1 (16,7)	9 (12,5)
<b>MSI I LOH</b>	0 (0)	1 (5,9)	1 (16,7)	2 (2,8)

HETERO – heterozigot koji nema genetsku promjenu; HOMO – homozigot; MSI – mikrosatelitna nestabilnost; LOH – gubitak heterozigotnosti



**Slika 8.** Prikaz rezultata (u postotcima) zbirne analize dvaju mikrosatelitnih markera D16S752 i D16S3025 za gen *CDH1* u različitim gradusima meningeoma. Legenda: HETERO – heterozigot koji nema genetsku promjenu; HOMO – homozigot; MSI – mikrosatelitna nestabilnost; LOH – gubitak heterozigotnosti.

### 5.1.2. Genetičke analize mikrosatelitne nestabilnosti i gubitka heterozigotnosti gena *CDH2* pomoću mikrosatelitnih biljega D18S66 i D18S819

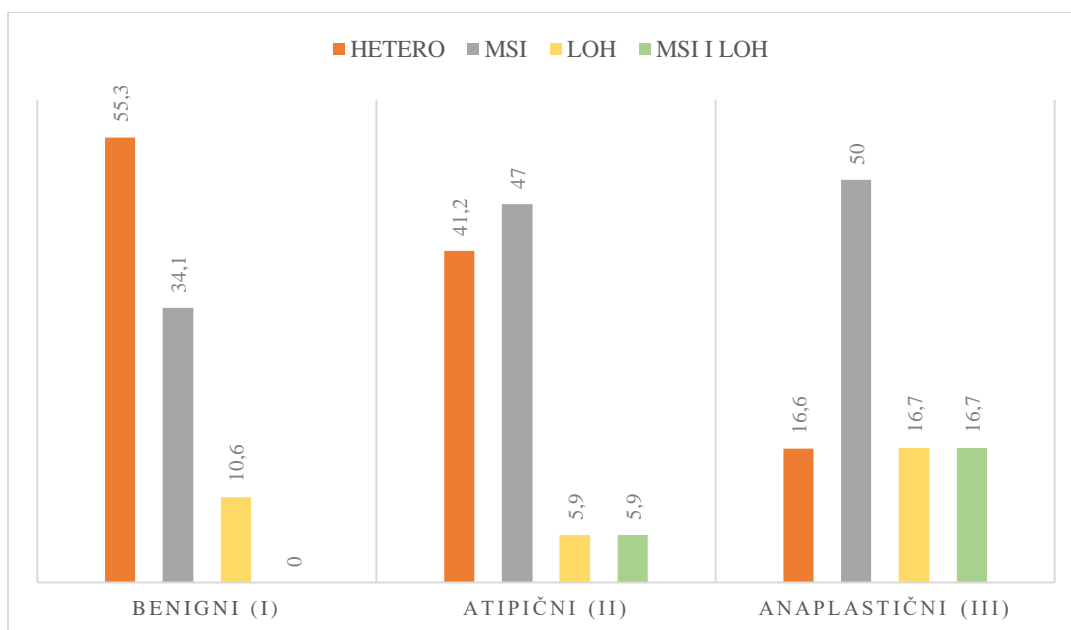
Za potrebe analize genetskih promjena regije na 18. kromosomu, u kojoj se nalazi gen *CDH2* korištena su dva polimorfna mikrosatelitna biljega s visokom stopom heterozigotnosti. Uzorak je ovaj put činio broj od 70 intrakranijalnih meningeoma zbog slabe koncentracije izolirane DNA dvaju uzoraka. U ukupnom uzorku od 70 intrakranijalnih meningeoma markeri D18S66 i D18S819 su se pokazali visoko informativnom sa 100%-tnom heterozigotnošću. Rezultati genetičkih analiza gena *CDH2* za pojedini uzorak prikazani su u Prilogu 2.

Analiza markerom D18S66 je zabilježila 27 uzoraka (38,6%) s mikrosatelitnom nestabilnosti, 7 uzoraka (10%) s gubitkom heterozigotnosti i 2 uzorka (2,8%) koji su pretrpjeli obje genetske promjene (Tablica 9, Slika 9 i 10). Nije nađena statistički značajna razlika u pojavnosti genetskih promjena analiziranih markerom D18S66 s obzirom na spol ( $p=0,271$ ), dob ( $p=0,408$ ) i gradus ( $p=0,100$ ).

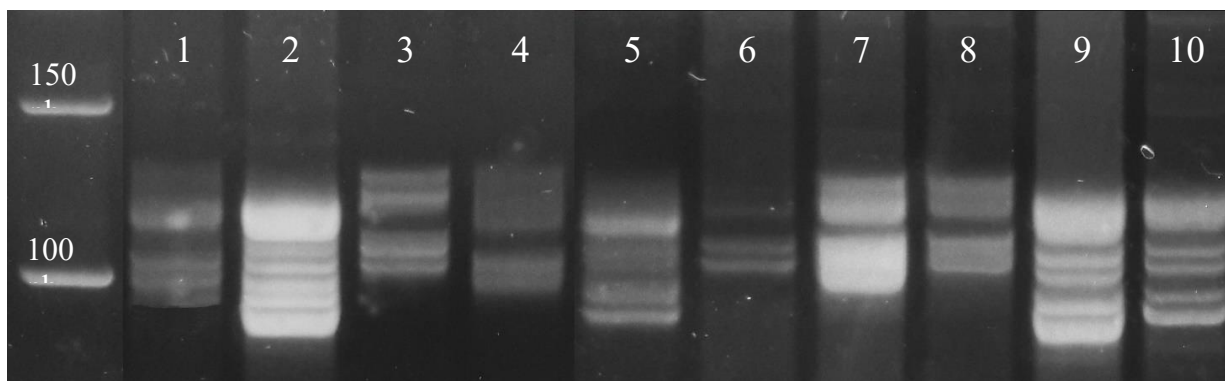
**Tablica 9.** Prikaz zabilježenih genetskih promjena mikrosatelitne nestabilnosti i gubitka heterozigotnosti pomoću mikrosatelitnog biljega D18S66 kroz različite graduse meningeoma.

	Benigni (I)	Atipični (II)	Anaplastični (III)	Ukupno
	(N=47)	(N=17)	(N=6)	(N=70)
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<b>D18S66</b>				
<b>HETERO</b>	26 (55,3)	7 (41,2)	1 (16,6)	34 (48,6)
<b>MSI</b>	16 (34,1)	8 (47,0)	3 (50,0)	27 (38,6)
<b>LOH</b>	5 (10,6)	1 (5,9)	1 (16,7)	7 (10)
<b>MSI I LOH</b>	0 (0)	1 (5,9)	1 (16,7)	2 (2,8)

HETERO – heterozigot koji nema genetsku promjenu; HOMO – homozigot; MSI – mikrosatelitna nestabilnost; LOH – gubitak heterozigotnosti



**Slika 9.** Prikaz rezultata (u postotcima) genetičkih analiza dobivenih pomoću mikrosatelitnog markera D18S66 u različitim gradusima meningeoma. Legenda: HETERO – heterozigot koji nema genetsku promjenu; HOMO – homozigot; MSI – mikrosatelitna nestabilnost; LOH – gubitak heterozigotnosti.



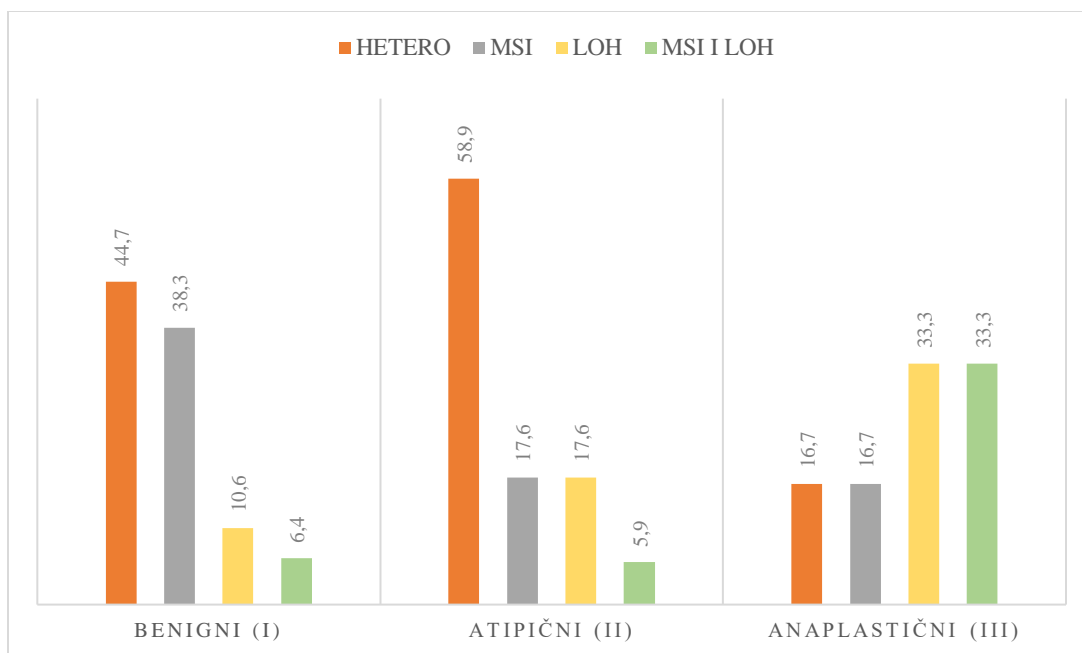
**Slika 10.** Prikaz genetskih promjena gena *CDH2* zabilježenih mikrosatelitnim biljegom D18S66 u uzorcima meningeoma na gelovima Spreadex (Elchrom Scientific). Neparni brojevi predstavljaju tumorsku DNA dok parni brojevi predstavljaju DNA krvi istog pacijenta. Pruge 1 i 2 – uzorak pokazuje MSI i LOH; pruge 3 i 4 – uzorak pokazuje MSI; pruge 5 i 6 – uzorak pokazuje MSI; pruge 7 i 8 – uzorak pokazuje MSI; pruge 9 i 10 – uzorak pokazuje MSI.

Marker D18S819 je pokazao 22 uzorka (31,4%) s mikrosatelitnom nestabilnosti, 10 uzoraka (14,3%) s gubitkom heterozigotnosti i čak 6 uzoraka (8,6%) koji su imali obje genetske promjene (Tablica 10, Slika 11 i 12). Rezultati analize ovim markerom također nisu pokazali statistički značajnu povezanost između pojavnosti genetskih promjena sa spolom ( $p=0,778$ ), dobi ( $p=0,199$ ) ili gradusom ( $p=0,098$ ).

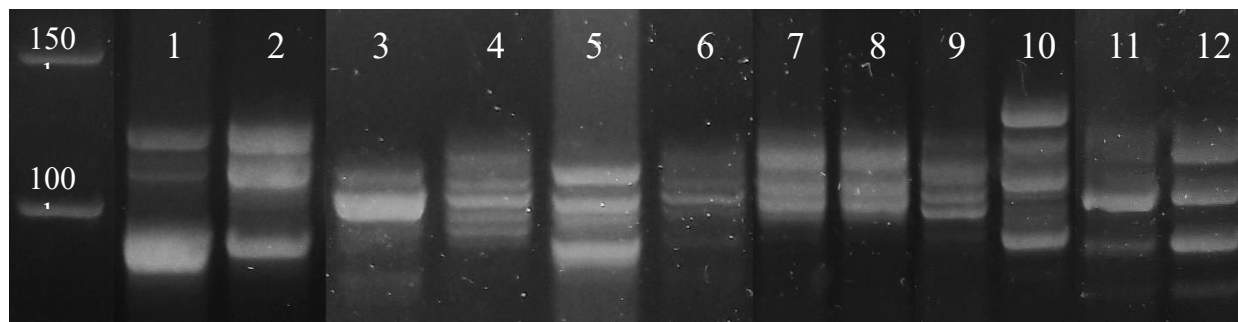
**Tablica 10.** Prikaz zabilježenih genetskih promjena mikrosatelitne nestabilnosti i gubitka heterozigotnosti pomoću mikrosatelitnog biljega D18S819 kroz različite graduse meningeoma.

	Benigni (I)	Atipični (II)	Anaplastični (III)	Ukupno
	(N=47)	(N=17)	(N=6)	(N=70)
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<b>D18S819</b>				
<b>HETERO</b>	21 (44,7)	10 (58,9)	1 (16,7)	32 (45,7)
<b>MSI</b>	18 (38,3)	3 (17,6)	1 (16,7)	22 (31,4)
<b>LOH</b>	5 (10,6)	3 (17,6)	2 (33,3)	10 (14,3)
<b>MSI I LOH</b>	3 (6,4)	1 (5,9)	2 (33,3)	6 (8,6)

HETERO – heterozigot koji nema genetsku promjenu; HOMO – homozigot; MSI – mikrosatelitna nestabilnost; LOH – gubitak heterozigotnosti



**Slika 11.** Prikaz rezultata (u postotcima) genetičkih analiza dobivenih pomoću mikrosatelitnog markera D18S819 u različitim gradusima meningeoma. Legenda: HETERO – heterozigot koji nema genetsku promjenu; HOMO – homozigot; MSI – mikrosatelitna nestabilnost; LOH – gubitak heterozigotnosti.



**Slika 12.** Prikaz genetskih promjena gena *CDH2* zabilježenih mikrosatelitnim biljegom D18S819 u uzorcima meningeoma na gelovima Spreadex (Elchrom Scientific). Neparni brojevi predstavljaju tumorsku DNA dok parni brojevi predstavljaju DNA krvi istog pacijenta. Pruge 1 i 2 – uzorak pokazuje MSI i LOH kroz nejednakost alela; pruge 3 i 4 – uzorak pokazuje LOH; pruge 5 i 6 – uzorak pokazuje MSI; pruge 7 i 8 – heterozigotni uzorak bez promjena; pruge 9 i 10 – uzorak pokazuje MSI; pruge 11 i 12 – uzorak pokazuje LOH kroz nejednakost alela.

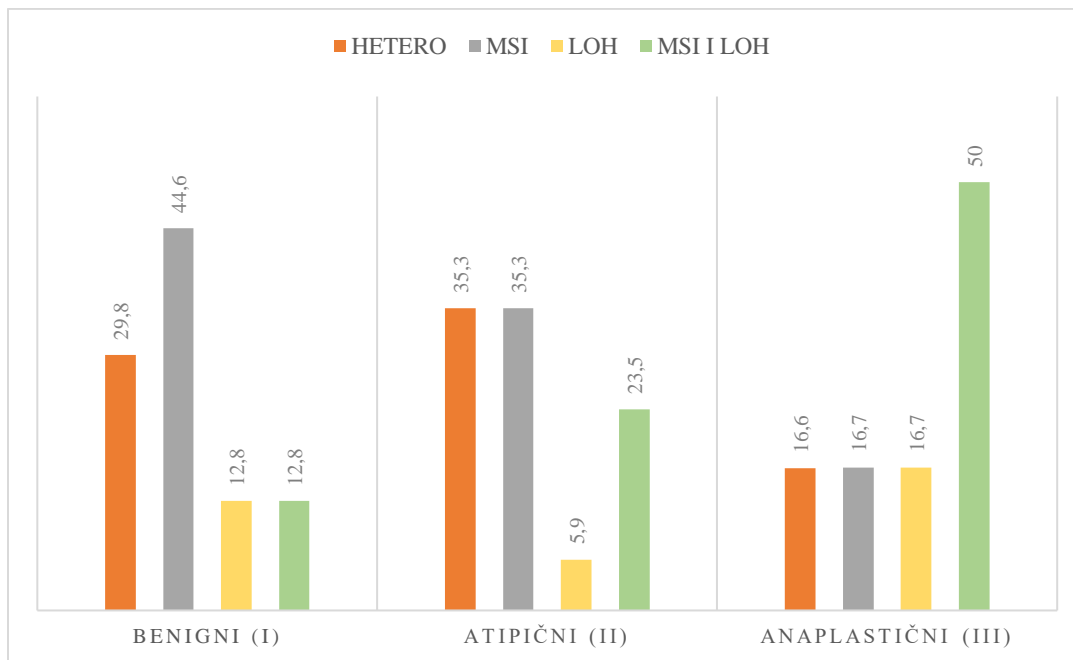
Zbirnom analizom dvaju markera gena *CDH2* utvrđen je značajan broj genetskih promjena. Čak 70% uzoraka je pokazao jednu ili više genetskih promjena – 28 uzoraka (40%) mikrosatelitnu

nestabilnost, 8 uzoraka (11,4%) gubitak heterozigotnosti te 13 uzoraka (18,6%) obje vrste genetskih promjena (Tablica 11, Slika 13). Zbirna analiza genetskih promjena *CDH2* također nije pokazala statistički značajnu povezanost učestalosti tih promjena sa spolom ( $p=0,620$ ), dobi ( $p=0,151$ ) i gradusom ( $p=0,307$ ).

**Tablica 11.** Prikaz zabilježenih genetskih promjena mikrosatelitne nestabilnosti i gubitka heterozigotnosti pomoću mikrosatelitnog biljega D18S66 i D18S819 kroz različite graduse meningeoma.

	Benigni (I)	Atipični (II)	Anaplastični (III)	Ukupno
	(N=47)	(N=17)	(N=6)	(N=70)
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<b>D18S66 i D18S819</b>				
<b>HETERO</b>	14 (29,8)	6 (35,3)	1 (16,6)	21 (30,0)
<b>MSI</b>	21 (44,6)	6 (35,3)	1 (16,7)	28 (40,0)
<b>LOH</b>	6 (12,8)	1 (5,9)	1 (16,7)	8 (11,4)
<b>MSI I LOH</b>	6 (12,8)	4 (23,5)	3 (50,0)	13 (18,6)

HETERO – heterozigot koji nema genetsku promjenu; HOMO – homozigot; MSI – mikrosatelitna nestabilnost; LOH – gubitak heterozigotnosti



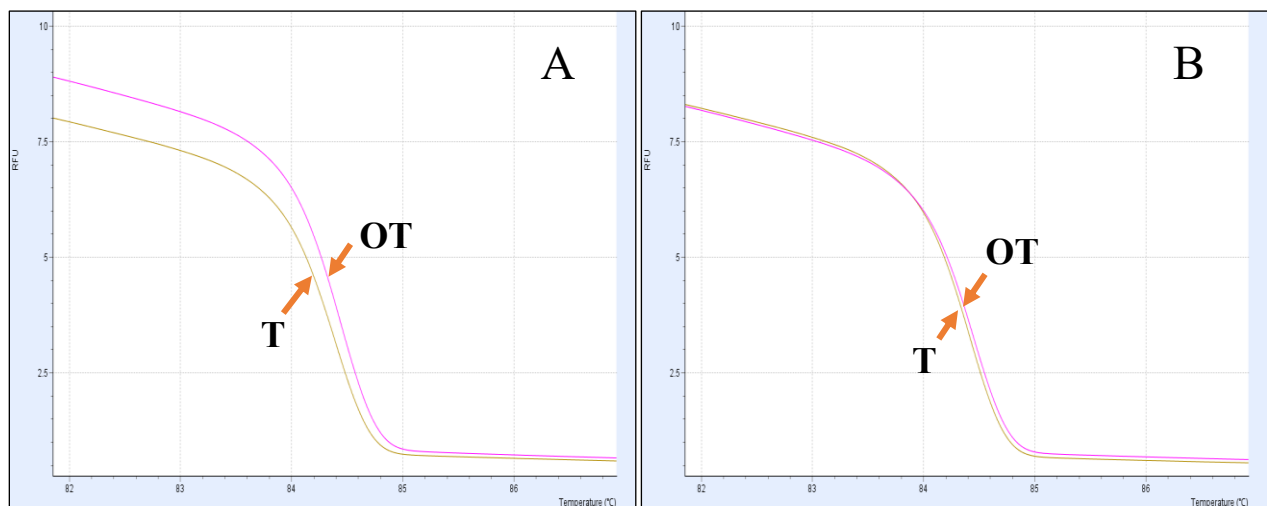
**Slika 13.** Prikaz rezultata (u postotcima) zbirne analize dvaju mikrosatelitnih markera D18S66 i D18S819 za gen *CDH2* u različitim gradusima meningeoma. Legenda: HETERO – heterozigot koji nema genetsku promjenu; HOMO – homozigot; MSI – mikrosatelitna nestabilnost; LOH – gubitak heterozigotnosti.

### 5.1.3. Usporedba genetičkih analiza mikrosatelitne nestabilnosti i gubitka heterozigotnosti gena *CDH1* i *CDH2*

Dobiveni rezultati genetičkih analiza mikrosatelitnim biljezima za gene *CDH1* i *CDH2* su uspoređeni kako bi se vidjelo je li njihova međusobna pojavnost povezana (Prilog 2). Za potrebe istraživanja odnosa ovih dvaju gena korišten je Cramerov V koeficijent koji je otkrio statistički značajnu povezanost između pojavnosti genetskih promjena između markera D16S725 i D18S66 ( $\varphi_c=0,294$ ; **p=0,016**) ili markera D16S3025 i D18S66 ( $\varphi_c=0,489$ ; **p=0,000**), te u slučajevima kada su oba mikrosatelitna biljega gena *CDH1* uspoređeni s markerom gena *CDH2* D18S66 ( $\varphi_c=0,307$ ; **p=0,010**) ili oba mikrosatelitna biljega gena *CDH2* s markerom gena *CDH1* D16S3025 ( $\varphi_c=0,353$ ; **p=0,005**). Odnosno, u ovom uzorku intrakranijalnih meningeoma se pokazalo da ako gen *CDH1* pokazuje genetsku promjenu, vrlo je vjerojatno da će i gen *CDH2* biti promijenjen.

### 5.1.4. Mutiranost eksona 3 $\beta$ -katenina (*CTNNB1*) i predikcija njenog učinka

Analizom krivulja dobivenih metodom HRM odabrani su uzorci čije su se krivulje razlikovale od onih dobivenih analizom DNA iz krvi istog pacijenta (Slika 14). Ukupno su analizirana 63 uzorka intrakranijalnih meningeoma i pripadajuće krvi. Nakon ovog koraka koji predstavlja grublji probir uzoraka s mutacijama, a koji može pokazati i lažno pozitivni rezultat, selektirani uzorci su sekvencirani, te je dobivena i informacija o vrsti mutacije u eksonu 3.



**Slika 14.** Prikaz rezultata metode analize taljenja visoke rezolucije A) uzorak s potencijalnom mutacijom; B) nemutirani uzorak. Legenda: T – uzorak tumora, OT – uzorak krvi istog pacijenta.



Metodom Sangerovog sekvenciranja otkriveno je 14 uzoraka (22,2%) intrakranijalnih meningeoma s mutacijom u mutacijskom žarištu  $\beta$ -katenina (Slika 15). Sekvenciranjem je djelomično obuhvaćen i prvi dio sekvence introna 3, gdje su također zabilježene mutacije (Tablica 12). Od ukupnog broja uzoraka s mutacijama tri su uzorka pokazala mutacije u eksonu, osam u intronu, a tri uzorka su imali mutacije i u eksonu i intronu. Sekvence uzoraka mutiranih u eksonu su dodatno analizirane kako bi se utvrdio njihov učinak na dio proteinskog produkta duljine 76 aminokiselina kojeg kodiraju (Tablica 13). Rezultati simulacija predikcije sekundarne strukture proteina su pokazali da mutacije u eksonu uzoraka T21, T253, T254, T260 i T451 uzrokuju raniji prekid sinteze proteina odnosno rezultiraju prijevremenim stop kodonom u sekvenci zbog čega nastaju kraći proteini koji su često nefunkcionalni. Simulacija sekundarne strukture proteina mutiranog uzorka T285 je pokazala da supstitucija baza u eksonu ne uzrokuje razliku u strukturi formiranog proteina, međutim dvije insercije u intronu mogu prouzročiti pomak okvira čitanja i izrezivanje introna na krivom mjestu, opet dovodeći do nefunkcionalnosti proteina. Zbog navedenih činjenica, svi mutirani uzorci sadrže barem jednu genetsku promjenu koja ima utjecaj na funkcionalnost proteina i koja je potencijalno škodljiva. Uzorci s mutacijama u eksonu 3 nisu pokazivali promjene koje se najčešće pojavljuju u S33, S37, T41, S45 već su se one događale na drugim lokacijama. U 3/6 slučajeva eksonskih mutacija sinteza proteina je bila zaustavljena prije S33, S37, T41, S45 te ili zbog pomaka okvira čitanja ili zbog mutacije pogrešnog smisla nije došlo do sinteze navedenih aminokiselina na tim lokacijama. U 2/6 slučajeva je sinteza proteina bila zaustavljena nakon S33, S37, T41, S45, čime su navedene aminokiseline formirane, ali je cijeli N-terminalni kraj  $\beta$ -katenina bio kraći. Mutacije u intronu 3 su se u 11/12 uzoraka pojavljivale na dvije lokacije u genomu s insercijom baze A.

**Tablica 12.** Prikaz analizirane nukleotidne sekvence eksona 3 (crna slova) i dijela introna 3 (crvena slova)  $\beta$ -katenina u nemutiranim uzorcima.

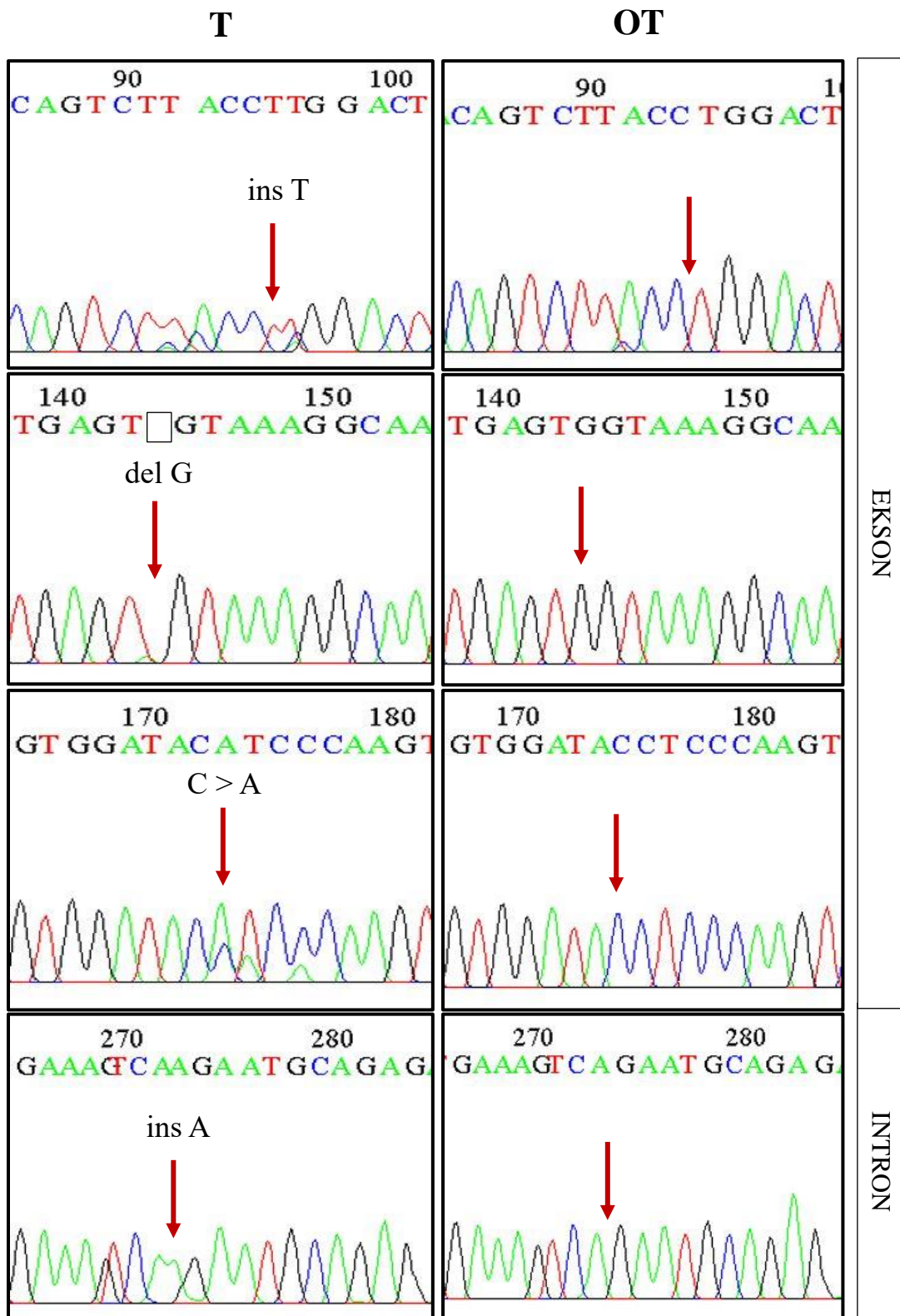
<b><math>\beta</math>-katenin</b>	
Nukleotidna sekvenca	GCTGATTTGATGGAGTTGGACATGGCCATGGAACCAGACAGAA AAGCGGCTGTTAGTCACTGGCAGCAACAGTCTTACCTGGACTCT GGAATCCATTCTGGTGCCACTACCACAGCTCCTTCTCTGAGTGG TAAAGGCAATCCTGAGGAAGAGGATGTGGATACCTCCCAAGTC CTGTATGAGTGGGAACAGGGATTTTCTCAGTCCTTCACTCAAGA ACAAGTAGCTGGTAAGAGTATTATTTTCATTGCCTTACTGAAA GTCAGAATGCAG
Redoslijed aminokiselina	ADLMELDMAMEPDRKAAVSHWQQQSYLDSGIHSGATTTAPSLSG KGNPEEEDVDTSQVLYEWEQGFSSFTQEQA

U uzrocima sa zabilježenim mutacijama ukupno je detektirano 14 insercija, 4 delecije i 4 supstitucije koje su za posljedice imale 18 pomaka okvira čitanja, dvije besmislene mutacije (engl. *nonsense*), jednu mutaciju pogrešnog smisla (engl. *missense*) i jednu tihu mutaciju. Od ukupnog broja meningeoma s mutacijama koje uzrokuju kraće nefunkcionalne proteine (prijevremeni završetak sinteze proteina), imunohistokemijska analiza je utvrdila da 3 uzorka (60%) imaju slab signal obiju proučavanih formi  $\beta$ -katenina (nefosforilirani i ukupni), dok je 1 uzorak imao slabi signal nefosforiliranog oblika  $\beta$ -katenina i umjereni signal ukupnog  $\beta$ -katenina, a 1 uzorak umjereni signal obiju formi  $\beta$ -katenina. Tiha mutacija popraćena potencijalno krivim izrezivanjem introna imala je slabi signal nefosforiliranog oblika  $\beta$ -katenina i jaki signal ukupnog  $\beta$ -katenina. Od ukupnog broja meningeoma s potencijalnim krivim izrezivanjem introna 4 uzorka (50%) pokazala su slab signal obiju formi  $\beta$ -katenina, dok su 3 uzorka (37,5%) imala umjereni signal obiju formi  $\beta$ -katenina, a 1 uzorak je pokazao jaki signal nefosforiliranog oblika  $\beta$ -katenina i umjereni signal ukupnog  $\beta$ -katenina. Atipični meningeomi koji su pokazali mutaciju u eksonu ili intronu 3 *CTNNB1* su u 75% slučajeva pokazivali umjereni signal obiju formi  $\beta$ -katenina. U većini uzoraka (13 od 14) signal nefosforiliranog oblika  $\beta$ -katenina bio je jednak ili slabiji u odnosu na signal ukupnog  $\beta$ -katenina (Tablica 13).

Pojava mutacije nije statistički povezana s dobi ( $p=0,073$ ) niti specifičnim gradusom ( $p=0,538$ ). Mutacije su zabilježene u deset uzoraka benignih meningeoma, 4 uzoraka atipičnih meningeoma, te nisu zabilježene u anaplastičnim uzorcima.

**Tablica 13.** Prikaz analiziranih mutacija utvrđenih u eksonu i intronu 3  $\beta$ -katenina na 14 uzoraka intrakranijalnih meningeoma.

Uzorak	Mutacija	Broj	Vrsta mutacije	Lokacija mutacije	Očekivani učinak	Učinak zabilježen imunohistokemijskom analizom
T21	Ekson	2	Delecija i supstitucija	g.30119delA g.30239C>A	Pomak okvira čitanja i prijevremeni završetak sinteze proteina	Slab signal (1+) obiju formi $\beta$ -katenina
T32	Intron	1	Insercija	g.30340_30341insA	Pomak okvira čitanja i potencijalno krivo izrezivanje introna	Slab signal (1+) obiju formi $\beta$ -katenina
T241	Intron	1	Insercija	g.30340_30341insA	Pomak okvira čitanja i potencijalno krivo izrezivanje introna	Jak signal (3+) nefosforiliranog oblika i umjeren signal (2+) ukupnog $\beta$ -katenina
T253	Ekson i intron	2	Delecija i insercija	g.30204delG g.30343_30344insA	Pomak okvira čitanja s prijevremenim završetkom sinteze proteina i potencijalno krivo izrezivanje introna	Slab signal (1+) obiju formi $\beta$ -katenina
T254	Ekson	1	Delecija	g.30203delT	Pomak okvira čitanja i prijevremeni završetak sinteze proteina	Slab signal (1+) obiju formi $\beta$ -katenina
T260	Ekson i intron	4	Supstitucija i 3 insercije	g.30096A>T g.30153_30154insT g.30340_30341insA g.30343_30344insA	Prijevremeni završetak sinteze proteina i potencijalno krivo izrezivanje introna zbog pomaka okvira čitanja	Slab signal (1+) nefosforiliranog oblika i umjeren signal (2+) ukupnog $\beta$ -katenina
T264	Intron	1	Delecija	g.30307delA	Potencijalno krivo izrezivanje introna	Slab signal (1+) obiju formi $\beta$ -katenina
T276	Intron	1	Insercija	g.30340_30341insA	Pomak okvira čitanja i potencijalno krivo izrezivanje introna	Umjeren signal (2+) obiju formi $\beta$ -katenina
T285	Ekson i intron	3	Supstitucija i 2 insercije	g.30096A>T g.30340_30341insA g.30343_30344insA	Tiha mutacija i potencijalno krivo izrezivanje introna zbog pomaka okvira čitanja	Slab signal (1+) nefosforiliranog oblika i jak signal (3+) ukupnog $\beta$ -katenina
T286	Intron	1	Insercija	g.30343_30344insA	Pomak okvira čitanja i potencijalno krivo izrezivanje introna	Slab signal (1+) obiju formi $\beta$ -katenina
T331	Intron	1	Insercija	g.30340_30341insA	Pomak okvira čitanja i potencijalno krivo izrezivanje introna	Slab signal (1+) obiju formi $\beta$ -katenina
T430	Intron	2	2 insercije	g.30340_30341insA g.30343_30344insA	Pomak okvira čitanja i potencijalno krivo izrezivanje introna	Umjeren signal (2+) obiju formi $\beta$ -katenina
T451	Ekson	1	Supstitucija	g.30141C>T	Prijevremeni završetak sinteze proteina	Umjeren signal (2+) obiju formi $\beta$ -katenina
T459	Intron	1	Insercija	g.30340_30341insA	Pomak okvira čitanja i potencijalno krivo izrezivanje introna	Umjeren signal (2+) obiju formi $\beta$ -katenina



**Slika 15.** Primjeri sekvenci s različitim tipovima mutacija u eksonu 3 i intronu 3 gena *CTNNB1* dobivenih metodom Sangerovog sekvenciranja. Crvena strelica označava mjesto mutacije. Legenda: T – uzorak tumora, OT – uzorak krvi istog pacijenta.

### 5.1.5. Genetske promjene u različitim podtipovima meningeoma

Kao što je prethodno spomenuto, prikupljeno je sedam podtipova meningeoma. Svi podtipovi su pokazali neku vrstu genetske promjene (MSI i/ili LOH) na *CDH1* i *CDH2* genu. Većina podtipova meningeoma je pokazala mutacije eksona i/ili introna 3 gena *CTNNB1*, s izuzetkom angiomatoznih (gradus I), psamomatoznih (gradus I) i anaplastičnih (gradus III) meningeoma. Promjene gena *CDH1* bile su najčešće u angiomatoznim (I) meningeomima s učestalosti od 100%, zatim psamomatoznim (gradus I) i anaplastičnim (gradus III) meningeomima s učestalošću od 66,7%. Gen *CDH2* je često bio promijenjen te je pokazivao jednu od genetskih promjena u svim uzorcima fibroznih (gradus I) i angiomatoznih (gradus I) meninegoma. Svi uzorci angiomatoznih meningeoma imali su neku vrstu genetske promjene na *CDH1* i *CDH2* genu, ali ne i u eksonu i/ili intronu 3 gena *CTNNB1* gdje nisu pronađene mutacije. Ekson i/ili intron 3 gena *CTNNB1* najčešće su bili mutirani u atipičnim meningeomima (gradus II) s učestalošću od 25% i meningotelijalnim meningeomima (gradus I) s učestalošću od 22,2%. Ukupan broj genetskih promjena proučavanih gena u pojedinom podtipu meningeoma je prikazan u Tablici 14. Nije zabilježena statistički značajna povezanost pojavnosti mutacija *CTNNB1* s postojanjem genetskih promjena gena *CDH1* ( $p=0,772$ ) i gena *CDH2* ( $p=0,420$ ).

**Tablica 14.** Ukupan broj genetskih promjena *CDH1* i *CDH2* i mutacija gena *CTNNB1* u pojedinom podtipu meningeoma.

<b>Podtip (gradus)</b>	<b><i>CDH1</i></b>	<b><i>CDH2</i></b>	<b><i>CTNNB1</i></b>
Meningotelijalni (I)	7 (36,8%)	11 (61,1%)	4 (22,2%)
Fibrozni (I)	2 (25,0%)	8 (100%)	1 (14,3%)
Angiomatozni (I)	2 (100%)	2 (100%)	0 (0%)
Tranzicionalni (I)	3 (17,6%)	11 (68,8%)	5 (33,3%)
Psamomatozni (I)	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0 (0%)
Atipični (II)	5 (29,4%)	11 (64,7%)	4 (25,0%)
Anaplastični (III)	4 (66,7%)	5 (83,3%)	0 (0%)

## 5.2. Rezultati proteinske ekspresije i lokalizacije

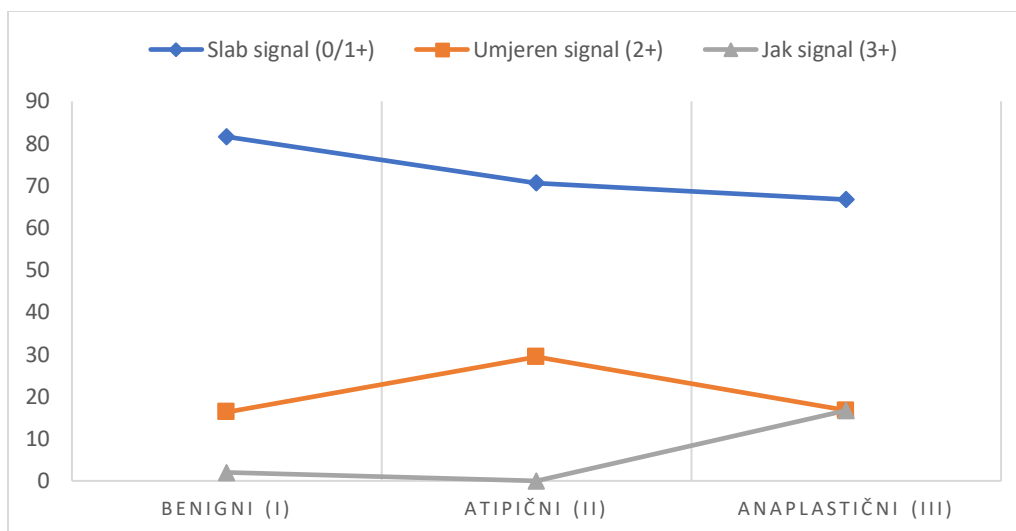
Analizirana je ekspresija i lokalizacija proteina E-kadherina, N-kadherina, dviju formi  $\beta$ -katenina, TWIST1, SNAIL i SLUG na parafinskim rezovima istih pacijenata s dijagnosticiranim intrakranijalnim meningeomima. Signal je analiziran na mjestu tumorskog žarišta gdje su brojane stanice u vidnom polju na povećanju od 20x. Intenzitet imunopozitiviteta u stanicama je iskazan H-zbrojem čiji je raspon vrijednosti od 0-300 (Prilog 3). Na temelju vrijednosti H-zbroja, proteinska ekspresija uzoraka je kategorizirana u tri razine jačine signala: 0-100 = slab signal (0/1+), 101-200 = umjeren signal (2+) i 201-300 = jak signal (3+).

### 5.2.1. Ekspresija proteina E-kadherina u intrakranijalnim meningeomima

Analiza proteinske ekspresije E-kadherina pomoću H-zbroja na uzorcima intrakranijalnih meningeoma je pokazala vrlo nisku pojavnost proteina vezanu uz citoplazmu i membranu. Od 72 uzorka najveći postotak uzoraka (77,8%) pokazivao je slab signal. Čak u 22 uzorka (30,6%) nije zabilježen signal, a samo dva uzorka (2,8%) su pokazivali vrijednosti veće od 200. Srednja vrijednost ekspresije je iznosila 48,83. U Tablici 15. i na Slici 16. je prikazan broj (postotak) uzoraka u pojedinoj kategoriji jačine signala proteinske ekspresije.

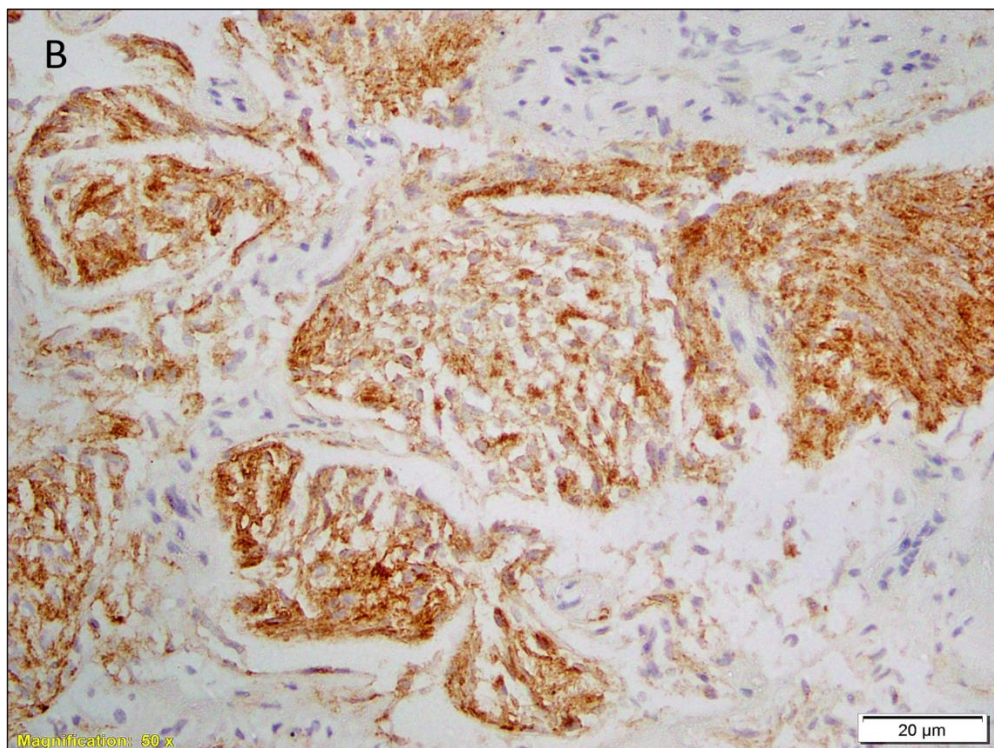
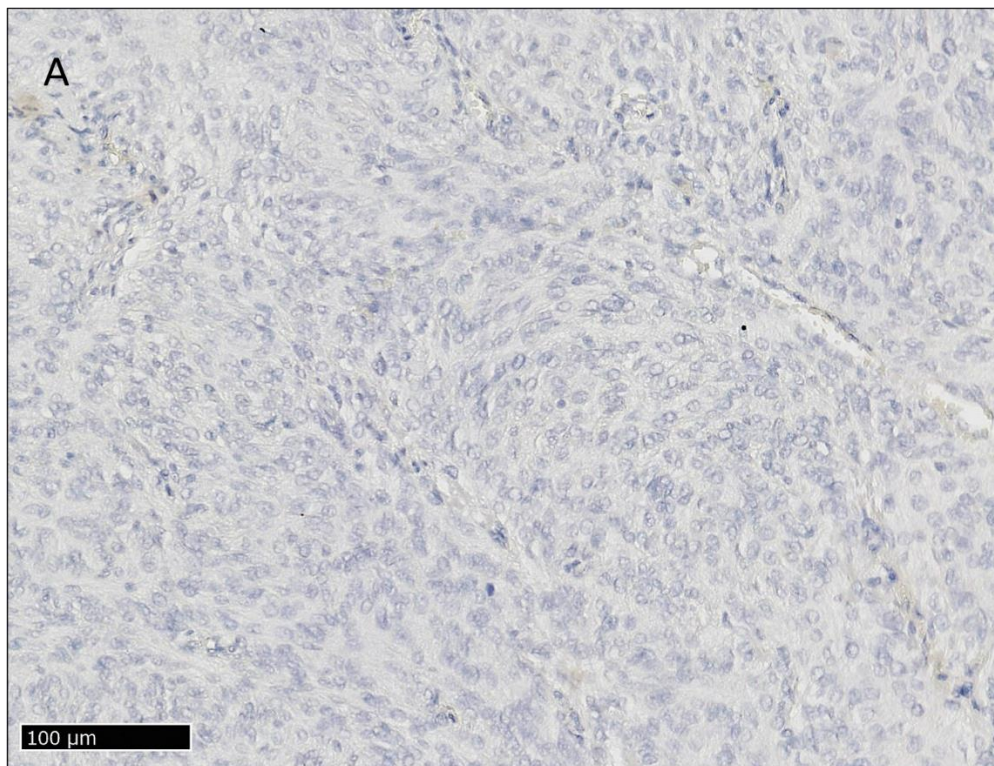
**Tablica 15.** Prikaz broja (postotka) uzoraka u pojedinoj kategoriji jačine signala E-kadherina u različitim gradusima meningeoma.

	Benigni (I) (N=49) N (%)	Atipični (II) (N=17) N (%)	Anaplastični (III) (N=6) N (%)	Ukupno (N=72) N (%)
<b>E-kadherin</b>				
<b>Slab signal (0/1+)</b>	40 (81,6)	12 (70,6)	4 (66,7)	56 (77,8)
<b>Umjeren signal (2+)</b>	8 (16,3)	5 (29,4)	1 (16,7)	14 (19,4)
<b>Jak signal (3+)</b>	1 (2,0)	0 (0)	1 (16,7)	2 (2,8)



**Slika 16.** Prikaz udjela uzoraka u pojedinoj kategoriji jačine signala E-kadherina u različitim gradusima meningeoma.

Usporedbom rezultata analize H-zbroj s obzirom na gradus (ANOVA), spol (t-test) ili dobnu skupinu (Pearsonova korelacija) nije zabilježena statistički značajna povezanost (redom:  $p=0,116$ ,  $p=0,513$  i  $p=0,816$ ). Također, uporaba t-testa je pokazala da ekspresija E-kadherina nije bila povezana s pojavom genetskih promjena zabilježenih pomoću mikrosatelitnih biljega D16S752 ( $p=0,236$ ) i D16S3025 ( $p=0,127$ ) za gen *CDH1*, niti s pojavom genetskih promjenama zabilježenih pomoću markera D18S66 ( $p=0,486$ ) i D18S819 ( $p=0,975$ ) za gen *CDH2*. Od 56 uzoraka koji su imali slab signal, njih 35,7% je imalo promjenu gena *CDH1*. Uzorci s umjerenim signalom su u 28,6% slučajeva imali promjene na genu *CDH1*, dok kod uzorka s jakim signalom jedan od dva je pokazivao genetsku promjenu ovog gena. Povezanost je analizirana i kod ekspresije E-kadherina s pojavom mutacija gena *CTNNB1* te se ni ona nije pokazala statistički značajnom ( $p=0,771$ ).



**Slika 17.** Prikaz rezultata imunohistokemijskog bojanja meningeoma na E-kadherin. A) negativan uzorak pri povećanju 20x i B) uzorak sa srednjim i jakim intenzitetom bojanja pri povećanju od 50x.

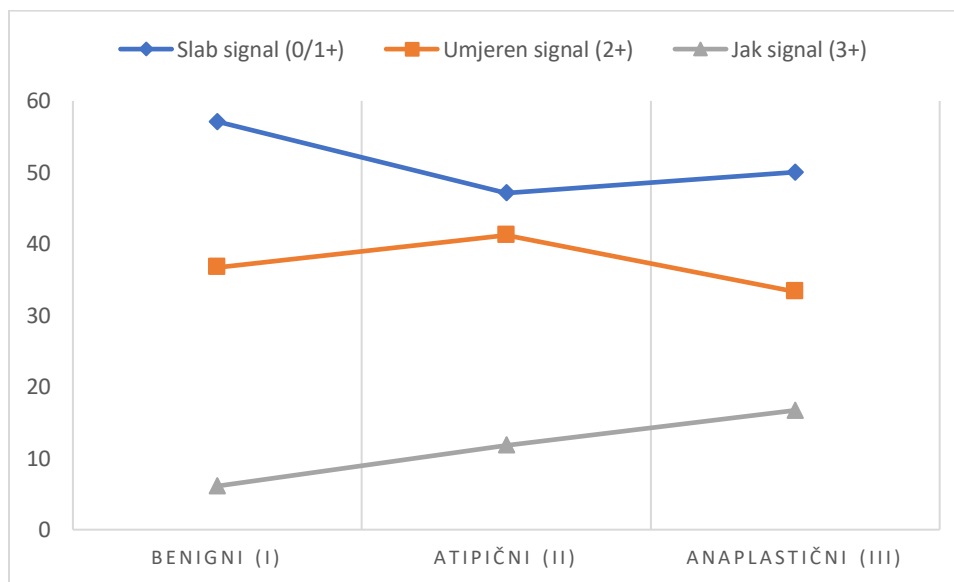


### 5.2.2. Ekspresija proteina N-kadherina u intrakranijalnim meningeomima

Proteinska ekspresija N-kadherina je bila znatno izraženija u intrakranijalnim meningeomima u odnosu na ekspresiju E-kadherina. Srednja vrijednost ekspresije dobivene H-zbrojem je iznosila 81,04. Od 72 uzorka najveći postotak uzoraka pokazivao je slab signal 54,2%. U samo 4 (5,6%) ih nije zabilježen signal, dok je 27 (37,4%) pokazivalo umjeren signal, a 6 (8,3%) uzoraka jak signal. Podjela rezultata H-zbroja u tri kategorije jačine signala s obzirom na graduse je prikazana u Tablici 16. i na Slici 18. Ekspresija proteina je bila vezana uz citoplazmu stanice.

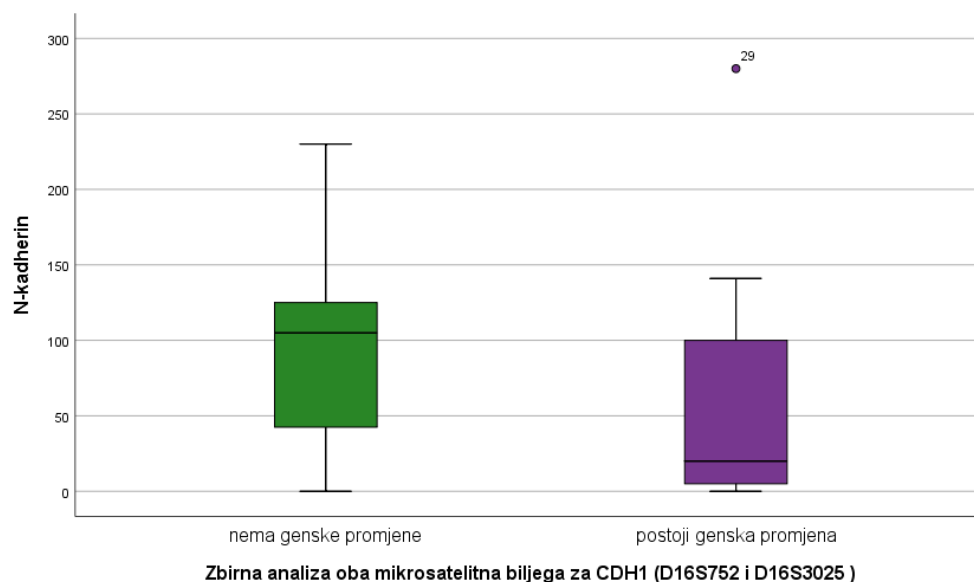
**Tablica 16.** Prikaz broja (postotka) uzoraka u pojedinoj kategoriji jačine signala N-kadherina u različitim gradusima meningeoma.

	Benigni (I) (N=49)	Atipični (II) (N=17)	Anaplastični (III) (N=6)	Ukupno (N=72)
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<b>N-kadherin</b>				
<b>Slab signal (0/1+)</b>	28 (57,1)	8 (47,1)	3 (50,0)	39 (54,2)
<b>Umjeren signal (2+)</b>	18 (36,7)	7 (41,2)	2 (33,3)	27 (37,5)
<b>Jak signal (3+)</b>	3 (6,1)	2 (11,8)	1 (16,7)	6 (8,3)

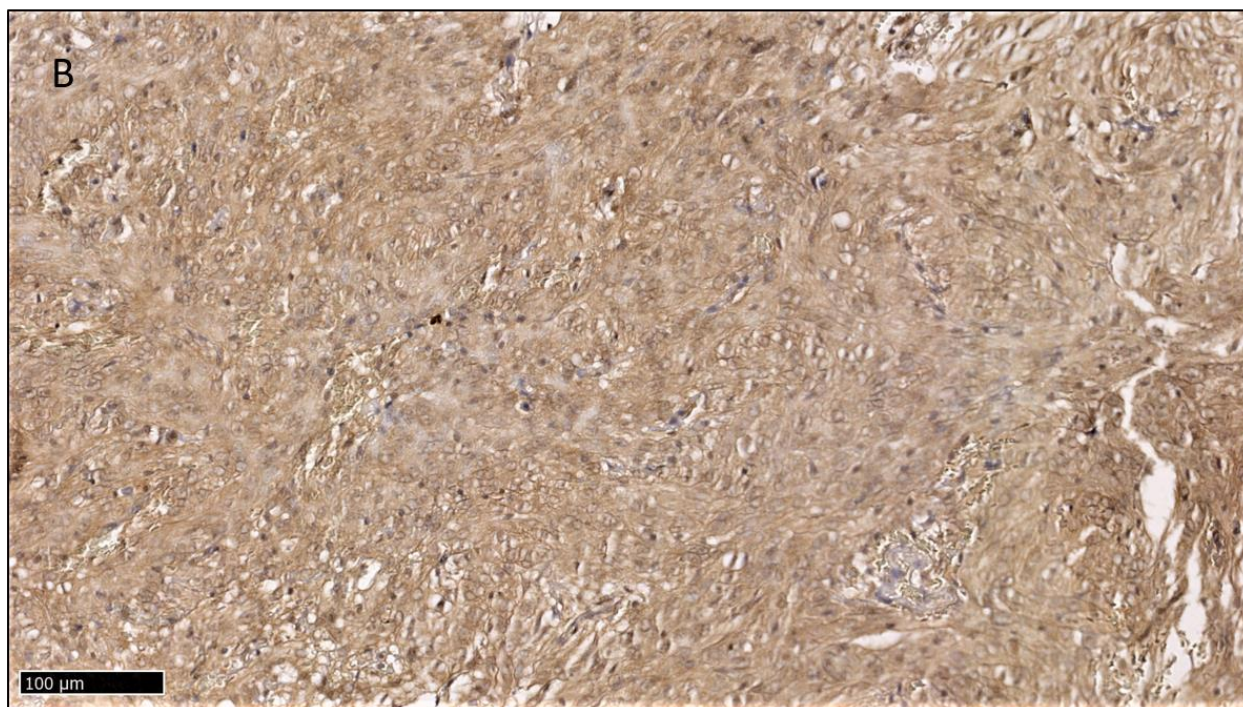
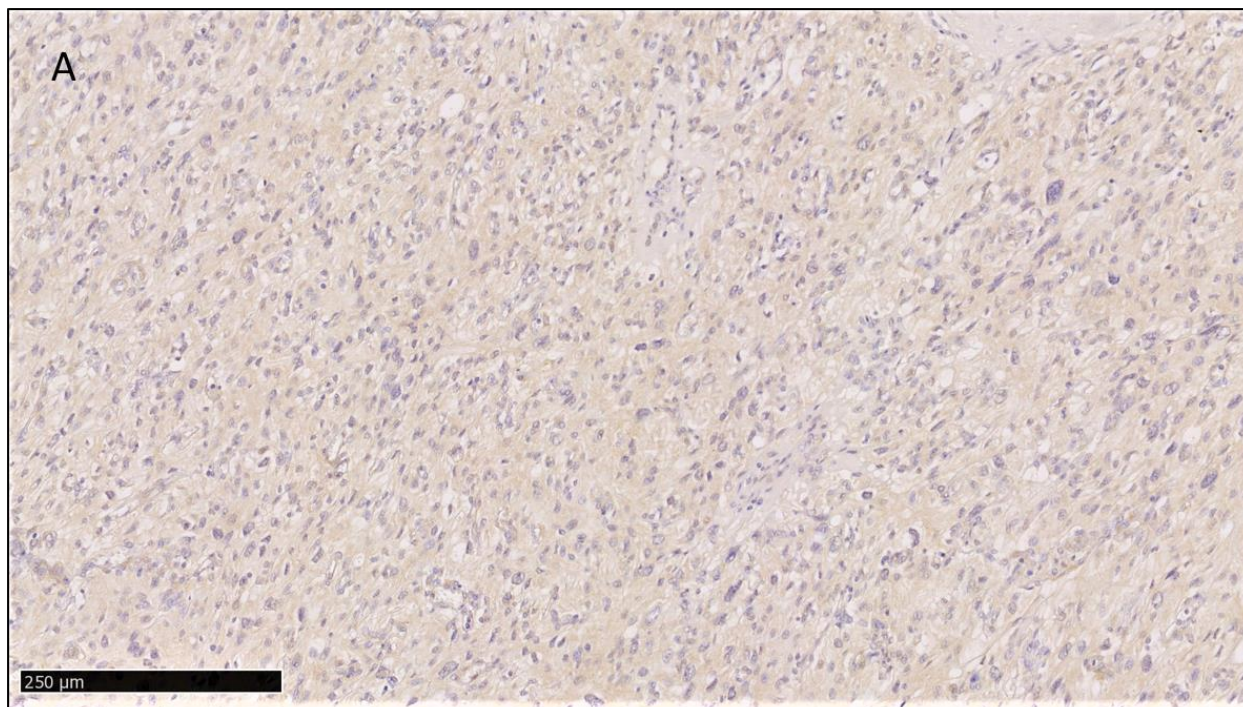


**Slika 18.** Prikaz udjela uzoraka u pojedinoj kategoriji jačine signala N-kadherina u različitim gradusima meningeoma.

Povezanost H-zbroja s gradusom, spolom i dobnom skupinom nije se pokazala statistički značajnom (redom:  $p=0,552$ ,  $p=0,511$  i  $p=0,537$ ), međutim pomoću t-testa je zabilježena statistički značajna razlika u ekspresije N-kadherina s obzirom na prisutnost genetskih promjena gena *CDH1* (E-kadherina) dobivenih pomoću mikrosatelitnih biljega D16S752 i D16S3025 ( $t=2,100$ ,  $df=67$ ,  $p=0,040$  i  $t=2,589$ ,  $df=63$ ,  $p=0,012$ ). Zbirna analiza mikrosatelitnih biljega E-kadherina također je pokazala statistički značajnu razliku u ekspresiji N-kadherina s obzirom na prisutnost genetskih promjena *CDH1* ( $t=2,462$ ,  $df=70$ ,  $p=0,016$ ) (Slika 19). Detaljnijom post-hoc analizom je utvrđeno da uzorci s mutacijom na E-kadherinu imaju u prosjeku značajno manju ekspresiju N-kadherina izraženu H-zbrojem. Ekspresija N-kadherina nije statistički značajno povezana s mutacijama zabilježenim pomoću markera D18S66 ( $p=0,272$ ) i D18S819 ( $p=0,181$ ) u njegovom genu *CDH2*. Od 38 uzoraka koji su pokazivali slabu ekspresiju N-kadherina, njih 73,7% je imalo promjenu gena *CDH2*. Gotovo identičan rezultat su pokazali i uzorci s umjerenom ekspresijom N-kadherina gdje je njih 73,1% imalo genetsku promjenu gena *CDH2*. Uzorci s jakim signalom su imali manje genetskih promjena te su one zabilježene u 33,3% uzoraka. Nije pronađena statistički značajna povezanost između ekspresije N-kadherina i mutacija gena *CTNNB1* ( $p=0,098$ ).



**Slika 19.** Prikaz odnosa razine ekspresije N-kadherina, dobivene analizom H-zbroj, s genetskim promjenama na E-kadherinu, dobivenih pomoću zbirne analize mikrosatelitnih biljega D16S752 i D16S3025, u intrakranijalnim meningeomima. Točka 29 predstavlja uzorak 29 (T253) sa stršecom vrijednosti (engl. *outlier*).



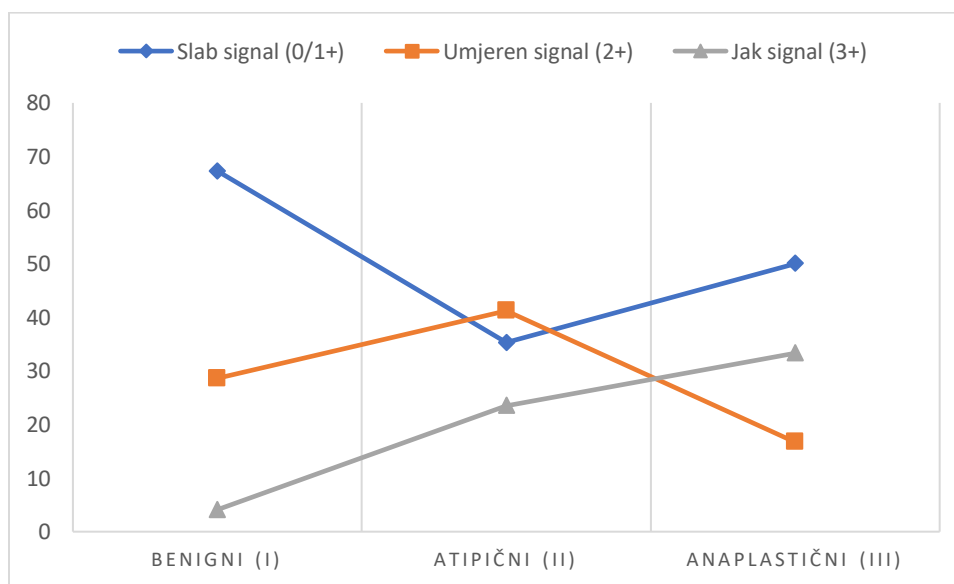
**Slika 20.** Primjer rezultata imunohistokemijskog bojanja meningeoma na N-kadherin pri povećanju od 20x. A) uzorak sa slabim intenzitetom bojanja i B) uzorak s jakim intenzitetom bojanja.

### 5.2.3. Ekspresija ukupnog proteina $\beta$ -katenina u intrakranijalnim meningeomima

Ukupni protein  $\beta$ -katenin koji sadrži fosforilirani i nefosforilirani oblik  $\beta$ -katenina je bio prisutan različitom jačinom u svim uzorcima intrakranijalnih meningeoma. Njegova ekspresija je bila vezana uz citoplazmu i membrane te nije zabilježena u jezgrama. Srednja vrijednost rezultata dobivenih H-zbrojem je iznosila 91,50. Najčešće je zabilježen slab signal (58,3%), a jak signal proteinske ekspresije je zabilježen u 8 uzoraka (11,1%). Podjela rezultata H-zbroja u tri kategorije jačine signala s obzirom na graduse je prikazana u Tablici 17. i na Slici 21.

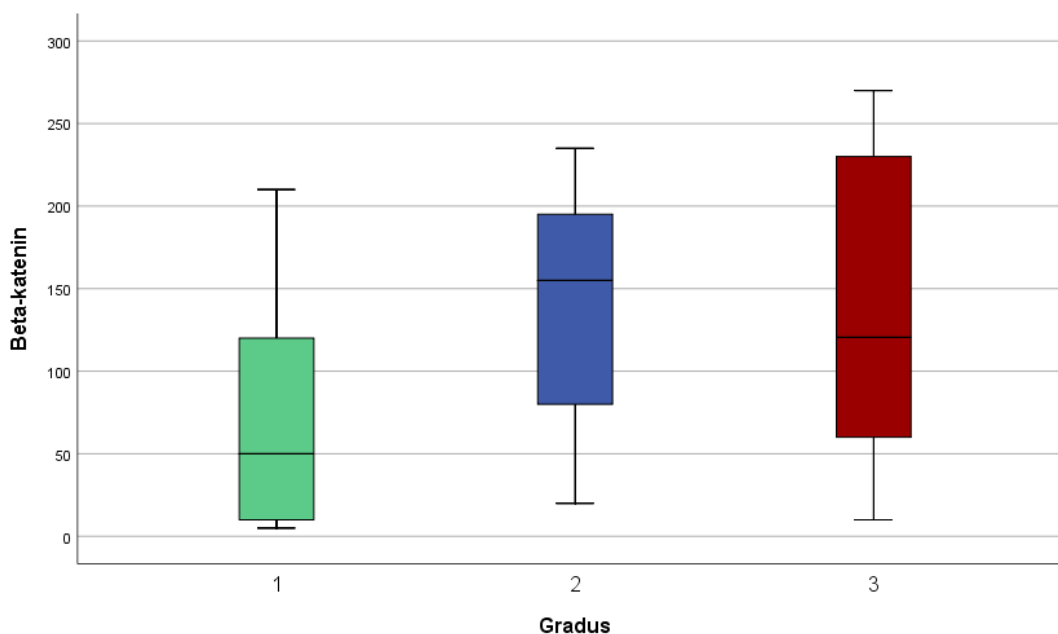
**Tablica 17.** Prikaz broja (postotka) uzoraka u pojedinoj kategoriji jačine signala ukupnog  $\beta$ -katenina u različitim gradusima meningeoma.

	Benigni (I)	Atipični (II)	Anaplastični (III)	Ukupno
	(N=49)	(N=17)	(N=6)	(N=72)
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<b><math>\beta</math>-katenin</b>				
<b>Slab signal (0/1+)</b>	33 (67,3)	6 (35,3)	3 (50,0)	42 (58,3)
<b>Umjeren signal (2+)</b>	14 (28,6)	7 (41,2)	1 (16,7)	22 (30,6)
<b>Jak signal (3+)</b>	2 (4,1)	4 (23,5)	2 (33,3)	8 (11,1)

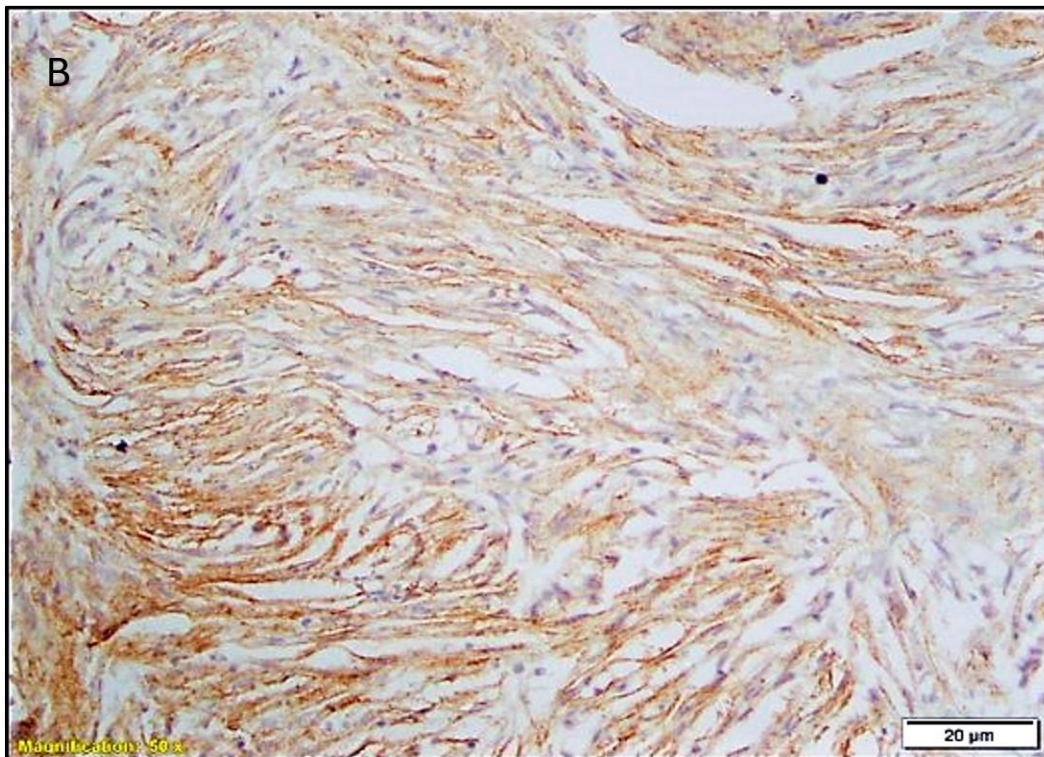
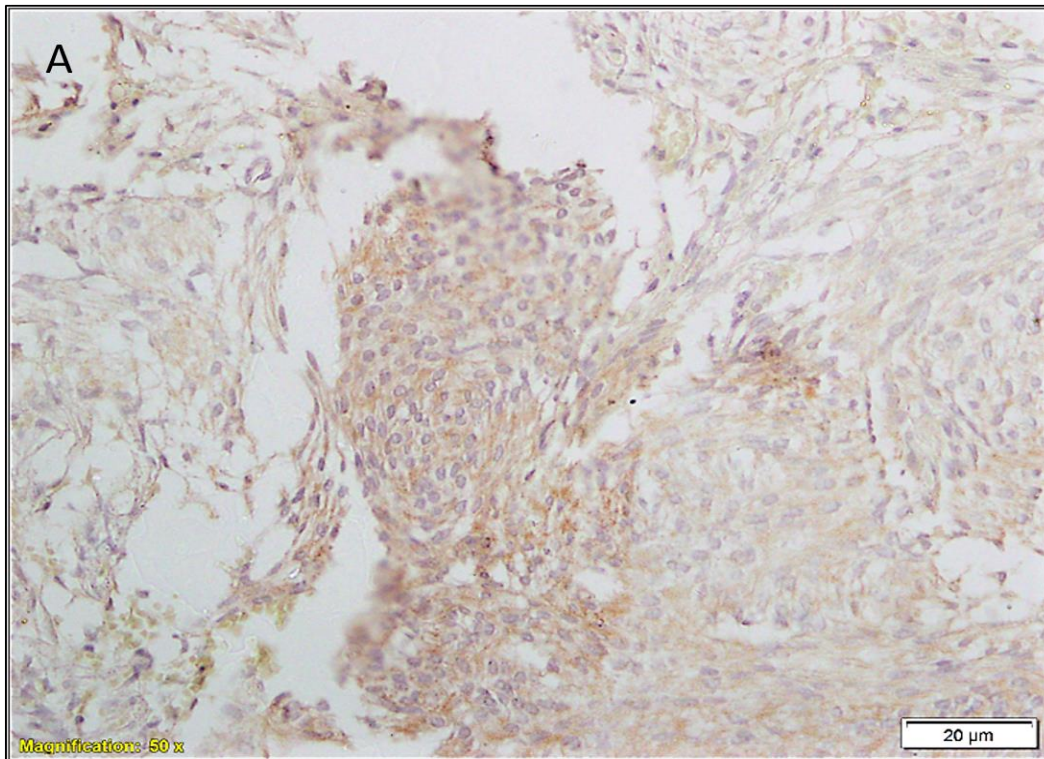


**Slika 21.** Prikaz udjela uzoraka u pojedinoj kategoriji jačine signala ukupnog  $\beta$ -katenina u različitim gradusima meningeoma.

Uporabom analize varijance uz Bonferronijev i Scheffeov post-hoc postupak dobivena je statistički značajna razlika proteinske ekspresije ukupnog  $\beta$ -katenina u različitim gradusima ( $F=7,289$ ,  $p=0,001$ ) (Slika 22). Tu značajnost je potvrdio i neparametrijski test Kruskal-Wallis ( $H=12,248$ ,  $df=2$ ,  $p=0,002$ ). Post-hoc analiza je pokazala da gradusi II i III imaju gotovo dva puta veću srednju vrijednost H-zbroja od gradusa I, ali se viši gradusi međusobno ne razlikuju u ekspresiji ukupnog  $\beta$ -katenina. Napomena: testovi su ustvrdili statistički značajnu razliku u ekspresiji gradusa I i gradusa II, dok je detaljnijom analizom utvrđena značajna razlika i između gradusa I i III koja nije zabilježena testovima zbog manjeg broja uzoraka anaplastičnih meningeoma ( $N=6$ ). Statistički značajna korelacija između ekspresije proteina i spola i dobi nije zabilježena ( $p=0,634$  i  $p=0,492$ ). Nadalje, proteinska ekspresija ukupnog  $\beta$ -katenina nije pokazivala statističku povezanost ni s genetskim promjenama na E- ( $p=0,965$ ) i N-kadherinu ( $p=0,780$ ) niti s mutacijama gena *CTNNB1* ( $p=0,545$ ).



**Slika 22.** Razina ekspresije ukupnog  $\beta$ -katenina dobivena analizom H-zbroj u meningeomima različitih gradusa.



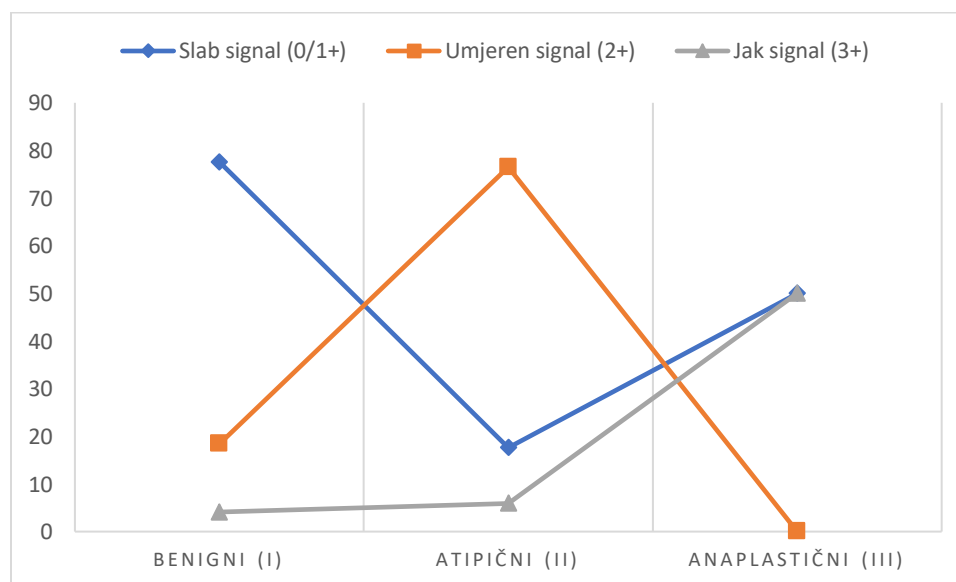
**Slika 23.** Prikaz rezultata imunohistokemijskog bojanja meningeoma na ukupan  $\beta$ -katenin pri povećanju od 50x. A) uzorak sa slabim i umjerenim intenzitetom bojanja i B) uzorak s umjerenim i jakim intenzitetom bojanja.

### 5.2.4. Ekspresija proteina nefosforiliranog $\beta$ -katenina u intrakranijalnim meningeomima

Proteinska ekspresija nefosforiliranog, odnosno aktivnog oblika  $\beta$ -katenina je zabilježena u većini uzoraka intrakranijalnih meningeoma te je bila vezana uz citoplazmu i membrane u stanici, dok se u jezgrama nije pokazala. Srednja vrijednost rezultata ekspresija dobivenih H-zbrojem je iznosila 85,43. Najveći broj uzoraka je imao slabu ekspresiju (61,1%). U 3 uzorka (4,6%) nije zabilježen signal. Jak signal je također zabilježen u maloj frekvenciji, odnosno u 6 uzorka (8,3%). Tablica 18. i Slika 24. prikazuju podjelu rezultata H-zbroja u tri kategorije jačine signala s obzirom na graduse.

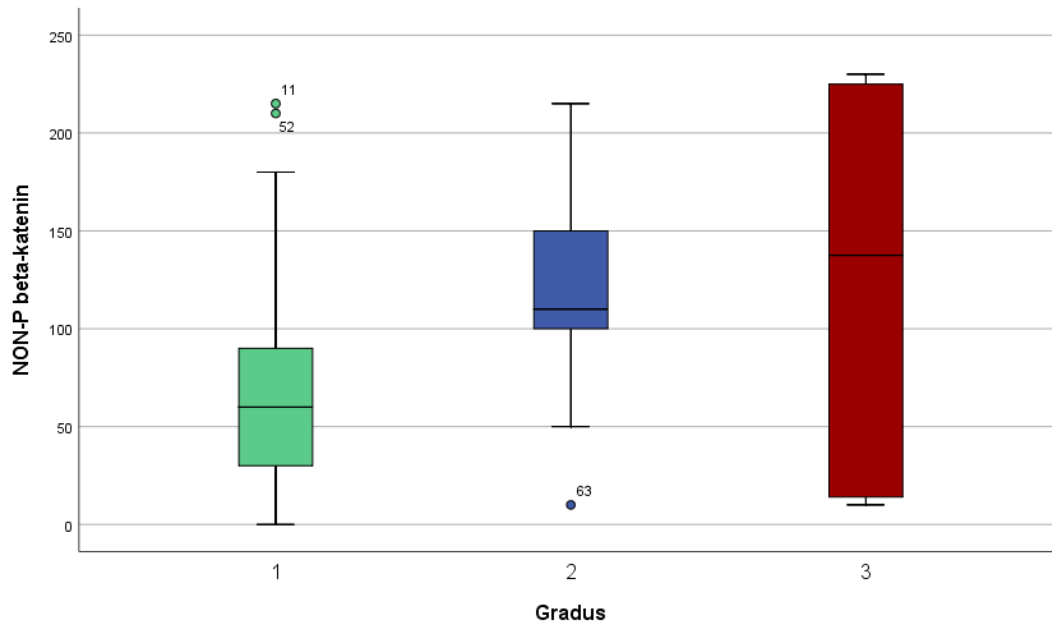
**Tablica 18.** Prikaz broja (postotka) uzoraka u pojedinoj kategoriji jačine signala nefosforiliranog  $\beta$ -katenina (NON-P  $\beta$ -katenina) u različitim gradusima meningeoma.

	Benigni (I) (N=49) N (%)	Atipični (II) (N=17) N (%)	Anaplastični (III) (N=6) N (%)	Ukupno (N=72) N (%)
<b>NON-P <math>\beta</math>-katenin</b>				
<b>Slab signal (0/1+)</b>	38 (77,6)	3 (17,6)	3 (50,0)	44 (61,1)
<b>Umjeren signal (2+)</b>	9 (18,4)	13 (76,5)	0 (0)	22 (30,6)
<b>Jak signal (3+)</b>	2 (4,1)	1 (5,9)	3 (50,0)	6 (8,3)



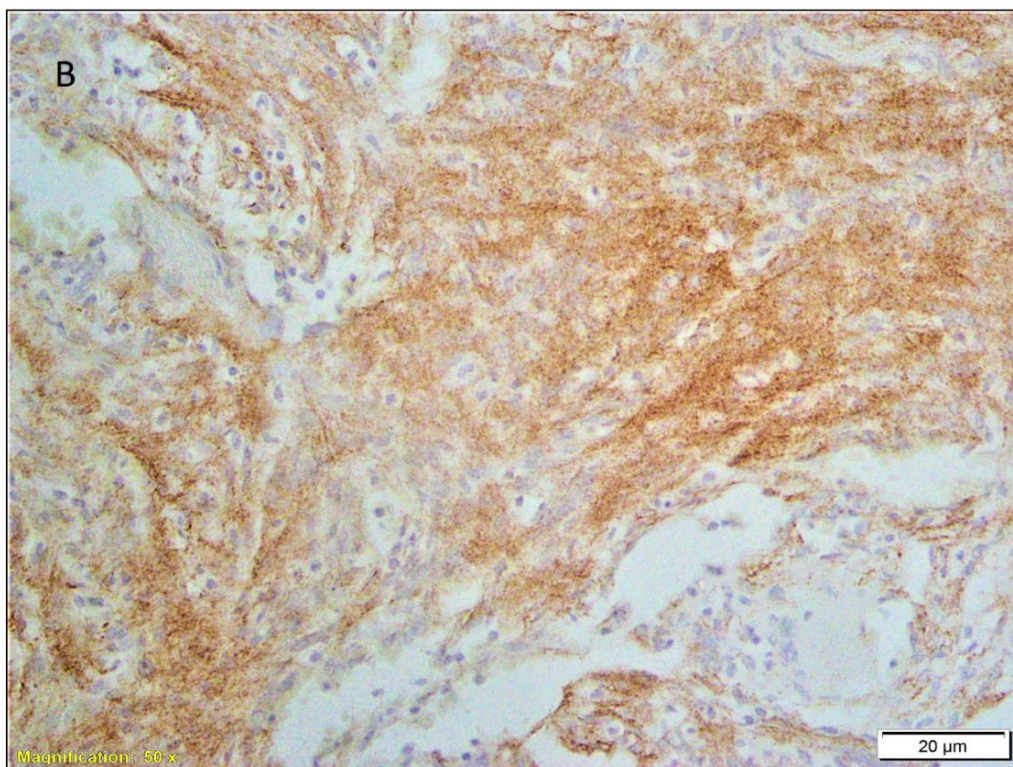
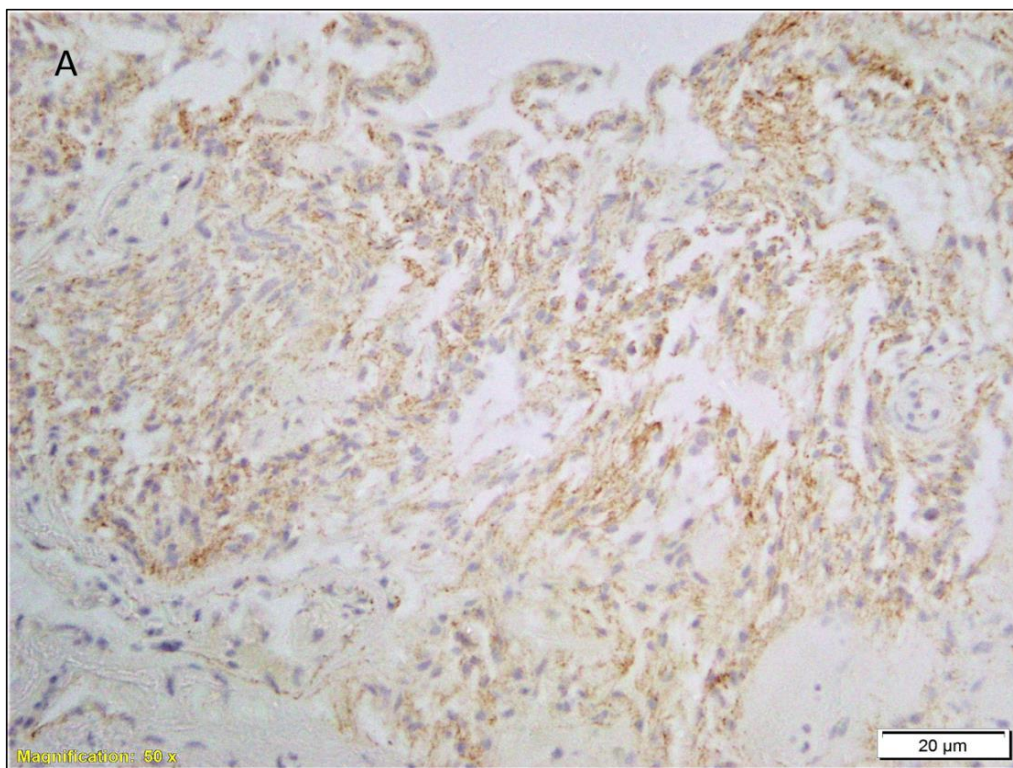
**Slika 24.** Prikaz udjela uzoraka u pojedinoj kategoriji jačine signala nefosforiliranog  $\beta$ -katenina u različitim gradusima meningeoma.

Uporabom analize varijance uz Bonferronijev i Scheffeov post-hoc postupak testirana je razlika proteinske ekspresije nefosforiliranog  $\beta$ -katenina u različitim gradusima koja se pokazala statistički značajnom ( $F=5,932$ ,  $p=0,004$ ) te je ponovno potvrđena testom Kruskal-Wallis ( $H=12,021$ ,  $df=2$ ,  $p=0,002$ ) (Slika 25). Kao i u slučaju ekspresije  $\beta$ -katenina, post-hoc analiza je pokazala da gradusi II i III imaju gotovo dva puta veću srednju vrijednost H-zbroja od gradusa I, dok se viši gradusi međusobno ne razlikuju u ekspresiji nefosforiliranog  $\beta$ -katenina. Isto tako, ni u slučaju s nefosforiliranim  $\beta$ -kateninom, njegova ekspresija nije pokazala statistički značajnu povezanost sa spolom ( $p=0,907$ ), dobi ( $p=0,419$ ) ili genetskim promjenama *CDH1* ( $p=0,102$ ), *CDH2* ( $p=0,648$ ) i *CTNNB1* ( $p=0,422$ ).



**Slika 25.** Razina ekspresije nefosforiliranog oblika  $\beta$ -katenina dobivena analizom H-zbroj u meningeomima različitih gradusa. Točke 11, 52 i 63 predstavljaju uzorke T45, T328 i T455 sa stršećom vrijednosti (engl. *outlier*).





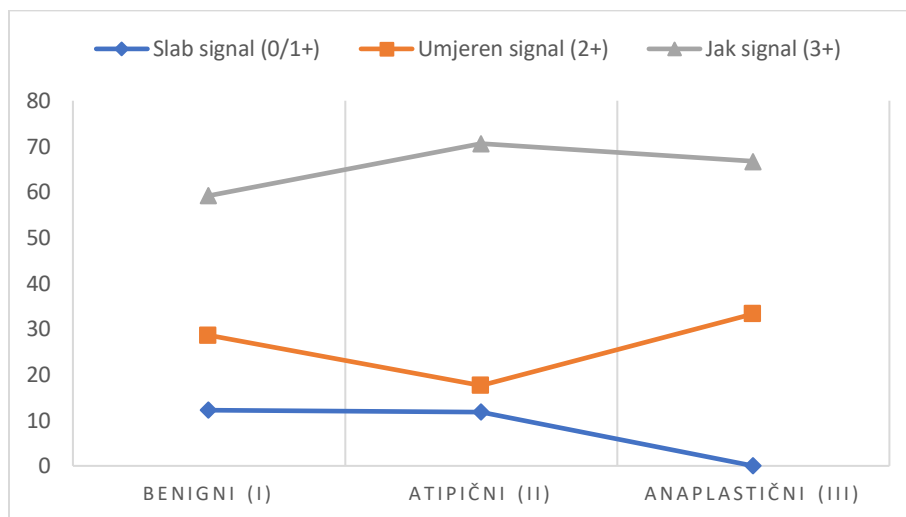
**Slika 26.** Prikaz rezultata imunohistokemijskog bojanja meningeoma na nefosforilirani oblik  $\beta$ -katenina pri povećanju od 50x. A) uzorak sa slabim i umjerenim intenzitetom bojanja i B) uzorak s umjerenim i jakim intenzitetom bojanja.

### 5.2.5. Ekspresija proteina TWIST1 u intrakranijalnim meningeomima

Ekspresija proteina TWIST1 je bila isključivo prisutna u staničnim jezgrama. Proteinska ekspresija se pokazala izrazito jakom sa srednjom vrijednosti rezultata dobivenih H-zbrojem koja je iznosila 200,56. Jak signal je zabilježen u većini ili 45 uzoraka (62,5%), dok je samo 8 uzoraka imalo slab signal (11,1%). Rezultati H-zbroja podijeljeni u tri kategorije jačine signala s obzirom na graduse prikazani su u Tablici 19. te na Slici 27.

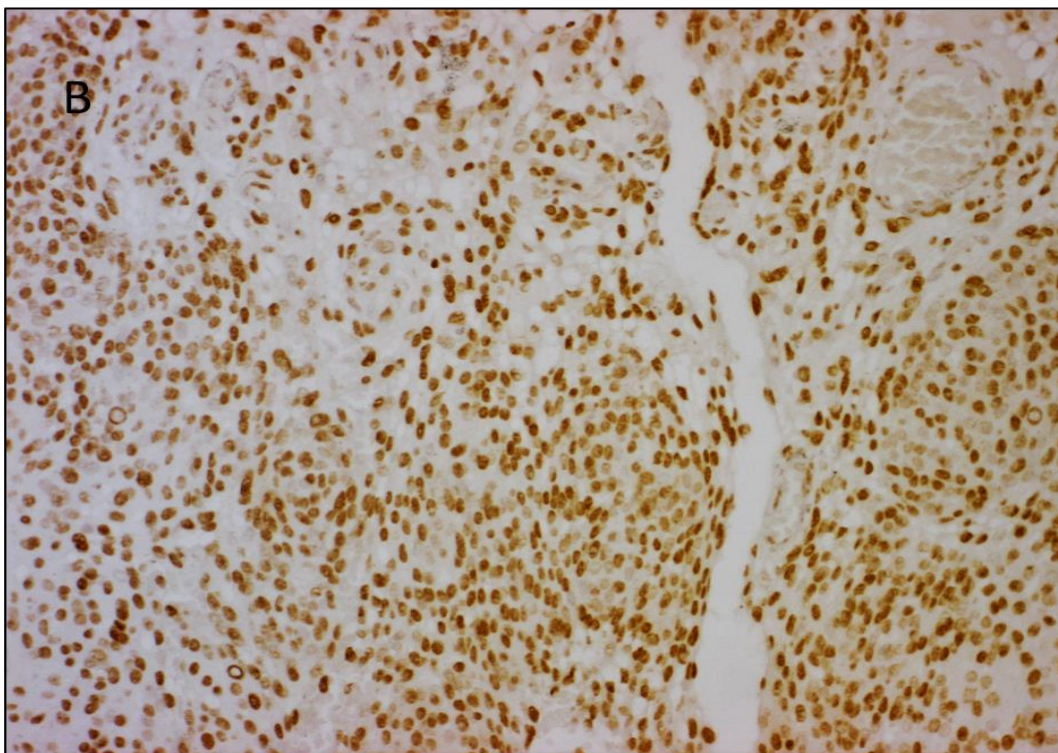
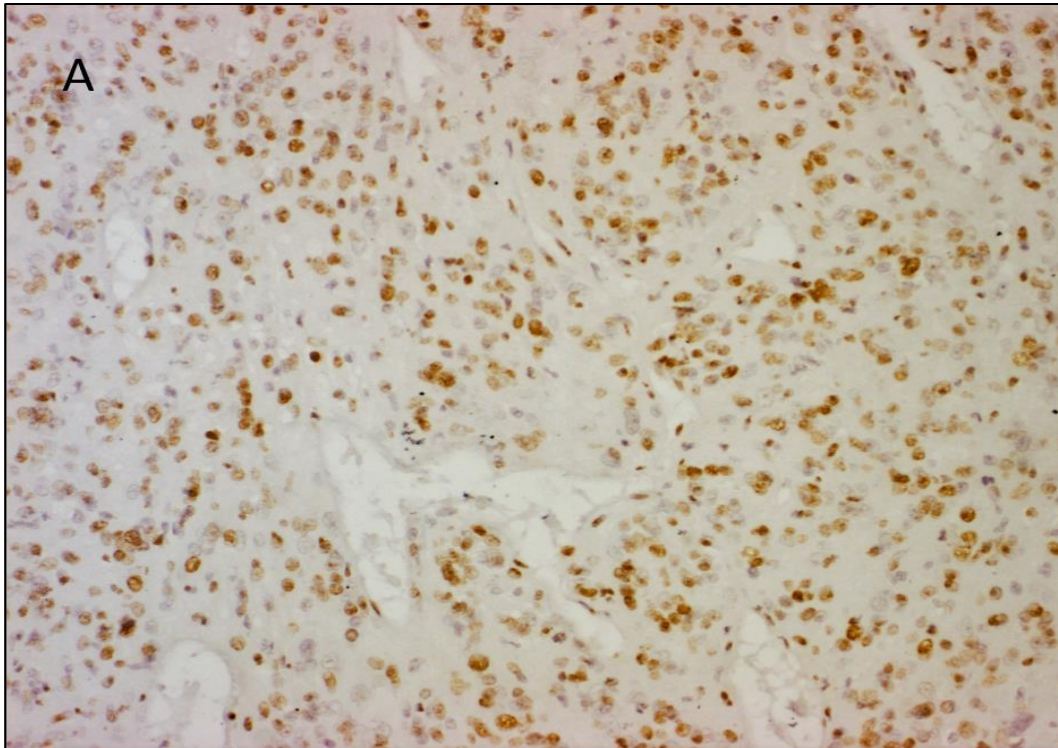
**Tablica 19.** Prikaz broja (postotka) uzoraka u pojedinoj kategoriji jačine signala TWIST1 proteina u različitim gradusima meningeoma.

	Benigni (I) (N=49)	Atipični (II) (N=17)	Anaplastični (III) (N=6)	Ukupno (N=72)
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<b>TWIST1</b>				
<b>Slab signal (0/1+)</b>	6 (12,2)	2 (11,8)	0 (0)	8 (11,1)
<b>Umjeren signal (2+)</b>	14 (28,6)	3 (17,6)	2 (33,3)	19 (26,4)
<b>Jak signal (3+)</b>	29 (59,2)	12 (70,6)	4 (66,7)	45 (62,5)



**Slika 27.** Prikaz udjela uzoraka u pojedinoj kategoriji jačine signala TWIST1 u različitim gradusima meningeoma.

Ekspresija proteina TWIST1 nije pokazala statistički značajnu povezanost s gradusom ( $p=0,484$ ), spolom ( $p=0,957$ ), dobi ( $p=0,249$ ) ili genetskim promjenama na E- ( $p=0,772$ ), N-kadherinu ( $p=0,919$ ) i  $\beta$ -kateninu ( $p=0,146$ ).



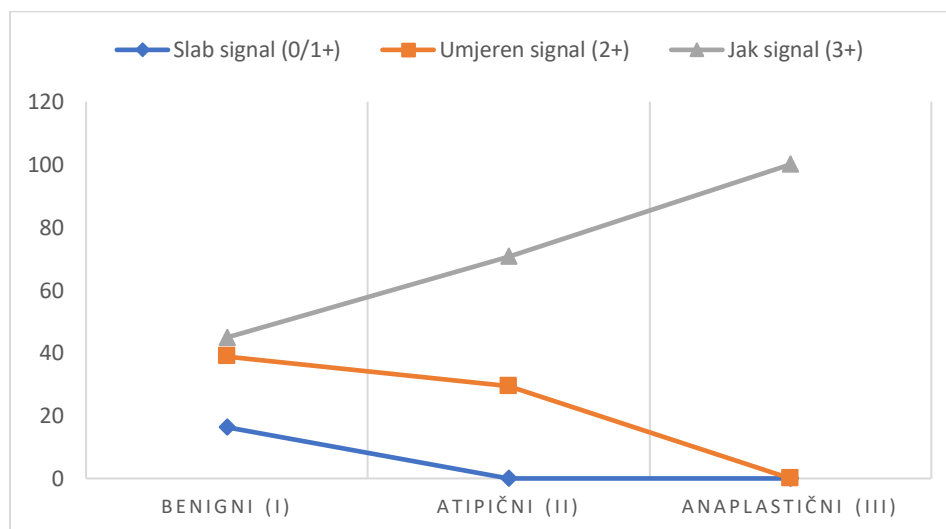
**Slika 28.** Prikaz rezultata imunohistokemijskog bojanja meningeoma na TWIST1 pri povećanju od 20x. A) uzorak s nebojanim i obojanim jezgrama, B) uzorak s umjerenim i jakim intenzitetom bojanja jezgri.

### 5.2.6. Ekspresija proteina SNAIL i SLUG u intrakranijalnim meningeomima

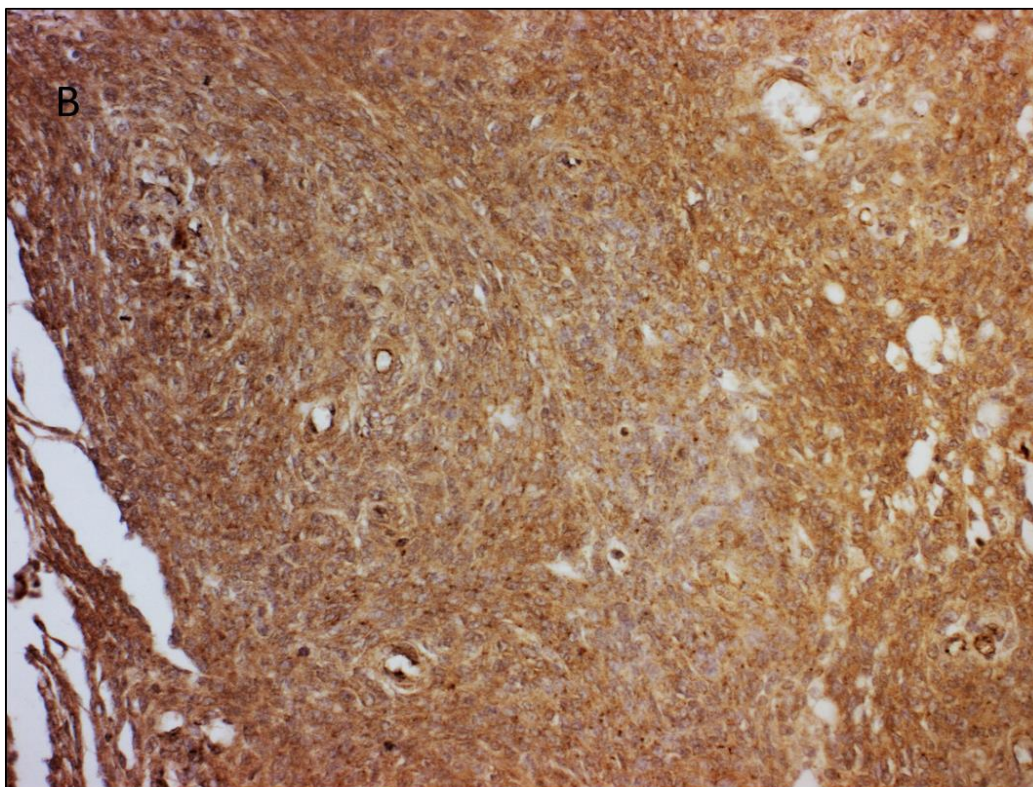
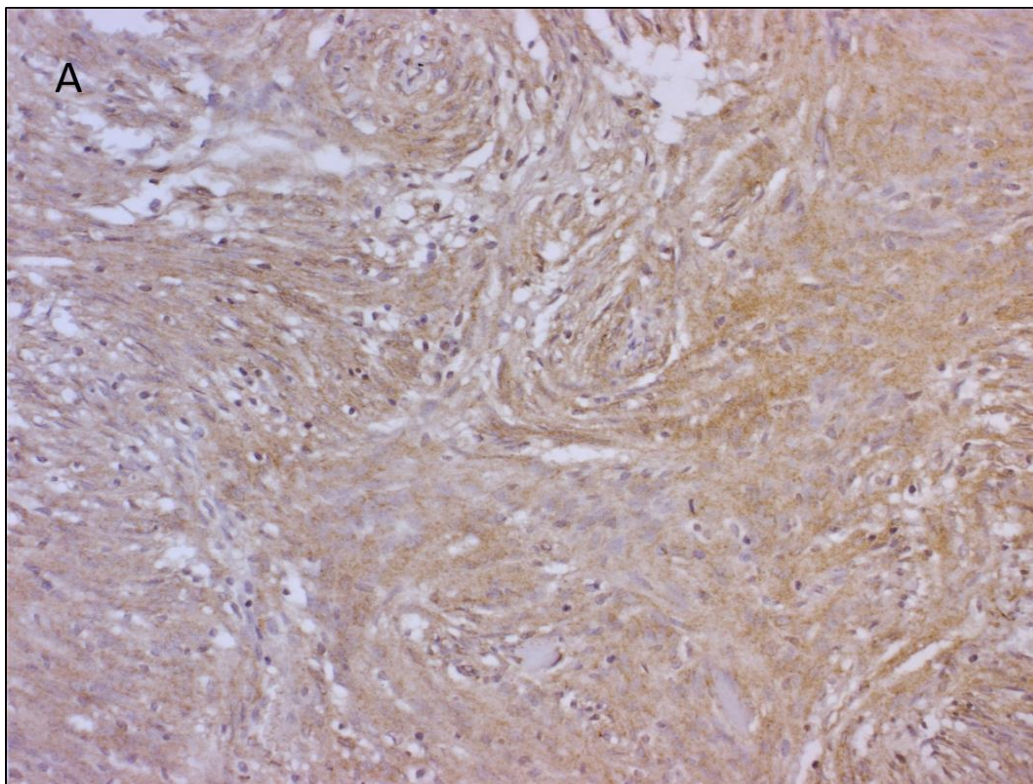
Signal proteinske ekspresije je u ovom slučaju obuhvaćao dva proteina sličnih transkripcijskih funkcija – SNAIL i SLUG. Imunohistokemijskom analizom je precizirano da je njihova ekspresija najčešće bila zabilježena u citoplazmi, a u nekim uzorcima i u jezgri. Sama ekspresija proteinskog signala u citoplazmi je bila vrlo jaka sa srednjom vrijednošću rezultata H-zbroja 190,00. U svim uzorcima je zabilježen signal. Svega 8 uzoraka (11,1%) je pokazivalo slabi signal u citoplazmi te su svi uzorci sa slabim signalom pripadali gradusu I. Isto tako svi meningeomi klasificirani kao gradus III su pokazivali jaki signal. U ukupnom uzorku, najčešće je zabilježen jak signal koji se pojavio u 40 uzoraka (55,6%). Rezultati H-zbroja citoplazmatskog imunopozitiviteta podijeljeni u tri kategorije jačine signala s obzirom na graduse prikazani su u Tablici 20. i na Slici 29.

**Tablica 20.** Prikaz broja (postotka) uzoraka u pojedinoj kategoriji jačine signala citoplazmatskog SNAIL i SLUG u različitim gradusima meningeoma.

	Benigni (I) (N=49)	Atipični (II) (N=17)	Anaplastični (III) (N=6)	Ukupno (N=72)
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<b>SNAIL i SLUG (citoplazma)</b>				
<b>Slab signal (0/1+)</b>	8 (16,3)	0 (0)	0 (0)	8 (11,1)
<b>Umjeren signal (2+)</b>	19 (38,8)	5 (29,4)	0 (0)	24 (33,3)
<b>Jak signal (3+)</b>	22 (44,9)	12 (70,6)	6 (100,0)	40 (55,5)



**Slika 29.** Prikaz udjela uzoraka u pojedinoj kategoriji jačine signala citoplazmatskog SNAIL i SLUG u različitim gradusima meningeoma.

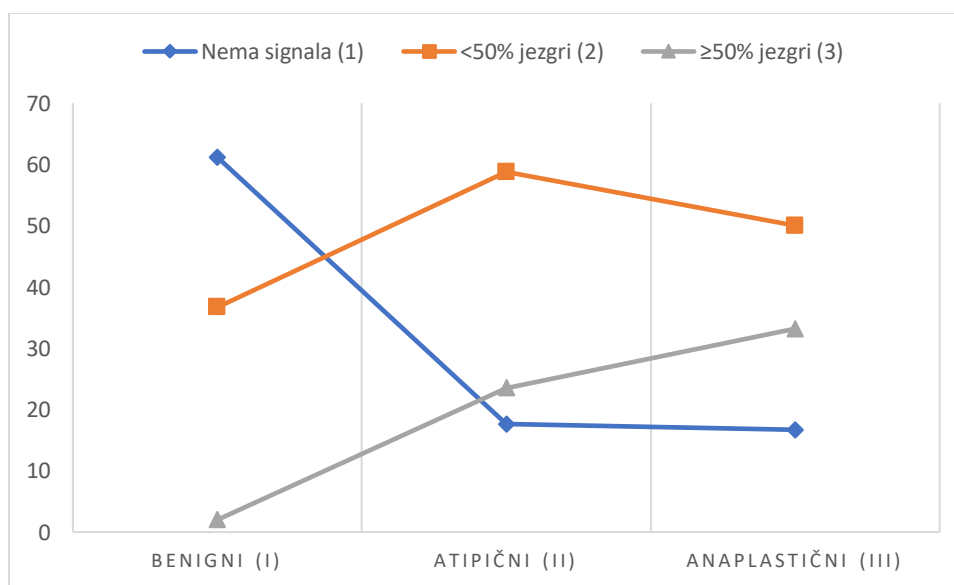


**Slika 30.** Prikaz rezultata imunohistokemijskog bojanja meningeoma na SNAIL i SLUG pri povećanju od 20x. A) uzorak s umjerenim intenzitetom bojanja i B) uzorak s jakim intenzitetom bojanja.

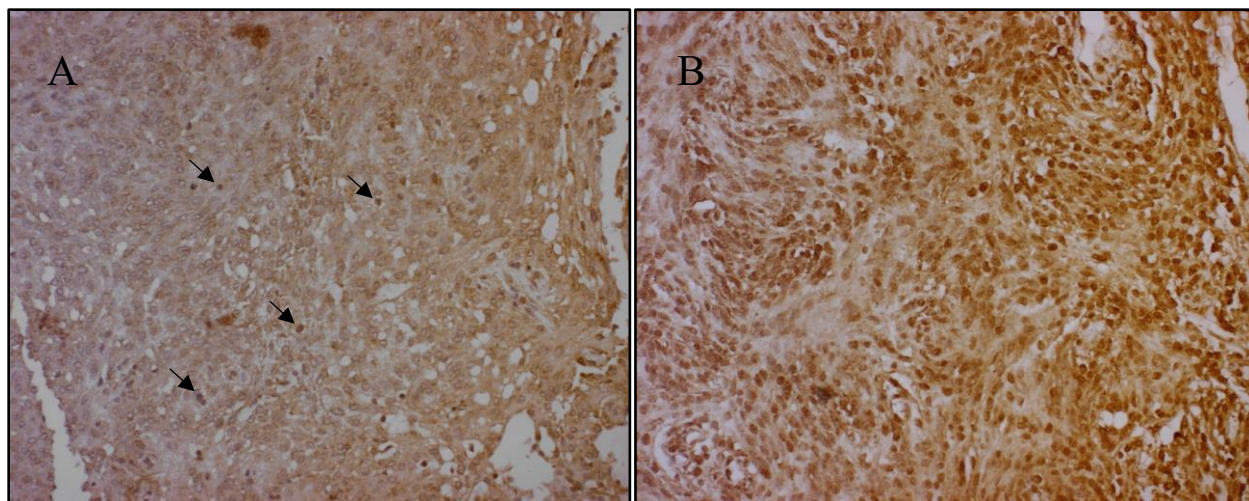
Ekspresija proteina SNAIL i SLUG u jezgrama je klasificirana u tri kategorije: 1 = nema signala u jezgrama, 2 = signal u jezgrama postoji te je zastupljen u <50% jezgara u vidnom polju i 3 = signal u jezgrama je zastupljen u  $\geq 50\%$  jezgara u vidnom polju. Velik broj uzoraka nije pokazivao ekspresiju proteina u jezgri (34 uzoraka ili 47,2%), ipak uzorci u kojima je zabilježeno više od 50% jezgara s ekspresijom su najvećim udjelom bili atipični i anaplastični meningeomi (6 od 7 uzoraka). U prilog tome ide i statistička analiza pomoću hi-kvadrat testa  $\chi^2$  i Cramerovog V koeficijenta koja je pokazala da povećana ekspresija SNAIL i SLUG u citoplazmi je povezana s njihovom povećanom ekspresijom u jezgrama ( $\chi^2=17,795$ ,  $df=4$ ,  $p=0,001$  i  $\phi_c=0,352$ ;  $p=0,001$ ). Rezultati jezgrene ekspresije proteina podijeljeni u tri kategorije jačine signala s obzirom na graduse prikazani su u Tablici 21. i na Slici 31.

**Tablica 21.** Prikaz broja (postotka) uzoraka u pojedinoj kategoriji jačine signala jezgrenog SNAIL i SLUG u različitim gradusima meningeoma.

	Benigni (I)	Atipični (II)	Anaplastični (III)	Ukupno
	(N=49)	(N=17)	(N=6)	(N=72)
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<b>SNAIL i SLUG (jezgre)</b>				
<b>Nema signala (1)</b>	30 (61,2)	3 (17,6)	1 (16,7)	34 (47,2)
<b>&lt;50% jezgri (2)</b>	18 (36,7)	10 (58,8)	3 (50,0)	31 (43,1)
<b><math>\geq 50\%</math> jezgri (3)</b>	1 (2,0)	4 (23,5)	2 (33,2)	7 (9,7)



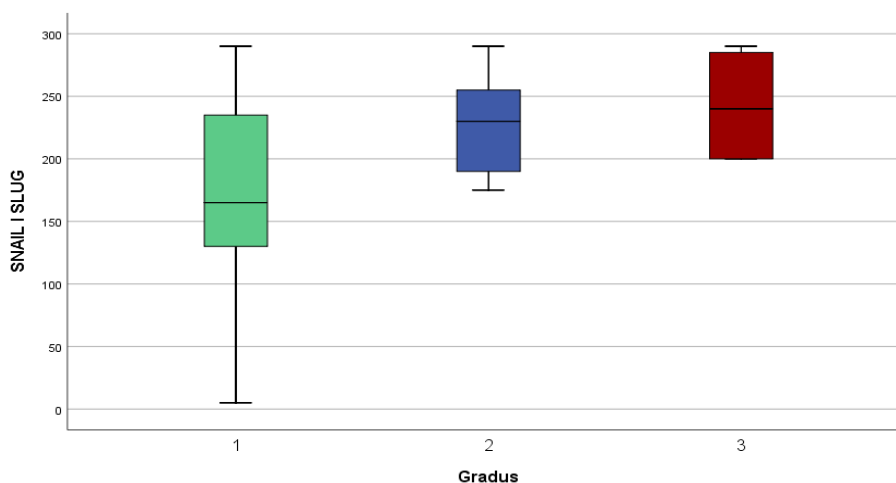
**Slika 31.** Prikaz udjela uzoraka u pojedinoj kategoriji jačine signala jezgrenog SNAIL i SLUG u različitim gradusima meningeoma.



**Slika 32.** Prikaz rezultata imunohistokemijskog bojanja meningeoma na SNAIL i SLUG pri povećanju od 20x. A) uzorak sa slabim intenzitetom bojanja jezgara (<50% jezgri) i B) uzorak s jakim intenzitetom bojanja jezgri ( $\geq 50\%$  jezgri).

Analiza varijance je pokazala da postoji statistički značajna razlika ekspresije proteina SNAIL i SLUG u različitim gradusima ( $F=7,380$ ,  $p=0,001$ ) koja je potvrđena i pomoću testa Kruskal-Wallis ( $H=12,310$ ,  $df=2$ ,  $p=0,002$ ) (Slika 33). Post-hoc analiza je utvrdila da postoji značajna razlika u srednjoj vrijednosti H-zbroja gradusa I i gradusa II te gradusa I i gradusa III gdje je povećanje gradusa pratila i povećana ekspresija proteina. Citoplazmatska ekspresija proteina SNAIL i SLUG nije pokazala statistički značajnu povezanost spolom ( $p=0,510$ ), dobi ( $p=0,399$ ) ili proučavanim genetskim promjenama ( $CDH1$   $p=0,781$ ;  $CDH2$   $p=0,503$ ). Iako prethodne analize navode na zaključak da se proteinska ekspresija u jezgrama povećava s gradusom, odnosno da postoji statistički značajna povezanost, ona je potvrđena i statističkim testovima ( $\chi^2=17,621$ ,  $df=4$ ,  $p=0,001$  i  $\phi_c=0,350$ ;  $p=0,001$ ). Statistički značajna povezanost je zabilježena i kod ekspresije proteina SNAIL i SLUG u jezgri s pojavnošću genetskih promjena na  $CDH1$  genu zabilježenih mikrosatelitnim biljekom D16S3025 ( $\chi^2=16,573$ ,  $df=2$ ,  $p=0,000$  i  $\phi_c=0,505$ ;  $p=0,000$ ). Odnosno, uzorci na kojima nisu zabilježene mutacije značajno češće nisu imali ekspresiju proteina u jezgri ili je ona bila u manje od 50% jezgara, dok uzorci s mutacijama na  $CDH1$  genu su značajno češće pokazivali ekspresiju proteina u više od 50% jezgri. Proteinska ekspresija SNAIL i SLUG u jezgrama je pokazala i statistički značajnu povezanost s pojavnošću genetskih promjena zbirne analize oba mikrosatelitna biljega za  $CDH1$  gen ( $p=0,001$ ) te s genetskim promjenama zabilježenim mikrosatelitnim biljezima za  $CDH2$  gen (D18S66,  $p=0,002$

ili D18S819,  $p=0,005$ ). Međutim, detaljnija analiza nije pokazala navedene statističke povezanosti proteinske ekspresije SNAIL i SLUG u jezgrama s genetskim promjenama zabilježenim zbirnom analizom oba markera za gen *CDH1* ili s genetskim promjenama gena *CDH2* zabilježenim markerom D18S66 ili D18S819. Povezanost ekspresije SNAIL i SLUG s prisutnošću mutacija gena *CTNNB1* nije se pokazala statistički značajnom ( $p=0,143$ ).



**Slika 33.** Razina ekspresije SNAIL i SLUG dobivena analizom H-zbroj u meningeomima različitih gradusa.

### 5.2.7. Usporedba rezultata imunohistokemijskih analiza proteinskih ekspresija

Proteinske ekspresije su uspoređene kako bi se dobio uvid u njihove međusobne odnose. Rezultati dobiveni analizom H-zbroj proteinske ekspresije E-kadherina, N-kadherina, obiju formi  $\beta$ -katenina, TWIST1, SNAIL i SLUG su prikazane u Prilogu 3. Međusobnom usporedbom proteinskih ekspresija utvrđeno je devet statistički značajnih povezanosti prikazanih u Tablici 22. Proteinske ekspresije koje su se pokazale statistički značajno povezanima su uključivale sljedeće parove: E-kadherin i  $\beta$ -katenin ( $p=0,001$ ), E-kadherin i nefosforilirani oblik  $\beta$ -katenina ( $p=0,037$ ), N-kadherin i  $\beta$ -katenin ( $p=0,009$ ), N-kadherin i nefosforilirani oblik  $\beta$ -katenina ( $p=0,018$ ),  $\beta$ -katenin i nefosforilirani oblik  $\beta$ -katenina ( $p=0,000$ ),  $\beta$ -katenin i TWIST1 ( $p=0,033$ ), nefosforilirani oblik  $\beta$ -katenina i SNAIL i SLUG ( $p=0,017$ ), nefosforilirani oblik  $\beta$ -katenina i TWIST1 ( $p=0,048$ ), TWIST1 i SNAIL i SLUG ( $p=0,033$ ). Kod svih parova korelacija je bila pozitivna.



**Tablica 22.** Rezultati korelacija proteinskih ekspresija E-kadherina, N-kadherina,  $\beta$ -katenina, nefosforiliranog  $\beta$ -katenina (NON-P  $\beta$ -katenin), TWIST1 te SNAIL i SLUG. Parovi koji su pokazali statistički značajnu povezanost su: E-kadherin i  $\beta$ -katenin ( $p=0,001$ ), E-kadherin i nefosforilirani oblik  $\beta$ -katenina ( $p=0,037$ ), N-kadherin i  $\beta$ -katenin ( $p=0,009$ ), N-kadherin i nefosforilirani oblik  $\beta$ -katenina ( $p=0,018$ ),  $\beta$ -katenin i nefosforilirani oblik  $\beta$ -katenina ( $p=0,000$ ),  $\beta$ -katenin i TWIST1 ( $p=0,033$ ), nefosforilirani oblik  $\beta$ -katenina i SNAIL i SLUG ( $p=0,017$ ), nefosforilirani oblik  $\beta$ -katenina i TWIST1 ( $p=0,048$ ), TWIST1 i SNAIL i SLUG ( $p=0,033$ ). Kod svih parova korelacija je bila pozitivna, odnosno povećanje ekspresije jednog proteina je pratilo i povećanje ekspresije drugog proteina.

		E-kadherin	N-kadherin	NON-P $\beta$ -katenin	$\beta$ -katenin	SNAIL i SLUG	TWIST1
E-kadherin	Pearsonova korelacija	1	0,140	0,247*	0,373**	0,227	0,005
	Značajnost (dvosmjerna)		0,240	<b>0,037</b>	<b>0,001</b>	0,056	0,970
	N	72	72	72	72	72	72
N-kadherin	Pearsonova korelacija	0,140	1	0,277*	0,305**	-0,008	-0,035
	Značajnost (dvosmjerna)	0,240		<b>0,018</b>	<b>0,009</b>	0,948	0,769
	N	72	72	72	72	72	72
NON-P $\beta$ -katenin	Pearsonova korelacija	0,247*	0,277*	1	0,628**	0,279*	0,233*
	Značajnost (dvosmjerna)	<b>0,037</b>	<b>0,018</b>		<b>0,000</b>	<b>0,017</b>	<b>0,048</b>
	N	72	72	72	72	72	72
$\beta$ -katenin	Pearsonova korelacija	0,373**	0,305**	0,628**	1	0,204	0,252*
	Značajnost (dvosmjerna)	<b>0,001</b>	<b>0,009</b>	<b>0,000</b>		0,086	<b>0,033</b>
	N	72	72	72	72	72	72
SNAIL i SLUG	Pearsonova korelacija	0,227	-0,008	0,279*	0,204	1	0,251*
	Značajnost (dvosmjerna)	0,056	0,948	<b>0,017</b>	0,086		<b>0,033</b>
	N	72	72	72	72	72	72
TWIST1	Pearsonova korelacija	0,005	-0,035	0,233*	0,252*	0,251*	1
	Značajnost (dvosmjerna)	0,970	0,769	<b>0,048</b>	<b>0,033</b>	<b>0,033</b>	
	N	72	72	72	72	72	72

\*. Korelacija je značajna na razini 0.05 (dvosmjerna).

\*\*.. Korelacija je značajna na razini 0.01 (dvosmjerna).

## 6. RASPRAVA

### 6.1. Uloga E- i N-kadherina u intrakranijalnim meningeomima

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da oba istraživana kadherina imaju vrlo visoku frekvenciju genetskih promjena sugerirajući ulogu njihovih gena u procesu nastanka i napredovanja intrakranijalnih meningeoma.

Gen *CDHI* (E-kadherin) je proučavan pomoću dva mikrosatelitna biljega koja su pokazala visok stupanj heterozigotnosti (D16S752 95,8% i D16S3025 90,3%). U cjelokupnom uzorku u kojeg ulaze samo informativni slučajevi (heterozigoti) markerom D16S752 zabilježeno je 16 uzoraka s mikrosatelitnom nestabilnošću (22,2%) i 7 uzoraka s gubitkom heterozigotnosti (10,1%), dok je markerom D16S3025 utvrđena mikrosatelitna nestabilnost u 6 uzoraka (8,3%), gubitak heterozigotnosti u 5 uzoraka (7,7%), a čak 2 uzorka (3,1%) viših gradusa su pokazali obje vrste genetskih promjena. Zbirna analiza obaju markera za *CDHI* je pokazala da su svi uzorci informativni u barem jednom od markera dovodeći do sljedećih rezultata: mikrosatelitna nestabilnost je zabilježena u 19,4% (14 uzoraka), gubitak heterozigotnosti u 12,5% (9 uzoraka), a 2 su uzorka (2,8%) pokazala obje genetske promjene. Statistička analiza nije pokazala povezanost pojavnosti genetskih promjena zbirne analize s određenim gradusom niti pathohistološkim podtipom, međutim njihova pojavnost u 34,7% cjelokupnog uzorka nije zanemariva.

Iz literature je poznat gubitak heterozigotnosti regije 16q22.1 u kojoj se nalazi gen *CDHI* u različitim tipovima tumora poput tumora dojke, endometrija, jajnika i prostate, adenokarcinoma, te različitim karcinomima probavnog sustava (Latil i sur., 1997; Berx i sur., 1998; Sarrio i sur., 2003). Mutiranost ove regije može rezultirati metastaziranjem i/ili igrati ulogu u progresiji. Tako, primjerice, gubitak heterozigotnosti alela *CDHI* dovodi do invazivnosti u tumorima poput neseminoma (Vladušić i sur., 2010). Utjecaj LOH-a na gen *CDHI* je najizraženiji u karcinomima želuca i karcinomima dojki (pogotovo lobularnim tumorima dojki). U lobularnim tumorima dojki čini česti i rani događaj s velikom frekvencijom (73%), rezultirajući inaktivacijom E-kadherina i progresijom tumora (Cleton-Jansen, 2002; Sarrio i sur., 2003; Green i sur., 2009). Žene s *CDHI* mutacijama imaju pojačan rizik obolijevanja od tumora dojke (Schulten i sur., 2017). U karcinomima žučnog mjehura LOH gena *CDHI* također predstavlja rani događaj koji igra ulogu u ubrzavanju mutacija vezanih uz progresiju i patogenezu ovih tumora (Priya i sur., 2010). S druge

strane, LOH ne čini česti događaj u gastroezofagealnim karcinomima ili karcinomima pločastih stanica larinksa (Pećina-Šlaus i sur., 2005; Salem i sur., 2018). Istraživanje gena *CDHI* u različitim tumorima mozga pokazalo je da 14.3% primarnih tumora mozga posjeduje LOH te je ova genetska promjena bila uglavnom vezana uz meningeome (31% uzoraka meningeoma je pokazivao LOH). Meningeomi s LOH-om pripadali su benignoj skupini sugerirajući da treba biti oprezan kod prognoze bolesti, s obzirom da i oni mogu skrivati invazivni potencijal (Nikuševa-Martić i sur., 2007). Slične rezultate su pokazali i Pećina-Šlaus i sur. (2017) koji su pronašli LOH gena *CDHI* u 37.5% meningeoma. Simon i sur. (1996) sugeriraju da LOH ovoga gena doprinosi razvoju malignosti u meningeomima. Ovaj doktorski rad je pokazao nešto manju frekventnost gubitka heterozigotnosti u meningeomima, ali s obzirom da se pojavljuju u benignim uzorcima s laganim porastom frekvencije pojavljivanja u višim gradusima, može se pretpostaviti da LOH gena *CDHI* igra ulogu u progresiji meningeoma.

Mikrosatelitna nestabilnost (MSI) igra važnu ulogu u tumorigenezi te je opisana u mnogim tumorima, prvenstveno kolorektalnim, gastričkim i endometrijskim karcinomima (Wirtz i sur., 1998; Salvesen i sur., 2000). Istraživanja uključenosti MSI u primarnim tumorima mozga donose različite zaključke. Dok neki tvrde da MSI igra važnu ulogu u progresiji tumora mozga, ostali se ne slažu s takvim tvrdnjama (Chen i sur., 2012). Znanstveni rad Alvina i sur. (2000) je pokazao da primarni tumori mozga pripadaju grupi tumora s niskim MSI gdje pogreške u replikaciji DNA i neispravno funkcioniranje sustava za popravak DNA ne igraju ulogu u onkogenezi. Istraživanja MSI u meningeomima također su kontradiktorna. Chen i sur. (2012) tvrde da je MSI rijedak događaj u meningeomima te ne igra ulogu u progresiji dok Pykett i sur. (1994) tvrde da je prema njihovim nalazima MSI uključen u tumorigenezu meningeoma. Pećina-Šlaus i sur. (2016b) su pokazali MSI gena *CDHI* u 11% meningeoma. Uzorci meningeoma istraživani u ovoj disertaciji su češće pokazivali MSI nego LOH. Iako je MSI bio najčešće prisutan u malignom gradu s pojavnošću u 50% uzoraka, zabilježen je i u 22,5% benignih meningeoma. Ovaj nalaz isto sugerira ulogu MSI gena *CDHI* u progresiji meningeoma. Nalazi MSI u genu *CDHI* mogu ukazivati na povećanu nestabilnost genoma koja u ranim fazama tumorigeneze ubrzava proces evolucije tumorskih stanica akumulirajući mutacije (Breivik i Gaudernack, 1999). Moguće objašnjenje za manju frekvenciju MSI u atipičnim meningeomima (11,7% uzoraka) je što takva nestabilnost genoma u ranim fazama tumorigeneze može izazvati proliferaciju stanica, ali i njihovu smrt ako stopa mutacija pređe određeni prag. Budući da neke stanice zadobiju previše oštećenja

nakupljanjem mutacija, ti klonovi odumiru te u daljnju progresiju ulaze samo stanice s manje mutacija i manjom nestabilnošću genoma (Tomlinson i sur., 1996).

U ovom istraživanju promjene gena *CDH2* (N-kadherina) su proučavane pomoću mikrosatelitnih biljega D18S66 i D18S819 koji su bili visoko informativni sa 100%-tnom heterozigotnošću. Analiza markerom D18S66 je zabilježila 27 uzoraka (38,6%) s mikrosatelitnom nestabilnosti, 7 uzoraka (10%) s gubitkom heterozigotnosti i 2 uzorka (2,8%) koji su pretrpjela obje genetske promjene. Marker D18S819 je pokazao 22 uzorka (31,4%) s mikrosatelitnom nestabilnosti, 10 uzoraka (14,3%) s gubitkom heterozigotnosti i čak 6 uzoraka (8,6%) koji su imali obje genetske promjene. Zbirnom analizom dvaju markera za gen *CDH2* utvrđen je značaj broj genetskih promjena. Čak 70% uzoraka je pokazao jednu ili više genetskih promjena od čega 28 uzoraka (40%) mikrosatelitnu nestabilnost, 8 uzoraka (11,4%) gubitak heterozigotnosti te 13 uzoraka (18,6%) obiju vrsta genetskih promjena.

Genetske promjene *CDH2* nisu tako opsežno istraživane u tumorima kao one gena *CDH1*, već je naglasak stavljen na analiziranje razine ekspresije njegovog proteinskog produkta. Ipak, istraživanja kromosomske nestabilnosti u različitim tumorima poput kolorektalnih karcinoma, karcinoma mjehura i karcinoma pločastih stanica glave i vrata su pokazala delecije kromosoma 18q na kojem se nalazi gen za N-kadherin (Brewster i sur., 1994; Frank i sur., 1997; Jones i sur., 1997; Druliner i sur., 2018). Pokazalo se da je LOH kromosoma 18q uključen u tumore s agresivnim ponašanjem i smanjenom stopom preživljenja (Takebayashi i sur., 2004). Još 1994 g. Jen i sur. sugeriraju kako LOH 18q ima prognostičku vrijednost za pacijente oboljele od kolorektalnog karcinoma kod kojih LOH u drugom stadiju kolorektalnog karcinoma pokazuje da njihov tijek bolesti odgovara pacijentima u trećem stadiju karcinoma te da im je potrebna dodatna terapija. Pacijenti drugog stadija bez LOH-a su odgovarali skupini pacijenata prvog stadija i nije im bila potrebna dodatna terapija. Sarli i sur. (2004) smatraju LOH kromosoma 18q genetičkim markerom koji upućuje na pojavu recidiva i stopu preživljenja za pacijente stadija III kolorektalnog karcinoma. Novija istraživanja su pokazala da gubitak regije 18q11.2-q12.1 treba uzeti u obzir prilikom određivanja kemoterapije pacijentima s metastatskim kolorektalnim karcinomom (van Dijk i sur., 2018). LOH kromosoma 18 se pokazao prognostičkim markerom i kod novotvorina gušterače (Fukushige i sur., 1998). Ovaj doktorat je pokazao da je LOH gena *CDH2* bio češći događaj u odnosu na LOH gena *CDH1*. Isto tako, 61,9% uzorka s LOH-om ujedno je sadržavalo i MSI (13/21 uzorka). Iako LOH gena *CDH2* nije bio statistički značajno povezan niti s jednim

gradusom meningeoma, uzorci bilježe lagani porast LOH-a kroz graduse, gdje 4/6 uzoraka (66,7%) gradusa III sadržava gubitak alela. Ova činjenica sugerira da, iako LOH gena *CDH2* može biti prisutan u benignim menigeomima, njegov porast u višim gradusima upućuje na ulogu u progresiji intrakranijalnih meningeoma i u razvoju agresivnog karaktera. Zahvaljujući rezultatima ove disertacije može se spekulirati da benigni meningeomi kod kojih su uočene genetske promjene gena *CDH1* i *CDH2* skrivaju genetski potencijal za kasniju eventualnu progresiju.

Radovi koji govore o kolorektalnim karcinomima pokazuju da se uz gubitak heterozigotnosti kromosoma 18q često veže i mikrosatelitna nestabilnost istog kromosoma koja sugerira bolju prognozu preživljenja pacijenata (Sarli i sur., 2004). Uzorci analizirani u ovom doktoratu također često uz LOH pokazuju i MSI. MSI gena *CDH2* s pojavnosću u 58,6% uzoraka, pokazala se češćim događajem u odnosu na LOH gena *CDH2* (30%) ili u odnosu na MSI gena *CDH1* (22,2%). Genetske promjene MSI gena *CDH2* nisu statistički značajno povezane s određenim gradusom, već se pojavljuju u relativno sličnim frekvencijama kroz sve stupnjeve malignosti doprinoseći nestabilnosti genoma već u ranim fazama razvoja intrakranijalnih meningeoma. Može se pretpostaviti da ovakav konstantan nalaz MSI doprinosi nestabilnosti genoma meningeoma, te je odgovoran za porast akumulacije mutacija što se ogleda u kasnijim fazama bolesti.

Usporedba genetičkih analiza mikrosatelitnim biljezima za gene *CDH1* i *CDH2* otkrila je statistički značajnu povezanost u pojavnosti genetskih promjena između markera D16S725 i D18S66 ( $\varphi_c=0,294$ ; **p=0,016**) ili markera D16S3025 i D18S66 ( $\varphi_c=0,489$ ; **p=0,000**), te u slučajevima kada su oba mikrosatelitna biljega za gen *CDH1* uspoređeni s markerom gena *CDH2* D18S66 ( $\varphi_c=0,307$ ; **p=0,010**) ili oba mikrosatelitna biljega za gen *CDH2* s markerom gena *CDH1* D16S3025 ( $\varphi_c=0,353$ ; **p=0,005**). Odnosno, uzorci intrakranijalnih meningeoma istraživani u ovoj disertaciji pokazali su da, ako gen *CDH1* ima genetsku promjenu, vrlo je vjerojatno da će i gen *CDH2* biti promijenjen. Ovakva korelacija sugerira akumulaciju genetskih promjena u genima odgovornim za epitelno-mezenhimsku tranziciju u intrakranijalnim menigeomima. Rezultat o značajnoj povezanosti genetskih promjena sudionika kadherinske izmjene pokazuje da su oba gena uključena i da je uspostavljena osnova za neispravnu EMT u tumorima menigeomima.

Konstantna pojava genomske nestabilnosti u uzorcima istraživanim u ovom doktoratu ne iznenađuje, uzme li se u obzir činjenica da su prijašnja istraživanja Pećine-Šlaus i sur. (2017) gena *MLH1*, *MSH2*, *DVL3* *AXINI* i *CDH1* pokazala da 38% meningeoma ima MSI na jednom, 16% na

dva, a 13.3% na tri lokusa. Najviše je bio promijenjen gen *MLH1* koji je pokazivao MSI u 26% te LOH u 24% uzoraka, dok je gen *MSH2* pokazivao MSI u 14% uzoraka. Oba gena su dio postreplikacijskog sustava za popravak DNA (MMR od engl. *mismatch repair*). Pokazalo se da, ako MMR ne funkcionira, dolazi do pojačane frekvencije mutacija u stanicama tumora te nakupljena mikrosatelitna nestabilnost igra važnu ulogu u tumorigenezi (Bhargava i Fuentes, 2010). Rezultati Pećine-Šlaus i sur. (2017) sugeriraju da je MMR u meningeomima često manjkav, a rezultat je zabilježena genomska nestabilnost. Prepoznavanje specifičnih regija tumora s MSI može imati važne implikacije u dijagnostici karcinoma kao i prediktivni potencijal tijekom bolesti. MSI krajolik već predstavlja dio dijagnostike za gastrointestinalne, kolorektalne i endometrijalne tumore (Yamamoto i Imai, 2015; Hause, 2016). Rezultati genomske nestabilnosti u istraživanim genima ove disertacije sugeriraju povećanu frekvenciju mutacija u meningeomima. MSI u genima odgovorim za epitelno-mezenhimsku tranziciju najvjerojatnije korijene vuče iz nestabilnosti gena MMR sustava. Genetske promjene *CDH1* i *CDH2* su prisutne u svim gradusima meningeoma. Također, geni *CDH1* i *CDH2* često su istovremeno imali jednu od istraživanih genetskih promjena. Zbog navedenoga, ovi geni mogu predstavljati koristan prognostički marker progresije i predikcije ponašanja meningeoma s obzirom da se genetske promjene pojavljuju u benignim stadijima, a povećavaju svoju frekvenciju prelaskom u malignije oblike (posebice LOH u *CDH2* genu).

Rezultati analiza na proteinskoj razini prikazanih u ovoj disertaciji pridonijeli su daljnjem rasvjetljavanju uloge E- i N-kadherina u intrakranijalnim meningeomima. Ekspresija E-kadherina u intrakranijalnim meningeomima je pokazala njegovu slabu ekspresiju sa srednjom vrijednošću 48,83. Čak u 22 uzorka (30,6%) nije zabilježen signal, dok je jak signal zabilježen samo u jednom benignom i jednom malignom uzorku. Nedostatak ekspresije nije statistički značajno povezan s gradusom te je većina uzoraka neovisno o gradusu pokazivala slabi signal (81,6% benignih, 70,6% atipičnih i 66,7% anaplastičnih uzoraka). Ovaj rezultat se može pripisati malom broju anaplastičnih uzoraka (N=6) te se može govoriti o smanjenoj ekspresiji E-kadherina u anaplastičnim meningeomima s obzirom da je 4/6 uzoraka pokazivalo slab signal. Nadalje, genetske promjene njegovog gena *CDH1* nisu pokazale statistički značajnu povezanost sa slabom ekspresijom, iako je 9/11 uzoraka s LOH-om (81,8%) ili 13/16 uzoraka s MSI (81,2%) imalo slabu ekspresiju. Ovi rezultati ukazuju da ukupne genetske promjene doprinose smanjenoj ekspresiji. Situacija gdje genetske promjene gena *CDH1* ne koreliraju s njegovom proteinskom ekspresijom ne iznenađuje, budući da je zabilježena i u drugim vrstama tumora. Primjerice, dio uzoraka

karcinoma prostate, mjehura, endometrija, hereditarnog difuznog gastričkog karcinoma te invazivnog duktalnog ili lobularnog karcinoma nije sadržavao genetsku promjenu *CDH1*, ali je pokazao smanjenu ekspresiju E-kadherina. U tim slučajevima gubitak ekspresije E-kadherina se može pripisati transkripcijskim ili posttranslacijskim modifikacijama, odnosno epigenetskom utišavanju kao npr. metilaciji promotora E-kadherina (Priya i sur., 2010; Bruner i Derksen, 2018).

I drugi autori pokazali su slične rezultate. Tako se zna da je gubitak ekspresije E-kadherina usko povezan s progresijom i agresivnim metastatskim karakterom različitih tumora. Smanjenjem razine njegove ekspresije dolazi do promjene u adhezivnoj snazi stanica stvarajući invazivne tumorske stanice sposobne za migraciju (Mendosa i sur., 2018). Istraživanje Hownga i sur. (2002) korištenjem PCR amplifikacije cDNA iz primarnih tumora mozga je pokazalo ekspresiju E-kadherina u samo u dva uzorka astrocitoma (2/16) dok je u većini uzoraka meningeoma (14/15) i pituitarnih adenoma (tumora hipofize) (12/14) E-kadherin detektiran. Time je pokazano da ekspresija E-kadherina varira u različitim primarnim tumorima mozga. Razina ekspresije E-kadherina te njena povezanost sa stupnjem malignosti meningeoma je još uvijek nejasna te nailazi na kontradiktorne zaključke istraživanja. Shimada i sur. (2005) su pokazali ekspresiju E-kadherina s jakim imunohistokemijskim signalom (3+) u 92% uzoraka čime je isključena uloga ekspresije E-kadherina u progresiji meningeoma. Slične rezultate su zabilježili i Brunner i sur. (2006) koji su našli ekspresiju E-kadherina u staničnoj membrani u 66% slučajeva, zatim Backer-Grøndahl i sur. (2014) koji isto prijavljuju da nema jasne korelacije između ekspresije E-kadherina i invazivnog karaktera i na kraju Mrachek i sur. (2015) koji nisu zabilježili gubitak E-kadherina u gradusu III (rezultati IHC su pokazali jačinu signala od 2+). S druge strane, Schwechheimer i sur. (1998) u većini malignih (6/9) meningeoma ne nailaze na ekspresiju E-kadherina dok u ostala tri uzorka ekspresija je slabog signala. Panagopoulos i sur. (2008) nisu naišli na ekspresiju E-kadherina u anaplastičnim uzorcima meningeoma. Međutim, kako se ponovo radilo o malom broju meningeoma gradusa III, samo dva, bili su oprezni s donošenjem zaključka o povezanosti ekspresije s gradusom. Smanjenje ekspresije E-kadherina u meningeomima višeg gradusa su zabilježili i Nagaishi i sur. (2012), Pećina-Šlaus i sur. (2012), Arsene i sur. (2014) te El-Gewely i sur. (2016) predlažući E-kadherin kao mogući prognostički marker. Istraživanja Zhou i sur. (2010) te Foda i sur. (2019) pokazala su statistički značajnu povezanost smanjene ekspresije E-kadherina s histološkim gradusom meningeoma. Wallesch i sur. (2017) su zabilježili i značajni gubitak E-kadherina u recidivima meningeoma.

U ovoj disertaciji, ekspresija N-kadherina u istraživanim uzorcima je bila lokalizirana u citoplazmi sa srednjom vrijednošću ekspresije 81,04. Samo 4 (5,6%) uzorka nije imalo signal, dok je 6 (8,3%) uzoraka pokazivalo jak signal. Iako ekspresija nije pokazala statistički značajnu povezanost s gradusom, jasno je vidljivo da je bila viša u odnosu na razine ekspresije E-kadherin čija je srednja vrijednost 48,83. Statistički značajna korelacija je utvrđena između ekspresije N-kadherina i genetskih promjena gena *CDH1* (E-kadherina) ( $p=0,016$ ). Post-hoc analiza pokazala je da uzorci s mutacijom na E-kadherinu imaju u prosjeku značajno manju ekspresiju N-kadherina izraženu H-zbrojem. Pojavnost genetskih promjena *CDH2* nije pokazala statistički značajnu povezanost s ekspresijom N-kadherina. Ipak, od 38 uzoraka koji su pokazivali slabu ekspresiju N-kadherina, njih 73,7% je imalo promjenu gena *CDH2*. Sličan rezultat pokazali su i uzorci s umjerenom ekspresijom N-kadherina gdje je njih 73,1% pokazivalo genetsku promjenu *CDH2*. Uzorci s jakim signalom su imali manje genetskih promjena te su one zabilježene u 33,3% uzoraka. Ovi rezultati također ukazuju da ukupne genetske promjene *CDH2* doprinose smanjenoj ekspresiji njegovog proteinskog produkta.

Poznato je iz literature da povećana ekspresija N-kadherina može biti okidač agresivnog karaktera tumora s mogućnošću metastaziranja i veće stope recidiva. Zabilježena je u tumorima poput karcinoma dojke, pluća, prostate, gušterače, melanoma, multiplog mijeloma, gastičkog karcinoma ili karcinoma pločastih stanica usne šupljine (Mrozik i sur., 2018; Cao i sur., 2019). Što se tiče njegove ekspresije u tumorima mozga, gliomi pokazuju značajno povećanu ekspresiju N-kadherina u usporedbi s normalnim tkivom mozga. Međutim, Xiong i sur. (2017) tu ekspresiju i invazivan karakter s tendencijom migracije pripisuju ekspresiji proN-kadherina koji predstavlja „nezreli“ oblik N-kadherina s različitim individualnim funkcijama. Štoviše, zna se da ekspresija N-kadherina nema istu ulogu u invazivnosti glioma kao u drugim vrstama karcinoma. Postoje nalazi da povećana ekspresija N-kadherina u štakorskoj staničnoj liniji glioma C6 suprimira njen invazivan karakter. Ipak, uzevši sve u obzir, ekspresija N-kadherina može biti prognostički marker metastaza glioma budući da može nadvladati inhibitorni efekt E-kadherina (Cao i sur., 2019). Shinoura i sur. (1995) su pokazali da je N-kadherin bio značajno jače eksprimiran u višim gradusima astrocitnih tumora (anaplastičnim i glioblastomima) u odnosu na niže, međutim nije se pokazao konzistentnim u uzorcima koji su pokazivali invazivnost. To su potvrdili i pokusom na staničnim linijama glioblastoma koje nisu pokazale korelaciju između ekspresije N-kadherina i mobilnosti stanica. Slične rezultate je dalo i istraživanje Reszec i sur. (2015) koji su zabilježili



ekspresiju N-kadherina u 92.3% difuznih astrocitoma, 90.1% anaplastičnih astrocitoma te svim uzorcima glioblastoma. Njihov zaključak je bio da N-kadherin u astroцитomima ima ulogu u formaciji i progresiji tumora, dok u glioblastomima sudjeluje u stvaranju međustaničnih veza kako bi se izbjegao neželjeni učinak hipoksije na stanice tumora i ima značajniju ulogu u angiogenezi nego li u invaziji parenhima mozga. Istraživanje na intrakranijalnim meningeomima Rutkowskog i sur. (2018) je pokazalo da je ekspresija N-kadherina bila samo prisutna na membrani neoplastičnih stanica u 48,1% uzoraka gradusa I (s jakom ekspresijom u uzorcima koji su bili recidivi) te u 68% uzoraka viših gradusa (II i III). Njihovi rezultati ekspresije su se pokazali i statistički značajno vezanim uz peritumoralni edem mozga.

Iako proteinske ekspresija E- i N-kadherina u ovoj disertaciji nisu pokazale statistički značajnu razliku, uspoređujući srednje vrijednosti njihovih ekspresija (48,83 u odnosu na 81,04) te razine ekspresije po gradusima, vidljiva je veća ekspresija N-kadherina. Ovi nalazi sugeriraju kadherinsku izmjenu u intrakranijalnim meningeomima koja je prominentna značajka EMT, neovisno o gradusu. Moguće objašnjenje za visoku ekspresiju N-kadherina u gradusu I jest da čak i benigni oblici meningeoma mogu sadržavati invazivni karakter s potencijalom za progresiju i većom stopom recidiva poput viših gradusa. U tumorima dojke N-kadherin promovira pokretljivost stanica neovisno o ekspresiji E-kadherina (Cao i sur., 2019). Zbog svega navedenoga, N-kadherin bi potencijalno mogao biti dobar prognostički marker ponašanja meningeoma neovisno o histološkom gradusu.

## **6.2. Uloga transkripcijskih faktora SNAIL, SLUG i TWIST1 u intrakranijalnim meningeomima**

Proteinska ekspresija transkripcijskog faktora TWIST1 u uzorcima ove disertacije se pokazala izrazito jakom sa srednjom vrijednosti rezultata dobivenih H-zbrojem iznosa 200,56. TWIST1 je bio lokaliziran isključivo u jezgrama. Jak signal je zabilježen u 45 uzoraka (62,5%), dok je svega 8 uzoraka imalo slab signal (11,1%). Iako su uzorci ove disertacije pokazali lagan porast ekspresije TWIST1 u višim gradusima, ona nije bila statistički značajno vezana uz maligne oblike. Isto tako niti jedan anaplastični meningeom nije pokazao slab signal te ih je 66,7% pokazivalo izrazito jak signal. Nadalje, ekspresije proteina TWIST1 je bila puno viša u meningeomima od ekspresije E-kadherina, ali nije potvrđena statistički značajna negativna korelacija.

Rezultati ekspresije proteina SNAIL i SLUG u uzorcima ove disertacije su također pokazali visoku ekspresiju sličnu TWIST1 sa srednjom vrijednošću H-zbroja 190,00 u citoplazmi. U svim uzorcima je zabilježen signal. Osam uzoraka (11,1%) koji su pokazivali slabi signal u citoplazmi klasificirani su kao gradus I. Međutim, svi meningeomi klasificirani kao gradus III su uvijek pokazivali jaki signal. U ukupnom uzorku, jak signal je zabilježen u 40 uzoraka (55,6%). Izuzev u citoplazmi, dio uzoraka je pokazao ekspresiju proteina SNAIL i SLUG i u jezgrama (52,8%). 34 uzorka (47,2%) nisu pokazala ekspresiju proteina u jezgri, dok uzorci u kojima je prebrojano više od 50% jezgara s ekspresijom su najvećim udjelom atipični i anaplastični meningeomi (6 od 7 uzoraka). U prilog tome ide i statistička analiza koja je pokazala da povećana ekspresija SNAIL i SLUG u citoplazmi dovodi do povećanja njihove ekspresije u jezgrama ( $\chi^2=17,795$ ,  $df=4$ , **p=0,001** i  $\phi_c=0,352$ ; **p=0,001**). Daljnja analiza je pokazala statistički značajnu povezanost ekspresije proteina SNAIL i SLUG s različitim gradusima ( $F=7,380$ , **p=0,001**), odnosno postoji značajna razlika u srednjoj vrijednosti H-zbroja gradusa I i gradusa II te gradusa I i gradusa III gdje je povećanje gradusa pratila i povećana ekspresija proteina. Iako prethodne analize navode na zaključak da se proteinska ekspresija u jezgrama povećava s gradusom, odnosno da postoji statistički značajna povezanost, ona je potvrđena i statističkim testovima ( $\chi^2=17,621$ ,  $df=4$ , **p=0,001** i  $\phi_c=0,350$ ; **p=0,001**). Ovaj rezultat je u skladu s drugim istraživanjima koja su pokazala da je ekspresija SNAIL i SLUG u jezgrama bila povezana s većim malignim potencijalom i lošijom prognozom kod nekih drugih tumora kao npr. kod malignog pleuralnog mezotelioma te u neuroendokrinim tumorima pluća (Galvan i sur., 2010; Kobayashi i sur., 2013). S druge strane, bez obzira na visoku ekspresiju transkripcijskih faktora SNAIL i SLUG u odnosu na ekspresiju E-kadherina, nije zabilježena statistički značajna korelacija što je djelomično u skladu s nalazima istraživačke skupine Wallesch i sur. (2017). Statistički značajna povezanost je zabilježena i kod ekspresije proteina SNAIL i SLUG u jezgri s pojavnošću genetskih promjena na genu *CDHI* zabilježenih mikrosatelitnim biljegom D16S3025 ( $\chi^2=16,573$ ,  $df=2$ , **p=0,000** i  $\phi_c=0,505$ ; **p=0,000**). Odnosno, uzorci na kojima nisu zabilježene genetske promjene značajno češće nisu imali ekspresiju proteina u jezgri ili je ona bila u manje od 50% jezgara, dok uzorci s promjenama gena *CDHI* su pokazivali ekspresiju proteina u više od 50% jezgara.

Iz literature je poznato da su pojačane ekspresije proteina SNAIL i TWIST1 pouzdani markeri agresivnog karaktera odnosno invazivnosti različitih tumora poput karcinoma dojke, karcinoma pločastih stanica jednjaka, kolorektalnog karcinoma te odontogenih tumora (Oh i sur.,

2017; Al Khatib i sur., 2019; Cho i sur., 2019). Pojačana ekspresija transkripcijskih faktora je često pokazatelj lošijeg ishoda bolesti pa se tako ona smatra prognostičkim markerom hematoloških tumora, invazivnog lobularnog karcinoma, karcinoma pločastih stanica donje usne i karcinoma kolona (Yang i sur., 2004; Norozi i sur., 2016; de Moraes i sur., 2019; Wang i sur., 2018). SNAIL se također pokazao kao dobar prognostički marker progresije za karcinome poput malignog pleuralnog mezotelioma, neuroendokrinih plućnih tumora, seroznog karcinoma jajnika, karcinoma prostate ili karcinoma pločastih stanica glave i vrata (Galvan i sur., 2010; Mendelsohn i sur., 2012; Smith i Odero-Marah, 2012; Kobayashi i sur., 2013; Hojo i sur., 2018). Nakamura i sur. (2018) naglašavaju da u oralnim karcinomima SNAIL i SLUG djeluju u tandemu i predstavljaju potencijalne terapijske mete. S obzirom na suprotne rezultate velikog broja publiciranih radova s temom uloge ekspresije transkripcijskih faktora EMT u različitim tumorima, Zhang i sur. (2014) su odlučili napraviti meta analizu svih podataka. Rezultati meta analize ekspresije transkripcijskih faktora SNAIL i TWIST1 u različitim tumorima su potvrdili da njihova povećana ekspresija utječe na razvoj tumora i sugerira nepovoljan ishod liječenja, pri čemu je TWIST1 bolji prognostički marker od SNAIL. Poznato je da je uz više graduse astrocitnih tumora (posebno glioblastome) vezana i jača ekspresija proteina TWIST1 koji je neovisan prediktor lošijeg ishoda liječenja (Nordfors i sur., 2015). Nagaishi i sur. (2012) su zabilježili pojačanu ekspresiju transkripcijskih faktora SLUG i TWIST1 uz smanjenje regulaciju E-kadherina u meningealnim tumorima solidnih fibroznih tumora i hemangiopericitomima. Ekspresije u ovim tumorima su bile jače u odnosu na njihove ekspresije u meningeomima. Ostala istraživanja transkripcijskih faktora EMT na meningeomima su donijela djelomično slične rezultate. Soini i sur. (2010) prijavljuju samo 8% uzoraka meningeoma koji su pokazivali ekspresiju TWIST1, specifično vezanu uz atipične i anaplastične meningeoma te recidive. Wallesch i sur. (2017) komparacijom proteinske ekspresije u meningeomima viših gradusa s meningeomima nižih su zabilježili smanjenje ekspresije E-kadherina koje prati povećanje ekspresije proteina SLUG, ali i lagani pad ekspresije proteina TWIST1. Iste rezultate su zabilježili i u recidivima. Oba istraživanja sugeriraju ulogu barem jednog transkripcijskog faktora u razvoju invazivnog karaktera meningeoma.

Poznato je da pojačana ekspresija transkripcijskih faktora EMT ne mora nužno predstavljati kasni događaj u različitim karcinomima, nego može biti uključena i u inicijalnim događajima razvoja tumora (Goossens i sur., 2017). Rezultati ove disertacije su u skladu s ovom tvrdnjom budući da je jaka ekspresiju SNAIL, SLUG i TWIST1 zabilježena u svim gradusima,

ponovno potvrđujući da meningeomi, iako histološki klasificirani kao benigni, mogu pokazati invazivni karakter. Nadalje, pojačana ekspresija transkripcijskih faktora SNAIL, SLUG ili TWIST1 je često u literaturi klasificirana kao dobar prognostički marker razvoja tumora, pojave recidiva ili čak rezistencije na terapiju. Rezultati analize ekspresije SNAIL i SLUG u ovoj disertaciji su se pokazali kao bolji prognostički markeri progresije meningeoma u odnosu na TWIST1, usprkos činjenici da su njihove ekspresije bile statistički značajno pozitivno povezane ( $p=0,033$ ), odnosno porast ekspresije SNAIL i SLUG je pratio i porast ekspresije TWIST1. Nalaz da su SNAIL i SLUG bolji prognostički markeri progresije tumora u odnosu na TWIST1 je i u skladu s rezultatima istraživanja Wallesch i sur. (2017). Kao dodatan prognostički marker u progresiji meningeoma se može koristiti i ekspresija SNAIL i SLUG u jezgrama.

Statistička analiza u ovom istraživanju nije pokazala značajnu povezanost porasta ekspresije transkripcijskih faktora EMT i pada ekspresije E-kadherina. Međutim ovaj doktorat je pokazao izrazito jake ekspresije SNAIL, SLUG i TWIST1 u odnosu na nisku ekspresiju E-kadherina te se ne može isključiti njihova regulatorna uloga u meningeomima. Kao što je već spomenuto, ovo istraživanje je pokazalo da genetske promjene *CDHI* doprinose smanjenoj ekspresiji E-kadherina, ali nisu jedini uzrok. Moguće je da osim genetskih promjena smanjenju razine ekspresije E-kadherina u uzorcima intrakranijalnih meningeoma dodatno doprinose transkripcijski faktori SNAIL, SLUG i TWIST1 koji vrše represiju sinteze E-kadherina vezujući se za njegov promotor. Zahvaljujući svemu navedenom, SNAIL, SLUG i TWIST1 bi mogli predstavljati dobre prognostičke faktore i doprinijeti boljoj stratifikaciji pacijenata kod liječenja intrakranijalnih meningeoma.

### **6.3. Uloga fosforilacijskog statusa $\beta$ -katenina i signalnog puta Wnt u intrakranijalnim meningeomima**

U ovom doktoratu, aktivacija signalnog puta Wnt u intrakranijalnim meningeomima je proučavana pomoću njegove središnje molekule –  $\beta$ -katenina, istraživanjem njegovih genetskih promjena, lokacije i stabilizacije u različitim gradusima. Za proučavanje genetskih promjena, odabran je ekson 3  $\beta$ -katenina, odgovoran za izgradnju N-terminalnog kraja proteina koji se sastoji od konzerviranih serin/treonin aminokiselina. Ekson 3 se iz literature (Gao i sur., 2018) pokazao kao mutacijsko žarište u mnogim vrstama tumora uključujući dojku, kolon, jetru, prostatu te melanom, dajući  $\beta$ -kateninu onkogeni potencijal. Ovo istraživanje na 63 uzoraka intrakranijalna

meningeoma je pokazalo da i u ovom tipu tumora postoji mutacijski trend u eksonu 3  $\beta$ -katenina. Od 14 uzoraka s mutacijom (22,2% analiziranih uzoraka), tri uzorka su pokazala mutacije u eksonu 3, osam u intronu 3, a tri uzorka su imala mutacije i u eksonu 3 i u intronu 3. Pronađene mutacije u eksonima su u 5/6 slučajeva (83,3%) bile mutacije pogrešnog smisla koje su zbog delecije ili insercije i posljedičnog pomaka okvira čitanja rezultirale prijevremenim završetkom sinteze proteina. Samo u jednom uzorku koji je imao mutaciju u eksonu 3 se radilo o supstituciji baza koja je za posljedicu imala tihu mutaciju. Međutim, u tom uzorku su zabilježene i dvije insercije u intronu koje mogu prouzročiti pomak okvira čitanja i izrezivanje introna na krivom mjestu, ponovo dovodeći do nefunkcionalnosti proteina. Analizirani uzorci s mutacijama u eksonu 3 nisu pokazivali promjene u S33, S37, T41, S45, već su se one događale na drugim lokacijama. U 3/6 slučajeva eksonskih mutacija sinteza proteina je bila zaustavljena prije S33, S37, T41, S45 te ili zbog pomaka okvira čitanja ili mutacija pogrešnog smisla nije došlo do sinteze navedenih aminokiselina na tim lokacijama. U 2/6 slučajeva je sinteza proteina bila zaustavljena nakon S33, S37, T41, S45, čime su navedene aminokiseline formirane, ali je cijeli N-terminalni kraj  $\beta$ -katenina bio kraći. Mutacije u intronima su bile poprilično uniformne budući da je 11/12 uzoraka pokazalo inserciju baze A na dva mjesta u intronu udaljenih svega nekoliko nukleotidnih baza. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je svih 14 uzoraka s mutacijom sadržavalo barem jednu genetsku promjenu koja ima utjecaj na funkcionalnost proteina i koja je potencijalno škodljiva. Mutirani uzorci nisu bili statistički povezani s određenim gradusom ( $p=0,538$ ) i primijećeno je da anaplastični meningeomi nisu bili mutirani. Mutacije su zabilježene u deset uzoraka benignih meningeoma (71,4%) i četiri uzorka atipičnih meningeoma (28,6%). Ovi nalazi odgovaraju i rezultatima Kim i Jeonga (2019) koji su koristili dostupnu bazu genoma humanog karcinoma (engl. *Human Cancer Genome Databases*). Uzimajući u obzir različite karcinome, mutacije eksona 3 u sveukupnom uzorku pojedinog karcinoma su se pojavljivale u frekvenciji od 0-36% uzoraka (najčešće su bile u endometrijskim i karcinomima jetre, dok su se najmanje pojavljivale u kolorektalnim). Mutacije u genu *CTNNB1* endometrijskih karcinoma su češće u nižim gradusima i ranim stadijima razvoja bolesti te su povezani s lošijim ishodom bolesti zbog veće šanse pojavljivanja recidiva. Budući da ni u uzorku ove disertacije mutacije nisu zabilježene u najvišem, malignom gradusu meningeoma, već su uglavnom zabilježene u benignim gradusima, moguće je da ove mutacije predstavljaju pokretačke mutacije meningeoma i nisu vezane uz progresiju. Nadalje, Lee i sur. (2009) su proučavali najčešće mutacije eksona 3 na fosforilacijskim lokacijama

S33, S37, S41 i T45 različitih tumora mozga, uključujući i meningeome. Pokazali su da kodoni za ove kritične aminokiseline nisu bili promijenjeni niti u jednom primarnom tumoru uključujući i meningeome, već je mutacija na S33 nađena samo u metastazi primarnog tumora karcinoma pluća. Rezultati ove disertacije su pokazali sličan scenarij gdje nisu zabilježene mutacije u navedenim kodonima, već su one pronađene u drugim kodonima unutar istoga eksona što može upućivati na genetske promjene specifične za meningeome.

Kako bi se potvrdio učinak otkrivenih mutacija na proteinskoj razini, učinjena je imunohistokemijska analiza pomoću dva antitijela koja prate ukupan  $\beta$ -katenin (fosforiliran i nefosforiliran) i nefosforilirani ili aktivni oblik  $\beta$ -katenina (NON-P  $\beta$ -katenin) u stanici. Uzorci s mutacijama u eksonu 3 su u 83,3% (5/6) slučajeva imali slab signal NON-P  $\beta$ -katenina te u jednom slučaju umjereni signal. Što se tiče ukupnog  $\beta$ -katenina, on je također u 50% (3/6) slučajeva pokazivao slab signal, u 33,3% (2/6) umjeren i u jednom slučaju s tihom mutacijom jak signal, odnosno pokazivao je jednak ili jači signal u odnosu na NON-P  $\beta$ -katenin u istim uzorcima. Kod uzoraka s mutacijama, samo u intronima signal ukupnog  $\beta$ -katenina i NON-P  $\beta$ -katenina je bio slab u 4/8 slučajeva, umjeren u 3/8, a jedan uzorak je pokazivao jak signal nefosforiliranog oblika i umjeren signal ukupnog  $\beta$ -katenina. Isti trend su zabilježili i Sakai i sur. (2017) koristeći navedena dva antitijela u istraživanju dezmoidne fibromatoze. Monoklonsko antitijelo za nefosforilirani ili aktivni  $\beta$ -katenin prepoznaje endogeni  $\beta$ -katenin u kojem S33, S37 i T41 nisu fosforilirani ili endogeni  $\beta$ -katenin u kojem je fosforiliran samo S33, a S37 i T41 nisu. Ovo antitijelo međutim ne može prepoznati  $\beta$ -katenin fosforiliran na S33/S37/T41. Zbog toga je ovo antitijelo dizajnirano da prepozna stabilizirani, aktivni ili mutantni oblik  $\beta$ -katenina karakterističan za tumorske stanice.  $\beta$ -katenin fosforiliran na S45 se obično akumulira u jezgri, dok  $\beta$ -katenin fosforiliran na S33/S37/T47/S45 obično uvjetuje da ovaj oblik  $\beta$ -katenina stvara veze između stanica vezanjem s E-kadherinom ili je vezan s proteinom APC. U slučaju kada  $\beta$ -katenin ima deletirani N-kraj, on ne može provesti transkripciju u jezgri (Dar i sur., 2017). Svi uzorci u istraživanju Sakai i sur. (2017) su pokazivali jednak ili slabiji signal NON-P  $\beta$ -katenina u odnosu na signal ukupnog  $\beta$ -katenina zbog toga što NON-P antitijelo ne detektira i  $\beta$ -katenin fosforiliran na S33/S37/T41. Treba međutim naglasiti da u ovoj disertaciji mutirani uzorci atipičnih meningeoma su u 75% slučajeva pokazivali umjeren signal obiju formi  $\beta$ -katenina. Drugim riječima, iako je u nekim uzorcima došlo do promjene u redoslijedu aminokiselina ili preranog zaustavljanja sinteze proteina koje su rezultirale da protein u svom N-terminalnom dijelu nema

fosforilacijska mjesta za kinaze, aktivni oblik  $\beta$ -katenina je bio slabog ili umjerenog signala. Međutim, obično je isti signal pokazivalo i bojenje na ukupan  $\beta$ -katenin (u 4/6 uzoraka), sugerirajući da se uglavnom radi o aktivnom obliku koji dovodi do aktivacije signalnog puta Wnt. Jedina značajnija razlika u signalu analize između dva različita  $\beta$ -katenina je bila u slučaju s tihom mutacijom zbog koje su fosforilacijska mjesta bila aktivnija, te je NON-P  $\beta$ -katenin pokazivao slab signal, za razliku od ukupnog  $\beta$ -katenina s jakim signalom. Svi uzorci s mutiranim intronom 3 pokazali su isti nalaz gdje je aktivni oblik činio većinu ukupnog  $\beta$ -katenina, sugerirajući time i aktivaciju signalnog puta Wnt.

Rezultati imunohistokemijske analize ovog istraživanja na 72 uzorka na ukupni  $\beta$ -katenin i NON-P  $\beta$ -katenin su pokazali vrlo bliske srednje vrijednosti H-zbroja (91,50 za ukupni  $\beta$ -katenin i 85,43 za NON-P  $\beta$ -katenin). Statistička analiza je pokazala značajnu povezanost ekspresije  $\beta$ -katenina i njegovog nefosforiliranog oblika ( $p=0,000$ ), potvrđujući prisustvo aktivnog mutantnog oblika proteina. Također, ova studija je dokazala da porast ekspresije ukupnog  $\beta$ -katenina prati i porast ekspresije aktivnog oblika, te da je porast ekspresije oba oblika  $\beta$ -katenina statistički značajno povezan s višim gradusima. Pri tome su gradusi II i III imali dva puta veću srednju vrijednost H-zbroja od gradusa I, ali se viši gradusi međusobno nisu razlikovali u razinama ekspresije  $\beta$ -katenina. Drugim riječima, ekspresija ukupnog i aktivnog oblika  $\beta$ -katenina je pojačana u agresivnijim tipovima meningeoma. Literatura navodi da pojačana ekspresija  $\beta$ -katenina može biti posljedica nepravilnog funkcioniranja destruktivnog kompleksa, pojačane ekspresije liganda WNT kao i gubitka ili smanjenja regulacije (Taciak i sur., 2018). Rezultati pojačane ekspresije  $\beta$ -katenina u uzorcima u ovoj disertaciji, pogotovo njegovog aktivnog oblika u gradusima II i III upućuju da signalni put Wnt igra važnu ulogu u meningeomima i njihovoj progresiji. Međutim, izostanak ekspresije  $\beta$ -katenina u jezgrama uzoraka ove disertacije sugerira da, iako je  $\beta$ -katenin aktivan, postoji mogućnost da u benignim slučajevima on još nije dospio u jezgru. Izostanak ekspresije  $\beta$ -katenina u jezgrama malignih meningeoma viših gradusa teško je objasniti, ali se može objasniti malim brojem uzoraka u ovim skupinama. Tome u prilog idu i rezultati Shimade i sur., 2005 te Brunnera i sur., 2006 koji nisu zabilježili ekspresiju  $\beta$ -katenina u jezgri stanica meningeomima te rezultati Rutkowskog i sur. (2018) koji nisu zabilježili jezgrenu ekspresiju  $\beta$ -katenina u svim uzorcima viših gradusa. U radu Rutkowskog i sur. (2018) korišteno je antitijelo koje hvata C-terminalni kraj  $\beta$ -katenina, a jezgrena ekspresija je zabilježena u 33/50

tumora viših gradusa s time da je samo 6/50 tumora pokazivalo jaku ekspresiju u gotovo svim stanicama.

S obzirom na visoku ekspresiju aktivnog oblika  $\beta$ -katenina u višim gradusima može se govoriti o ulozi signalnog puta Wnt u progresiji intrakranijalnih meningeoma. Za konačnu potvrdu ove hipoteze potrebno je istraživanje na većem broju uzoraka meningeoma viših gradusa s ciljem rasvjetljavanja prelaska  $\beta$ -katenina u jezgre.

#### **6.4. Uzajamno djelovanje signalnog puta Wnt i epitelno-mezenhinske tranzicije u intrakranijalnim meningeomima**

Kako bi se potvrdilo uzajamno djelovanje signalnog puta Wnt i EMT u intrakranijalnim meningeomima uspoređene su proteinske ekspresije cjelokupnog i nefosforiliranog oblika  $\beta$ -katenina s ekspresijama glavnih aktera EMT: E-kadherinom, N-kadherinom, SNAIL, SLUG i TWIST1. Proteinske ekspresije koje su se pokazale statistički značajno povezanima su uključivale sljedeće parove: E-kadherin i  $\beta$ -katenin ( $p=0,001$ ), E-kadherin i nefosforilirani oblik  $\beta$ -katenina ( $p=0,037$ ), N-kadherin i  $\beta$ -katenin ( $p=0,009$ ), N-kadherin i nefosforilirani oblik  $\beta$ -katenina ( $p=0,018$ ),  $\beta$ -katenin i TWIST1 ( $p=0,033$ ), nefosforilirani oblik  $\beta$ -katenina i TWIST1 ( $p=0,048$ ) i nefosforilirani oblik  $\beta$ -katenina i SNAIL i SLUG ( $p=0,017$ ). Kod svih parova korelacija je bila pozitivna, odnosno povećanje ekspresije jednog proteina je pratilo i povećanje ekspresije drugog proteina.

Poznato je da prelazak  $\beta$ -katenina u jezgru može dovesti do smanjene ekspresije E-kadherina i potaknuti invazivnost tumora. Međutim, u uzorcima ove disertacije ekspresija E-kadherina je povezana s ekspresijom ukupnog i aktivnog  $\beta$ -katenina. Postoji nekoliko objašnjenja za ovu situaciju koja na prvu ne sugerira ulogu signalnog puta Wnt u procesu EMT. Prvo objašnjenje je da, iako mnoge studije govore o E-kadherinu kao tumor supresoru, u zadnje vrijeme je sve više istraživanja koja naglašavaju da ekspresija E-kadherina održava fenotip tumorskih stanica, čak i onih s invazivnim karakterom. Ekspresija E-kadherina ne mora značajnije pasti da bi došlo do EMT (Rodriguez i sur., 2012; Petrova i sur., 2016). Nadalje, ekspresija E-kadherina i  $\beta$ -katenina nije toliko izražena u membranama koliko u citoplazmi sugerirajući raspad membranskog E-kadherin/ $\beta$ -katenin kompleksa nužnog za adheziju stanica. Isto tako, ukupna ekspresija E-kadherina je bila slabija u odnosu na ekspresiju  $\beta$ -katenina kojeg je uglavnom činio nefosforilirani ili aktivni oblik.



Ukupna ekspresija N-kadherina je bila nešto bliža ekspresiji  $\beta$ -katenina, te se ovaj rezultat uklapa u tvrdnju da aktivni oblik  $\beta$ -katenina, odnosno aktivacija signalnog puta Wnt doprinosi ekspresiji N-kadherina i EMT. Isto tako poznato je da N-kadherin/ $\beta$ -katenin kompleks predstavlja izvor  $\beta$ -katenina u stanicama karcinoma potrebnog za transkripciju onkogeni u jezgri (Mrozik i sur., 2018).

Rezultati povećane ekspresije svakog transkripcijskog faktora, TWIST1, SNAIL i SLUG koje prati povećana razina  $\beta$ -katenina idu u prilog činjenici da nakupljanje  $\beta$ -katenina potiče transkripciju SNAIL, SLUG i TWIST1, kao i činjenici da signalni put Wnt biva aktiviran najvjerojatnije nemogućnošću GSK3 $\beta$  da fosforilira *SNAIL*. Tako dolazi do stabilizacije  $\beta$ -katenina i promicanja ekspresije E-kadherina. Time se stvara zatvoreni ciklus jer ekspresija E-kadherina omogućava nakupljanje  $\beta$ -katenina u citoplazmi i jezgri čime se potiče transkripcija različitih onkogeni (Gonzalez i Medici, 2014; Lamouille i sur., 2014). Stoga, rezultati ove disertacije idu u prilog uskoj povezanosti aktivacije signalnog puta Wnt i epitelno-mezenhimske tranzicije u intrakranijalnim meningeomima.

Istraživanje ove disertacije rasvjetljava ulogu važnih molekula signalnog puta Wnt i epitelno-mezenhimske tranzicije u razvoju i progresiji intrakranijalnih meningeoma. Prepoznavanje molekularnih promjena odgovornih za kontrolu stanične pokretljivosti od velike je znanstvene vrijednosti jer donosi potencijalne biljege progresije i otkriva nove molekularne mete za terapijske intervencije kod malignih oblika intrakranijalnih meningeoma te pomaže u preciznoj dijagnostici meningeoma probirom onih bolesnika koji mogu pokazati nepovoljan tijek bolesti. Otkrivanje uloge signalnog puta Wnt i epitelno-mezenhimske tranzicije u razvoju agresivnijih histopatoloških tipova meningeoma u konačnici doprinosi povećanju preživljenja i boljoj perspektivi oboljelih od intrakranijalnih meningeoma.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Zbirna analiza genetskih promjena E-kadherina i N-kadherina sugerira da geni sudionici kadherinske izmjene mogu igrati ulogu u razvoju i progresiji meningeoma, posebice gen *CDH2*. Rezultat o značajnoj povezanosti genetskih promjena sudionika kadherinske izmjene ( $p=0,005$ ) upućuje da su oba gena uključena i da je uspostavljena osnova za neispravnu EMT u tumorima meningeomima.
2. Ekspresija E-kadherina je slaba u intrakranijalnim meningeomima, dok je ekspresija N-kadherina u intrakranijalnim meningeomima viša u odnosu na E-kadherin, što sugerira kadherinsku izmjenu u intrakranijalnim meningeomima.
3. Postoji statistički značajna korelacija između pojačane ekspresije N-kadherina i genetskih promjena *CDH1* ( $p=0,016$ ) pri čemu je utvrđeno da uzorci s promjenom gena *CDH1* imaju u prosjeku značajno manju ekspresiju N-kadherina izraženu H-zbrojem.
4. Proteinska ekspresija transkripcijskih faktora EMT SNAIL, SLUG i TWIST1 u meningeomima je izrazito jaka te porast ekspresije jednog transkripcijskog faktora prati i porast drugog ( $p=0,033$ ). Povećana ekspresija SNAIL i SLUG je statistički značajno povezana s višim gradusima ( $p=0,001$ ) što ukazuje da transkripcijski faktori mogu imati ulogu u progresiji intrakranijalnih meningeoma i EMT s time da SNAIL i SLUG predstavljaju bolji prognostički marker u odnosu na TWIST1.
5. Ekspresija SNAIL i SLUG u jezgrama je dobar pokazatelj progresije intrakranijalnih meningeoma budući da se povećava s gradusom ( $p=0,001$ ). Meningeomi koji nemaju genetske promjene *CDH1* značajno češće nemaju ekspresiju proteina SNAIL i SLUG u jezgri ili je ona zabilježena u manje od 50% jezgara, za razliku od uzoraka s promjenama gena *CDH1* ( $p=0,000$ ).
6. Ekspresija transkripcijskih faktora EMT SNAIL, SLUG i TWIST1 je izrazito jača od ekspresije E-kadherina u intrakranijalnim meningeomima što sugerira da transkripcijski faktori EMT dodatno utišavaju ekspresiju E-kadherina.
7. Genetičke analize mutacijskog žarišta gena *CTNNB1* su otkrile da 22,2% uzoraka sadrži genetske promjene koje imaju utjecaj na funkcionalnost proteina. Proteinska analiza mutiranih uzoraka sugerira da je u uzorku uglavnom prisutan aktivni oblik koji može dovesti do aktivacije signalnog puta Wnt. Budući da u uzorcima istraživanim u ovoj disertaciji mutacije nisu zabilježene u najvišem, malignom gradusu meningeoma, već su

uglavnom zabilježene u benignim gradusima, moguće je da ove mutacije predstavljaju pokretačke mutacije meningeoma i nisu nužno vezane uz progresiju.

8. Porast ekspresije ukupnog  $\beta$ -katenina prati i porast ekspresije njegovog aktivnog oblika koji potiče Wnt signalizaciju ( $p=0,000$ ). Ekspresije oba oblika  $\beta$ -katenina su statistički značajno više u višim gradusima sugerirajući ulogu signalnog puta Wnt kao pokretača progresije meningeoma.
9. Analiza proteinskih ekspresija E-kadherina, N-kadherin, SNAIL, SLUG i TWIST1 kao sudionika EMT i dvaju oblika  $\beta$ -katenina kao glavnih aktera signalnog puta Wnt sugerira usku povezanost aktivacije signalnog puta Wnt i epitelno-mezenhimske tranzicije u intrakranijalnim meningeomima.

## 8. LITERATURA

1. Aiello NM, Kang Y (2019). Context-dependent EMT programs in cancer metastasis. *J Exp Med* **216**: 1016–1026.
2. Akyol A, Güner G, Özşeker HS, Işık A, Atıcı Ö, Uzun S, Atayar E, Ozaltın F, Gedikoğlu G, Sökmensüer C, Fearon ER (2019). An immunohistochemical approach to detect oncogenic *CTNNB1* mutations in primary neoplastic tissues. *Lab Invest* **99**: 128–137.
3. Al Khatib AM, Mărgăritescu C, Taisescu O, Andreiana BC, Florescu MM, Ciurea RN (2019). Immunoexpression of E-cadherin, snail and twist in colonic adenocarcinomas. *Rom J Morphol Embryol* **60**: 531–536.
4. Alvino E, Fernandez E, Pallini R (2000). Microsatellite instability in primary brain tumors. *Neurol Res* **22**: 571–575.
5. Arsene D, Comănescu M, Ardeleanu C (2014). Adhesion cell molecules as potential markers of aggressiveness in meningiomas. *Rom J Morphol Embryol* **55**: 585–589.
6. Backer-Grøndahl T, Moen BH, Arnli MB, Torseth K, Torp SH (2014). Immunohistochemical characterization of brain-invasive meningiomas. *Int J Clin Exp Pathol* **7**: 7206–7219.
7. Becker J, Wilting J (2019). Wnt signaling in neuroblastoma. *Cancers (Basel)* **11**: pii: E1013.
8. Berx G, Becker KF, Höfler H, van Roy F (1998). Mutations of the human E-cadherin (*CDH1*) gene. *Hum Mutat* **12**: 226–237.
9. Bhargava A, Fuentes FF (2010). Mutational dynamics of microsatellites. *Mol Biotechnol* **44**: 250–266.
10. Bi WL, Abedalthagafi M, Horowitz P, Agarwalla PK, Mei Y, Aizer AA, Brewster R, Dunn GP, Al-Mefty O, Alexander BM, Santagata S, Beroukhir R, Dunn IF (2016). Genomic landscape of intracranial meningiomas. *J Neurosurg* **125**: 525–535.
11. Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, Weinberg RA (2018). EMT in cancer. *Nat Rev Cancer* **18**: 128–134.
12. Breivik J, Gaudernack G (1999). Genomic instability, DNA methylation, and natural selection in colorectal carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* **9**: 245–254.
13. Brewster SF, Gingell JC, Browne S, Brown KW (1994). Loss of heterozygosity on chromosome 18q is associated with muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* **70**: 697–700.
14. Bruner HC, Derksen PWB (2018). Loss of E-cadherin-dependent cell–cell adhesion and the development and progression of cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**: pii: a029330.
15. Brunner EC, Romeike BF, Jung M, Comtesse N, Meese E (2006). Altered expression of b-catenin/E-cadherin in meningiomas. *Histopathology* **49**: 178–187.

16. Buerki RA, Horbinski CM, Kruser T, Horowitz PM, James CD, Lukas RV (2018). An overview of meningiomas. *Futur Oncol* **14**: 2161–2177.
17. Bukovac A, Kafka A, Hrašcan R, Vladušić T, Pećina-Šlaus N (2019). Nucleotide variations of TP53 exon 4 found in intracranial meningioma and in silico prediction of their significance. *Mol Clin Oncol* **11**: 563–572.
18. Buttrick S, Shah AH, Komotar RJ, Ivan ME (2016). Management of Atypical and Anaplastic Meningiomas. *Neurosurg Clin N Am* **27**: 239–247.
19. Cao ZQ, Wang Z, Leng P (2019). Aberrant N-cadherin expression in cancer. *Biomed Pharmacother* **118**: 109320.
20. Çelen I, Ross KE, Arighi CN, Wu CH (2015). Bioinformatics knowledge map for analysis of beta-catenin function in cancer. *PLoS One* **10**: e0141773.
21. Chen MN, Wang P, Zhang J, Zhou BY, Mao Q, Liu YH (2012). Analysis of the role of hMLH1 hypermethylation and microsatellite instability in meningioma progression. *Genet Mol Res* **11**: 3933–3941.
22. Chen T, You Y, Jiang H, Wang ZZ (2017). Epithelial–mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis. *J Cell Physiol* **232**: 3261–3272.
23. Cho YA, Kim EK, Cho BC, Koh YW, Yoon SO (2019). Twist and Snail/Slug expression in oropharyngeal squamous cell carcinoma in correlation with lymph node metastasis. *Anticancer Res* **39**: 6307–6316.
24. Cleton-Jansen AM (2002). E-cadherin and loss of heterozygosity at chromosome 16 in breast carcinogenesis: Different genetic pathways in ductal and lobular breast cancer? *Breast Cancer Res* **4**: 5–8.
25. Coy S, Rashid R, Stemmer-Rachamimov A, Santagata S (2020). An update on the CNS manifestations of neurofibromatosis type 2. *Acta Neuropathol* **139**: 643–665.
26. Dar MS, Singh P, Mir RA, Dar MJ (2017). Beta-catenin N-terminal domain: An enigmatic region prone to cancer causing mutations. *Mutat Res* **773**: 122–133.
27. Das V, Bhattacharya S, Chikkaputtaiah C, Hazra S, Pal M (2019). The basics of epithelial–mesenchymal transition (EMT): A study from a structure, dynamics, and functional perspective. *J Cell Physiol* 1–21.
28. Deng J, Hua L, Han T, Tian M, Wang D, Tang H, Sun S, Chen H, Cheng H, Zhang T, Xie Q, Wan L, Zhu H, Gong Y (2020). The CREB-binding protein inhibitor ICG-001: a promising therapeutic strategy in sporadic meningioma with NF2 mutations. *Neuro-Oncology Adv* **2**: 1–11.
29. Diepenbruck M, Christofori G (2016). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: Yes, no, maybe? *Curr Opin Cell Biol* **43**: 7–13.
30. van Dijk E, Biesma HD, Cordes M, Smeets D, Neerincx M, Das S, Eijk PP, Murphy V, Barat A, Bacon O, Prehn JHM, Betge J, Gaiser T, Fender B, Meijer GA, McNamara DA, Klinger R, Koopman M, Ebert MPA, Kay EW, Hennessey BT, Verheul HMW, Gallagher WM, O'Connor DP, Punt CJA, Loupakis F, Lambrechts D, Byrne AT, van Grieken NCT,

- Ylstra B (2018). Loss of chromosome 18q11.2-q12.1 is predictive for survival in patients with metastatic colorectal cancer treated with bevacizumab. *J Clin Oncol* **36**: 2052–2060.
31. Druliner BR, Ruan X, Sicotte H, O'Brien D, Liu H, Kocher JPA, Boardman L (2018). Early genetic aberrations in patients with sporadic colorectal cancer. *Mol Carcinog* **57**: 114–124.
  32. El-Gewely MR, Andreassen M, Walquist M, Ursvik A, Knutsen E, Nystad M, Coucheron DH, Myrmetel KS, Hennig R, Johansen SD (2016). Differentially expressed microRNAs in meningiomas grades I and II suggest shared biomarkers with malignant tumors. *Cancers (Basel)* **8**: pii: E31.
  33. El-Sahli S, Xie Y, Wang L, Liu S (2019). Wnt signaling in cancer metabolism and immunity. *Cancers (Basel)* **11**: pii: E904.
  34. Fathi AR, Roelcke U (2013). Meningioma. *Curr Neurol Neurosci Rep.* **13**: 337.
  35. Foda AARM, Alam MS, Ikram N, Rafi S, Elnaghi K (2019). Spinal versus intracranial meningioma: Expression of E-cadherin and Fascin with relation to clinicopathological features. *Cancer Biomarkers* **25**: 333–339.
  36. Frank CJ, McClatchey KD, Devaney KO, Carey TE (1997). Evidence that loss of chromosome 18q is associated with tumor progression. *Cancer Res* **57**: 824–827.
  37. Fukushige S, Furukawa T, Satoh K, Sunamura M, Kobari M, Koizumi M, Horii A (1998). Loss of chromosome 18q is an early event in pancreatic ductal tumorigenesis. *Cancer Res* **58**: 4222–4226.
  38. Galani V, Lampri E, Varouktsi A, Alexiou G, Mitselou A, Kyritsis AP (2017). Genetic and epigenetic alterations in meningiomas. *Clin Neurol Neurosurg* **158**: 119–125.
  39. Galván JA, González MV, Crespo G, Folgueras MV, Astudillo A (2010). Snail nuclear expression parallels higher malignancy potential in neuroendocrine lung tumors. *Lung Cancer* **69**: 289–295.
  40. Gao C, Wang Y, Broaddus R, Sun L, Xue F, Zhang W (2018). Exon 3 mutations of CTNNB1 drive tumorigenesis: A review. *Oncotarget* **9**: 5492–5508.
  41. Ghosh N, Hossain U, Mandal A, Sil PC (2019). The Wnt signaling pathway: a potential therapeutic target against cancer. *Ann N Y Acad Sci* **1443**: 54–74.
  42. Goldsberry WN, Londoño A, Randall TD, Norian LA, Arend RC (2019). A review of the role of wnt in cancer immunomodulation. *Cancers (Basel)* **11**: pii: E771.
  43. Gonzalez DM, Medici D (2014). Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal* **7**: re8.
  44. Goossens S, Vandamme N, van Vlierberghe P, Berx G (2017). EMT transcription factors in cancer development re-evaluated: Beyond EMT and MET. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1868**: 584–591.
  45. Green AR, Krivinskas S, Young P, Rakha EA, Paish EC, Powe DG, Ellis IO (2009). Loss of expression of chromosome 16q genes DPEP1 and CTCF in lobular carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res Treat* **113**: 59–66.

46. Green MR, Sambrook J (2012). *Molecular Cloning – a laboratory manual*. 4. izd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
47. Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**: 646–674.
48. Hause RJ, Pritchard CC, Shendure J, Salipante SJ (2016). Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat Med* **22**: 1342–1350.
49. Herrera A, Herrera M, Peña C (2016). The emerging role of Snail1 in the tumor stroma. *Clin Transl Oncol* **18**: 872–877.
50. Hojo N, Huisken AL, Wang H, Chirshev E, Kim NS, Nguyen SM, Campos H, Glackin CA, Ioffe YJ, Unternaehrer JJ (2018). Snail knockdown reverses stemness and inhibits tumour growth in ovarian cancer. *Sci Rep* **8**: 8704.
51. Howng S-L, Wu C-H, Cheng T-S, Sy W-D, Lin P-CK, Wang C, Hong Y-R (2002). Differential expression of Wnt genes,  $\beta$ -catenin and E-cadherin in human brain tumors. *Cancer Letters* **183**: 95-101.
52. Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu ZF, Levitt RC, Sistonen P, Kinzler KW, Vogelstein B, Hamilton SR (1994). Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* **331**: 213-21.
53. Jones JW, Raval JR, Beals TF, Worsham MJ, Van Dyke DL, Esclamado RM, Wolf GT, Bradford CR, Miller T, Carey TE (1997). Frequent loss of heterozygosity on chromosome arm 18q in squamous cell carcinomas. Identification of 2 regions of loss--18q11.1-q12.3 and 18q21.1-q23. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **123**: 610-614.
54. Jordan JT, Plotkin SR (2018). Benign Intracranial Tumors. *Neurol Clin* **36**: 501–516.
55. Kahn M (2014). Can we safely target the WNT pathway? *Nat Rev Drug Discov* **13**: 513-532.
56. Kalluri R, Weinberg RA (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**: 1420-1428.
57. Khan MA, Chen HC, Zhang D, Fu J (2013). Twist: A molecular target in cancer therapeutics. *Tumor Biol* **34**: 2497–2506.
58. Kim S, Jeong S (2019). Mutation hotspots in the  $\beta$ -catenin gene: Lessons from the human cancer genome databases. *Mol Cells* **42**: 8–16.
59. Kobayashi M, Huang CL, Sonobe M, Kikuchi R, Ishikawa M, Imamura N, Kitamura J, Iwakiri S, Itoi K, Yasumizu R, Date H (2013). Snail expression is associated with a poor prognosis in malignant pleural mesotheliomas. *Ann Thorac Surg* **95**: 1181–1188.
60. Kumar R, Bashyam MD (2017). Multiple oncogenic roles of nuclear beta-catenin. *J Biosci* **42**: 695–707.
61. Lamouille S, Xu J, Derynck R (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**: 178–196.

62. Latil A, Cussenot O, Fournier G, Driouch K, Lidereau R (1997). Loss of heterozygosity at chromosome 16q in prostate adenocarcinoma: Identification of three independent regions. *Cancer Res* **57**: 1058–1062.
63. Lee CI, Hsu MY, Chou CH, Wang C, Lo YS, Loh JK, Howng SL, Hong YR (2009). CTNNB1 (beta-catenin) mutation is rare in brain tumours but involved as a sporadic event in a brain metastasis. *Acta Neurochir (Wien)* **151**: 1107-1111.
64. Liao TT, Yang MH (2017). Revisiting epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: the connection between epithelial plasticity and stemness. *Mol Oncol* **11**: 792–804.
65. Loh CY, Chai JY, Tang TF, Wong WF, Sethi G, Shanmugam MK, Chong PP, Looi CY (2019). The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells* **8**: pii: E1118.
66. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* **131**: 803-20.
67. Mendonsa AM, Na TY, Gumbiner BM (2018). E-cadherin in contact inhibition and cancer. *Oncogene* **37**: 4769-4780.
68. Matsui WH (2016). Cancer stem cell signaling pathways. *Medicine (Baltimore)*. **95**: S8–S19.
69. Mawrin C, Perry A (2010). Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. *J Neurooncol* **99**: 379-391.
70. Mazières J, Brugger W, Cappuzzo F, Middel P, Frosch A, Bara I, Klingelschmitt G, Klughammer B (2013). Evaluation of EGFR protein expression by immunohistochemistry using H-score and the magnification rule: re-analysis of the SATURN study. *Lung Cancer* **82**: 231–237.
71. Mendelsohn AH, Lai CK, Shintaku IP, Fishbein MC, Brugman K, Elashoff DA, Abemayor E, Dubinett SM, St John MA (2012). Snail as a novel marker for regional metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Otolaryngol* **33**: 6-13.
72. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**: 1215.
73. Mo Y, Wang Y, Zhang L, Yang L, Zhou M, Li X, Li Y, Li G, Zeng Z, Xiong W, Xiong F, Guo C (2019). The role of Wnt signaling pathway in tumor metabolic reprogramming. *J Cancer* **10**: 3789–3797.
74. de Moraes EF, Santos HBP, Cavalcante IL, Rabenhorst SHB, Santos JN dos, Galvão HC, Freitas RA (2019). Twist and E-cadherin deregulation might predict poor prognosis in lower lip squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* **127**: 318–329.
75. Mrachek EK, Davis D, Kleinschmidt-DeMasters BK (2015). Dual Use of E-Cadherin and D2-40 Immunostaining in Unusual Meningioma Subtypes. *Am J Clin Pathol* **144**: 923-34.



76. Mrozik KM, Blaschuk OW, Cheong CM, Zannettino ACW, Vandyke K (2018). N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC Cancer* **18**: 939.
77. Nagaishi M, Nobusawa S, Tanaka Y, Ikota H, Yokoo H, Nakazato Y (2012). Slug, Twist, and E-Cadherin as Immunohistochemical Biomarkers in Meningeal Tumors. *PLoS One* **7**: e46053.
78. Nakamura R, Ishii H, Endo K, Hotta A, Fujii E, Miyazawa K, Saitoh M (2018). Reciprocal expression of Slug and Snail in human oral cancer cells. *PLoS One* **13**: e0199442.
79. Nantajit D, Lin D, Li JJ (2015). The network of epithelial-mesenchymal transition: potential new targets for tumor resistance. *J Cancer Res Clin Oncol.* **141**: 1697-713.
80. Nasser MM, Mehdipour P (2017). Exploration of Involved Key Genes and Signaling Diversity in Brain Tumors. *Cell Mol Neurobiol* **38**: 393–419.
81. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD (2010). Genomic instability an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 220–228.
82. Ng LF, Kaur P, Bunnag N, Suresh J, Sung ICH, Tan QH, Gruber J, Tolwinski NS (2019). WNT Signaling in Disease. *Cells* **8**: pii: E826.
83. Nieto MA (2011). The Ins and Outs of the Epithelial to Mesenchymal Transition in Health and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**: 347–376.
84. Nikuševa-Martić T, Beroš V, Pećina-Šlaus N, Pećina HI, Bulić-Jakuš F. (2007). Genetic changes of CDH1, APC, and CTNNB1 found in human brain tumors. *Pathol Res Pract* **203**: 779–787.
85. Noelanders R, Vleminckx K (2016). How Wnt Signaling Builds the Brain: Bridging Development and Disease. *Neuroscientist* **23**: 314–329.
86. Nordfors K, Haapasalo J, Mäkelä K, Granberg KJ, Nykter M, Korja M, Paavonen T, Haapasalo H, Soini Y (2015). Twist predicts poor outcome of patients with astrocytic glioma. *J Clin Pathol* **68**: 905–912.
87. Norozi F, Ahmadzadeh A, Shahjehani M, Shahrabi S, Saki N (2016). Twist as a new prognostic marker in hematological malignancies. *Clin Transl Oncol* **18**: 113–124.
88. Oh KY, Yoon HJ, Lee JI, Ahn SH, Hong SD (2017). Twist and Snail expression in tumor and stromal cells of epithelial odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med* **46**: 127–133.
89. Oliva CA, Montecinos-Oliva C, Inestrosa NC (2018). Wnt Signaling in the Central Nervous System: New Insights in Health and Disease. *Prog Mol Biol Transl Sci* **153**: 81-130.
90. Panagopoulos AT, Lancellotti CLP, Veiga JCE, de Aguiar PH, Colquhoun A (2008). Expression of cell adhesion proteins and proteins related to angiogenesis and fatty acid metabolism in benign, atypical, and anaplastic meningiomas. *J Neurooncol* **89**: 73-87.
91. Panda M, Biswal BK (2019). Cell signaling and cancer: a mechanistic insight into drug resistance. *Mol Biol Rep* **46**: 5645–5659.
92. Pastushenko I, Blanpain C (2019). EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol* **29**: 212–226.

93. Pećina-Šlaus N, Kafka A, Lechpammer M (2016a). Molecular genetics of intracranial meningiomas with emphasis on canonical Wnt signalling. *Cancers (Basel)* **8**: pii: E67.
94. Pećina-Šlaus N, Cicvara-Pećina T, Kafka A (2012). Epithelial-to-mesenchymal transition: possible role in meningiomas. *Front Biosci (Elite Ed)* **4**: 889-896.
95. Pećina-Šlaus N, Kafka A, Bukovac A, Vladušić T, Tomas D, Hrašćan R (2017). Genetic changes of MLH1 and MSH2 genes could explain constant findings on microsatellite instability in intracranial meningioma. *Tumor Biol* **39**: 1010428317705791.
96. Pećina-Šlaus N, Kafka A, Vladušić T, Pećina HI, Hrašćan R (2016b). AXIN1 Expression and Localization in Meningiomas and Association to Changes of APC and E-cadherin. *Anticancer Res* **36**: 4583-4594.
97. Pećina-Šlaus N, Kljaić M, Nikuševa-Martić T (2005). Loss of heterozygosity of APC and CDH1 genes in laryngeal squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract* **201**: 557–563.
98. Pećina-Šlaus N, Nikuševa Martić TN, Deak AJ, Zeljko M, Hrašćan R, Tomas D, Musani V (2010). Genetic and protein changes of E-cadherin in meningiomas. *J Cancer Res Clin Oncol* **136**: 695-702.
99. Pereira BJA, Oba-Shinjo SM, de Almeida AN, Marie SKN (2019). Molecular alterations in meningiomas: Literature review. *Clin Neurol Neurosurg* **176**: 89–96.
100. Pérez-Magán E, Campos-Martín Y, Mur P, Fiaño C, Ribalta T, García JF, Rey JA, Rodríguez de Lope A, Mollejo M, Meléndez B (2012). Genetic alterations associated with progression and recurrence in meningiomas. *J Neuropathol Exp Neurol* **71**: 882–893.
101. Petrova YI, Schecterson L, Gumbiner BM (2016). Roles for E-cadherin cell surface regulation in cancer. *Mol Biol Cell* **27**: 3233–3244.
102. Pham MH, Zada G, Mosich GM, Chen TC, Giannotta SL, Wang K, Mack WJ (2011). Molecular genetics of meningiomas: A systematic review of the current literature and potential basis for future treatment paradigms. *Neurosurg Focus* **30**: E7.
103. Polakis P (2012). Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**: pii: a008052.
104. Preusser M, Brastianos PK, Mawrin C (2018). Advances in meningioma genetics: novel therapeutic opportunities. *Nat Rev Neurol* **14**: 106-115.
105. Priya TP, Kapoor VK, Krishnani N, Agrawal V, Agrawal S (2010). Role of E-cadherin gene in gall bladder cancer and its precursor lesions. *Virchows Arch* **456**: 507–514.
106. Proctor DT, Ramachandran S, Lama S, Sutherland GR (2018). Towards Molecular Classification of Meningioma: Evolving Treatment and Diagnostic Paradigms. *World Neurosurg* **119**: 366–373.
107. Pykett MJ, Murphy M, Harnish PR, George DL (1994). Identification of a Microsatellite Instability Phenotype in Meningiomas. *Cancer Res* **54**: 6340–6343.
108. Rai H, Ahmed J (2014). N-cadherin: a marker of epithelial to mesenchymal transition in tumor progression. *Internet J Oncol* **10**: 1–12.

109. Reszec J, Szkudlarek M, Hermanowicz A, Bernaczyk PS, Mariak Z, Chyczewski L (2015). N-cadherin, beta-catenin and connexin 43 expression in astrocytic tumours of various grades. *Histol Histopathol* **30**: 361-371.
110. Rodriguez FJ, Lewis-Tuffin LJ, Anastasiadis PZ (2012). E-cadherin's dark side: possible role in tumor progression. *Biochim Biophys Acta* **1826**: 23-31.
111. Rogers L, Barani I, Chamberlain M, Kaley TJ, McDermott M, Raizer J, Schiff D, Weber DC, Wen PY, Vogelbaum MA (2015). Meningiomas: Knowledge base, treatment outcomes, and uncertainties. A RANO review. *J Neurosurg* **122**: 4–23.
112. Rutkowski R, Chrzanowski R, Trwoga M, Kochanowicz J, Turek G, Mariak Z, Reszeć J (2018). Expression of N-cadherin and  $\beta$ -catenin in human meningioma in correlation with peritumoral edema. *Int J Neurosci* **128**: 805–810.
113. Saitoh M (2018). Involvement of partial EMT in cancer progression. *J Biochem* **164**: 257-264.
114. Sakai T, Nishida Y, Hamada S, Koike H, Ikuta K, Ota T, Ishiguro N (2017). Immunohistochemical staining with non-phospho  $\beta$ -catenin as a diagnostic and prognostic tool of COX-2 inhibitor therapy for patients with extra-peritoneal desmoid-type fibromatosis. *Diagn Pathol* **12**: 66.
115. Salem ME, Puccini A, Xiu J, Raghavan D, Lenz H, Korn WM, Shields AF, Philip PA, Marshall JL, Goldberg RM (2018). Comparative Molecular Analyses of Esophageal Squamous Cell Carcinoma, Esophageal Adenocarcinoma, and Gastric Adenocarcinoma. *Oncologist* **23**: 1319–1327.
116. Salvesen HB, MacDonald N, Ryan A, Iversen OE, Jacobs IJ, Akslen LA, Das S (2000). Methylation of hMLH1 in a population-based series of endometrial carcinomas. *Clin Cancer Res* **6**: 3607–3613.
117. Sarli L, Bottarelli L, Bader G, Iusco D, Pizzi S, Costi R, D'Adda T, Bertolani M, Roncoroni L, Bordi C (2004). Association between recurrence of sporadic colorectal cancer, high level of microsatellite instability, and loss of heterozygosity at chromosome 18q. *Dis Colon Rectum* **47**: 1467–1482.
118. Sarrió D, Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sánchez-Estévez C, Guo M, Herman JG, Gamallo C, Esteller M, Palacios J (2003). Epigenetic and genetic alterations of APC and CDH1 genes in lobular breast cancer: Relationships with abnormal E-cadherin and catenin expression and microsatellite instability. *Int J Cancer* **106**: 208–215.
119. Saydam O, Shen Y, Würdinger T, Senol O, Boke E, James MF, Tannous BA, Stemmer-Rachamimov AO, Yi M, Stephens RM, Fraefel C, Gusella JF, Krichevsky AM, Breakefield XO (2009). Downregulated MicroRNA-200a in Meningiomas Promotes Tumor Growth by Reducing E-Cadherin and Activating the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway. *Mol Cell Biol* **29**: 5923–5940.
120. Scheie D, Kufaiishi HHA, Broholm H, Lund EL, de Stricker K, Melchior LC, Grauslund M (2019). Biomarkers in tumors of the central nervous system – a review. *APMIS* **127**: 265–287.

121. Schulten HJ, Bangash M, Karim S, Dallol A, Hussein D, Merdad A, Al-Thoubaity FK, Al-Maghrabi J, Jamal A, Al-Ghamdi F, Choudhry H, Baeesa SS, Chaudhary AG, Al-Qahtani MH (2017). Comprehensive molecular biomarker identification in breast cancer brain metastases. *J Transl Med* **15**: 269.
122. Schwechheimer K, Zhou L, Birchmeier W (1998). E-Cadherin in human brain tumours: Loss of immunoreactivity in malignant meningiomas. *Virchows Arch* **432**: 163-167.
123. Sedgwick AE, D'Souza-Schorey C (2016). Wnt signaling in cell motility and invasion: Drawing parallels between development and cancer. *Cancers (Basel)* **8**: pii: E80.
124. Shaikh N, Dixit K, Raizer J (2018). Recent advances in managing/understanding meningioma. *F1000Res* **7** (F1000 Faculty Rev): 490.
125. Shimada S, Ishizawa K, Hirose T (2005). Expression of E-cadherin and catenins in meningioma: Ubiquitous expression and its irrelevance to malignancy. *Pathol Int* **55**:1-7.
126. Shinoura N, Paradies NE, Warnick RE, Chen H, Larson JJ, Tew JJ, Simon M, Lynch RA, Kanai Y, Hirohashi S, Hemperly JJ, Menon AG, Brackenburfy R (1995). Expression of N-cadherin and alpha-catenin in astrocytomas and glioblastomas. *Br J Cancer* **72**: 627–633.
127. Simon M, Kokkino AJ, Warnick RE, Tew JM, von Deimling A, Menon AG (1996). Role of genomic instability in meningioma progression. *Genes Chromosom Cancer* **16**: 265–269.
128. Smith BN, Odero-Marah VA (2012). The role of Snail in prostate cancer. *Cell Adh Migr* **6**: 433–441.
129. Soini Y, Rauramaa T, Alafuzoff I, Sandell PJ, Kärjä V (2010). Claudins 1, 11 and twist in meningiomas. *Histopathology* **56**: 821-824.
130. Soundararajan R, Fradette JJ, Konen JM, Moulder S, Zhang X, Gibbons DL, Varadarajan N, Wistuba II, Tripathy D, Bernatchez C, Byers LA, Chang JT, Contreras A, Lim B, Parra ER, Roarty EB, Wang J, Yang F, Barton M, Rosen JM, Mani SA (2019). Targeting the Interplay between Epithelial-to-Mesenchymal-Transition and the Immune System for Effective Immunotherapy. *Cancers (Basel)* **11**: pii: E714.
131. Stemmler MP (2008). Cadherins in development and cancer. *Mol Biosyst* **4**: 835–850.
132. Taciak B, Pruszyńska I, Kiraga L, Bialasek M, Krol M (2018). Wnt signaling pathway in development and cancer. *J Physiol Pharmacol* **69**: 185–196.
133. Takebayashi S, Hickson A, Ogawa T, Jung KY, Mineta H, Ueda Y, Grénman R, Fisher SG, Carey TE (2004). Loss of chromosome arm 18q with tumor progression in head and neck squamous cancer. *Genes Chromosom Cancer* **41**: 145–154.
134. Tang H, Massi D, Hemmings BA, Mandalà M, Hu Z, Wicki A, Xue G (2016). AKT-ions with a TWIST between EMT and MET. *Oncotarget* **7**: 62767–62777.
135. Tomlinson IPM, Novelli MR, Bodmer WF (1996). The mutation rate and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 14800–14803.
136. Tompa M, Kalovits F, Nagy A, Kalman B (2018). Contribution of the Wnt Pathway to Defining Biology of Glioblastoma. *Neuromolecular Med* **20**: 437–451.

137. Torrisi M, Kaleel M, Pollastri G (2019). Deeper Profiles and Cascaded Recurrent and Convolutional Neural Networks for state-of-the-art Protein Secondary Structure Prediction. *Sci Rep* **9**: 12374.
138. Vallée A, Lecarpentier Y, Vallée JN (2019). Targeting the Canonical WNT/ $\beta$ -Catenin Pathway in Cancer Treatment Using Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Cells* **8**: pii: E726.
139. VanderVorst K, Dreyer CA, Konopelski SE, Lee H, Ho HYH, Carraway KL 3rd (2019). Wnt/PCP signaling contribution to carcinoma collective cell migration and metastasis. *Cancer Res* **79**: 1719–1729.
140. Vladušić T, Hrašćan R, Vrhovac I, Krušlin B, Gamulin M, Grgić M, Pećina-Šlaus N, Franekić Čolić J (2010). Loss of heterozygosity of selected tumor suppressor genes in human testicular germ cell tumors. *Pathol Res Pract* **206**: 163–167.
141. Wallesch M, Pachow D, Blücher C, Firsching R, Warnke JP, Braunsdorf WEK, Kirches E, Mawrin C (2017). Altered expression of E-Cadherin-related transcription factors indicates partial epithelial-mesenchymal transition in aggressive meningiomas. *J Neurol Sci* **380**: 112–121.
142. Wang D, Rai B, Qi F, Liu T, Wang J, Wang X, Ma B (2018). Influence of the twist gene on the invasion and metastasis of colon cancer. *Oncol Rep* **39**: 31–44.
143. Wang N, Osswald M (2018). Meningiomas: Overview and New Directions in Therapy. *Semin Neurol* **38**: 112–120.
144. Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR (2008). Cadherin switching. *J Cell Sci* **121**: 727–735.
145. Wiese KE, Nusse R, van Amerongen R (2018). Wnt signalling: Conquering complexity. *Development* **145**: pii: dev165902.
146. Wirtz HC, Müller W, Noguchi T, Scheven M, Rüschoff J, Hommel G, Gabbert HE (1998). Prognostic value and clinicopathological profile of microsatellite instability in gastric cancer. *Clin Cancer Res* **4**: 1749–1754.
147. Wong SHM, Fang CM, Chuah LH, Leong CO, Ngai SC (2018). E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol* **121**: 11–22.
148. Wrobel G, Roerig P, Kokocinski F, Neben K, Hahn M, Reifenberger G, Lichter P (2005). Microarray-based gene expression profiling of benign, atypical and anaplastic meningiomas identifies novel genes associated with meningioma progression. *Int J Cancer* **14**: 249-56.
149. Xiong Y, Liu L, Zhu S, Zhang B, Qin Y, Yao R, Zhou H, Gao DS (2017). Precursor N-cadherin mediates glial cell line-derived neurotrophic factor-promoted human malignant glioma. *Oncotarget* **8**: 24902–24914.
150. Yamamoto H, Imai K (2015). Microsatellite instability: an update. *Arch Toxicol* **89**: 899–921.

151. Yang G, Shen T, Yi X, Zhang Z, Tang C, Wang L, Zhou Y, Zhou W (2018). Crosstalk between long non-coding RNAs and Wnt/ $\beta$ -catenin signalling in cancer. *J Cell Mol Med* **22**: 2062–2070.
152. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* **117**: 927–939.
153. Zañudo JGT, Guinn MT, Farquhar K, Szenk M, Steinway SN, Balázs G, Albert R (2019). Towards control of cellular decision-making networks in the epithelial-to-mesenchymal transition. *Phys Biol* **16**: 031002.
154. Zhang K, Zhang J, Han L, Pu P, Kang C (2012). Wnt/beta-catenin signaling in glioma. *J Neuroimmune Pharmacol* **7**: 740–749.
155. Zhang P, Hu P, Shen H, Yu J, Liu Q, Du J (2014). Prognostic role of Twist or Snail in various carcinomas: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Invest* **44**: 1072–1094.
156. Zhao Z, Rahman MA, Chen ZG, Shin DM (2017). Multiple biological functions of Twist1 in various cancers. *Oncotarget* **8**: 20380–20393.
157. Zhou K, Wang G, Wang Y, Jin H, Yang S, Liu C (2010). The potential involvement of E-cadherin and beta-catenins in meningioma. *PLoS One* **5**: e11231.
158. Zhu QQ, Ma C, Wang Q, Song Y, Lv T (2016). The role of TWIST1 in epithelial-mesenchymal transition and cancers. *Tumor Biol* **37**: 185–197.

## 9. ŽIVOTOPIS

Anja Bukovac rođena je 30. listopada 1988. u Zagrebu, gdje završava osnovnu školu i opću gimnaziju. Diplomirala je 2012. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, te stekla naziv magistre ekologije i zaštite prirode. Poslijediplomski doktorski studij Biologija upisuje 2015. godine na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te počinje s izradom disertacije pod mentorstvom prof.dr.sc. Nives Pećine-Šlaus. Od 2016. godine zaposlena je kao znanstveni suradnik/asistent na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom svog zaposlenja bila je suradnik na jednom domaćem i jednom projektu financiranom iz sredstava EU. 2017. sudjeluje na ljetnoj školi pod nazivom „Essential Molecular Biology – A hands-on laboratory course“ pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Portu (Portugal). Sudjeluje u nastavi na dva kolegija na dodiplomskom studiju, te na dva kolegija na poslijediplomskim studiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom svog rada na Medicinskom fakultetu aktivno je sudjelovala na 21 međunarodnoj i domaćoj konferenciji s 25 izlaganja, prvi je autor jednog znanstvenog rada, te koautor na pet znanstvenih radova, tri stručna rada i jednom poglavlju u knjizi. Prema bazi WoS do sada je citirana 10 puta, a h-indeks joj iznosi 2. Također, jedna je od organizatora radionice pod nazivom „WNT4EMT – Uloga signalnog puta WNT u epitelno-mezenhimske tranziciji“. Članica je nekoliko međunarodnih i domaćih znanstvenih i stručnih organizacija za neuroznanost i istraživanje karcinoma. Od 2019. godine sudjeluje na radionicama Festivala znanosti i Tjedna mozga s ciljem popularizacije znanosti.

## PRILOG 1 Pregled patohistoloških parametara prikupljenih uzoraka meningeoma.

	Uzorak	Spol	Dob	Gradus	Patohistološki tip	Lokacija
1	T8	M	66	I	Angiomatozni	Pontocerebelarni kut
2	T9	M	72	I	Meningotelijalni	Fronto-parijetalno L
3	T12	M	54	I	Fibrozni	Parijetalno L
4	T21	Ž	70	I	Meningotelijalni	Stražnja lubanjska jama
5	T24	Ž	63	I	Fibrozni	Fronto-temporalno D
6	T25	Ž	62	I	Meningotelijalni	Parijetalno D
7	T29	M	65	I	Meningotelijalni	Temporalno L
8	T32	M	35	I	Meningotelijalni	Parijeto-okcipitalno L
9	T35	M	64	I	Meningotelijalni	Parijetalno D
10	T36	M	45	I	Fibrozni	Stražnja lubanjska jama
11	T45	Ž	55	I	Meningotelijalni	Temporalno D
12	T53	Ž	47	I	Meningotelijalni	Parijetalno L
13	T56	Ž	51	I	Fibrozni	Pontocerebelarni kut
14	T64	Ž	70	I	Angiomatozni	Frontalno L
15	T77	Ž	69	I	Meningotelijalni	Temporalno L
16	T78	Ž	71	III	Anaplastični	Parijeto-okcipitalno L
17	T81	M	61	I	Tranzicionalni	Pontocerebelarni kut
18	T83	Ž	56	I	Tranzicionalni	Frontalno L
19	T89	M	45	I	Tranzicionalni	Pontocerebelarni kut
20	T241	Ž	74	I	Tranzicionalni	Sfenoidalno D
21	T243	M	73	II	Atipični	Parijeto-okcipitalno D
22	T245	Ž	62	I	Meningotelijalni	Parijetalno L
23	T246	M	75	I	Tranzicionalni	Parijetalno D
24	T247	M	32	I	Tranzicionalni	Frontalno L
25	T248	M	77	I	Tranzicionalni	Baze lubanje
26	T249	Ž	66	I	Fibrozni	Pontocerebelarni kut L
27	T251	Ž	71	I	Tranzicionalni	Frontalno D
28	T252	Ž	64	I	Tranzicionalni	Okcipitalno D
29	T253	M	71	I	Meningotelijalni	Fronto-temporalno D
30	T254	Ž	66	I	Tranzicionalni	Okcipitalno L
31	T255	Ž	73	I	Tranzicionalni	Fronto-parijetalno L
32	T256	Ž	67	II	Atipični	Parijetalno L
33	T259	Ž	79	I	Tranzicionalni	Parasagitalno L
34	T260	M	40	I	Meningotelijalni	Frontalno L
35	T262	Ž	63	I	Meningotelijalni	Baza lubanje D
36	T264	Ž	61	I	Tranzicionalni	Frontalno D
37	T266	M	67	III	Anaplastični	Okcipitalno D



## PRILOG 1 – nastavak. Pregled patohistoloških parametara prikupljenih uzoraka meningeoma.

	Uzorak	Spol	Dob	Gradus	Patohistološki tip	Lokacija
38	T268	Ž	64	I	Psamomatozni	Selarna regija
39	T269	M	66	I	Fibrozni	Okcipitalno D
40	T272	M	66	I	Tranzicionalni	Fronto-temporalno L
41	T273	Ž	35	I	Tranzicionalni	Incizura tentorija
42	T276	Ž	58	I	Tranzicionalni	Incizura tentorija
43	T285	Ž	68	I	Fibrozni	Okcipitalno D
44	T286	Ž	46	I	Tranzicionalni	Frontalno D
45	T287	Ž	71	I	Meningotelijalni	Baza lubanje
46	T291	Ž	55	I	Psamomatozni	Frontalno L
47	T294	Ž	78	I	Psamomatozni	Parijeto-okcipitalno L
48	T295	Ž	55	I	Psamomatozni	Temporalno D
49	T297	M	77	I	Meningotelijalni	Fronto-bazalno obostrano
50	T324	Ž	48	I	Meningotelijalni	Temporalno L
51	T325	Ž	43	I	Meningotelijalni	Petroklivalno L
52	T328	Ž	37	I	Meningotelijalni	Frontalno L
53	T331	M	60	II	Atipični	Frontalno L
54	T334	Ž	59	I	Fibrozni	Retrosigmoidno L
55	T409	Ž	61	II	Atipični	Pontocerebelarno L
56	T430	M	40	II	Atipični	Frontalno L; R
57	T443	Ž	69	II	Atipični	Parijetalno D
58	T444	M	41	II/III	Atipični/anaplastični	Srednja lubanjska jama sa širenjem
59	T451	Ž	38	II	Atipični	Temporalno L sa širenjem u pterigopalatinalnu jamu
60	T452	Ž	64	II	Atipični	Parasagitelno-parijetalno L; R
61	T453	M	76	II	Atipični	Frontalno L
62	T454	M	69	II	Atipični	Frontalno D
63	T455	M	57	II	Atipični	Parijetalno D
64	T456	M	64	II	Atipični	Sfenoidalni greben
65	T458	Ž	40	II	Atipični	Fronto-temporalno D
66	T459	Ž	30	II	Atipični	Frontalno L
67	T460	M	67	II	Atipični	Frontalno D
68	T461	M	73	II	Atipični	Frontalno L; R gradusa I
69	T462	Ž	58	II	Atipični	Fronto-temporalno D
70	T479	Ž	23	III	Anaplastični	Temporo-parijetalno D
71	T481	M	85	III	Anaplastični	Fronto-temporalno D
72	T482	Ž	74	III	Anaplastični	Pontocerebelarni kut D i moždano deblo

Legenda: M – muško; Ž – žensko; D – desno; L – lijevo; R-recidiv

**PRILOG 2 Rezultati genetičkih analiza mikrosatelitne nestabilnosti i gubitka heterozigotnosti gena *CDH1* i *CDH2*.**

Uzorak	E-kadherin ( <i>CDH1</i> )			N-kadherin ( <i>CDH2</i> )		
	D16S752	D16S3025	UKUPNO	D18S66	D18S819	UKUPNO
T8	MSI	MSI	MSI	MSI	MSI	MSI
T9	MSI	HETERO	MSI	LOH A.I.	MSI	MSI i LOH A.I.
T12	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	LOH A.I.	LOH A.I.
T21	HETERO	LOH	LOH	LOH	MSI	MSI i LOH
T24	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	MSI
T25	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
T29	MSI	HETERO	MSI	MSI	MSI i LOH	MSI i LOH
T32	MSI	HOMO	MSI	HETERO	LOH	LOH
T35	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
T36	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	LOH	LOH
T45	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	MSI
T53	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
T56	LOH	LOH	LOH	MSI	MSI	MSI
T64	MSI	MSI	MSI	MSI	MSI i LOH A.I.	MSI i LOH A.I.
T77	HETERO	HOMO	HETERO	ND	ND	ND
T78	MSI	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HETERO
T81	HETERO	HETERO	HETERO	ND	ND	ND
T83	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
T89	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
T241	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	HETERO	MSI
T243	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
T245	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
T246	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	MSI
T247	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	MSI
T248	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	HETERO	MSI
T249	HOMO	HETERO	HETERO	MSI	MSI	MSI
T251	HETERO	HETERO	HETERO	LOH	MSI	MSI i LOH
T252	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
T253	HOMO	HETERO	HETERO	MSI	MSI	MSI
T254	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
T255	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
T256	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
T259	LOH A.I.	HETERO	LOH A.I.	MSI	MSI	MSI
T260	HOMO	HETERO	HETERO	MSI	HETERO	MSI
T262	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	HETERO	MSI
T264	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	MSI	MSI
T266	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	MSI	MSI
T268	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
T269	HETERO	HOMO	HETERO	HETERO	MSI	MSI
T272	MSI	HETERO	MSI	LOH	LOH	LOH

**PRILOG 2 – nastavak. Rezultati genetičkih analiza mikrosatelitne nestabilnosti i gubitka heterozigotnosti gena *CDH1* i *CDH2*.**

Uzorak	E-kadherin ( <i>CDH1</i> )			N-kadherin ( <i>CDH2</i> )		
	D16S752	D16S3025	UKUPNO	D18S66	D18S819	UKUPNO
T273	LOH	HETERO	LOH	HETERO	MSI	MSI
T276	HETERO	HOMO	HETERO	MSI	MSI	MSI
T285	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	MSI
T286	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	LOH	LOH
T287	MSI	HETERO	MSI	HETERO	MSI	MSI
T291	MSI	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HETERO
T294	MSI	HETERO	MSI	HETERO	HETERO	HETERO
T295	MSI	MSI	MSI	LOH	HETERO	LOH
T297	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
T324	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
T325	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	HETERO	MSI
T328	LOH A.I.	LOH	LOH	MSI	MSI i LOH A.I.	MSI i LOH A.I.
T331	LOH A.I.	LOH A.I.	LOH A.I.	MSI	HETERO	MSI
T334	MSI	MSI	MSI	MSI	HETERO	MSI
T409	MSI	MSI	MSI	MSI	MSI	MSI
T430	LOH A.I.	HETERO	LOH A.I.	HETERO	HETERO	HETERO
T443	MSI	MSI i LOH	MSI i LOH	LOH	LOH	LOH
T444	MSI	MSI i LOH	MSI i LOH	MSI	MSI i LOH A.I.	MSI i LOH A.I.
T451	HETERO	HOMO	HETERO	MSI	HETERO	MSI
T452	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
T453	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	MSI	MSI
T454	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	MSI	MSI
T455	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
T456	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	LOH A.I.	MSI i LOH A.I.
T458	HETERO	HOMO	HETERO	HETERO	MSI i LOH	MSI i LOH
T459	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
T460	HETERO	LOH	LOH	MSI i LOH	HETERO	MSI i LOH
T461	HETERO	HOMO	HETERO	MSI	HETERO	MSI
T462	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	LOH A.I.	MSI i LOH A.I.
T479	LOH	HETERO	LOH	LOH A.I.	LOH A.I.	LOH A.I.
T481	MSI	MSI	MSI	MSI i LOH	MSI i LOH	MSI i LOH
T482	HETERO	HETERO	HETERO	MSI	LOH A.I.	MSI i LOH A.I.

HETERO – heterozigot bez zabilježenih genetskih promjena; HOMO – homozigot; MSI – mikrosatelitna nestabilnost; LOH – gubitak heterozigotnosti; LOH A.I. – gubitak nestabilnosti kroz nejednakost alela; ND- nije definirano

### PRILOG 3 Rezultati analize proteinske ekspresije.

U tablici su prikazani rezultati analize ekspresije proteina E-kadherin, N-kadherin,  $\beta$ -katenin, nefosforilirani oblik  $\beta$ -katenina (NON-P  $\beta$ -katenin), TWIST1, SNAIL i SLUG, odnosno procjene intenziteta imunopozitiviteta u citoplazmi stanica iskazane H-zbrojem (vrijednosti od 0 do 300), te postotak jezgara u vidnom polju koje ekspimiraju SNAIL i SLUG.

Uzorak	E-kadherin	N-kadherin	NON-P $\beta$ -katenin	$\beta$ -katenin	TWIST1	SNAIL i SLUG	SNAIL i SLUG jezgre
T8	30	120	20	10	1	130	/
T9	2	0	0	5	260	5	/
T12	3	120	30	5	242	160	30%
T21	140	10	40	40	152	90	/
T24	0	0	5	60	22	130	/
T25	5	200	115	115	243,5	210	10%
T29	95	120	40	140	185	235	/
T32	150	5	60	90	222	235	5%
T35	0	110	1	5	160	140	/
T36	136	115	165	95	235	270	30%
T45	25	120	0	5	94	280	/
T53	0	40	50	10	225	200	10%
T56	0	5	5	135	260	150	10%
T64	0	10	40	40	166	10	/
T77	25	105	80	45	254	210	/
T78	45	40	14	60	285,5	285	/
T81	65	95	105	120	134	235	/
T83	0	50	2	5	221	240	/
T89	0	145	210	180	267	270	/
T241	0	2	215	131	280	240	10%
T243	190	90	120	60	201	280	/
T245	1	115	30	40	182	150	/
T246	1	90	14	50	139	190	10%
T247	120	110	5	56	163	230	30%
T248	0	110	140	25	291	165	/
T249	0	130	70	10	202	80	/
T251	0	5	80	20	151	270	20%
T252	10	10	60	10	5	130	/
T253	1	10	35	5	255	290	10%
T254	110	60	40	30	161	160	/
T255	60	5	5	50	255	235	5%
T256	0	205	105	30	276	290	/
T259	80	100	110	124	2	115	/
T260	85	0	40	110	268	125	30%
T262	145	115	50	5	5	120	/

### PRILOG 3 – nastavak. Rezultati analize proteinske ekspresije.

Uzorak	E-kadherin	N-kadherin	NON-P β-katenin	β-katenin	TWIST1	SNAIL i SLUG	SNAIL i SLUG jezgre
T264	0	70	95	5	210	70	/
T266	145	204	225	181	254	280	30%
T268	40	30	175	40	106	235	20%
T269	60	60	60	116	191	160	/
T272	0	60	5	80	241	220	30%
T273	1	50	155	5	188	200	/
T276	0	120	175	140	257	135	/
T285	5	90	80	200	191	55	/
T286	30	100	80	80	257	30	/
T287	200	5	54	15	232	200	5%
T291	0	1	90	60	231	140	/
T294	100	280	60	210	246	170	/
T295	0	20	70	180	213	235	/
T297	65	193	80	175	224	70	/
T324	10	135	30	5	246	110	10%
T325	130	230	180	190	232	130	/
T328	0	5	0	40	228	220	10%
T331	0	2	10	20	270,5	210	30%
T334	2	2	90	130	275	250	>50%
T409	55	141	215	200	254	260	40%
T430	90	120	124	165	178	180	10%
T443	2	50	121	95	238	240	>50%
T444	2	20	215	230	222	200	>50%
T451	0	177	180	155	197	230	5%
T452	80	115	100	230	229	230	20%
T453	5	45	50	50	64	180	>50%
T454	40	140	110	120	267	190	10%
T455	70	220	110	170	42	180	30%
T456	100	10	190	210	242	210	30%
T458	50	0	100	80	266	255	>50%
T459	190	25	150	195	261	250	5%
T460	100	10	90	130	253	290	>50%
T461	30	103	181	190	191	175	/
T462	160	105	100	235	244	245	40%
T479	0	90	60	60	162	200	40%
T481	0	110	10	10	137	200	>50%
T482	230	130	230	270	236	290	10%