

Klinička važnost izražaja metiltransferaze EZH2 i demetilaze histona H3 JMJD3 u karcinomima pločastih stanica hipofarinksa

Pegan, Alan

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:665767>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



Sveučilište u Zagrebu

Medicinski fakultet

ALAN PEGAN

**Klinička važnost izražaja metiltransferaze
EZH2 i demetilaze histona H3 JMJD3 u
karcinomima pločastih stanica
hipofarinksa**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2017.

Doktorski rad je izrađen u Zavodu za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, i u Klinici za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak“, Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice.

Voditelji rada: prof. dr. sc. Koraljka Gall Trošelj, prof. dr. sc. Mirko Ivkić

POPIS OZNAKA I KRATICA

AEBP2- od engl. Adipocyte Enhancer-Binding Protein

AJCC - Američko zajednički odbor za rak (od engl. American Joint Committee on Cancer)

Ala- alanin

ARE/EpRE- od engl. Antioxidant Response Elements/ Electrophile Response Element

BAX – od engl. Bcl2-associated X protein

BD- od engl. Basic Domain

BMI1- od engl. B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1

CBX- od engl. Chromobox

CD95 – od engl. Cluster of Differentiation 95

CDK- od engl. Cyclin Dependent Kinase

CpG- citozin- fosfat-gvanin

CT- kompjuterizirana tomografija

DBD- od engl. DNA- Binding Domain

DNA- od engl. Deoxyribonucleic acid

DNMT- DNA- metiltransferaza

DZNep-3- od engl. Deazaneplanocin A

EED- od engl. Embryonic Ectoderm Development

EMT- od engl. epithelial-mesenchymal transition

EZH- od engl. Enhancer of Zeste Homologs

FDG-PET- pozitronska emisijska tomografija s 18-fluorodeoksiglukozom

G- gradus tumora po Brodersu

Glu- glutaminska kiselina

H- histon

H3K27- lizin 27 u histonu H3

HAT- acetiltransferaza histona (od engl. Histone Acetyltransferaze)

HDAC- deacetilaza histona (od engl. Histone Deacetylase)

HDMT- demetilaza histona (od engl. Histone Demethyltransferaze)

His- histidin

HMT- metiltrasferaza histona (od engl. Histone methyltransferaze)

HOTAIR- od engl. HOX Antisense Intergenic RNA

HPV- od engl. Human Papilloma Virus

ICF- imunodeficijencija (od engl. Immunodeficiency), nestabilnost centromera (od engl. Centromere Instability), razvojne anomalije lica (od engl. Facial Anomalies)

JARID2- engl. Jumonji- and ARID-domain-containing protein

JMJD3 – od engl. Jumonji Domain Containing Protein 3

LOH- od engl. Loss of Heterozygosity

LSD1- od engl Lysine Specific Demethylase 1

MDM2- od engl. Murine Double Minute 2

MICU1- od engl Mitochondrial Calcium Uptake 1

mi-RNA- nekodirajuća mala molekula RNA

MR- magnetska rezonanca

mTOR- od engl. mammalian target of rapamycin

Myc- od engl. v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog

NCCN- od engl. National Comprehensive Cancer Network (NCCN)

NLS- od engl. Nuclear Localization Signal

NNK- 4 metilnitrozamino – 1 – (3 piridil) – 1 – butanon

NNN- N- nitrosonornikotin

NRFF- od engl. NF-E2-related factor 2

NSCLC- od engl. non-small cell lung cancer

OD- od engl. Oligomerization Domain

p21^{WAF1} – od engl. cyclin-dependent kinase inhibitor 1

PcG- od engl. Polycomb Group Protein

PCGF- od engl. Polycomb-group RING Finger

PCL- od engl. Polycomblike

PCST- od engl. Pearson's chi-squared test

PRC- od engl. Polycomb Repressive Complex

PRD- od engl. Proline Rich Domain

RbAP48- od engl. Retinoblastoma binding protein

RING1- od engl. Really interesting new gene 1

RNA- od engl. ribonucleic acid

SCHM1- od engl. Sex Comb on Midleg Homolog 1

SIRT1- - sirtuin (od engl. Silent Mating type Information Regulation 2 Homolog) 1

Suz12- od engl. Suppressor of Zeste 12

SV40- od engl. Simian Virus 40

TAD- od engl. Transactivation Domain

TGF- β - od engl. transforming growth factor beta

TNM– klasifikacija proširenosti tumora (od engl. Tumor, Lymph Node metastasis, Distant Metastasis)

TrxG- engl. Trithorax Group Protein

UPD- engl. unipaternal disomy

WHO- IARC – od engl. World Health Organization; International Agency for Research on Cancer

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Anatomija ždrijela	1
1.1.1. Anatomija hipofarinks	1
1.2. Histološka građa ždrijela	2
1.3. Epidemiologija zloćudnih tumora glave i vrata	3
1.3.1 Epidemiologija karcinoma hipofarinksa	4
1.4. Etiološki čimbenici u nastanku zloćudnog tumora hipofarinksa	4
1.4.1. Vanjski etiološki čimbenici	5
1.4.1.1. Pušenje	5
1.4.1.2. Alkohol	5
1.4.1.3. Papiloma virus čovjeka (HPV)	6
1.4.2. Unutarnji etiološki čimbenici	8
1.4.2.1. Sindrom Plummer Vinson	8
1.5. Karcinom hipofarinksa	8
1.5.1. Simptomi	8
1.5.2. Klinički pregled	9
1.5.3. Slikovne metode	9
1.5.4. Klasifikacija TNM i klasifikacija po Brodersu	10
1.5.5. Liječenje karcinoma hipofarinksa	12
1.5.6. Preživljenje	14
1.6. Uvod u epigenetiku	15
1.6.1. Metilacija molekule DNA	15
1.6.1.1. Uloga promijenjenog obrasca metilacije DNA u karcinogenezi	16
1.6.2. Posttranslacijske promjene histona	17
1.6.2.1. Metilacija lizina u histonu H3	18
1.6.2.1.1. Enzimi koji sudjeluju u modifikaciji histona metilacijom	18
1.6.2.1.2. Skupina proteina Polikomb	19
1.6.2.1.3. Polikomb represivni kompleks 1	19
1.6.2.1.4. Polikomb represivni kompleks 2	21

1.6.2.1.5. Gen i protein <i>EZH2</i>	22
1.6.2.1.5.1. Mutacije gena <i>EZH2</i>	23
1.6.2.1.5.2. Posttranslacijske modifikacije <i>EZH2</i>	24
1.6.2.1.5.3. Mehanizam djelovanja <i>PRC2</i>	25
1.6.2.1.5.4. Aktivnost kompleksa <i>PRC2</i> u karcinomima	27
1.6.2.1.5.4.1. <i>EZH2</i> u karcinomima glave i vrata	28
1.6.2.1.6. Obitelj demetilaze histona	31
1.6.2.1.6.1. Gen i protein <i>JMJD3/KDM6B</i>	32
1.6.2.1.6.2. Mehanizam djelovanja <i>JMJD3</i>	33
1.6.2.1.6.3. <i>JMJD3</i> u karcinomima	34
1.7. Tumor supresorski gen <i>TP53</i>	34
1.7.1. Povijesni pregled	34
1.7.2. Gen i protein <i>TP53</i>	35
1.7.3. Obitelj gena <i>TP53</i>	37
1.7.4. Mutacije gena <i>TP53</i>	38
1.7.5. Biološka funkcija proteina p53	41
1.7.6. Uloga p53 kao tumor supresorskog proteina	41
1.7.7. <i>TP53</i> u zloćudnim tumorima glave i vrata	42
2. Hipoteza	44
3. Ciljevi rada	45
3.1. Opći cilj	45
3.2. Specifični ciljevi	45
4. Bolesnici, materijali i metode	46
4.1. Bolesnici	46
4.2. Materijali -kemikalije i puferi	47
4.2.1. Izdvajanje genomske DNA	47
4.2.2. Izdvajanje ukupne RNA	47
4.2.3. Obrnuto prepisivanje	47
4.2.4. Lančana reakcija polimeraze (PCR) i elektroforeza u gelu agaroze	48
4.2.5. Restriksijske endonukleaze	49
4.2.6. Elektroforeza i bojanje DNA u gelu poliakrilamida	49

4.2.7. Pročišćavanje PCR produkata za sekvenciranje	49
4.2.8. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu	50
4.2.9. Reakcija imunohistokemije	50
4.3. Metode	51
4.3.1. Izdvajanje nukleinskih kiselina	51
4.3.1.1. Izdvajanje genomske DNA	51
4.3.1.2. Izdvajanje ukupne RNA	51
4.3.2. Određivanje koncentracije i provjera kvalitete izdvojenih nukleinskih kiselina spektrofotometrijom i elektroforezom u gelu agaroze	52
4.3.3. Obrnuto prepisivanje	53
4.3.4. Provjera uspješnosti prepisivanja mRNA u cDNA i postojanje kontaminirajuće DNA	53
4.3.5. Određivanje heterozigotnosti korištenjem polimorfnih restrikcijskih mjesta za <i>TP53</i> i sekvenciranjem	54
4.3.6. Jedinstvena reakcija koamplifikacije nekoliko gena	55
4.3.7. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)	56
4.3.7.1. Interpretacija rezultata qRT-PCR	57
4.3.8. Izraženost i lokalizacija proteina EZH2, JMJD3 i p53	58
4.4. Statistička obrada podataka	59
5. Rezultati	60
5.1. Obrada podataka vezana uz kliničke parametre	60
5.1.1. Razdioba bolesnika prema dobi i praćenju	60
5.1.2. Preživljenje bolesnika u odnosu na dob	61
5.1.3. Razdioba uzoraka u odnosu na veličinu tumora i zahvaćenost limfnih čvorova	62
5.1.4. Utjecaj parametara „T“ i „N“ na preživljenje bolesnika	64
5.1.5. Razdioba uzoraka u odnosu na stupanj diferencijacije	65
5.1.6. Analiza izražaja EZH2, JMJD3 i p53	66
5.1.6.1. Izraženost i značaj EZH2, JMJD3 i p53 u odnosu na parametar cT	66
5.1.6.2. Izraženost i značaj EZH2, JMJD3 i p53 u odnosu na parametar pT	69
5.1.6.3. Izraženost i značaj EZH2, JMJD3 i p53 u odnosu	

na gradus tumora	71
5.1.6.4. Izraženost i značaj EZH2, JMJD3 i p53 u odnosu na parametar cN	72
5.1.6.5. Izraženost i značaj EZH2, JMJD3 i p53 u odnosu na parametar pN	74
5.2. Molekularno-gentičke analize na razini DNA i RNA	78
5.2.1. Izdvajanje nukleinskih kiselina	78
5.2.1.1. Izdvajanje DNA	78
5.2.1.2. Izdvajanje RNA	78
5.2.2. Provjera uspešnosti obrnutog prepisivanja umnažanjem dva ubikvitarno („housekeeping“) ispoljena gena – <i>GAPDH</i> i <i>PAPOLA</i>	79
5.2.3. Provjera prisutnosti kontaminirajuće genomske DNA umnažanjem dijela gena <i>GAPDH</i> korištenjem početnice komplementrane slijedu nukleotida u intronu	81
5.2.4. Analiza gubitka heterozigotnosti gena <i>TP53</i> – analiza na razini DNA	81
5.2.4.1. Sekvenciranje uzoraka za potvrdu gubitka heterozigotnosti	82
5.2.5. Izdvajanje najčešćih mutacija u genu <i>TP53</i> u karcinomima hipofarinksa	85
5.2.6. Promjera omjera izražaja mRNA <i>EZH2</i> i <i>JMJD3</i> u karcinomima hipofarinksa primjenom koamplifikacijskog protokola	86
5.2.6.1. Koamplifikacijski protokol i detekcija signala u gelu agaroze	86
5.2.6.2. Određivanje omjera razine ispoljenosti <i>EZH2</i> i <i>JMJD3</i> u tkivima netumora i tumora u gelu poliakrilamida obojnim srebrom	88
5.2.6.3. Određivanje omjera transkripata <i>EZH2/JMJD3</i> u tkivima netumora i tumora lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu	89
5.3. Multivarijantna analiza prognostičkih čimbenika	90
6. Rasprava	93
6.1. Kliničko-patološki parametri i preživljenje bolesnika	93
6.2. Značaj izražaja <i>EZH2</i>	95
6.3. Značaj izražaja p53	98
6.4. Značaj izražaja <i>JMJD3</i>	102

6.5. Značaj multivarijantne analize	104
7. Zaključak	105
8. Sažetak	106
9. Summary	107
10. Literatura	108
11. Životopis	134

1. UVOD

1.1 Anatomija ždrijela

Ždrijelo je mišićno-membranozna cijev. Anatomski, u duljini od 12-13 cm, čini dio probavnog i dišnog puta koji se pruža od baze lubanje do ušća u jednjak. Podijeljeno je u tri dijela: gornji dio (*epipharynx* ili *nasopharynx*), srednji dio (*mesopharynx* ili *oropharynx*) i donji dio (*hypopharynx*). Sva tri dijela imaju otvor koji ih povezuje s prostorom prema sprijeda, što im daje važnu ulogu u fiziologiji gutanja i disanja. U anglosaksonskoj literaturi često se spominje naziv “*aerodigestive crossing*” – čime se opisuje kretanje zalogaja i zraka ždrijelom u jednjak, odnosno – grkljan (1).

Gornji se dio ždrijela proteže od baze lubanje do, prilikom gutanja, vodoravno postavljene stražnje plohe mekog nepca. Prema sprijeda je, preko koana, u doticaju s nosnim hodnicima, a na bočnim stijenkama se nalaze otvori slušne cijevi, *ostium pharyngeum tubae auditivae*.

Srednji se dio ždrijela proteže od stražnjeg ruba mekog nepca do mjesta na kojem sluznica ždrijela pristupa na poklopac grkljana, *epiglottis*. Sprijeda se u ovaj dio ždrijela otvara *isthmus faucium*. U donjem dijelu je *epiglottis*, koji je korijenom jezika povezan s naborima, *plicae glossoepiglotticae*. Bočno su dva luka, *arcus palatoglossus* i *arcus palatopharyngeus*, između kojih su smješteni parni krajnici nepca.

Donji se dio ždrijela, *hypopharynx* (slika 1), pruža od gornjeg dijela jezične kosti do donjeg dijela prstenaste hrskavice, u područje koje se nastavlja u vratni dio jednjaka. Na prednjoj se stijenci nalazi ulaz u grkljan, *aditus laryngis*, omeđen sprijeda i gore epiglotisom, sa strane naborima, *plicae aryepiglotticae*, a straga i dolje rubovima ureza, *incisura interarytenoidea*. Ždrijelni lukovi od kojih nastaje hipofarinks (četvrti i šesti) nastaju od stanica neuralnog grebena, a počinju se razvijati početkom četvrtog tjedna embrionalnog života (2).

1.1.1. Anatomija hipofarinksa

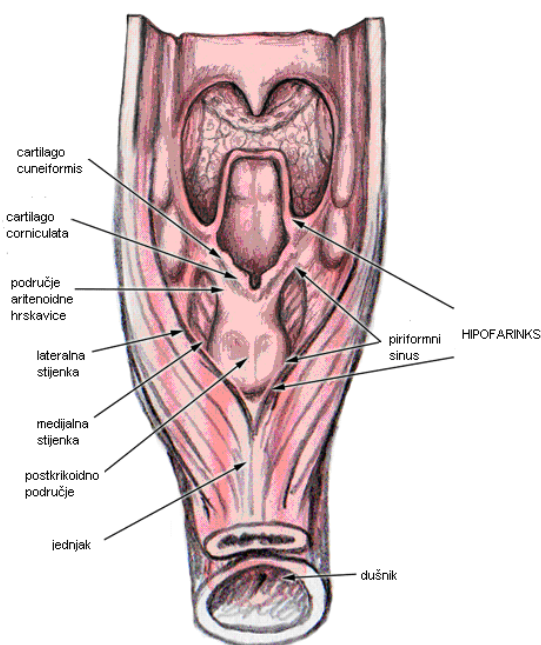
Hipofarinks, je funkcionalno-anatomski podijeljen u tri podjedinice: 1. piriformni sinus; 2. stražnja stijenka ždrijela i 3. postkrikoidno područje.

1. Parni piriformni sinusi čine bočne dijelove donjeg dijela ždrijela - od faringoepiglottičkog nabora do razine glasiljki. Nastaju zbog toga što je štitasta hrskavica šira od drugih hrskavica grkljana. Kruškolikog su oblika po čemu su dobili ime, orijentirani širim

dijelom u kranijalnom smjeru. Njihovo bočno omeđenje čine ploče štitaste hrskavice i tirohoidna membrana, a medijalno ih omeđuju ariepiglotički nabori, aritenoidi i prstenasta hrskavica.

2. Stražnja stijenka ždrijela proteže se od jezične kosti do donjeg dijela krikofaringealnog mišića. Od prevertebralnog lista fascije vrata je odvojena retrofaringealnim prostorom, *spatium retropharyngeum*, koji je ispunjen vezivnim tkivom. Stražnju stijenku ždrijela izvana oblaže bukofaringealna fascija, *fascia buccopharyngea*, tako da je retrofaringealni prostor, zapravo, prostor između bukofaringealne fascije i prevertebralnog lista fascije vrata.

3. Postkrikoidno područje nalazi se na stražnjoj stijenci grkljana, od aritenoida do donjeg dijela prstenaste hrskavice, odnosno ušća jednjaka. Prednju stijenku hipofarinksa čini postkrikoidno područje (3).



Slika 1. Uzdužni presjek ždrijela (4).

1.2. Histološka građa ždrijela

Ždrijelo je građeno od pet slojeva: 1) sluznica, *tela mucosa*, koja sadržava male žlijezde ždrijela, *glandulae pharyngeae* (mukozne i mješovite žlijezde); 2) podsluznica, *tela submucosa*; 3) *fascia pharyngobasilaris*, koja je učvršćena za bazu lubanje; 4) mišići ždrijela, *musculi pharyngei*; i 5) *fascia buccopharyngea*, rahlo vezivno tkivo koje oblaže ždrijelo

izvana. Ždrijelo je obloženo neuroženim višeslojnim pločastim epitelom, osim u području nazofarinksa (5).

Mišići ždrijela se dijele u dvije skupine: u vanjskom se sloju nalaze kružni mišići koji suzuju ždrijelo (stezači ili konstriktori), dok se u unutarnjem sloju nalaze uzdužni mišići koji polaze s baze lubanje ili s mekog nepca i podižu ždrijelo (levatori). Kružni sloj mišića ždrijela čine tri parna mišića: gornji, srednji i donji stezač ždrijela, *m. constrictor pharyngis superior, medius et inferior*. Mišići se međusobno prekrivaju poput crijeva na krovu. Zajedničkim i usklađenim djelovanjem stežu ždrijelo i omogućavaju gutanje.

Unutarnji, uzdužni sloj mišića ždrijela čine tri mišića: *m. palatopharyngeus*, *m. salpingopharyngeus* i *m. stylopharyngeus*. Sva tri mišića podižu ždrijelo, a *m. palatopharyngeus* dodatno sužava ždrijelni tjesnac i spušta lukove nepca.

Hipofarinks krvlju opskrbljuju ogranci velikih krvnih žila vrata, uključujući ogranke gornje štitne arterije, *arteria thyroidea superior*, arterije jezika, *arteria lingualis* i uzlazne arterije ždrijela, *arteriae pharyngeae ascendens*. Venska krv se odvodi preko venskog spleta, *plexus pharyngicus*, smještenog u faringobazilarnoj fasciji, koji se drenira u unutanju venu vrata.

Drenaža limfe hipofarinksa odvija se prednjim i stražnjim putevima. Prednjim se putevima dreniraju larinks i piriformni sinus, kroz tirohoidnu membranu uz gornju arteriju grkljana (*a. laryngica superior*) u subdigastrične čvorove, te čvorove u gornjem, srednjem i donjem jugularnom području. Stražnjim se putevima stražnja stijenka hipofarinksa drenira u retrofaringealne, te gornje i srednje jugularne čvorove, kroz donji konstriktor ždrijela. Drenaža donjeg dijela piriformnog sinusa odvija se kroz krikotireoidnu membranu, uz povratni živac u paratrahealne čvorove (6).

Hipofarinks je osjetno i motorno inerviran preko ogranaka IX. i X. moždanog živca (*n. glossopharyngeus* i *n. vagus*) kroz živčani splet ždrijela, *plexus pharyngeus*. Deseti moždani živac, preko Arnoldovog živca, osjetno inervira vanjski slušni hodnik pa je stoga bol u uhu često prvi znak bolesti hipofarinksa.

1.3. Epidemiologija zloćudnih tumora glave i vrata

U zloćudne tumore glave i vrata ubrajaju se karcinomi usnice, usne šupljine, ždrijela, grkljana, nosa i paranazalnih sinusa, te žlijezda slinovnica (7).

Zloćudni tumori podrijetlom od pločastih stanica najčešći su zloćudni tumori glave i vrata. Nalaze se na šestom mjestu u odnosu na sve skupine dijagnosticiranih karcinoma u svijetu.

Svake godine u svijetu od zloćudnih tumora usne šupljine, ždrijela i grkljana oboli približno 550 000 ljudi, a umre približno 300 000 ljudi (8). Prema podacima American Cancer Society za godinu 2016, procjenjuje se da će od zloćudnog tumora usne šupljine i ždrijela oboljeti 48 330 ljudi, a umrijeti 9 570 (9). Prema podacima European Cancer Observatory, u Europi je 2012. godine od karcinoma usnice, usne šupljine i ždrijela oboljelo 99 630 ljudi; 73 856 muškaraca i 25 774 žena. U istom je razdoblju umrlo 43 662 ljudi, 34 249 muškaraca i 9 413 žena (10).

Prema istom izvoru, u 2012. godini je stopa incidencije karcinoma usnice, usne šupljine i ždrijela u Republici Hrvatskoj bila 12:100 000 (ukupno 685 oboljelih, 373 umrla). Prema dostupnim podacima, vidljivo je da je smrtnost od karcinoma usnice, usne šupljine i ždrijela u Hrvatskoj, u razdoblju od 1993. do 2010. godine, uglavnom nepromijenjena (u prosjeku, 330-340 oboljelih muškaraca i 45-50 žena godišnje) (11).

1.3.1 Epidemiologija karcinoma hipofarinksa

Prema podacima National Cancer Database, izračunato je da, za razdoblje od 1985. do 1994. godine, karcinomi hipofarinksa čine 4,3% karcinoma glave i vrata, u SAD (12).

Incidencija karcinoma hipofarinksa u svijetu iznosi 1:100 000. Najviša je u Brazilu, Indiji te središnjoj i zapadnoj Europi (2,5:100 000). Niža je (0,5:100 000) u zemljama istočne Azije, Afrike i sjeverne Europe (12).

Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u 2013. godini (Bilten 38, 2015) (13), odvojeno su dokumentirani podatci za anatomska područja hipofarinksa (C12) i piriformnog sinusa (C13). U Hrvatskoj je godine 2013. od zloćudnog tumora hipofarinksa (C12+C13) oboljelo 110 ljudi (98 muškaraca, 12 žena). Prema istom izvoru (13), od bolesti najčešće obolijevaju muškarci u dobi između 50. i 70. godine života. Broj novooboljelih, kao i omjer muškaraca i žena oboljelih od karcinoma hipofarinksa je stalan i iznosi 9:1, u vremenskom periodu od 2001. do 2013. godine.

1.4. Etiološki čimbenici u nastanku zloćudnog tumora hipofarinksa

Čimbenike koji utječu na nastanak zloćudnog tumora hipofarinksa možemo podijeliti u vanjske (npr. pušenje, konzumacija alkohola i infekcija virusom HPV) i unutarnje (npr. nedostaci vitamina i željeza) (14).

1.4.1. Vanjski etiološki čimbenici

1.4.1.1. Pušenje

Pušenje je najvažniji čimbenik rizika za nastanak karcinoma glave i vrata. Postoje dvije osnovne vrste duhana: „black (air cured)“ koji se upotrebljava u cigarama, duhanu za lule i nekim cigaretama i „blond (flue cured)“ duhan, koji je u širokoj uporabi u proizvodnji cigareta. Dokazano je da su karcinomi usne šupljine, ždrijela, grkljana i jednjaka jače povezani s uživanjem „air cured“ duhana (15). Prema podacima International Agency for Research on Cancer u 2010. godini, dim cigareta sadržava 4 000 različitih molekula, od kojih je oko 250 dokazano štetnih, od toga 60 karcinogena. Naj snažniji su policiklički aromatski ugljikovodici i specifični metaboliti nikotina, kao što su 4 metilnitrozamino – 1 – (3 piridil) – 1 – butanon (NNK) i N- nitrosonornikotin (NNN), zatim benzeni i polonij 210 (16). U multicentričnoj studiji provedenoj 2009. godine u 15 europskih zemalja otkrivena je snažnija povezanost pušenja u razvoju karcinoma grkljana i hipofarinksa u odnosu na karcinome usne šupljine, orofarinksa i jednjaka. Prema podacima iz studije, pušači imaju 12 puta veći rizik obolijevanja od karcinoma grkljana i hipofarinksa u odnosu na nepušače, a rizik se povećava s povećanjem broja cigareta i broja godina koje bolesnik puši (17). Omjer rizika za razvoj karcinoma hipofarinksa povećava se u bolesnika koji puše do 10 cigareta dnevno, ako puše dulje od 20 godina (18). Važan čimbenik rizika je i dubina inhalacije duhanskog dima. U pušača cigara i lula, koji dim uglavnom zadržavaju u gornjim dišnim putovima, povećana je incidencija karcinoma usne šupljine i orofarinksa. U bivših pušača stopa obolijevanja od karcinoma glave i vrata je manja u odnosu na aktivne pušače, ali i dalje veća u odnosu na nepušače (19,20).

1.4.1.2. Alkohol

Alkohol se, u kombinaciji s pušenjem, procjenjuje kao najvažniji čimbenik za razvoj karcinoma glave i vrata. U zemljama Europske unije konzumacija alkohola je, nakon pušenja i povišenog krvnog tlaka, treći najvažniji čimbenik prerane smrti u ljudi (21).

U literaturi se spominje nekoliko različitih mehanizama koji povezuju alkohol i karcinogenezu. Najbolje istraženi su: toksični učinak acetaldehida, utjecaj alkohola kao otapala za karcinogene iz duhana, učinak reaktivnih vrsta kisika i dušika, te promjene u metabolizmu folata (22). Konzumiranje alkohola, neovisno o pušenju, povećava rizik za

nastanak karcinoma ždrijela. Meta-analizom koja je uključivala 7 954 oboljelih od karcinoma ždrijela i usne šupljine iz 26 studija, pokazano je da relativni rizik iznosi 1,75 u skupini osoba koje konzumiraju 25 grama alkohola na dan, 2,85 u skupini koja konzumira 50 grama na dan, te 6,01 u skupini koja konzumira 100 grama dnevno (23). Relativni rizik za razvoj karcinoma usne šupljine i ždrijela u bolesnika koji konzumiraju tri i više pića dnevno je 5,13 u odnosu na bolesnike koji povremeno ili uopće ne konzumiraju alkohol (24).

1.4.1.3 Papiloma virus čovjeka (HPV, od engl. Human Papilloma Virus)

Nakon što je zur Hausen povezao HPV i karcinom grlića maternice 70-tih godina prošlog stoljeća, Syrjanen je 1983. godine, po prvi put, povezao infekciju virusom HPV s karcinomom glave i vrata (25, 26).

Papiloma virusi su DNA-virusi koji pripadaju obitelji *Papillomaviridae*. Njihova dvolančana uzvojnica DNA koja se sastoji od približno 8000 parova baza obavijena je virusnom kapsidom ikozaedarskog oblika, građenom od 72 kapsomere. Genom papiloma virusa podijeljen je u osam otvorenih okvira čitanja (engl. *open reading frames*), koji se nalaze u tri područja: rano, regulatorno i kasno područje.

Geni ranog područja kodiraju proteine (E1-E7; „E“ - early) koji su odgovorni za umnažanje virusa. Ovi proteini interferiraju sa staničnim ciklusom domaćina i imaju važnu ulogu u zloćudnoj preobrazbi zaražene stanice. Regulatorno područje sadrži elemente koji reguliraju prepisivanje DNA virusa. Kasno područje kodira proteine (L1-L2; „L“ - late) koji čine kapsidu, koja je važna i za razlikovanje pojedinih tipova papiloma virusa (27, 28,29). Do sada je poznato 189 različitih tipova papiloma virusa, koji su podjeljeni u 29 rodova, od toga pet u čovjeka (30). Unutar ovih pet rodova otkriveno je 120 različitih tipova HPV, koji imaju visok afinitet prema bazalnom sloju sluznice.

Prema mogućnosti da uzrokuju karcinom grlića vrata maternice podijeljeni su na viruse visokog i niskog rizika. Do sada je izolirano 15 tipova virusa visokog rizika: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 i 82. Dok je u razvoju karcinoma vrata grlića maternice put infekcije seksualni kontakt, u razvoju karcinoma glave i vrata način infekcije je još predmet rasprave (31). Najčešće se, kao mogući put prijenosa infekcije, spominje oro-genitalni kontakt, ali također i vertikalni način prijenosa, tijekom intrauterinog života.

HPV tipa 16 najčešće je izdvojeni tip virusa u karcinomima glave i vrata. U prvoj meta-analizi objavljenoj 2003. godine obrađena su 432 bolesnika s karcinomom tonzile. U 221

(51%) ispitanika izdvojena je HPV DNA, s predominacijom tipa 16 u 84% HPV-DNA pozitivnih uzoraka (32).

Meta-analizom objavljenom 2005. godine obrađeni su podatci dobiveni od 5 046 bolesnika s karcinomima usne šupljine, orofarinksa i grkljana, od kojih je 26% bilo pozitivno na infekciju HPV, najčešće u području orofarinksa (35,6%) (33). U studiji provedenoj na populaciji srednje Europe i Južne Amerike, koja je uključivala preko 2 000 bolesnika s karcinomom glave i vrata i više od 3 000 zdravih ispitanika, manje od 5% oboljelih imalo je protutijela na E6 i E7 (34). Nepčane i jezična tonzila mjesta su najveće učestalosti karcinoma povezanih s infekcijom HPV, što se pokušava objasniti specifičnim imunim odgovorom. Kao potencijalni mehanizam spominje se inhibicija T-limfocita prilikom početne infekcije virusom (35). Mnoge studije govore u prilog boljeg preživljenja bolesnika s karcinomom orofarinksa koji je pozitivan na infekciju HPV (36, 37). Točan mehanizam kojim bi se objasnila povoljnija prognoza za sada nije poznat.

Postoje i studije koje ukazuju na lošiji ishod bolesti u bolesnika pozitivnih na infekciju HPV. Lee i sur. su objavili da bolesnici s karcinomom usne šupljine koji je pozitivan na HPV tipa 16 u uznapredovanom stadiju imaju lošije ukupno preživljenje ne samo u odnosu na skupinu bolesnika bez infekcije HPV, nego i u odnosu na bolesnike u čijim je karcinomima dokazan HPV tipa 18. Autori su navedene razlike pokušali objasniti različitim životnim navikama, karakterističnim za pojedina podneblja (žvakanje betela) (38).

U prvoj do sada provedenoj studiji na 61 uzorku karcinoma hipofarinksa (39), HPV visokog rizika izoliran je u 82% uzoraka (50/61). Svi bolesnici uključeni u studiju bili su u IV stadiju bolesti. Kod bolesnika inficiranih virusom visokog rizika, tumorska bolest se ponovno pojavila (rekurencija) u 32% bolesnika, u odnosu na 8% u skupini HPV negativnih, ili inficiranih virusom niskog rizika. U bolesnika u čijim je tumorima dokazana prisutnost virusa visokog rizika, tumori nisu bili slabije diferencirani. Njihova sklonost metastaziranju, proboju kapsule limfnog čvora ili invaziji hrskavice larinksa nije bila povećana u odnosu na bolesnike u čijim tumorima nije dokazan HPV. Petogodišnje preživljenje bez povrata bolesti za HPV(+) skupinu iznosilo 58%, dok je u HPV(-) skupini iznosilo 88%. U skupini bolesnika s HPV(-) tumorom, pozitivna reakcija na p53 je, metodom imunohistokemije, dokazana u 36% uzoraka, a u skupini s HPV(+) tumorom u 33% uzoraka. Bolesnici s pozitivnom reakcijom imunohistokemije za p53 imali su lošiju prognozu u odnosu na skupinu s negativnom reakcijom. Usporedbom skupina HPV(+)/p53(+) i HPV(-)/p53(-) pokazano je da je stopa recidiva tumora značajno veći u prvoj skupini (36). U drugoj studiji provedenoj na bolesnicima u Švedskoj ispitani su uzorci 109 bolesnika liječenih u razdoblju od 2000-2007.

U svega sedam bolesnika (6%) izdvojena je HPV-DNA, od čega u četiri bolesnika HPV tipa 16. Sva četiri tumora imala su pozitivnu reakciju imunohistokemije na p16. Tri od četiri bolesnika preživjela su dulje od pet godina, dok je jedan bolesnik umro od smrti nepoznatog uzroka (40). Slični podatci vezani uz učestalost HPV u karcinomu hipofarinksa nađeni su i u studiji provedenoj na bolesnicima u Japanu gdje je od 171 bolesnika tek njih šest (3,5%) bilo HPV (+) (41).

1.4.2. Unutarnji etiološki čimbenici

1.4.2.1 Sindrom Plummer Vinson

Sindrom Plummer Vinson, poznat je i pod nazivom sindrom Patterson Kelly. Definiran je trijasom: disfagija, sideropenična anemija i suženje jednjaka (42,43). Najopsežnija studija (99 bolesnika) povezanosti sindroma Plummer Vinson i karcinoma hipofarinksa provedena je u Švedskoj, 1975. godine (44). Od ovog sindroma najčešće obolijevaju žene u dobi između 40. i 70. godine, ali sindrom je opisan i u djece, i adolescenata. Sindrom je prepoznat kao čimbenik rizika u razvoju karcinoma pločastih stanica gornjeg dijela probavnog sustava. U 3-15% bolesnika sa sindromom Plummer-Vinson, razvije se karcinom hipofarinksa ili jednjaka (43).

1.5. Karcinom hipofarinksa

1.5.1. Simptomi

Hipofarinks se smatra „tihim područjem“, u kojem zbog „mekanih“ anatomskih granica, tumor može znatno narasti prije nego što dovede do ispada fiziološke funkcije. Zbog toga se oboljeli liječniku javljaju najčešće u uznapredovalim stadijima bolesti (45).

Hoffman i suradnici analizirali su učestalost simptoma karcinom hipofarinksa u 2939 oboljelih: najčešća je bila disfagija (48%) , a slijedili su: čvor na vratu (45,1%), bolnost ždrijela (43%), promuklost (35,6%), otalgija (17,5%), dispneja (11,8%), hemoptiza (8,1%) i gastroezofagealni refluks (3%). U ranim stadijima bolesti (I/II) čak je 37% bolesnika asimptomatsko. U uznapredovalim stadijima (III/IV) vodeći simptom bio je čvor na vratu, praćen dispnejom i hemoptizom (46).

Disfagija se kao vodeći simptom javlja zbog fizičke zapreke prolasku hrane iz ždrijela u jednjak i često je praćena odinofagijom. U dijela bolesnika javlja se i aspiracija (ovo je još jedan pokazatelj važnosti hipofarinksa u koordinaciji gutanja, odnosno nesmetanom prolasku hrane oko grkljana). Posljedica navednog je, naročito u uznapredovalim stadijima, gubitak tjelesne mase i dehidracija.

Čvor na vratu, naročito ako je prisutan uz unutarnju jugularnu venu (područja II-IV (Slika 2)) upućuje na mogućnost prisustva zloćudnog tumora hipofarinksa. Bolnost ždrijela uglavnom je jednostrana i traje dulje vrijeme, a bolesnici u anamnezi često spominju pokušaj liječenja antibioticima. Otagija je posljedica prijenosa bolnih impulsa X. moždanim živcem do Arnoldova živca koji osjetno inervira zvukovod (45, 47). Promuklost je posljedica zahvaćanja povratnog živca grkljana (*n. laryngeus recurrens*) ili zahvaćanja struktura larinksa (npr. krikoaritenoidni zglobovi), što u uznapredovalim stadijima bolesti dovodi do dispneje.

1.5.2. Klinički pregled

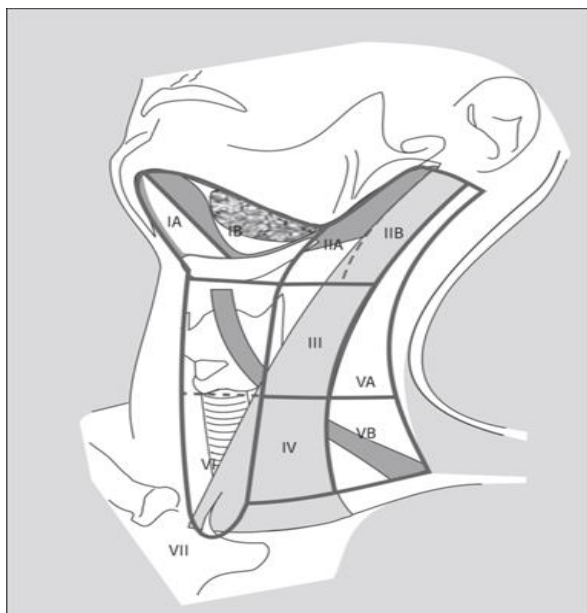
Klinički pregled uključuje inspekciju, palpaciju, te indirektnu i fiberoptičku laringoskopiju. Trebao bi završiti postavljanjem kliničkog stadija bolesti. Tijekom pregleda treba obratiti pozornost na promjene morfologije sluznice, pokretljivost dijelova ždrijela i grkljana i zastoj sline. Korištenjem fiberoptičke laringoskopije detaljno se mogu analizirati svi dijelovi združenog probavno-dišnog puta te njihovo funkcioniranje. Korištenjem dodatnih tehničkih pomagala i računalnih programa (npr. stroboskopija i videokimografija) može se detaljnije procijeniti pokretljivost struktura. Posljednja u nizu metoda naziva se „narrow band imaging“, a omogućava analizu promjena na sluznici i rano otkrivanje karcinoma (48).

1.5.3. Slikovne metode

Od slikovnih se metoda najčešće koriste kompjuterizirana tomografija (CT) i magnetska rezonanca (MR). Točnost određivanja stadija bolesti metodom kliničkog pregleda iznosi 58%, CT 80%, a MR 85% (49). Kliničke studije pokazuju bolju specifičnost CT (84%) u odnosu na MR vezano uz procjenu invazije hrskavice (62%). U bolesnika s uznapredovalom bolešću, u kojih je povećan rizik od udaljenih metastaza, može se učiniti pozitronska emisijska tomografija s 18-fluorodeoksiglukozom (FDG-PET) (45).

1.5.4. Klasifikacija TNM i klasifikacija po Brodersu

Na temelju dobivenih podataka određuje se klinički stadij bolesti, prema međunarodnoj klasifikaciji TNM (50). Slovom T označava se veličina tumora, slovom N lokalne metastaze u limfne čvorove raspodijeljene u šest područja vrata (Slika 2), a slovom M metastaze u udaljne organe.



Slika 2. Područja limfnih čvorova vrata (51).

Tablica 1. Klasifikacija TNM: Karcinomi hipofarinksa (AJCC 2010) (50).

Stadij T		Primarni tumor
Tx		Primarni tumor se ne može dokazati
T0		Nema vidljivog primarnog tumora
Tis		Karcinom <i>in situ</i>
T1		Ograničen na jednu podjedinicu hipofarinksa i/ili 2 cm ili manje u promjeru
T2		Zahvaća više od jedne podjedinice hipofarinksa; ili strukturu u neposrednoj blizini; ili je velik $> 2 \text{ cm} \leq 4 \text{ cm}$, bez fiksacije hemilarinksa
T3		Tumor $> 4 \text{ cm}$; ili fiksira hemilarinks; ili se širi na jednjak
T4 Tumor se širi u okolne strukture*	T4a	Umjereno uznapredovala bolest; karcinom zahvaća štitastu/prstenastu hrskavicu, jezičnu kost, štitnjaču, ili tkivo centralna područja vrata
	T4b	Izrazito uznapredovala bolest: karcinom zahvaća prevertebralnu fasciju, obavića arteriju karotis, ili zahvaća strukture medijastinuma
Stadij N		Status regionalnih limfnih čvorova
Nx		Metastaza u limfnom čvoru ne može se dokazati
N0		Nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
N1		Metastaza u ipsilateralnom limfnom čvoru $\leq 3 \text{ cm}$
N2	N2a	Metastaza u ipsilateralnom limfnom čvoru $> 3 \text{ cm} \leq 6 \text{ cm}$
	N2b	Dvije ili više metastaza u ipsilateralnim limfnim čvorovima $\leq 6 \text{ cm}$
	N2c	Metastaze obostrano (neovisno o veličini) ili u kontralateralnim limfnim čvorovima $\leq 6 \text{ cm}$
N3		Metastaza u limfnom čvoru $> 6 \text{ cm}$
Stadij M		Status udaljenih metastaza
Mx		Udaljene metastaze se ne mogu dokazati
M0		Nema udaljenih metastaza
M1		Udaljene metastaze postoje

Postoji i klasifikacija TNM u odnosu na patohistološke osobitosti tumora, koju određuje patolog nakon pregleda uzoraka tkiva bolesnika dobivenih tijekom operacije.

Na temelju ove klasifikacije određuje se stadij bolesti (0-4), na način na koji je prikazano u Tablici 2.

Tablica 2. Stadij bolesti na temelju klasifikacije TNM (AJCC 2010) (50).

Stadij	T	N	M
0	Tis	N0	M0
1	T1	N0	M0
2	T2	N0	M0
3	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
4a	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
4b	T4b	Bilo koji N	M0
4c	Bilo koji T	Bilo koji N	M1

Klasifikacijom po Brodersu (52,53) ocjenjuje se stupanj diferenciranosti tumora, odnosno udio keratinocita koji ga izgrađuju.

Stupanj 1 – dobro diferenciran tumor: > 75% keratinocita

Stupanj 2 – umjereno dobro diferenciran tumor: > 50% keratinocita

Stupanj 3 – slabo diferenciran tumor: > 25% keratinocita

Stupanj 4 – anaplastičan tumor: < 25% keratinocita.

1.5.5. Liječenje karcinoma hipofarinksa

Po završetku dijagnostičke obrade i procjene općeg stanja bolesnika, pristupa se liječenju bolesti. Posebnost liječenja karcinoma ovog područja vezana je uz složenost anatomije i vitalne uloge sjecišta probavno-dišnog puta. Stoga, uz radikalno liječenje, veliku pozornost treba posvetiti održavanju i/ili ponovnoj uspostavi funkcije disanja i gutanja, a po mogućnosti i govoru bolesnika.

Iako u svijetu postoji velik broj smjernica za liječenje karcinoma hipofarinksa, u svakodnevnoj se kliničkoj praksi najčešće koriste smjernice NCCN (od engl. *National*

Comprehensive Cancer Network). Prema mogućnosti očuvanja funkcije organa (nakon kirurškog liječenja), ovim su smjernicama bolesnici podijeljeni u nekoliko skupina.

U prvoj skupini nalaze se bolesnici u ranim stadijima bolesti (T1,T2 i ponekad T3), u kojih nije potrebno učiniti totalnu laringektomiju i stoga je moguće očuvanje funkcije organa (engl. *organ preservation*). U drugu su skupinu razvrstani bolesnici u kojih je potrebno učiniti totalnu laringektomiju. U trećoj se skupini nalaze bolesnici sa stadijem karcinoma T4a. Konačno, u četvrtoj se skupini nalaze bolesnici u kojih radikalno odstranjenje tumora zbog proširenosti nije moguće postići operacijom (tzv. inoperabilni bolesnici) zbog njegovog opsežnog širenja. Liječenje bolesnika prve skupine može biti kirurško i/ili radioterapijom. Kirurško liječenje može, ali i ne mora uključivati disekciju vrata ili lobektomiju štitne žlijezde, a najviše ovisi o prethodno postavljenom stadiju bolesti, prema TNM (Tablice 1 i 2). Na temelju patohistološke analize odstranjenog tkiva određuje se daljnji tijek liječenja bolesnika. Postoperativno zračenje primjenjuje se u bolesnika kod kojih postoji širenje bolesti na vrat. Kemoradioterapija se primjenjuje u bolesnika kod kojih postoje tzv. „štetne značajke“ (od engl. *adverse features*): a) ekstrakapsularno širenje, b) pozitivni rubovi resekcije, c) pT4, d) N2 ili N3, e) perineuralna invazija, f) embolija krvnih žila.

U bolesnika druge skupine potrebno je učiniti totalnu laringektomiju, nerijetko uz obostranu disekciju vrata, lobektomiju štitne žlijezde i disekciju vrata u području VI.

Vrlo se često nakon provedenog kirurškog liječenja provodi postoperativna radioterapija ili kemoradioterapija (po istim postulatima koji vrijede i u prvoj skupini bolesnika). U jednako vrijedne mogućnosti liječenja ubraja se i konkomitantna kemoradioterapija. Indukcijska kemoterapija, s praćenjem odgovora primarnog sjela karcinoma i nastavka liječenja bilo konzervativnim pristupom (konkomitantna kemoradioterapija) i/ili operativno liječenje također se može primijeniti.

U smjernicama je posebno izdvojena skupina bolesnika sa stadijem bolesti T4a, koji bi trebali biti liječeni kirurški, laringofaringektomijom (ili panlaringektomijom), uz odstranjenje štitne žlijezde i disekciju vrata. Po završenom kirurškom liječenju, ovi bi se bolesnici trebali uputiti na kemoradioterapiju. Iznimku od pravila čini skupina bolesnika, u kojih se patohistološkom analizom utvrdi da nema metastaza u limfnim čvorovima vrata (N0), te ako se radi o stadiju tumora I ili II po Brodersu (gradus tumora (G)), i tumor se ne širi u područje subglotisa. U ovih je bolesnika kirurški zahvat jedini način liječenja. Bolesnici u stadiju T4a koji su neskloni kirurškom liječenju, podvrgavaju se konkomitantnoj kemoradioterapiji.

Bolesnicima koji su razvrstani u četvrtu skupinu, s izrazito uznapredovalim stadijem karcinoma (u ranijim smjernicama se za ovu skupinu upotrebljavao izraz „inoperabilni

bolesnici“) najčešće se, a ovisno i o općem stanju bolesnika, predlaže konkomitantna kemoradioterpija. U slučaju pozitivnog odgovora na ovaj način liječenja, u dijelu bolesnika moguće je provesti daljnje kirurško liječenje (54).

1.5.6. Preživljenje

Na preživljenje bolesnika oboljelih od karcinoma hipofarinksa utječu mnogi čimbenici (npr. stadij bolesti, smještaj u pojedinom dijelu hipofarinksa, lokalne i udaljene metastaze).

Bolesnici s karcinomom hipofarinksa imaju lošiju prognozu u odnosu na bolesnike sa zloćudnim tumorima na drugim sijelima u području glave i vrata. Razlog za lošiju prognozu je uglavnom kasno otkrivanje bolesti. Udio svih bolesnika koji žive pet godina nakon postavljanja dijagnoze je 30% (55). Ovaj je udio znatno viši (60%) u bolesnika u kojih je bolest otkrivena u ranom stadiju i koji nemaju metastaze u limfnim čvorovima vrata (N0). Bolesnici s karcinomom smještenim u donjim dijelovima hipofarinksa (vrh piriformnog sinusa i postkrikoidno područje) imaju lošiju prognozu u usporedbi s bolesnicima čiji su tumori smješteni u gornjim dijelovima hipofarinksa. Petogodišnje preživljenje bolesnika u Pingreeovoj (56) studiji (1317 bolesnika) ovisno o stadiju bolesti (Tablica 2) iznosi: stadij I 63%, stadij II 57%, stadij III 42% i stadij IV 22%. Udaljene metastaze razvija približno 25% bolesnika (57) s plućima kao najčešćim sijelom, zatim jetrom i kostima. Ipak bolesnici najčešće umiru od lokalnog recidiva karcinoma, a tek zatim od udaljenih metastaza, drugog primarnog karcinoma i komorbiditeta (4).

1.6. Uvod u epigenetiku

Britanski genetičar i embriolog C. H. Waddington (1905-1975) uveo je pojam „epigenetika“ (epi+genesis) kako bi definirao ispoljavanje određenog fenotipa u kontekstu uzročno-posljedičnih odnosa između gena i njihovih proteinskih produkata (58). Danas se pojmom „epigenetika“ objedinjuju događaji i mehanizmi koji se smatraju temeljem nasljednih i reverzibilnih promjena funkcije gena, neovisno o slijedu baza u molekuli DNA (59). Najbolje istraženi epigenetski mehanizmi su metilacija molekule DNA, postranslacijske modifikacije histona i utišavanje gena ovisno o malim molekulama RNA. Molekule uključene u epigenetsku regulaciju međusobno „komuniciraju“ kako bi uspostavile specifičnu epigenomsku mrežu. Njezina primarna funkcija jest kontrola aktivnosti gena s obzirom na tip stanice, vrstu podražaja i specifični „vremenski prozor“ ispoljavanja. Oni su usko povezani s uspostavljanjem vlastite (epigenomske) mreže signala unutar koje se međusobno nadopunjuju i upravljaju važnim procesima u stanici (60).

1.6.1. Metilacija molekule DNA

Metilacija molekule DNA najproučavaniji je epigenetski mehanizam. Odnosi se na kovalentno vezanje metilne skupine na 5. atom ugljika u citozinu, pri čemu se najčešće metiliraju citozini koji se nalaze unutar dinukleotida CpG. Metilaciju kataliziraju proteini DNA metiltransferaze (DNMT). Ovi enzimi podijeljeni su u dvije obitelji (porodice): održavajuće i „*de novo*“ DNMT. Održavajuća DNMT je DNMT1. Važna je za točno kopiranje uspostavljenog obrasca metilacije DNA stanice majke u DNA stanica kćeri. Tijekom S-faze staničnog ciklusa nalazi se u replikacijskim rašljama (61). DNA metiltransferaze *de novo* su DNMT3a i DNMT3b. Posjeduju *de novo* metilacijsku aktivnost, iz čega proizlazi da su neophodne za uspostavljanje obrasca metilacije, i stoga je njihova uloga izuzetno važna u razvojnim procesima (62). Mutacije DNMT3A relativno su česte u akutnim monocitnim leukemijama (63). Nasljedne mutacije gena za DNMT3B čine molekularno-genetičku podlogu za nastanak sindroma ICF (imunodeficijencija - Immunodeficiency, nestabilnost centromera - Centromere Instability i razvojne anomalije lica - Facial Anomalies) (64).

1.6.1.1. Uloga promijenjenog obrasca metilacije molekula DNA u karcinogenezi

U karcinomima se događaju dva osnovna poremećaja metilacije molekula DNA: 1) globalna hipometilacija genoma – ukupni gubitak metilacije; 2) žarišne hipermetilacije, primarno u području promotora tumor supresorskih gena.

1) Poznato je da globalna hipometilacija nekodirajućih područja genoma za posljedicu ima genomsku nestabilnost (engl. *Genome Instability*) i strukturne promjene kromosoma (engl. *Chromosome Abberations*). Hipometilacija molekule DNA u kodirajućim dijelovima genoma za posljedicu ima izražavajne gena koji, u fiziološkim uvjetima, nisu eksprimirani (na primjer područja upisanih gena ili geni na inaktivnom majčinom X-kromosomu) (65).

2) Utišavanje aktivnosti tumor supresorskih gena nerijetko je uzrokovano prekomjernom metilacijom citozina unutar odsječaka DNA koji se nazivaju „otočići CpG (od engl. *CpG island*)“. Ova su se područja DNA kasnih osamdesetih definirala kao područja u genomu dugačka 200 parova baza u kojima se nalazi više od 50% dinukleotida CpG (66). S ovom se definicijom otočića nije moglo napraviti oštro razgraničenje između *bona fide* otočića i Alu-ponavljanja. Stoga je, deset godina kasnije, definicija promijenjena. Prema njoj je otočić CpG odsječak molekule DNA koji je dugačak 500 parova baza, u kojem se nalazi više od 55% dinukleotida CpG (67). Konačno, u najnoviju definiciju otočića nisu uključeni samo parametri vezani isključivo uz molekulu DNA, nego i uz modifikacije histona, na temelju modeliranja. Tom najnovijom definicijom se računalnim programom predviđaju mjesta koja će se ponašati kao otočići, a u literaturi se uvodi pojam „Snaga otoka“ (od engl. *“CpG Island Strength”*) (68).

U karcinomima pločastih stanica glave i vrata velikim je brojem studija pokazana hipermetilacija promotora tumor supresorskih gena u odnosu na okolno zdravo tkivo. Nerijetko razina hipermetilacije molekule DNA u području tumor supresorskih gena korelira i s povećanom agresivnošću tumora, odnosno s uznapredovalim stadijima bolesti (69). Postojanje virusa HPV u tkivu tumora povezano je sa specifičnim obrascem metilacije molekule DNA, koji vrlo često uključuje prekomjernu metiliranost promotora gena *CCNA1* (ciklin A1) (70). Opsežnom meta-analizom je pokazano da se prekomjerna metiliranost promotora ovog gena pojavljuje u velikom broju različitih zloćudnih tumora (71), pa i u onima čiji se nastanak ne povezuje s infekcijom HPV.

1.6.2. Posttranslacijske promjene histona

Jedinstvena, fleksibilna struktura nukleoproteina u kojoj su objedinjeni DNA i histoni naziva se kromatin. Njegova osnovna jedinica naziva se nukleosom koji je građen od po dvije molekule četiri osnovna histona H2A, H2B, H3 i H4, oko kojih je omotano 147 parova baza molekule DNA. Nukleosomi su međusobno povezani s 10-90 parova baza DNA, koja je omotana oko jednog „linker“ histona H1(72). Histoni su građeni od loptaste C-terminalne domene i N terminalne domene (73,74) koja je podložna posttranslacijskim kovalentnim promjenama (metilacija, acetilacija, ubikvitinacija, SUMOilacija, fosforilacija, citrulinacija i ADP-ribozilacija) (75). Dobro je poznato i da različite posttranslacijske modifikacije molekula histona sudjeluju u regulaciji ekspresije gena. Sveukupnost modifikacija i njihov značaj u biološkom sustavu objedinjen je nazivom „histonski kod“ (76).

Reverzibilne modifikacije histona neophodne su za odvijanje temeljnih bioloških procesa u stanici (transkripcija, replikacija, popravak molekule DNA) koji prethode njezinoj diobi. Ovo uključuje procese čija je regulacija neophodna za pravovremenu transkripciju, replikaciju i popravak genomske DNA.

Najbolje proučene posttranslacijske modifikacije histona su acetilacija i metilacija bazičnih aminokiselina (lizin, histidin, arginin) unutar histona H3 i H4. Četiri velike skupine enzima koji kataliziraju postavljanje i uklanjanje histonskih posttranslacijskih modifikacija prijenosom acetilnih i metilnih skupina su acetiltransferaze histona (HAT, od engl. *Histone Acetyltransferase*), deacetilaze histona (HDAC, od engl. *Histone Deacetylase*), metiltransferaze histona (HMT, od engl. *Histone Methyltransferase*) i demetilaze histona (HDMT, od engl. *Histone Demethyltransferase*) (77). Najnovije studije ukazuju i na važnost aminokiseline serin, koja doprinosi složenosti histonskog koda na način da se ADP-ribozilira (78).

Nepostojanje acetilnih, negativno nabijenih skupina, na aminokiselini lizin u histonima H3 i H4 za posljedicu ima snažnije povezivanje negativno nabijene molekule DNA i histona. Ovo za posljedicu ima „zatvaranje“ kromatina koji postaje „zgusnut“ (heterokromatin) i nedostupan čimbenicima transkripcije. Geni koji se nalaze u području heterokromatina su, u pravilu, utišani. Kada se molekule lizina acetiliraju, naboj histona postaje negativan, što za posljedicu ima slabljenja veze između histona i molekule DNA. Krajnja posljedica je smanjena zbijenost kromatina koji postaje „rijedak“ (eukromatin). Genomska DNA u ovom

obliku kromatina postaje dostupna čimbenicima transkripcije. Stoga postojanje eukromatina ukazuje na transkripcijski aktivna područja jezgre (79).

Posljedica metilacije histona ovisna je o specifičnom kontekstu: na primjer metilacija lizina u histonu H3 na položajima 27 i 9 (H3K27me_{2/3}; H3K9me₃) (80, 81) smatra se oznakom neaktivnog kromatina. Međutim, metilacija lizina na položaju 4 u istoj molekuli histona (H3K4me₃) je aktivacijska modifikacija (82). Istovremeno prisustvo aktivirajućih (H3K4me₃) i represivnih oznaka histona (H3K27me₃) otkriveno je u području kontrolnih elemenata bivalentnih domena koje se nalaze u području gena koji su uključeni u diferencijaciju (na primjer, Homeotic (HOX-lokus), (83) u matičnim stanicama.

Prijenos acetilnih i metilnih skupina ne utječe samo na promjenu histonskog koda, nego i na funkciju mnogih nehistonskih proteina (84).

1.6.2.1. Metilacija lizina u histonu H3

Metilacija lizina u histonu H3 najčešća je na položajima 4 (H3K4), 9 (H3K9), 27 (H3K27) i 36 (H3K36). Obrazac uspostave metilacije je postepen, što znači da se metilacija lizina može ispoljavati postavljanjem jedne (monometilacija; m₁), dvije (dimetilacija; m₂) ili tri (trimetilacija; m₃) metilne skupine. Iako je u samom izrazu „kod histona“ izražena mnogostrukost modifikacija koje rezultiraju određenim „kodom“, uniformnost koda s obzirom na transkripcijsku aktivnost gena nije uvijek moguće u potpunosti točno predvidjeti. Predviđanje je još nesigurnije s obzirom na modifikacije u metilaciji molekule DNA. Ipak, u većini do danas istraženih modela, H3K4me₃ u području promotora gena predstavlja biljeg transkripcijske aktivnosti, dok je H3K27m₃ jedan od najsnažnijih signala za utišavanje gena u području čijeg se promotora ova promjena nalazi (85).

1.6.2.1.1. Enzimi koji sudjeluju u modifikaciji histona metilacijom

Dvije velike skupine proteina, čiji se učinci djelovanja smatraju antagonističkima, odgovorne su za obrasce metilacije histona H3 na lizinu 27 (H3K27), neizravno, ili izravno. Osnovna funkcija skupina proteina Trithorax (engl. *Trithorax Group Protein* (TrxG)) jest poticanje transkripcije. Ovaj je mehanizam dobro objašnjen kroz primarnu monometilaciju histona H3 (H3K4me₁), koja je često praćena povećanom razinom acetilacije na položaju H3K27 (86). Na ovaj način modificiran kod histona ima pro-transkripcijsku aktivnost. Suprotno tome, skupina proteina Polycomb (engl. *Polycomb Group Protein* (PcG)) svoju metiltransferaznu

aktivnost usmjerava na aminokiseline histona koje će, modificirane metilacijom, sudjelovati u stvaranju heterokromatina i posljedičnom utišavanju aktivnosti gena (87). Obje skupine proteina svoju aktivnost ispoljavaju u sklopu velikih proteinskih kompleksa pri čemu metiltransferazna aktivnost omogućuje dodavanje metilne skupine na određenu aminokiselinu. Ovako obilježen histon će na sebe privući proteine- partnere koji će svoju funkciju ispoljiti kao pojačivači ili utišavači transkripcije gena (88,89).

Antagonistički učinci kompleksa proteina TrxG i PcG otkriveni su u vinskoj mušici, (lat. *Drosophila melanogaster*) (90), u kojoj reguliraju razvoj kukca u smjeru anteroposteriorne osi. Kompleksi proteina PcG i TrxG iznimno su dobro evolucijski konzervirani. Uključeni su u različite biološke procese: proliferaciju stanica, diferencijaciju matičnih stanica, genomski upis i inaktivaciju X-kromosoma (91). Njihova je uloga u zloćudnoj preobrazbi stanice iznimno velika (92,93).

1.6.2.1.2. Skupina proteina Polikomb

Za sada je poznato da proteini skupine polikomb ulaze u sastav četiri kompleksa proteina: PRC1-PRC4 (PRC, od engl. *Polycomb Repressive Complex*) (94).

U humanoj su medicini najopsežnije istraženi kompleksi PRC1 i PRC2, koji djeluju kao utišavači aktivnosti gena. Ovu ulogu ostvaruju neovisno jedan o drugom (95), sinergistički (96) ili antagonistički (97,98).

Uz ova dva kompleksa se, naročito u području karcinogeneze, sve više spoznaje važnost kompleksa PRC4. U ovom se kompleksu nalazi NAD^+ -ovisna deacetilaza proteina SIRT1, za koji je pokazano da potiče *de novo* metilaciju DNA i tako može dovesti do trajnog utišavanja ciljnih gena za polikomb komplekse (npr. gena čija se aktivnost mijenja starenjem) (99, 100).

1.6.2.1.3. Polikomb represivni kompleks 1

Dokazano je postojanje šest podvarijanti kompleksa PRC1. Ubikvitin ligaza RING1A/B zajednička je svim podvarijantama, a varijabilni dio kompleksa čini podjedinica PCGF (PCGF 1-6; od engl. *Polycomb-group RING Finger*), građa koje određuje jedinstven sastav s njom združenih polipeptida. Kompleks PRC1 sisavaca primarno sudjeluje u nastanku supresivne monoubikvitilacije lizina 119 u histonu H2A (SCMH1, od engl. *Sex Comb on Midleg Homolog 1 (Drosophila)*) (101).

Svaki podtip kompleksa PRC1 veže se na različite sljedove nukleotida molekule DNA u genomu. Kompleksi PRC1 mogu se podijeliti u dvije osnovne skupine u odnosu na mehanizam djelovanja: kanoničnu (od engl. *canonical*) i ne-kanoničnu skupinu (od engl. *non-canonical*). Osnovna razlika između ove dvije skupine odnosi se na mogućnost „prepoznavanja“ modifikacije histona H3K27m3, u skladu s ranije navedenim međudjelovanjem ova dva kompleksa. Tako kanonična skupina sadrži proteine CBX koji „prepoznaju“ H3K27me3 oznaku, dok ne-kanonična skupina ne može prepoznati navedenu oznaku, ali ima znatno izraženiju ubikvitinsku aktivnost (102).

„Prepoznavanje“ oznaka H3K27m3 koju uspostavlja kompleks PRC2 smatra se izuzetno snažnom utišavajućom oznakom epigenoma, koja je, u slučaju nekih karcinoma, hijerarhijskom funkcijom nadređena razini metilacije molekule DNA, u području otočića CpG (103). U praktičnom smislu, ovo znači da postoji velika vjerojatnost da će gen biti utišan ako su u području njegovog nemetiliranog promotora, koji je bogat otočićima CpG, prisutne modifikacije histona H3 – H3K27m3. U embrionalnim matičnim stanicama miša je pokazano da se, u područjima CpG otoka, metilacija molekule DNA i H3K27m3 međusobno isključuju (104).

U kontekstu karcinogeneze postoji velik interes za PCGF 4, koji je poznat i pod imenom BMI 1, za koji se već više od dva desetljeća zna da posjeduje onkogenu funkciju (105). Njegovo ispoljavanje praćeno je u nekoliko različitih skupina tumora glave i vrata.

U karcinomima nazofarinksa pokazana je povezanost pojačanog izražaja BMI 1 s višim stadijem T i značajno kraćim petogodišnjim preživljenjem (106). U karcinomu grkljana je vrijednost BMI 1 pokazana kao neovisan prognostički čimbenik, povezano s metastatskim potencijalom zloćudnog tumora (107). Pojačani izražaj BMI 1 dokazan je i u uznapredovalim karcinomima pločastih stanica jednjaka (viši T- i N- stadij), a statističkim izračunom je pokazano da ima utjecaj na preživljenje bolesnika (ukupno petogodišnje preživljenje bilo je 41,3% u skupini bolesnika s niskim izražajem, a 33,2% u skupini bolesnika s visokim izražajem BMI 1 ($P = 0,015$) (108). S druge strane u studiji provedenoj na bolesnicima s ranim stadijima (T1/T2N0) karcinoma pločastih stanica jezika, sklonost ponovnoj pojavi bolesti bila je značajno veća u skupini bolesnika bez izražaja BMI1 u tkivu tumora (109).

1.6.2.1.4. Proteinski kompleks PRC 2

U čovjeka se kompleks PRC 2, u osnovi, sastoji od četiri evolucijski vrlo visoko konzervirane jedinice: EZH1 ili EZH2 (od engl. *Enhancer of Zeste Homologs*); EED (od engl. *Embryonic Ectoderm Development*); SUZ12 (od engl. *Suppressor of Zeste 12*); RBBP4 (RB Binding Protein 4, Chromatin Remodeling Factor/Chromatin Assembly Factor 1, p55 Subunit), koji se u literaturi često naziva i RbAP48 (od engl. *Retinoblastoma Binding Protein*) (110,111).

Kompleks je odgovoran za di-/tri- metilaciju lizina u histonu H3 (H3K27m2/3) (110,112) što je snažna oznaka za utišavanje gena. Prijenos metilne skupine s S-adenosil-L-metionina (AdoMet) na amino-skupinu lizina koji se ne mora nužno nalaziti u histonu, posredovan je SET-domenom metiltransferaze EZH2 (113). Prisutnost podjedinica EED i SUZ12 u kompleksu PRC2 neophodno je za pravilno funkcioniranje kompleksa (114). Podjedinica EED se svojim karboksi-terminalnim područjem veže za repove histona koji su trimetilirani na lizin i na taj način sudjeluje u odražavanju razine metilacije histona u jezgri, odnosno - u prijenosu obrasca metilacije na stanice kćeri (112, 115). RbAP48 je protein koji sadrži domenu WD40, a najnoviji podatci potvrđuju njegov značaj u uspostavi i održavanju stabilnosti kromosoma, kroz RBAP48-posredovano organiziranje heterokromatina (116). Čini se da bi njegov prekomjerni izražaj u hipofarinksu mogao imati dobar prognostički značaj (njegovo antiproliferativno djelovanje je, za sada pokazano na kulturama stanica i u eksperimentalnim životinjama) (117).

Uz ranije navedene, osnovne četiri podjedinice, još tri različita polipeptida mogu biti uključena u sastav kompleksa PRC2: JARID2 (od engl. *Jumonji- and ARID-Domain-Containing Protein*), AEBP2 (od engl. *Adipocyte Enhancer-Binding Protein*) i PCL (od engl. *PolyCombLike*). Pravilno funkcioniranje JARID2 vidljivo je kroz pravilnu postavljanje metilnih skupina na lizinima histona. Razvidno je da se radi o složenom mehanizmu regulacije, koji nužno mora osigurati pravovremenu aktivaciju gena (118). Njegov gubitak (gubitak dijela kromosoma 6 na kojem se JARID2 nalazi) je opisan u oboljelih od kronične mijeloidne leukemije, i to u vrijeme leukemijskog prijelaza. U vrijeme leukemijskog prijelaza gube se i AEBP2 i SUZ12 (119). Primarna uloga AEBP2 nije u potpunosti razjašnjena, iako je pokazano da u somatskim stanicama, vezanjem na promotor JARID2, potiče njegovu transkripciju (120). S druge strane ove dvije studije jasno ukazuju na supresorsku funkciju JARID2. Iako dodatne podjedinice kompleksa nisu neophodne za bazično funkcioniranje kompleksa, one mogu dodatno regulirati enzimsku aktivnost PRC2 i ponašati se kao „navigatori“ koji određuju mjesto enzimskog djelovanja kompleksa (121).

1.6.2.1.5. Gen i protein *EZH2*

Protein EZH2 otkriven je 1996. godine (kada je nazvan ENX-1), kao vezni partner onkoproteina Vav, u stanicama bolesnika s mijeloidnim oboljenjima (122). Područje dugačkog kraka kromosoma 7 (7q35-q36), na kojem *EZH2* zauzima 77 kB, detaljno je mapirano 2000. godine (123). Tri godine kasnije je pokazano da njegovo prekomjerno ispoljavanje, dokazano u približno 15 % analiziranih (N=225) karcinoma dojke, nastaje kao posljedica amplifikacije područja 7q35-q36 (124). Trenutno je u Genskoj banci pohranjeno pet različitih transkripata mRNA i pripadajućih inačica proteina EZH2, koje su prikazane u Tablici 3. Ove varijante glasničke RNA nastaju različitim prekrajanjem primarnog transkripta. O njihovoj se funkciji zna vrlo malo. Transkripcijske inačice 1 i 3 prisutne su u približno jednakoj količini, u 22 analizirana tkiva čovjeka. Ciljano potaknutim izražavanjem inačica proteina (Q 15910-2 i Q 15910-3; Tablica 3) u stanicama raka gušterače pokazano je da svaka inačica proteina ima povećani afinitet prema određenoj skupini gena (36.3 % gena bilo je reprimirano inačicom EZH2 β (Q 15910-3), a 47,6% gena inačicom EZH2 α (Q 15910-2). Za utišavanje preostalih 16,1% gena bila je potrebna nazočnost obje izoforme (125).

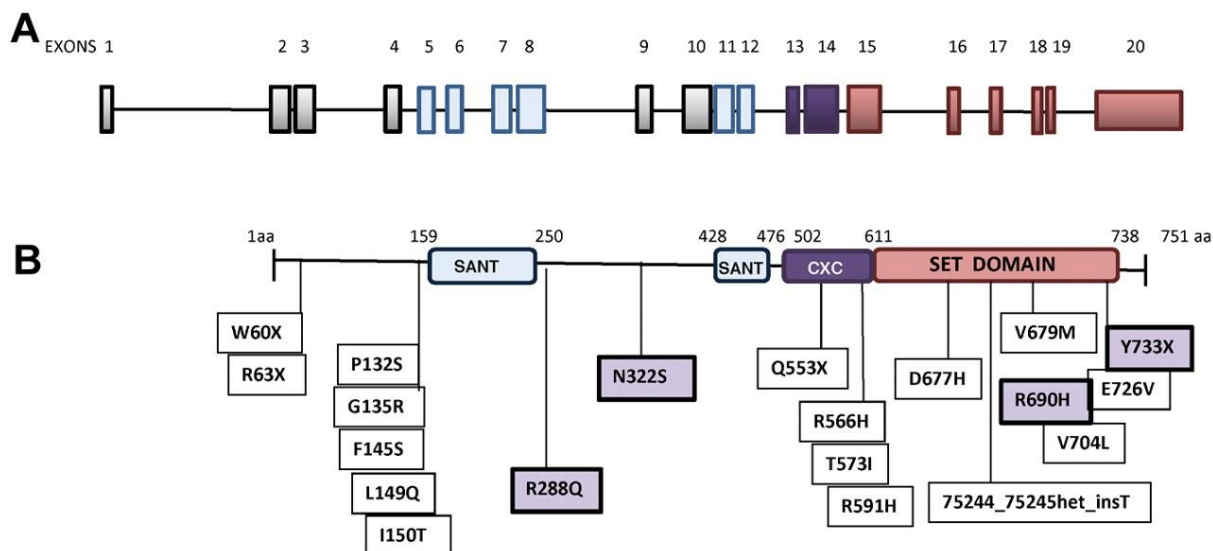
Tablica 3. Različiti transkripti mRNA i pripadajućih inačica proteina EZH2

UniProtBD/ Swiss-Prot	Inačice transkripata	mRNA NCBI	Duljina mRNA (nt)	Kodirajuće područje	Duljina cDNA (nt)	Veličina proteina
15910-1	TV 3	NM_001203247.1	2708	194-2434	2241	746
15910-2	TV 1	NM_004456.4	2723	194-2449	2256	751
15910-3	TV 2	NM_152998.2	2591	194-2317	2124	707
15910-4	TV 4	NM_001203248.1	2681	194-2407	2214	737
15910-5	TV 5	NM_001203249.1	2682	321-2408	2088	695

Protein EZH2 čine četiri osnovne domene:

- 1) Domena smještaja u jezgru (NLS, od engl. *Nuclear Localisation Signal*);
- 2) Dvije DNA vezujuće domene; SANT domene;

- 3) SET-domena - katalitička metiltransferazna aktivnost,
 - 4) Domena bogata cisteinima (engl. *Cystein Rich Domain*).
- U svim je ovim domenama dokazano postojanje mutacija.



Slika 3. Prikaz strukture EZH2 i lokalizacija mutacija (126). (A) Raspodjela egzona EZH2. Plavo i ljubičasto obojena polja označavaju egzone koji kodiraju SANT-DNA-vezujuću domenu i SET-domenu. (B) Smještaj mutacija („missense“ mutacije označene su ljubičastom bojom).

Do sada je poznat jedan homolog EZH2. Nazvan je EZH1 i kodiran je istoimenim genom koji se nalazi na kromosomu 17 (17q21) (127). Kodira protein koji sadrži 747 aminokiselina, molekulske mase 85 kD. Za razliku od EZH2 čije je ispoljavanje naročito snažno u stanicama s visokim proliferativnim potencijalom, za sada nije pokazano da i ispoljavanje EZH1 ovisi o razini diobene aktivnosti stanice. Ovo znači da je njegova aktivnost u stanicama sveprisutna (engl. *ubiquitous*). I EZH1 može biti dio kompleksa PRC2. EZH1 ima i važnu ulogu u zgušnjavanju kromatina i utišavanju prepisivanja, u odsutnosti ko-faktora metiltransferaze S adenozil metionina (128). Važno je naglasiti da je metiltransferazna aktivnost kompleksa PRC2 u kojem se nalazi EZH1 niža u odnosu na aktivnost PRC2 u kojem se nalazi EZH2.

1.6.2.1.5.1. Mutacije gena *EZH2*

Mutacije u genu *EZH2* pokazane su, po prvi puta, u limfomima i mijeloidnim neoplazmama. „Missense“ mutacija aminokiseline tirozina 641 (Y641), smještene unutar SET-domene dokazana je u 7% bolesnika s folikularnim limfomom i 22% bolesnika s difuznim tipom B staničnog limfoma (129). Ova je mutacija naknadno pokazana i u 3% melanoma (130). Naknadno je dokazano postojanje još dvije mutacije u SET-domeni, na položajima 677 i 687

(A677G, A687V) (131,132). Zanimljivo je da mutacija ne dovodi do gubitka katalitičke aktivnosti EZH2, već naprotiv, takav mutirani oblik proteina ima veći afinitet za metilne skupine („gain of function“). Stoga su di- i tri-metilacije H3K27 češće u tumorima s ovim tipovima mutacija (133). S druge strane, u oboljelih od hematoloških neoplazmi podrijetlom mijeloidne loze, dokazano je i prisustvo mutacija koje dovode do smanjene katalitičke aktivnosti EZH2 („loss of function“) (134, 135, 136). Ove su mutacije često združene s unipaternalnom disomijom (UPD; od engl. *Unipaternal Disomy*) (137), i najčešće se nalaze u domeni SET. Njihov funkcionalan doprinos razvoju neoplazme odvija se kroz stvaranje matičnih stanica raka (engl. *Cancer Stem Cells*), kroz HOXA9 –posredovanu samoobnovu stanica preteča mijeloidne loze (engl. *Myeloid Progenitors*). Nedavno je pokazano da utišavanje funkcije Ezh2 u eksperimentalnim uvjetima čini životinju sklonom obolijevanju od mijelodisplastičnog sindroma/mijeloproliferativnih neoplazmi združenih s trombocitozom i akutnom limfoblastičnom leukemijom podrijetla T-stanica. U ovom je modelu pokazano da, u ovakvim uvjetima, Ezh1 može preuzeti značajan dio uloge Ezh2 (138).

1.6.2.1.5.2. Post-translacijske modifikacije EZH2

Prva opisana modifikacija EZH2 na razini proteina bila je fosforilacija serina 21 (S21) posredovana s AKT1- Ovo za posljedicu ima smanjen afinitet vezanja EZH2 za histon H3 što rezultira derepresijom utišanih gena (139). Farmakološko inhibiranje fosforilacije EZH2/S21 za posljedicu ima smanjeno ispoljavanje gena antiapoptoze, uključujući i BCL2 (140). U glioblastomu, AKT1, preko fosforiliranja EZH2, potiče pro-onkogeno ispoljavanje STAT3 (141). Za funkciju važna modifikacija EZH2, posredovana je ciklin ovisnim kinazama 1 i 2 CDK1 i CDK2 (od engl. *Cyclin Dependent Kinase*) koje fosforiliraju treonin na položaju 350, 372 i 492 (T350,T372,T492) (142). Uloga fosforilacije na aktivnost EZH2 naglašeno je ovisna o mjestu fosforilacije. Fosforilacijom EZH2 na T350 za posljedicu ima povećanje njegovog afiniteta za nekodirajuće RNA HOTAIR (od engl. *HOX Transcript Antisense RNA*) i XIST (od engl. *X-Inactive Specific Transcript*), na koje se „lijepi“ funkcionalni PRC2. Ovo za posljedicu ima trimetilaciju novostvorenog histona H3 u stanicama-kćerima (143). Na modelu glioblastoma pokazano je i da CDK1-posredovano fosforiliranje EZH2 na T350 i T492 doprinosi njegovoj ubikvitinaciji i razgradnji.

Količina EZH2 u stanici može biti regulirana i malim, nekodirajućim molekulama RNA (mi-RNA), ovisno o vrsti stanice, odnosno tumora. U uvealnom melanomu je EZH2 mRNA izravna meta micro-RNA 32 (144), u karcinomu kolona micro-RNA 506 (145), dok je u

stanicama karcinoma prostate i želuca izravna meta micro-RNA 101(146), odnosno micro-RNA 126 (147). Smanjena količina EZH2 posredovana ovom micro-RNA, u spomenutom je modelu povezana s povećanom osjetljivošću na liječenje.

1.6.2.1.5.3. Mehanizam djelovanja PRC2

Najviša razina izraženosti PRC2 dokazana je u brzo dijelećim stanicama (148). Sukladno tome je i značajno ispoljavanje PRC2 dokazano tijekom embriogeneze, a izražaj mu je nizak u visokodiferenciranim stanicama (112). Iako bi se očekivalo da je smještaj kompleksa PRC2 isključivo u jezgri, njegovo je postojanje dokazano i u citoplazmi timocita (149), neutrofila i dendritičkih stanica (150). Pokazano je da EZH2 izravno metilira protein talin (150), te mijenjanjem njegove funkcije neizravno posreduje u adheziji i migraciji leukocita. Zbog toga što na ovaj način može modulirati imunološki odgovor, EZH2 se odnedavno smatra i važnim medijatorom tumorigeneze specifično vezane uz upalu (151).

Kompleks PRC 2 ima važnu ulogu u regulaciji diferencijacije embrionalnih matičnih stanica koja je ovisna o postojanju bivalentnih domena kromatina koje su karakterizirane istovremenom prisutnošću oznaka aktivacije - H3K4m3 i inhibicije - H3K27m3. Njihova je prisutnost prvobitno dokazana u području promotora gena za čimbenike transkripcije, u slučajevima njihove slabe (ali ipak prisutne) aktivnosti, u embrionalnim matičnim stanicama (152). Diferencirana stanica, s druge strane, jasno „određuje“ aktivnost kojeg gena joj je potrebna, pa se stoga, u diferenciranim stanicama, H3K27m3 koncentrira u područjima promotora gena koji trebaju biti utišani (112).

U sisavaca postoji nekoliko načina na koji se kompleks PRC veže u područje molekule DNA, a jedan od njih je posredovan nekodirajućim regulatornim sljedovima u molekuli DNA, tzv. PRE (engl. *polycomb group response element*) (153). Margueron i Reinberg (121) su pretpostavili da se proces vezanja sastoji od nekoliko koraka koji se odvijaju u točno određenom slijedu: (1) interakcija Jarid2 i AEBP2 s DNA (154,155); (2) interakcija RbAp46/48 s histonima H3 i H4 (156); (3) interakcija EED s H3K27m3 (115); (4) interakcija proteina PLC (od engl. *Polycomb Like*) s nepoznatim biljegom histona i (5) interakcija podjedinica PRC2 s dugačkim, nekodirajućim molekulama RNA.

Iako se prekomjerna metilacija molekule DNA još uvijek smatra ključnim epigenetičkim događajem koji prethodi utišavanju gena. Kondo i sur. su u pokusima na linijama stanica karcinoma dojke i prostate pokazali da razina metilacije DNA promotora tumor supresorskih gena relativno niska. Sukladno tome, obrazac njihove djelomične metilacije ne može objasniti

potpuno utišavanje tumor supresorskih gena (157). Međutim, postojanje velikog broja modificiranih aminokiselinskih ostataka lizina histona H3 (H3K27m3) može objasniti fenomen utišavanja aktivnosti gena. U ovom procesu, metilacija molekule DNA i trimetilacija histona H3 ne moraju biti nužno povezane. Odnedavno postoji još jedan model koji objašnjava vezanje kompleksa PRC2 na točno definirano područje kromatina: prema tom modelu, nemetilirane dinukleotide u otočićima CpG prepoznaje ne-kanonični kompleks PRC1 u suradnji s proteinom KDM2B (demetilaza histona) koja katalizira ubikvitiniranje histona H2A na lizinu 119 (H2AK119ub) (158,159). Ovako modificiran histon H2A predstavlja „sidrište“ za PRC2. Način na koji PRC2 kompleks prepoznaje H2AK119ub nije do kraja razjašnjen, ali je odnedavno poznato da je za „prepoznavanje“ ključan JARID2, koji je i sam „metilacijska meta“ kompleksa PRC2 (118).

Važna uloga kompleksa PRC2 u procesu razvoja i diferencijacije tkiva pokazana je u različitim modelnim sustavima, na različitim razinama. Na primjer, jedna od visokokonzerviranih funkcija PRC2 je utišavanje kromosoma X, kojem prethodi proteinom ATRX posredovana interakcija dugačke nekodirajuće RNA XIST i EZH2 (160). U ribicama (lat. *Danio rerio*) utišanim EZH2, rani razvoj prolazi uredno, a embrij ugiba relativno kasno - unutar vremenskog perioda u kojem počinje diferencijacija tkiva (161). U sisavaca s ciljno utišanim EZH2, ili SUZ12, ili EED1 se odumiranje dešava puno ranije; u miša već u fazi implantacije ili gastrulacije (162, 163). „Knockout“ miševi za Jarid2 imaju opsežne poremećaje u razvoju neuralne cijevi i ugibaju *in utero* (164), do 15. dana embrionalnog života. Svi ovi transgenični modeli dodatno potvrđuju važnost postojanja i složenost visoko konzerviranih funkcija kompleksa PRC2 (98).

Iako se EZH2 primarno smatra modifikatorom epigenoma, ova metiltransferaza histona može djelovati u znatno širem kontekstu.

Npr. EZH2 u kompleksu s estrogenskim receptorom (ER), alfa- i beta-kateninom u kompleksu koji regulira aktivnostc-Myc i ciklina D1 u karcinomu dojke. U transgeničnih miševa je pokazano da EZH2 utječe na nakupljanje beta katetina u jezgri. U stanicama karcinoma kolona međudjelovanje proliferirajućeg staničnog antigena PCNA (od engl. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) s EZH2 i beta-katetinom povećava izraženost ciljnih gena beta-katetina. Za navedeno nije potrebna EZH2 metiltrasferazna aktivnost. EZH2 može, idim H3K27, metilirati i druge proteine čime mijenja njihovu ulogu. Npr. EZH2 posredovana metilacija STAT3 važna je u napredovanju glioblastoma (165).

1.6.2.1.5.4. Aktivnost kompleksa PRC2 u karcinomima

Pojačani izražaj EZH2 u zloćudnim tumorima u pravilu ukazuje na lošiju prognozu, odnosno slabiju diferenciranost stanica. U karcinomu dojke je pokazano da se ispoljavanje EZH2, čiji promotor posjeduje vezno mjesto za HIF-1 α (od engl. *Hypoxia Inducible Factor 1 alpha*) pojačava u stanju hipoksije. U stanicama-pretečama karcinoma dojke (BTIC, od engl. *Breast Tumor Initiating Cells*), upravo prekomjerno ispoljavanje EZH2 za posljedicu ima utišavanje gena *RAD54*, koji je iznimno važan za popravak molekule DNA. Nemogućnost popravka prati amplifikacija centromere (ovo ukazuje na kromosomsku nestabilnost), u području koje se nalazi *RAF1*. Njegovo pojačano, amplifikacijom izazvano ispoljavanje za posljedicu ima nakupljanje aktiviranog, nefosforiliranog beta-katenina u jezgri. Ova kaskada događaja je neupitno pro-mitotička i čini temelj za selektivnu klonalnu proliferaciju (166). U karcinomu prostate je pojačani izražaj EZH2 povezan uz agresivnost bolesti i metastatski rasap (146). U većini modela zloćudnih tumora je pojačani izražaj EZH2 pokazan kao loš prognostički čimbenik, što je i dovelo do intenzivnog istraživanja njegovih potencijalnih specifičnih inhibitora (167).

Najčešće spominjani čimbenik transkripcije, vezan uz pojačano ispoljavanje EZH2, je c-Myc. Njegovo pozitivno djelovanje na aktivnost gena EZH2, vezanjem na promotor otkriveno je 2011. godine (168), na modelu stanica karcinoma prostate. c-Myc, zbog svog pleiotropnog djelovanja, dodatno i neizravno, doprinosi povišenoj razini EZH2 negativnom regulacijom miR-26a i miR-26b za koje se vezna mjesta nalaze u području 3'-UTR (od engl. *3-Prime UnTranslated Region*) primarnog transkripta EZH2. S druge strane, povećana količina EZH2 inhibira transkripciju miR-494 koja se veže za 3'UTR c-Myc te na taj način doprinosi povišenoj razini c-Myc. Ovaj mehanizam pozitivne povratne sprege pokazan je u limfomu (169). Vezanje EZH2 na promotor c-Myc u matičnim stanicama glioblastoma (ali ne i u linijama stanica glioblastoma) potiče transkripciju c-Myc koja je, u ovom specifičnom modelu, združena sa smanjenim proliferacijskim potencijalom stanica (170). Pokazano je da pojačana izraženosti EZH2 u HPV(+) kulturama stanica grlića maternice ovisi o onkoproteinu E7. Na biopsijama tkiva vrata grlića maternice HPV(+) bolesnica, dokazana je pojačana ekspresija EZH2 (171).

Iako je EZH2, zbog osnovnog mehanizma svog djelovanja, razvrstan u onkogene (poticanje signalnih puteva koji potiču onkogenezu), njegova uloga u tumorima glave i vrata, zbog

specifičnosti povezanih s djelovanjem na neke molekule uključene u signalne putove posredovane s NRF2 i NF- κ B je vrlo složena.

U nemalim stanicama pluća je nedavno pokazano da EZH2 može utišavati transkripciju gena *NRF 2* (172). Njegov je istoimeni proteinski produkt NRF2 (od engl. *NF-E2-related factor 2*) čimbenik transkripcije za gene koji u svojim promotorima posjeduju sljedove ARE/ EpRE (od engl. *Antioxidant Response Elements*)/*Electrophile Response Element (EpRE)*). Prisutni su u promotorima enzima Faze II, kao i gena koji kodiraju sintezu antioksidativnih enzima, uključujući NAD(P)H kinon dehidrogenaze, 1 i 2, i hem oksigenazu (173). Ovi enzimi sudjeluju u odstranjivanju viška slobodnih kisikovih vrsta (ROS, od engl. *Reactive Oxygen Species*). Nedavno je pokazano da: a) endogeno ispoljeni onkogeni K-ras i Myc potiču transkripciju NRF2 i pojačavaju proliferacijski potencijal stanice poticanjem njezinog antioksidacijskog, NRF2-ovisnog programa (174); b) aktivirani NRF2, poticanjem aktivnosti čimbenika transkripcije, ATF4, potiče ekspresiju ključnih enzima biosinteze serina/glicina: 3-fosfoglicerat dehidrogenaze (engl. *Phosphoglycerate Dehydrogenase - PHGDH*), mitohondrijske serin hidroksimetiltransferaze 2 (engl. *Serine Hydroxymethyltransferase 2 - SHMT2*) i fosfoserin aminotransferaze 1 (engl. *Phosphoserine Aminotransferase 1 - PSAT1*) (175). Ovi enzimi predstavljaju funkcionalnu poveznicu između NRF2 i sinteze glicina i nukleotida. Pokazano je da pojačana ispoljenost PHGDH i SHMT2 u stanicama ne-malih stanica karcinoma pluća ima negativnu prognostičku vrijednost (175). Ako EZH2 može utišati NRF2, što je i pokazano u ranije spomenutom modelu, onda je njegova uloga, osobito u odnosu na opisani signalni put – antionkogen.

1.6.2.1.5.4.1. EZH2 u karcinomima glave i vrata

Pojačana izraženost EZH2 u zloćudnim tumorima glave i vrata je, u velikom broju studija, pokazana kao loš prognostički biljeg. Međutim, snaga ispoljenosti ne predstavlja parametar koji bi se mogao smatrati nedvojbeno „lošim“ pokazateljem. Tako je na primjer, u petogodišnjem praćenju, pojačano ispoljavanje EZH2 dokazano u 80% bolesnika s leukoplakijama koje su progredirale u karcinom usne šupljine. Međutim, ova se progresija desila i u čak 28% oboljelih od leukoplakija u kojima EZH2 nije bio izražen, ili je bio izražen vrlo slabo (176). Dodatno je, u 47 bolesnika s raznolikim zloćudnim tumorima glave i vrata (od kojih niti jedan nije imao tumor u području ždrijela), pokazano da je snažno ispoljavanje EZH2 povezano sa snažnim ispoljavanjem ciklina D1 i histološkim karakteristikama tumora (177). Snažnu ispoljenost EZH2 u karcinomima jezika bilo je moguće povezati s većim

brojem kliničkih parametara (veličinom tumora, statusom limfnih čvorova i uznapredovalošću bolesti). Prisustvo metastaza u limfnim čvorovima vrata bilo je povezano sa smanjenom ispoljenošću E-kaderina (178). Mehaničističkom je studijom pokazano da EZH2 stvara komplekse s deacetilazama histona HDAC1/HDAC2 te proteinom Snail te, djelovanjem unutar kompleksa, utišava aktivnost gena za E-kaderin. Ovo je pogubno za domaćina s obzirom na to da pravilno funkcioniranje E-kaderina priječi nastanak epitelno-mezenhimalnog prijelaza (EMT) (EMT, od engl. *Epithelial-Mesenchymal Transition*) koju karakteriziraju gubitak polarnosti i adhezije stanica, što dovodi do pojačanog rasta i metastaziranja karcinoma (179, 180).

Analizom ispoljavanja EZH2 u dodatnih 97 zloćudnih tumora glave i vrata u kineskoj populaciji (ishodišni organi nisu bili navedeni) dodatno je pokazano da se u približno polovini zloćudnih tumora glave i vrata EZH2 ispoljava, a samo je ispoljavanje utoliko snažnije što je tumor manje diferenciran. Potvrda pro-onkogenom djelovanja EZH2 je u ovom modelu pokazana i dokidanjem aktivnosti EZH2 korištenjem DZNep (3- Deazaneplanocin A), primjena kojeg je dovela do smanjenog anti-apoptotičkog potencijala i posljedičnog zaustavljanja staničnog ciklusa, što je na kraju rezultiralo smanjenom proliferacijom stanica tumora (181).

Postoji nekoliko studija kojima se analizirao izražaj EZH2 u nazofarinksu. Alajez i suradnici su pokazali da je njegova pojačana izraženost povezana s većom učestalošću recidiva bolesti (182). S druge strane, utišavanje EZH2 posredovanjem miR-26a smanjuje agresivni rast stanica tumora i slabi njegov metastatski potencijal (183, 184). U karcinomima nazofarinksa, EZH2 metilacijom promotora IKK- α , važne komponente NF- κ B signalnog puta, dovodi do razvoja slabije diferenciranog tipa karcinoma (185).

Analizom ispoljavanja EZH2 u 118 bolesnika s karcinomima glave i vrata (samo 23 karcinoma hipofarinksa) pokazano je da relativno malen broj karcinoma glave i vrata ispoljava EZH2 (4/40 karcinoma usne šupljine, 12/22 karcinoma orofarinksa, 5/23 karcinoma hipofarinksa i 8/33 karcinoma larinksa), ali i da njegovo ispoljavanje pozitivno korelira sa širenjem bolesti u limfne čvorove (186).

U nedavno objavljenom istraživanju, Chang i suradnici su, analizom 90 uzoraka tumora glave i vrata (od toga 10 tumora hipofarinksa), pokazali da pojačan izražaj EZH2 pozitivno korelira sa stadijem „T“ i kraćim preživljenjem bolesnika. Nisu isključili mogućnost da kraće preživljenje nije posljedica povezanosti snažnog izražaja EZH2 i pojave neosjetljivosti na liječenje (187), s obzirom na to da su pokazali, *in vitro*, da ciljano utišavanje EZH2 metodom si-RNA povećava osjetljivost na cisplatinu. S druge strane, najnoviji podatci upućuju na to da

EZH2 može inhibirati transkripciju gena čiji su proteinski produkti uključeni u proces popravka molekule DNA. U kontekstu liječenja citostaticima, ovo je scenarij koji je dobar za domaćina, s obzirom na to da stanica ne može popraviti oštećenja DNA koja izaziva kemoterapeutik. Iz toga slijedi da, u ovom konkretnom scenariju (liječenje), pojačan izražaj EZH2 može biti koristan domaćinu (188). Najnovijom objavljenom studijom na karcinomima larinksa je pokazano (na razini mRNA i proteina) da je EZH2 jače ispoljen u tkivu tumora u odnosu na pripadajuće tkivo netumora, ali nije pokazana povezanost pojačanog izražaja i stadija tumora koji su, za potrebe statističke analize, bili razvrstani u dvije skupine (T1/T2 vs. T3/T4) (189). Zanimljivo istraživanje vezano je uz ulogu EZH2 u karcinomima glave i vrata na modelu korioalantiočne membrane. Rast tumora, angiogeneza, invazija (proboj bazalne membrane), metastaziranje i EMT su pozitivno vezani uz aktivan EZH2, a izostaju ako je EZH2 inaktivan (190).

Značaj izražaja EZH2 je u funkciji vremena i ovisi o tipu stanice. U većini se slučajeva djelovanje EZH2 interpretira kao ultimativno onkogeno. Dobar primjer za ovakav način djelovanje EZH2 je utišavanje gena Rap1GAP i E-kaderina, tumor supresorskih gena čiji je izražaj smanjen u mnogim zloćudnim tumorima, uključujući i tumore glave i vrata.

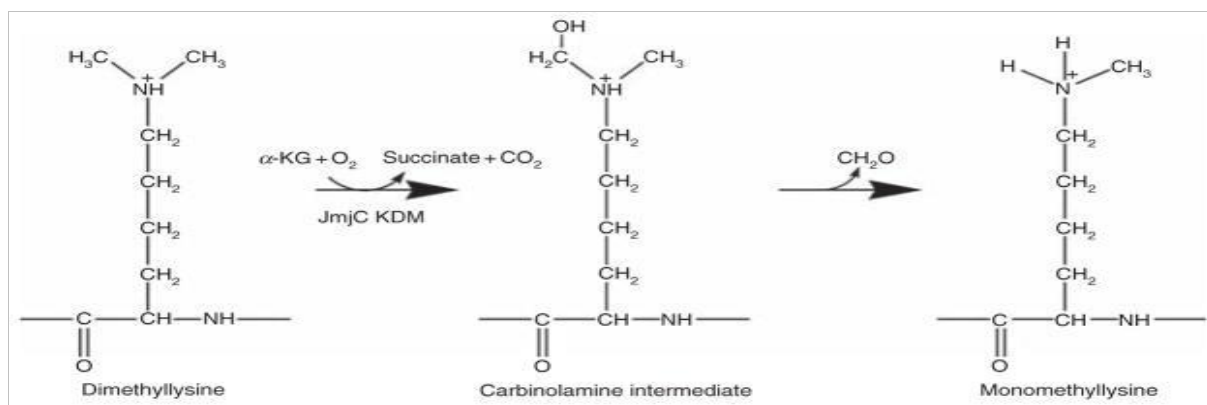
U kulturama stanica tumora glave i vrata pokazano je da pojačana izraženost EZH2 dovodi do smanjene izraženosti Rap1GAP, a utišavanje EZH2, posredovano miR-101, za posljedicu ima pojačanu izraženost Rap1GAP (191). Postavljanje trimetilacijske oznake, H3K27me3, u područje promotora gena za E-kaderin u stanicama podrijetlom karcinoma grkljana pokazano je nedavno (192). Inhibiranjem EZH2 se, u ovom modelu, aktivira transkripcija E-kaderina i stanice ulaze u mezenhimalno-epitelni, po domaćina koristan (smanjena tumorigeničnost stanica) prijelaz.

Međutim, u kontekstu reguliranja aktivnosti gena koji kodiraju čimbenike transkripcije, konačan rezultat aktiviranog EZH2 je prilično nepredvidiv. Poznato je da u stanicama nazofaringealnog karcinoma smanjena razina IKK α korelira sa slabijom diferencijacijom stanica tumora. Sukladno tome, snažan izražaj IKK α korelira s boljom diferencijacijom, neovisno o NF- κ B signalnom putu (193). Ovo je prilično važno za ove tumore, s obzirom da je u većini vrsta zloćudnih tumora situacija upravo obratna. Pokazana je i objašnjena (postavljanje trimetilacijske oznake na H3K27) povezanost između razine IKK α (niska) i EZH2 (visoka), u uzorcima karcinoma nazofarinksa. Ovakav događaj mogao bi biti povoljan za domaćina u planocelularnom karcinomu s obzirom na to da u ovim tipovima tumora pokazano da IKK α može doprinijeti i diferencijaciji (185).

1.6.2.1.6. Obitelj demetilaza histona

Proces metilacije i demetilacije aminokiselinskih ostataka lizina i arginina u molekulama histona je dinamičan proces u kojemu, uz metiltransferaze, sudjeluju i demetilaze histona. Ovi se, evolucijski iznimno visoko konzervirani enzimi, prema specifičnoj aktivnosti dijele u dvije osnovne skupine. U prvoj se skupini nalaze demetilaze koje su do 2002. godine bile smatrane isključivo oksidazama (amina). Bannister, Schneider i Kozarides su na temelju velikog broja eksperimentalnih rezultata zaključili da su ove oksidaze ujedno i demetilaze histona (194). Najpoznatiji predstavnik ove skupine je ujedno i prva otkrivena demetilaza poznata pod nazivom LSD1 (eng. Lysine Specific Demethylase 1), iako joj je službeni naziv KDM1A (195, 196, 197). Enzimi ove skupine mogu ukloniti metilnu skupinu samo ako je aminokiselinski ostatak lizina mono- ili dimetiliran. Drugim riječima, ne sudjeluju u demetilaciji trimetiliranog lizina.

Velik interes za područje djelovanja demetilaza u razvojnoj biologiji i molekularnoj onkologiji potaknulo je otkriće skupine demetilaza Jumonji (Jmj) i deoksigenaza ovisna o 2-oksoglutaratu- i divalentnom željezu, koje imaju širi spektar djelovanja u odnosu na oksidaze, pa sudjeluju u mono-, di- i tridemetilaciji substrata (198).



Slika 4. Mehanizam reakcije oksidacije amina u ostatku lizina (199).

U čovjeka postoji 30 proteina koji posjeduju Jumonji C (JmjC) katalitičku demetilaznu domenu, a više od polovice ovih proteina (N=18) posjeduje demetilaznu aktivnost vezanu uz histone (200).

Za dva enzima postoje dokazi da snažno sudjeluju u demetilaciju H3K27me3: UTX (od engl. *Ubiquitously Transcribed Tetratricopeptide Repeat (TRP) Gene on the X Chromosome* -

poznat i kao KDM6A) i JMJD3 (od engl. *Jumonji Domain Containing Protein 3*) - poznat i kao KDM6B (195, 196, 201). Za razliku od JMJD3, čija transkripcija može biti potaknuta različitim događajima (na primjer, upalom i onkogenim virusima) (202, 203), UTX se ispoljava stalno, zbog toga što je gen izbjegao proces nasumičnog inaktiviranja metilacijom, na majčinom kromosomu. Treća demetilaza, UTY (od engl. *Ubiquitously Transcribed Tetratricopeptide Repeat (TRP) Gene on the Y Chromosome*) koji se nalazi na kromosomu Y, ima minimalnu demetilaznu aktivnost (204).

Katalitička aktivnost UTX i JMJD3 je nedavno pokazana kao neophodna za diferencijaciju i sazrijevanje T-limfocita (205). Međutim, čini se da u zloćudno promijenjenim stanicama ova dva enzima imaju antagonističke uloge, pri čemu JMJD3 inhibira reprogramiranje stanice reguliranjem aktivnosti lokusa na kojem se nalazi INK/ARF (CDKN2A) i ubikvitiniranjem PHF20 privlačenjem ubikvitin ligaze TRIM26. Ova je uloga JMJD3 neovisna o njegovoj demetilaznoj aktivnosti (206). Međutim, u stanicama fibroblasta, aktivnost JMJD3 potaknuta signalnim putem RAS-RAF može se smatrati supresorskom, s obzirom na to da svojom demetilaznom aktivnošću izdvojeno pojačava aktivnost lokusa na kojem se nalazi INK/ARF kojim su kodirani tumor supresorski geni snažnog djelovanja (*p14, p15, p16*) (207). Ovo za posljedicu ima zaustavljanje ciklusa i senescenciju stanica (208). Postoji i treća funkcija JMJD3, koja se smatra onkogenom, u akutnoj limfatičkoj leukemiji podrijetlom T-stanica (T-ALL) (209).

Nazočnost JMJD3 je, kromatinskom imunoprecipitacijom, dokazana i u području trimetiliranog lizina na položaju 4 (H3K4me3) (210). Rezultati najnovijih istraživanja ukazuju na postojanje različitih interakcija JMJD3 i UTX s proteinima-partnerima, zbog čega su, osim u demetilaciju histona, uključeni i u procese ubikvitinacije i acetilacije kromatina.

1.6.2.1.6.1. Gen i protein JMJD3/KDM6B

Gen KDM6B (od engl. *Lysine-Specific Demethylase 6B*) se u čovjeka nalazi na kromosomu 17 (17p13.1), samo 191 494 pb udaljen od gena *TP53*. Kodirajući dio gena dugačak je 14 884 pb. Posjeduje 22 eksona, a kodirajući slijed počinje u drugoj polovini eksona 4 (211). Protein JMJD 3 se sastoji od 1 643 aminokiseline (195). U domeni Jmj C, kodiranom aminokiselinama 1 339-1 502, posjeduje 87% homologije s domenom JmjC UTX (212). Unutar ove domene nalaze se vezna mjesta za željezo: histidin (His) 1390, glutaminska kiselina (Glu) 1 392 i His 1 470, koja su neophodna za katalitičku aktivnost enzima (195). Iako se u početnim fazama istraživanja ove demetilaze tvrdilo da je njezin smještaj isključivo

u jezgri (213), danas se zna da to nije tako. Novije studije ukazuju na prisustvo JMJD3 i u jezgri, i u citoplazmi (214). Na temelju malobrojnih, do danas objavljenih studija o JMJD3 u raku, vrlo malo se može zaključiti o njegovoj ulozi, prvenstveno zbog kontradiktornosti dobivenih rezultata. Tako, na primjer, najnovija studija ukazuje na njegovu tumor supresorsku ulogu i prognostički značaj u oboljelih od karcinoma kolona (215), ali ne i karcinoma prostate (216). Važna antionkogeni uloga JMJD3 u stanicama karcinomu kolona pokazana je već 2011. godine, kada je dokazano da: a) aktivni metabolit vitamina D, $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D(3)}$ potiče transkripciju *JMJD3*; b) utišavanje *JMJD3* dovodi do smanjenog izražaja E-kaderina i posljedičnog epitelno-mezenhimalnog prijelaza (217). U stanicama karcinoma dojke situacija se čini upravo suprotnom, s obzirom na to da se JMJD3 pokazao neophodnim za epitelno-mezenhimalni prijelaz posredovan s TGF- β . Utišavanje JMJD3 u stanicama karcinoma dojke za posljedicu ima smanjeni proliferacijski potencijal (218).

1.6.2.1.6.2. Mehanizam djelovanja JMJD3

Ranije spomenuto poticanje ispoljavanja JMJD3 onkogenim virusima pokazano je na primarnim epitelnim stanicama čovjeka u kojima je bio prisutan HPV-E7 onkoprotein. Nazočnost E7 je bila povezana s reverzibilnim smanjenjem represijske oznake H3K27me3, uz istovremeni porast izražaja UTX i JMJD3, koji je bio uključen u aktiviranje tumor supresorskog lokusa *p16^{INK4A}*. U četiri uzorka tkiva bolesnica s HPV16 E7(+) cervikalnom intraepitelnom neoplazijom (CIN), pokazana je negativna povezanost izraženosti p16 u odnosu na stupanj metilacije H3K27me3, odnosno na izraženost JMJD3 (219).

Nedavno je pokazano da se p53 veže na JMJD3. Za vezanje je potrebna funkcionalna domena, koja je inače neophodna za tetramerizaciju p53. Još uvijek nije poznato da li do vezanja p53/JMJD3 dolazi upravo kroz tetramerizacijsku domenu p53, ili p53 mora imati strukturu tetramera kako bi se uopće vezao za JMJD3 (220). Izlaganje stanica zračenju za posljedicu nema samo pojačanu aktivnost gena *JMJD3* (208), nego i pojačano vezanje kompleksa JMJD3/p53 na ciljna područja molekule DNA. Modeliranjem je pokazano da 27% veznih mjesta za JMJD3 čine područja promotora, najčešće tumor supresorskih gena, u kojima je bilo zamijećeno smanjenje H3K27me3, sukladno demetilacijskoj aktivnosti JMJD3. Vezanja u području promotora, koje nije bilo praćeno smanjenjem biljega H3K27me3, prvenstveno gena čija je aktivnost regulirana s p53, bio je posredovan s p53 koji se, u danom modelu, ponašao kao „navigator“.

1.6.2.1.6.3. JMJD3 u karcinomima

Prvi rezultati ukazali su na značaj JMJD3 u karcinomima prostate, u smislu pojačane ekspresije u tumoru, u odnosu na okolno zdravo tkivo. Rezultati analize Western blot napravljeni su samo na pet uzoraka karcinoma prostate (protein dokazan, 3/4) dok u dva analizirana uzorka benigne hiperplazije prostate njegovo ispoljavanje nije dokazano (195). U studiji kojom su analizirani uzorci 36 bolesnika oboljelih od karcinoma bubrega, dokazana je povećana izraženost JMJD3 (na razini mRNA i proteina) u tkivu karcinoma u odnosu na zdravo tkivo (213). U tkivu glioblastoma, preciznije- u matičnim stanicama glioblastoma potaknutim na diferencijaciju dolazi do aktiviranja *JMJD3*, dok u već diferenciranim stanicama ovaj fenomen nije primijećen. S obzirom na opisani mehanizam starenja u stanicama koje su bile mutanti za lokus INK4/ARF, a mehanizam djelovanja JMJD3 odvija se preko aktivacije *p21* (221).

Najvećom, do sada provedenom kliničkom studijom analizirana je izraženosti *JMJD3* u 96 uzoraka tkiva bolesnika oboljelih od karcinoma debelog crijeva. Smanjena izraženost *JMJD3* mRNA u tkivu karcinoma u odnosu na zdravo tkivo, pokazana je u tkivu tumora (56,3%). U ovom je modelu postojala samo slaba korelacija između smanjenog izražaja *JMJD3* i slabije diferencijacije tumora ($P=0,082$) (217).

1.7. Tumor supresorski gen *TP53*

1.7.1. Povijesni pregled

„Čuvar genoma“ (engl. *Guardian of the Genome*) (222), „Zvijezda smrti“ (engl. *Death Star*) (223) i „Dobar i loš policajac“ (engl. *Good and Bad Cop*) (224) samo su neka od imena kojima se opisuje proteinski produkt gena *TP53*. Razlog nadijevanja ovako dramatičnih imena je posljedica shvaćanja da *TP53* robusno i neizostavno sudjeluje u odgovoru stanice na podražaje koji bi se mogli smatrati „prijetećim“ za domaćina. Međutim, godine istraživanja dovele su do spoznaja koje upućuju na manje dramatične funkcije ovog proteina. Stoga je novopredložen naziv „Čuvar homeostaze“ (od engl. *Guardian of Homeostasis*) više nego opravdan (225), ako se ima u vidu da *TP53* može regulirati aktivnost gena čiji proteinski produkti u stanici mogu imati antagonističke funkcije u istovjetnim procesima. Zbog toga se njegova funkcija počela smatrati „bifunkcionalno antagonističkom“ (226). Na primjer, *TP53*

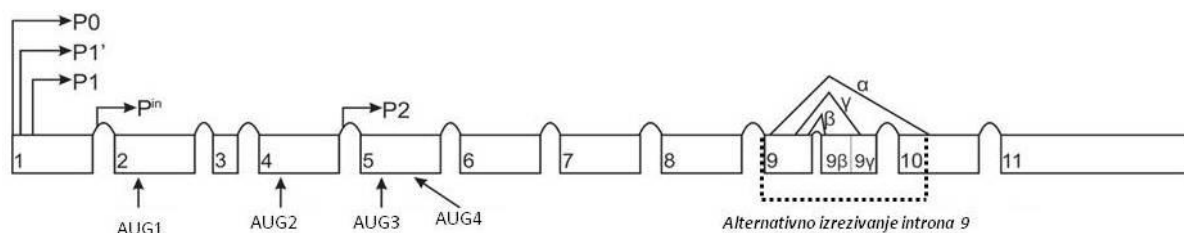
potiče aktivnost *bona fide* proapoptotičih gena (*PUMA*, *NOXA*), a u isto vrijeme potiče i aktivnost gena čiji su proteinski produkti neizravno uključeni u inhibiranje apoptoze (p21).

Protein p53 je otkriven godine 1979., u lizatima stanica zaraženih virusom SV40 (od engl. *Simian Virus 40*) (227). Pokazano je da se, u zaraženim stanicama, p53 veže s antigenom SV40, pri čemu nastaje stabilan kompleks koji djeluje onkogeno. Stoga je zaključeno da p53 ima snažan onkogeni potencijal. U radovima koji su uslijedili, prisustvo p53 dokazano je u mnogim linijama stanica podrijetlom od karcinoma i zbog toga se dugo vremena smatralo da je p53 onkogen. Ova je zablude dokinuta 10 godina nakon otkrića p53 kada je Finley pokazao da su se zaključci dotadašnjih istraživanja temeljili na prisutnosti mutiranog tipa gena *TP53* (228). Sukladno tome, zaključeno je da je *TP53* tumor supresorski gen, a godine 1993. proglašen je molekulom godine (229). Njegov proteinski produkt ima funkciju čimbenika transkripcije koji se kao tetramer izravno i specifično veže za DNA, te izravno utječe na ispoljavanje ciljnih gena (230).

1.7.2. Gen i protein *TP53*

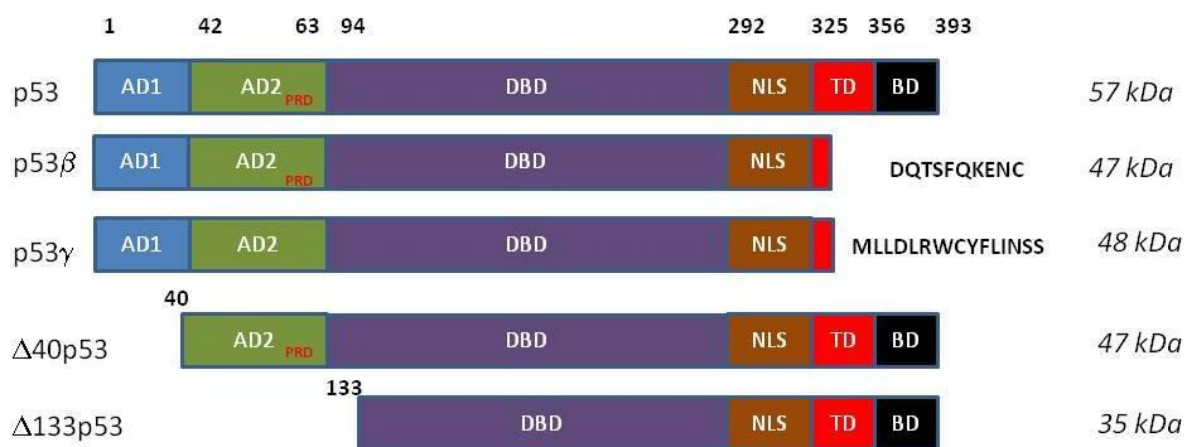
U čovjeka je p53 kodiran genom *TP53* koji se nalazi na kratkom kraku kromosoma 17 (17p13.1) na kojem zauzima 20 kb genomske DNA (7 571 719-7 590 862.). Čini ga 14 egzona, od kojih 10 kodira nastanak cjelovitog proteina, koji čine 393 aminokiseline. Prvi je egzon nekodirajući. Preostala tri egzona (egzon 2/3, egzon 9β, i egzon 9γ) uključeni su u sintezu različitih inačica transkripata i proteina (231).

Do 2002. godine se smatralo da *TP53* posjeduje samo jednu, osnovnu inačicu i mRNA i proteina (232). Danas je poznato da se primarni transkript *TP53*, može izrezati (i povezati) na barem 12 načina (toliko se inačica spominje u službenoj literaturi), iako su u Genskoj banci trenutno deponirani sljedovi 15 različitih inačica (233) (bazi je zadnji put pristupljeno 24.11.2016). Osim alternativnog izrezivanja, nastanku velikog broja inačica pogoduje postojanje pet promotora; tri u području egzona 1 i preostala dva u intronima 1 i 4 (231) te nekoliko točaka u kojima počinje transkripcija (Slika 5.). Transkripti potaknuti aktivnim promotorima P0, P1 i P1' predložci su za translaciju proteina pune duljine (393 aminokiseline). Njegov je početak na kodonu AUG1, na početku egzona 2.



Slika 5. Prikaz smještaja pet promotora *TP53*, tri u području egzona 1 i preostala dva u intronima 1 i 4 (231). Velikom broju inačica p53 pogoduje postojanje pet promotora smještenih u egzonu 1 (P0, P1 i P1'), intronu 1 (Pⁱⁿ) i intronu 4 (P2), četiri točke u kojima može započeti translacija (AUG1-AUG4) i tri načina na koji se može prekrojiti intron 9 (234,235).

Transkripcijske inačice $\Delta 133$ TP53 i $\Delta 160$ TP53 su pod kontrolom promotora P2 (intron 4). Različite inačice proteina TP53 dodatno su razvrstane u tri osnovne skupine (α , β i γ varijante), na temelju alternativnog prekrajanja introna 9 zbog čega dolazi do nastanka nekoliko inačica proteina koje se razlikuju u svom C-terminalnom dijelu (236)



Slika 6. Inačice proteina p53. U sastav punog proteina p53 molekulske mase 57kDa ulaze 393 aminokiseline. Inačica p53 α posjeduje cijelu oligomerizacijsku domenu. U sve tri inačice su prisutne aminokiseline koje su organizirane u domene AD1 i AD2: aktivacijske domene 1 (AK 1-42) i 2 (AK 43-92); PRD: područje bogato prolinom (od engl. *Proline Rich Domain*) (AK 64-92); DBD: domena vezanja za molekulu DNA (od engl. *DNA-binding domain*) (AK 101-300); NLS: signal smještaja u jezgu (od engl. *Nuclear Localisation Signal*) (AK 305-322); TD: domena tetramerizacije (od engl. *Tetramerisation Domain*; *Oligodimerisation Domain*) (AK 326-356); BD: bazična domena (od engl. *Basic Domain*) (AK 356-393) (234, 237, 238).

Još se jedan gen, *WRAP53* nalazi u ovom području, uzvodno od kodirajućeg područja *TP53*, na suprotnom lancu molekule DNA. Prostorno se preklapa s egzonom 1 i dijelom introna 1.

Poznato je da kodira nastanak transkripta koji je komplementaran slijedu nukleotida u egzonu 1. Ovaj antisense transkript regulira izražaj *TP53*, i na razini mRNA, i na razini proteina. Njegova je prisutnost važan poticajni čimbenik ne samo za pojačanu aktivnost promotora *TP53*, nego i za posredovanje u posttranslacijskim modifikacijama proteina p53, nakon izazivanja oštećenja molekule DNA (239). Iako je već dulje vrijeme poznato da je *TP53* najčešće mutirani gen u karcinomima čovjeka (javlja se u približno 50% zloćudnih tumora), nije dio standardiziranih algoritama koji bi se mogli koristiti u prognoziranju tijeka bolesti, odnosno odgovora na liječenje. Jedan od razloga je ranije naveden bifunkcionalni antagonizam funkcioniranja kojeg je gotovo nemoguće povezati s velikim brojem mutacija u ovome genu (trenutno je u datoteci Međunarodne agencije za rak (International Cancer Agency) pohranjeno 2 9794 mutacija gena *TP53*).

Sve veći broj istraživanja ukazuje da su različite izoforme *TP53* aberantno izražene u pojedinim tipovima karcinoma, pa tako i u karcinomima glave i vrata (240). Prisutnost ranije navedenih izoformi gena *TP53*, za koje još uvijek ne znamo za što su stanici točno potrebne, moglo bi, u budućnosti, ponuditi i objašnjenja vezana uz često kontradiktorne rezultate studija kojima se pokušava povezati status gena *TP53* s uspjehom liječenja i prognozom bolesti (241).

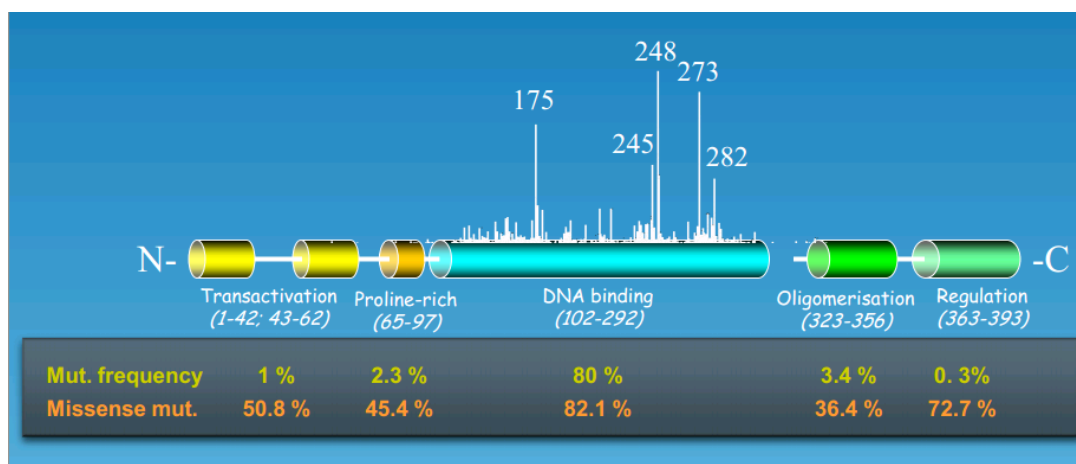
1.7.3. Obitelj gena *TP53*

Dugo se vremena smatralo da u genomu čovjeka ne postoje geni koji su slični genu *TP53*. U skladu s napretkom tehnologije, godine 1997. je identificiran njegov prvi homolog *TP73*. Gen *TP73* nalazi se na kratkom kraku kromosoma 1 (1p36.2-3). Upravo je ovo područje često izgubljeno u različitim vrstama zloćudnih tumora (neuroblastomi, tumori debelog crijeva, melanomi i zloćudni tumori dojke) (242). Godine 1998., Yang i suradnici su otkrili novog člana obitelji *TP53*, gen *TP63*, smješten na trećem kromosomu (3q27-29), u području koje je često udvostručeno u različitim vrstama tumora, što ukazuje na mogući onkogeni učinak ovog gena (243). U karcinomima malih stanica pluća je nedavno otkriveno postojanje onkogene inačice mRNA *TP73*, kojoj manjka egzon 2, odnosno egzoni 2 i 3 (*TP73Δex2*; *TP73Δex2/3*). Ove inačice najčešće nastaju zbog rearanžmana kromosoma (244). Za sada nisu poznate mutacije gena *TP63* koje bi bile vezane uz zloćudnu bolest. Međutim, mutacije mogu biti prisutne i u ovom genu. Njihovo je postojanje dokazano u oboljelih od različitih razvojnih poremećaja u kojima često prominira slika ektodermalne displazije (245, 246). U različitim je modelima pokazano dominantno-negativno djelovanje cijele ove obitelji proteina. Najbolje je

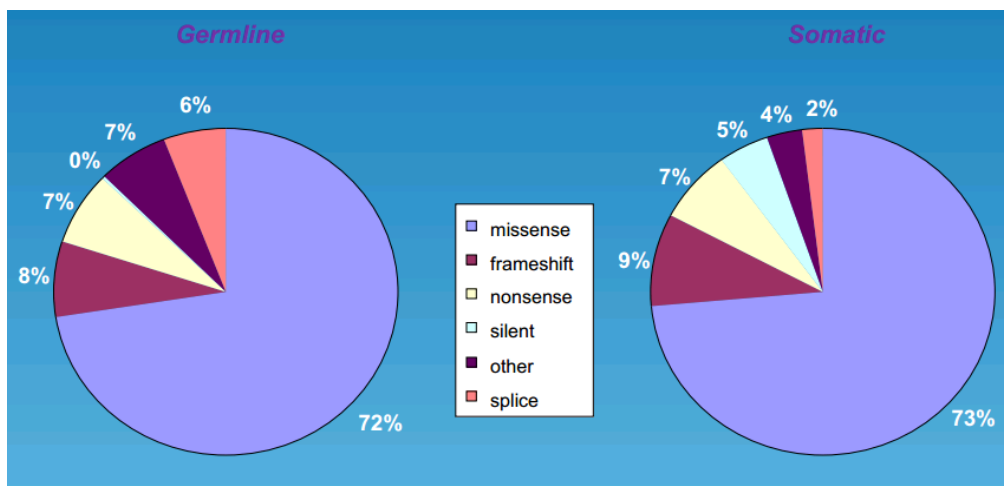
objašnjeno na razini proteina p53 koji, u slučaju da posjeduje specifične točkaste mutacije, može, zbog toga što ometa stvaranje tetramera, poništiti supresornu funkciju „zdravih“ molekula TP53, onih koje nastaju zbog aktivnosti preostalog, zdravog alela (247). Neki oblici p53 mutiranih proteina ispoljavaju ovakav negativno dominantan učinak i na preostala dva člana obitelji, TP63 i TP73, zbog čega mogu dovesti do potpunog funkcionalnog utišavanja cijele obitelji p53 srodnih proteina (248, (249). Do ovoga fenomena dolazi zbog toga što proteinske izoforme sve tri inačice proteina ulaze u interakciju tijekom koje stvaraju heterokomplekse čija funkcija ovisi i razini funkcionalnosti svakog proteina-partnera (250).

1.7.4. Mutacije gena TP53

Najučestalije mutacije gena *TP53* su tranzicije G:C>A:T (7 148 mutacija; 24,76%) i to u područjima dinukleotida CpG i transverzije G:C>T:A (4 217; 14,61%). Osim klasične podjele prema vrsti mutacije, mutacije gena *TP53* mogu se podijeliti u odnosu na funkcionalne posljedice. Ranije spomenute mutacije koje onemogućuju vezanje proteina p53 na molekulu DNA (engl. Disruptive Mutations), zbog toga što su raspoređene u egzonima 4-9, kojima je kodirana DNA-vezujuća domena (aminokiseline 101-292), imaju snažan onkogeni učinak.



Slika 7. Učestalost mutacija gena *TP53* (baza podataka IARC)(251).



Slika 8. Raspodjela mutacija gena *TP53* (baza podataka IARC); najčešće mutacije događaju se na kodonima 175, 248 i 275 (251).

Učestalost pojedinih mutacija *TP53* razlikuje se u različitim skupinama zloćudnih tumora i ovisi o tipu zloćudne bolesti: relativno je niska u hematopoetskim oboljenjima (10%), a visoka u karcinomima (50-70%) jajnika i debelog crijeva. U karcinomima glave i vrata su mutacije gena *TP53* dokazane u 40,6% slučajeva i na njih otpada približno 10% svih mutacija u genu *TP53*. Mutacije gena *TP53* mogu biti prisutne i u stanicama germinativne linije, što za posljedicu ima nastanak rijetkog sindroma nasljednog raka, sindroma Li-Fraumeni (252,253). Ovaj sindrom karakterizira visoka učestalost karcinoma dojke, sarkoma mekih tkiva i različitih drugih karcinoma.

Mutacija *TP53*, uz gubitak funkcije p53, može na nekoliko načina potaknuti razvoj karcinoma. U heterozigota, u kojih su prisutni divlji i mutirani tip alela, mutirani oblik proteina ponaša se na, ranije objašnjen, dominantno negativan način zbog stvaranja nefunkcionalnog tetramera (254). Ipak, najčešće se, pogotovo u uznapredovalim stadijima zloćudne bolesti, u stanici nalazi samo mutirani alel, zato što se divlji tip alela fizički gubi. Ova je pojava poznata pod nazivom gubitak heterozigotnosti (LOH, od engl. *Loss of Heterozygosity*) (254, 255).

Dobro je poznato da mutirani oblik proteina p53 ima znatno dulji poluvijek u odnosu na divlji tip proteina, kojemu je poluvijek samo 38 minuta. Poznato je da razgradnja proteina p53 ovisi o ubikvitinskom putu razgradnje u proteosomu, koji ovisi o aktivnosti nekoliko E3 ligaza, od kojih je najdetaljnije istražena E3 ligaza MDM2 (od engl. *Murine Double Minute 2*), koja je kodirana istoimenim genom koji se nalazi pod izravnom kontrolom p53. Barak i sur. su godine 1993. otkrili da je MDM2 izravni transkripcijski cilj p53, pa prema tome MDM2 utječe na razinu p53 preko mehanizmom autoregulatorne negativne povratne sprege (256).

Vezivanje divljeg tipa proteina p53 i MDM2 dešava se vrlo brzo i zbog toga se, u većini slučajeva, divlji tip proteina u stanici ne može detektirati. S druge strane, vezanje MDM2 za mutirane oblike proteina p53 je nerijetko, zbog prisustva mutacije, onemogućeno ili oslabljeno. Zbog toga se na mutirani p53 vežu drugi tipovi E3-ligaza koje su znatno manje učinkovite u procesu njegove razgradnje (257) pa se stoga mutirani oblik može detektirati. Vrlo je važan podatak da afinitet vezanja MDM2 za mutirani oblik p53 ovisi o tipu mutacije, pa se stoga univerzalan zaključak, kojim bi se nepogrešivo povezalo prisustvo mutacije s prisustvom proteina ne može, i ne smije izvoditi.

Ovo se naročito ogleda u kontekstu brojnih posttranslacijskih modifikacija koje reguliraju stabilnost p53 u kojem postoji najmanje 36 aminokiselina koje mogu biti modificirane fosforilacijom, acetilacijom, ubikvitinacijom, sumoilacijom, metilacijom i nedilacijom (258). Prvi i najvažniji korak u stabiliziranju p53 je fosforilacija različitim kinazama, uključujući i Jun N-terminalnu protein kinazu (JNK) i CHK1/CHK2 (259, 260). Najčešće se opisuje fosforilacija na serinima S15 i S20, te treoninu T18. Posljedica fosforilacije je ometanje interakcije p53-MDM2, stabilizacija p53 i aktiviranje njegove funkcije kao čimbenika transkripcije (261). S druge strane, fosforilacija serina na položaju 392 (S392) specifično aktivira snažno vezanje p53 na molekulu DNA, zbog stabiliziranog tetramera (262). Poznato je, naime, da p53 monomeri imaju slab afinitet za molekulu DNA (263). Stabiliziranju p53 doprinosi i njegova acetilacija posredovana acetilazom CBP/p300, zbog koje slabi njegovo vezanje s MDM2 (264). Održavanje ravnoteže u razini acetiliranosti p53 održavaju i deacetilaze histona, HDAC1 i Sirtuin 1 (SIRT1). SIRT1 deacetilira lizin 382 i zbog toga negativno utječe na apoptozu posredovanu s p53, a fosfataze proteina PP1 i PP2A defosforiliraju p53 i tako negativno reguliraju njegovu aktivnost (265).

Konačno, i MDM2 može biti posttranslacijski modificiran, pa tako u stanju stresa kinase ATM i c-ABL fosforiliraju MDM2 i slabe njegovu interakciju s p53 (266).

Zbog postojanja ovih, međusobno povezanih događaja, teško je predvidjeti točnu ulogu p53 u stanici raka. Ona se relativno dobro može pratiti kroz klinički odgovor na liječenje: u difuznom limfomu podrijetlom B-stanica te karcinomima jednjaka i orofarinksa, mutacija *TP53* povezana je sa smanjenom osjetljivošću na kemoterapiju. S druge strane, u nekim tumorima dojke i jajnika situacija je upravo suprotna: prisutnost mutiranog *TP53* povećava osjetljivost tumora na liječenje kemoterapijom (267).

1.7.5. Biološka funkcija proteina p53

Protein p53 je čimbenik transkripcije koji se, kao tetramer, izravno i specifično veže za ciljno mjesto na molekuli DNA, veliko 10 pb (RRRCWWGYYY: R - G/A; W, A/T - Y - C/T) (230). Vezani tetramer pozitivno utječe na transkripciju ciljnih gena. Ova je skupina gena (npr. $p21^{WAF1}$ (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1), *MDM2*, *BAX* (BCL 2-Associated X Protein)) uključena u velik broj bioloških funkcija stanice: regulaciju staničnog ciklusa, diferencijaciju, apoptozu, starenje stanice, metabolizam DNA i angiogenezu (268, 269). U sve većem broju radova se p53 spominje i kao regulator metabolizma, s obzirom na to da neizravno utječe na velik broj metaboličkih procesa: glikolizu, oksidativnu fosforilaciju, glutaminolizu, osjetljivost na inzulin, biosintezu nukleotida, oksidaciju masnih kiselina, autofagocitozu i mTOR-signalni put (od engl. *Mammalian Target of Rapamycin*) (270).

1.7.6. Uloga p53 kao tumor supresorskog proteina

p53 je uključen u iznimno širok spektar bioloških procesa u stanici. Iako se donedavno sagledavao u vrlo uskim okvirima, primarno kroz tumor supresorsko djelovanje, njegovo djelovanje u kontekstu metaboličkih procesa znatno proširuje okvire unutar kojih se mora sagledati njegova aktivnost. U području onkologije je još donedavno njegova uloga uglavnom bila istraživana u kontekstu reguliranja ciklusa stanice, nakon djelovanja nokse, na tri osnovna načina: 1. zaustavljanjem ciklusa i 2. poticanja sustava popravka molekule DNA. U slučaju da je oštećenje nepopravljivo, 3. poticanjem programirane smrti stanice kako bi se spriječila dioba i prijenos genetičkih grešaka na stanice-kćeri (223).

Ovisno o tipu stresa, p53 može potaknuti zaustavljanje stanice u G1-fazi staničnog ciklusa, poticanjem inhibitora ciklin ovisne kinaze, p21 (268). Protein P21, kodiran genom *CDKN1A*, čiji promotor ima dva vezna mjesta za vezanje p53 (271), veže se za velik broj ciklin-ovisnih kinaza (CDK4, CDK6) te na taj način regulira popravak molekule DNA. Izravno može zaustaviti replikaciju DNA, što nužno dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa. Uz zaustavljanje ciklusa stanice u G1-fazi, p53 također kontrolira i prelazak iz G2- u M-fazu staničnog ciklusa (272), mijenjanjem aktivnosti gena koji su uključeni u reguliranje kompleksa ciklin B1-CDK1 (ciklin ovisna kinaza 1; od engl. *Cyclin Dependent Kinase 1*, poznata kao i CDC2). Ova dva proteina su podjedinice visoko konzerviranog kompleksa s kinaznom aktivnošću, MPF (od engl. *M-Phase Promoting Factor*), koji je neophodan za prijelaze G1/S i G2/M, i u kojem CDK1 predstavlja katalitičku podjedinicu. Ranije

spomenuta, stresom potaknuta kinaza ATM fosforilira i stabilizira p53, koji: a) potiče transkripciju gena koji su negativni regulatori aktivnosti kompleksa ciklin B1/CDK1 (GADD45, P21, i 14.33) i istovremeno, b) utišava gene koji kodiraju ciklin B1 (*CCNB1*) i CDK1 (*CDK1*). Sinergizmom dvostruke regulacije dolazi do potpunog zaustavljanja prijelaza stanice iz faze G2 u mitozu (269, 273)

1.7.7. *TP53* u zloćudnim tumorima glave i vrata

Gubitak fiziološke funkcije p53, bilo mutacijom gena, gubitkom heterozigotnosti ili interakcijom s proteinima virusa, jedna je od najčešćih molekularnih promjena u karcinomima glave i vrata podrijetlom od pločastih stanica (274). Nastanak mutacije dešava se ranoj karcinogenezi ovih tumora. Mutacije *TP53* nalaze se i u histološki nepromijenjenoj sluznici bolesnika s karcinomima glave i vrata, što dijelom objašnjava pojavu lokalnih recidiva ili drugog primarnog karcinoma. Učestalost mutacija u *TP53* u karcinomima pločastih stanica glave i vrata razlikuje se između pojedinih studija, od 30% do 70%. Razlika bi se mogla objasniti različitim primarnim smještajem karcinoma, razlikama u metodama upotrebljenim za otkrivanje mutacije, ali i različitoj izloženosti mutagena iz okoline (275). Prema bazi podataka IARC, mutacije gena *TP53* se u karcinomima glave i vrata nalaze u 42,5% (2 881/6 777) analiziranih uzoraka (251).

Najučestaliji etiološki čimbenici povezani s pojavom karcinoma pločastog epitela glave i vrata: pušenje, alkohol i infekcija papiloma virusom visokog rizika, povezani su s funkcijom p53. Pokazana je jasna veza između učestalosti mutacija *TP53* i pušenja. Mutacije povezane s pušenjem najčešće zahvaćaju područje od petog do devetog eksona, što se manifestira mutacijama u kodonima 157, 173 i 273. Najznačajniji karcinogeni u duhanskom dimu su policiklički aromatski ugljikovodici i benzopireni, koji tvore DNA-adukte u kodirajućoj regiji *TP53* (276). Brennan i suradnici su pokazali se u 47% (38/81) tumora glave i vrata *TP53* mutacije mogu povezati s pušenjem. U nepušača koji obole od zloćudnih tumora glave i vrata mutacije su dokazali u samo 14% tumora (3/21) (277).

Učestalost mutacija *TP53* se u bolesnika koji puše i konzumiraju alkohol povećava 3,5 puta u odnosu na bolesnike koji te navike nemaju (275).

Znatno više se zna o povezanosti HPV visokog rizika i mutacija *TP53*. Iz istraživanja o karcinomima vrata maternice poznato je da se HPV nalazi u jezgri u obliku episoma, a replicira se izražavanjem ranih virusnih proteina, E1 i E2. Tijekom diferencijacije bazalnih

stanica, HPV-zaražene stanice ulaze u S-fazu staničnog ciklusa, ispoljavaju se kasni L1- i L2-geni, sintetiziraju se strukturalni proteini i dolazi do oslobađanja infektivnih viriona. Aktivira se transkripcija gena E6 i E7, čiji proteinski produkti imaju onkogeni potencijal (278). Protein E6 se preko E6-veznog proteina (engl. *E6 Associated Protein, E6 AP*), koji posjeduje ligaznu aktivnost, veže za TP53, i dovodi do njegove razgradnje u proteasomu (279).

U multicentričnoj studiji (280) kojom su se analizirale mutacije *TP53* u 420 uzoraka tkiva bolesnika oboljelih od zloćudnih tumora glave i vrata, pokazano je da mutacije *TP53* postoje u više od polovice tumora (53,3%). Najčešće su u u karcinomima hipofarinksa, 75%. Ovom je studijom pokazano značajno smanjeno ukupno preživljenje bolesnika s *TP53* mutacijama u odnosu na bolesnike s divljim tipom alela. Petogodišnje preživljenje bolesnika s mutacijama iznosilo je 40,7%, a bolesnika s divljim tipom *TP53* 54,8%.

U Muruyaminoj studiji (283 bolesnika s karcinomom glave i vrata) je pokazano da više od jedne trećine ovih tumora posjeduje mutacije u genu *TP53* (109/238; 38,5%). Veća vjerojatnost poostojanja mutacije bila je u bolesnika koji su konzumirali alkohol i cigarete. S druge strane, u tumorima s HPV(HPV(+)) je učestalost mutacija *TP53* bila izrazito niska (5,9%) (281).

Gubitak heterozigotnosti (LOH) *TP53* pokazan je u nekoliko studija u kojima su istraživani karcinomi hipofarinksa. Jedna od njih, kojom je prisutnost LOH pokazana u 52,6% (16/30) tumora nije pokazala statistički značajnu povezanost LOH *TP53* s analiziranim kliničkim parametrima (stadij T i N, stupanj diferencijacije), iako je bio češći u uznapredovalim stadijima bolesti. Jednom je studijom pokazana povezanost viših stadija karcinoma (III i IV), s učestalijom prisutnošću metastaza i povećanim udjelom tumora s LOH *TP53* (282).

2. HIPOTEZA

Omjer aktivnost gena *EZH2* i *JMJD3* je promijenjen u karcinomima pločastih stanica hipofarinksa, što za posljedicu ima postavljanje represivne oznake histona H3 (H3K27m3) u području promotora tumor supresorskih gena. Promjena u omjeru aktivnosti ova dva gena povezana je s prognozom bolesti u bolesnika s karcinomom pločastih stanica hipofarinksa.

3.CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj

Istražiti promjene u aktivnosti gena *EZH2* i *JMJD3* i utjecaj izraženosti proteina *EZH2*, *JMJD3* i p53 u karcinomima hipofarinksa, na nekoliko razina, te dobivene rezultate povezati s preživljenjem kirurški liječenih bolesnika.

3.2. Specifični ciljevi

1. Na razini DNA: istražiti postoji li gubitak heterozigotnosti (LOH) *JMJD3*, a ako postoji, istražiti da li je združen s LOH *TP53*.
2. Na razini mRNA: istražiti da li u zloćudnim tumorima hipofarinksa, u odnosu na okolno tkivo netumora, postoji različit obrazac ispoljavanja gena *EZH2* i *JMJD3*, odnosno - da li je promijenjen omjer količine mRNA *EZH2* i *JMJD3*.
3. Na razini proteina: istražiti da li se promjene omjera signala mRNA mogu pratiti i na razini izražaja istoimenih proteina. Dodatno odrediti izražaj p53.
4. Na razini praćenja bolesnika: povezati sve ranije dobivene podatke na razini proteina i kliničkim praćenjem: status TNM, stupanj diferencijacije i ukupno preživljenje operiranih bolesnika.

4. Bolesnici, materijali i metode

4.1. Bolesnici

Uzorci tkiva prikupljeni su tijekom kirurškog postupka na Klinici za ORL i kirurgiju glave i vrata, Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“, u razdoblju od 2001. do 2006. godine. Svi bolesnici uključeni u studiju bili su upoznati s postupkom i potpisali su informirani pristanak. Tkivo odstranjeno tijekom kirurškog zahvata je rutinski arhivirano za potrebe patohistološke analize, fiksiranjem formalinom i uklapanjem u parafin. Tijekom operacije su, dodatno, uzeti uzorci tkiva karcinoma pločastih stanica hipofarinksa (T), približnog volumena $0,5 \text{ cm}^3$, i, ako je bilo moguće, okolnog, tumorom nezahvaćenog tkiva (OT) hipofarinksa. Volumen tkiva tumora bio je, u pravilu znatno veći od volumena tkiva netumora. Ovi uzorci su odmah stavljeni u mikroeprevete, i pohranjeni u spremnik s tekućim dušikom kako bi bili dopremljeni i pohranjeni u Hrvatsku banku tumora, Institut „Ruđer Bošković“, u hladnjak na -80°C . Osnovni podatci o ispitanicima uključenim u ovu studiju prikazani su u Tablici 4.

Cjelokupna analiza, pri čemu nisu sve analize učinjene na svim uzorcima, je napravljena na 68 uzoraka tkiva hipofarinksa, pri čemu sam usporednu analizu tkiva netumora učinio kada god je to bilo moguće. Ispitanici su uglavnom bili muškoga spola (63/68). U Tablici 4 prikazana je razdioba bolesnika u odnosu na spol i dob, stadij bolesti i stupanj diferencijacije tumora.

Tablica 4. Spol i dob ispitanika, stadij bolesti i stupanj diferencijacije tumora

Osnovne karakteristike ispitanika		N=68	%
Spol	Žene	5	7,35
	Muškarci	63	92,64
Dob	<65 godina	55	80,88
	≥65 godina	13	19,12
Stadij bolesti	1	0	0
	2	3	4,41
	3	18	26,47
	4	47	69,18
Diferenciranost tumora	dobro	2	2,94
	umjereno	49	72,05
	slabo	17	25

4.2. Materijali - kemikalije i puferi

4.2.1. Izdvajanje genomske DNA

- Pufer za digestiju: 0,5 M etilendiaminotetraoctena kiselina (EDTA), 0,1 M Tris, 0,5% Tween 20, pH 8,5;
- Proteinaza K: 20 mg/mL (Sigma);
- Fenol ekvilibriran s Tris-HCl pH 8,0 (Sigma);
- Kloroform p.a. (Kemika);
- 96% etanol p.a. (Kemika);
- Pufer TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4.

4.2.2. Izdvajanje ukupne RNA

- Otopina TRI Reagent[®] koja sadrži gvanidin tiocijanat i fenol (Invitrogen);
- Kloroform p.a. (Kemika);
- Izopropanol p.a. (Kemika);
- 75% etanol;
- Voda bez nukleaza (QIAGEN);
- Komplet kemikalija RNeasy mini kit (QIAGEN);
- Komplet kemikalija Rnase free DNase set (QIAGEN) koji sadrži 1 500 U DNaze bez RNaze (engl. *RNase Free*) te odgovarajući pufer.

4.2.3. Obrnuto prepisivanje (engl. *Reverse Transcription, RT*)

- Reverzna transkriptaza M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) 200 U/μL (Sigma);
- 10 x pufer RT: 500 mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 50 mM DTT (Sigma);
- Inhibitor RNaza 40 U/μL (Promega);
- Početnica Oligo (dT)₁₈ 0,5 μg/μL (New England BioLabs);
- Smjesa dNTP u jednakim omjerima (10 mM svaki) (Eppendorf);
- Voda bez nukleaza (Promega).

4.2.4. Lančana reakcija polimerazom (PCR) i elektroforeza u gelu agaroze

- AmpliTaq® 360 DNA Polymerase (Applied Biosystems);
- 10x AmpliTaq® 360 Buffer (Applied Biosystems);
- 360 GC Enhancer (Applied Biosystems);
- 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP,
- 25 mM MgCl₂ (Applied Biosystems);
- Voda bez nukleaza (Promega);
- Agarozna tipa I niske endosmotske jakosti (Sigma);
- 1 x pufer TAE: 40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0;
- Pufer za nanošenje uzoraka: 0,25% bromofenolno modriilo (Sigma), 0,25% ksilen-cijanolo, 30% glicerol (Kemika);
- Standard DNA 1 kB+: veličina odsječaka: 100, 200, 300, 500, 650, 850, 1000, 1650, 2000, 5000, 12000 pb (Invitrogene);
- Standard 100 bp DNA Ladder: veličina odsječaka: od 100 do 1000 pb u ljestvičastom pomaku od 100 pb (na položaju 500 pb nalaze se odsječci veličine 500/517 pb) i zbog toga ovaj odsječak u gelu daje jak signal.
- Oligonukleotidne početnice, odsoljene, 100 µM (Sigma). Sastav nukleotida u početnicama, temperature sparivanja i veličine umnoženih odsječaka prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Sastav početnica, temperature sparivanja i veličine umnoženih odsječaka.

Naziv početnice	Sastav nukleotida	Veličina umnoženog odsječka (pb)	Temperatura sparivanja
GAPDH ex. 1	5' AACGGATTTGGTCGTATTGGGC 3'	642	58-65°C 58°C
GAPDH ex. 2	5' AGGGATGATGTTCTGGAGAGCC 3'		
GAPDH intr.	5' AAGCTGACTCAGCCCGCAAAGG 3'	605	
PAPOLA 1	5' CCTCGGTGGTGTTCCTGGGC 3'	448	63°C
PAPOLA 2	5' GCCCACCCATTCCAGGCGTT 3'		
JMJD3 1	5' GTGCCACTGACCCAGCCGAC 3'	262	63°C
JMJD3 2	5' AGCACCCGGCGGCTCTTTTC 3'		
EZH2 1	5' AAATCCCCCAGCCTGCCACG 3'	209	63°C
EZH2 1	5' TCCGGGATGCCGCTGCAAAG 3'		
TP53 Bst U1	5' GATGCT GTC CGCGGACGATAT 3'	247	58°C

TP53 Bst U2	5' CGTGCAAGTCACAGACTT GGC 3'		
TP53 Msp 1	5' AGG TCTGGTTTG CAACTGGG 3'	106	58°C
TP53 Msp 1 2	5' GAG GTCAAATAAGCAGCAGG 3'		
TP53 seq. 1	5' ACGTTCTGTCCCCCTTGCCG 3'	438	60°C
TP53 seq. 2	5' AGCGCCTCACAACCTCCGTC 3'		

4.2.5. Restriksijske endonukleaze

Restriksijska endonukleaza *Bst*UI (10 U/ μ L) koja prepoznaje slijed nukleotida 5'CG↓CG3' (New England BioLabs);

Pufer 2: 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,9.

Restriksijska endonukleaza *Msp*1 (10 U/ μ L) koja prepoznaje slijed nukleotida 5'CC↓GG3' (New England BioLabs);

Pufer 4: 50 mM kalij acetat, 20 mM Tris-acetat, 10 mM magnezij acetat, BSA 100 μ g/ml, pH 7,9.

4.2.6. Elektroforeza i bojanje DNA u gelu poliakrilamida

- 30% otopina akrilamida: akrilamid/bis-akrilamid – 29/1;
- 10% amonijev persulfat (APS) (Sigma);
- N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED) (Sigma);
- 5 x pufer TBE: 0,45 M Tris-borat, 0,01 M EDTA, pH 8,3;
- 10% etanol (Kemika);
- 1% HNO₃ (Kemika);
- 0,2% AgNO₃ (Kemika);
- Otopina za razvijanje: 3% Na₂CO₃ (Kemika), 0,018% formaldehid (Kemika);
- 5% Octena kiselina (Kemika).

4.2.7. Pročišćavanje produkta PCR za sekvenciranje

- GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma);
- 2-izopropanol p.a. (Kemika);
- Voda bez nukleaza (Promega).

4.2.8. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

- MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems);
- Kompleti početnica i proba TaqMan (Applied Biosystems):
 - a) Hs00996325_g1 (JMJD3): veličina odsječka 58 pb;
 - b) Hs01016789_m1 (EZH2): veličina odsječka 128 pb;
 - c) Hs99999905_m1 (GAPDH): veličina odsječka 122 pb;
 - d) Hs00951363_m1 (PAPOLA): veličina odsječka 135 pb.
- TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems).

4.2.9. Reakcije imunohistokemije

- Ksilen (Kemika);
- Etanol p.a. (Kemika);
- 1 x PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM);
- Citratni pufer: Na- citrat 10 mM, pH 6,0);
- Protutijela: a) TP53 - poliklonsko protutijelo (Santa Cruz FL-393; sc-6243) – epitop je puna duljina proteina – 393 aminokiseline;
 - b) EZH2 - poliklonsko protutijelo (Santa Cruz FL-393; sc-25383); epitop su aminokiseline na aminoterminalnom dijelu proteina: 31-110;
 - c) JMJD3 - poliklonsko protutijelo (Santa Cruz sc-130157 N-24); epitop nije deklariran
- VECTASTAIN® ABC Kit (Santa Cruz).

4.3. Metode

4.3.1. Izdvajanje nukleinskih kiselina

4.3.1.1. Izdvajanje genomske DNA

Genomsku DNA izdvajao sam iz tkiva tumora i pripadajućeg tkiva netumora. Usitnjeno tkivo ($0,5 \text{ cm}^3$) inkubirao sam 4-5 dana pri 37°C u 1 mL pufera za digestiju, uz dodatak $0,4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ Proteinaze K. Iz nastalog homogenata sam, metodom koja se temelji na izdvajanju fenol/kloroformom, izdvojio DNA. Na homogenat sam dodao jednaki volumen fenola. Uzorak sam miješao na kružnoj miješalici 10 minuta (ponovljeno svaki put nakon dodavanja organskog otapala). Faze (fenolna i vodena u kojoj je zaostala DNA) su se dodatno razdvojile nakon centrifugiranja (10 min pri $10\,000 \times g$). Na supernatant - vodenu fazu sam dodao jednak volumen otopine fenol:kloroform (1:1) te ponovio postupak izdvajanja (miješanje na kružnoj miješalici i centrifugiranje). Na izdvojenu vodenu fazu sam dodao jednak volumen kloroforma. Genomsku DNA sam iz gornje, vodene faze istaložio dodavanjem 2,5 volumena hladnog (-20°C), apsolutnog etanola. Postupak taloženja pospješio sam centrifugiranjem tijekom 20 min pri $14\,000 \times g$. Izdvojenu DNA otopio sam u $30\text{--}50 \mu\text{L}$ pufera TE i pohranio na 4°C .

4.3.1.2. Izdvajanje ukupne RNA

Za izdvajanje ukupne RNA iz tkiva tumora i pripadajućeg tkiva netumora koristio sam TRI Reagent[®] koji sadrži fenol i gvanidin izotiocijanat. Volumen uzorka korištenog u postupku izdvajanja bio je približno $0,5 \text{ cm}^3$. Komadić tkiva sam homogenizirao u 1 mL otopine TRI Reagent[®], tiješnjenjem sa sterilnim štapićem inzulinske štrcaljke. Na homogenat sam dodao 0,2 mL kloroforma. Uzorak sam centrifugirao na 4°C , tijekom 15 minuta, pri $12\,000 \times g$. Ukupnu RNA iz supernatanta sam istaložio dodavanjem jednakog volumena izopropanola te centrifugiranjem na 4°C , 5 minuta pri $12\,000 \times g$. Talog RNA sam isprao s 1 mL 75% etanola nakon čega sam uzorak ponovo centrifugirao, tijekom pet minuta pri $7\,500 \times g$. Osušeni talog RNA sam otopio u $100 \mu\text{L}$ vode bez RNaza, te dodatno pročistio od eventualno prisutne zaostale DNA, kompletima kemikalija „RNeasy[®] Mini Kit“ i „RNase free DNase set[®]“ prema uputama proizvođača.

Uspješnost postupka izdvajanja nukleinskih kiselina provjerio sam elektroforezom u 1% gelu agaroze, i spektrofotometrijom.

4.3.2. Određivanje koncentracije i provjera kvalitete izdvojenih nukleinskih kiselina spektrofotometrijom i elektroforezom u gelu agaroze

Masena koncentracija DNA određuje se na temelju mjerenja optičke gustoće na valnoj duljini od 260 nm (A_{260}), korištenjem formule:

$$\text{DNA (conc)} = \text{OD} \times R \times \epsilon,$$

u kojoj je „OD“ očitana optička gustoća, „R“ korišteno razrjeđenje, „ ϵ “ koeficijent ekstinkcije za DNA (50 $\mu\text{g/mL}$). Instrument kojim smo se koristili, BioSpec-Nano (Shimadzu) posjeduje software kojim je omogućeno automatsko korištenje izračuna masene koncentracije.

Čistoća uzorka procjenjuje se na temelju omjera A_{260}/A_{280} . Njegova vrijednost trebala bi biti između 1,65 i 1,85.

Izračun kojim se određuje koncentracija RNA je sličan; jedini parametar koji je različit je vrijednost „OD“, koja za jednolančanu RNA iznosi 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Čistoća uzorka bi, u idealnim uvjetima, trebala biti nešto manja od 2,0.

Kvalitetu izdvojenih nukleinskih kiselina sam provjerio elektroforezom u 1% gelu agaroze koji sam priredio otapanjem 0,6 g agaroze tipa I (Sigma) u 60 mL 1 x pufera TAE (konačna koncentracija 1 x). Otapanje agaroze sam pospješio laganim ključanjem smjese u mikrovalnoj pećnici. U otopinu tekuće agaroze sam dodao etidij-bromid, u konačnoj koncentraciji 0,3 $\mu\text{g/mL}$. Ovako priređenu agarozu izlio sam u prethodno pripremljen kalup za elektroforezu i ostavio ga da polimerizira tijekom pola sata. Nakon toga sam ga premjestio u kadicu za elektroforezu.

U jažice gela sam nanosio po 1 μg uzorka DNA ili RNA, na način da sam ga pomiješao s puferom za nanašanje i sterilnom deioniziranom vodom do ukupnog volumena 10 μL . Po završetku elektroforeze, koja je trajala približno 40 minuta pri naponu od 70 V, gel sam pogledao na transiluminatoru uređaja UVIsave (UVITEC, Cambridge) i slikanjem dokumentirao vrpce. Na ovaj su način bile dokumentirane i sve reakcije umnažanja lančanom reakcijom polimeraze.

4.3.3. Obrnuto prepisivanje (engl. *Reverse Transcription*)

Jedan mikrogram pročišćene ukupne RNA koristio sam u reakciji obrnutog prepisivanja. Reakcijska smjesa se početno sastojala od RNA (1 µg), 0,025 µg početnice oligo(dT)18 te vode bez nukleaza do 16.4 µl. Kako bi se omogućilo nalijeganje početnica oligo(dT) na poliA „rep“ glasničke RNA koji posjeduje sve, u potpunosti procesirane glasničke RNA u stanici, ovaj sam uzorak denaturirao 10 min pri 65°C nakon čega sam dodao: 2 µl otopine dNTP (10 mM svaki), 1 µl 10 x pufera, 20 U inhibitora RNaza te 40 U reverzne transkriptaze M-MLV. Nakon inkubacije (jedan sat pri 42°C) u uređaju za PCR (Applied Biosystems) na ovu sam otopinu novonastale cDNA dodao 80 µl demineralizirane vode. Prije pohrane uzorka na -20°C provjerio sam uspješnosti prepisivanja mRNA u cDNA s obzirom na: a) ispoljavanje gena koji bi trebali biti ubikvitarno ispoljeni – *GAPDH* i *PAPOLA*; b) prisutnost kontaminirajuće DNA.

4.3.4. Provjera uspješnosti prepisivanja mRNA u cDNA i postojanja kontaminirajuće DNA

Uspješnost reakcije RT provjerio sam umnažanjem cDNA gena *GAPDH* (gliceralehid-fosfat dehidrogenaza) i *PAPOLA* (od engl. ***Poly(A) Polymerase Alpha***) čije bi ispoljavanje trebalo biti jednako u svim uzorcima („housekeeping“ geni). Početnice su bile konstruirane na način da su, i u slučaju *GAPDH*, i u slučaju gena *PAPOLA*, bile smještene na granici dva egzona (*GAPDH*1; egzoni 1 i 2; *PAPOLA* 2; egzoni 13 i 14) ili u egzonu (*GAPDH*2 – egzon 7; *PAPOLA* 1 egzon 9) na način da između njih bude barem jedan intron slijed kojeg se ne očekuje u zreloj mRNA. Eventualno prisustvo genomske DNA u izdvojenoj RNA dokazivao sam kombinacijom početnica *GAPDH*2 i *GAPDH*3. Slijed početnice *GAPDH*3 je komplementaran slijedu nukleotida u intronu. Ako u uzorku nema kontaminacije s DNA, do umnažanja neće doći. Ako je cDNA u potpunosti prepisana, vjerojatnost da će početnice premostiti četiri egzona u genu *PAPOLA* (između kojih se nalazi ~ 9,5 kilobaza genomske DNA) je dovoljno velika da se može tvrditi da je obrnuto prepisivanje bilo uspješno i da u uzorku, najvjerojatnije, nema kontaminirajuće genomske DNA.

4.3.5. Određivanje heterozigotnosti korištenjem *TP53* polimorfnih restrikcijskih mjesta za *TP53* i sekvenciranjem

Gubitak heterozigotnosti za *TP53* sam određivao na temelju različite duljine restrikcijskih ulomaka (RFLP, od engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Lančanu reakciju polimerazom (PCR, od engl. *Polymerase Chain Reaction*) sam koristio za umnažanje dijela četvrtog eksona te prvog introna unutar kojih se nalaze polimorfna restrikcijska mjesta za restrikcijske endonukleaze *BstU1* i *MspI*, korištenjem genomske DNA. Umnoženi odsjecci dobiveni u reakcijama umnažanja bili su inkubirani s ovim enzimima na način da se napravi reakcijska smjesa (25 µL), u kojoj se nalazi pufer, približno 300 ng umnoženog odsječka i 10-15 U restrikcijskog enzima. Reakcije su se odvijale preko noći, uz trešnju, na odgovarajućoj temperaturi, za *BstU1* na 60°C odnosno na 37°C za *MspI*.

Produce restrikcija sam razdvajao u 12% gelu poliakrilamida (tri sata pri naponu od 180 V). Nakon završene elektroforeze, gel sam bojava srebrnim nitratom na slijedeći način: odmah po odvajanju od stakla, stavio sam ga u 10% etanol (fiksativ), tijekom najmanje pola sata. Nakon toga sam ga uklonio sisaljkom i na gel dodao u 1% dušičnu kiselinu (oksidans) tijekom pet minuta, a potom ispirali s destiliranom vodom. U otopini srebrnog nitrata gel se inkubirao tijekom narednih 25 minuta, nakon nekoliko ispiranja destiliranom vodom, u posudu s gelom sam dodao otopinu za razvijanje (otopina natrijeva bikarbonata i formaldehida). Reakciju sam zaustavili dodavanjem razrijeđene octene kiseline

Gubitak heterozigotnosti u tkivu tumora bio je, u slučajevima analiza RFLP, vidljiv kao gubitak vrpce u odnosu na netumorsko tkivo.

Rezultate analize RFLP provjerio sam sekvenciranjem produkata PCR dobivenih, korištenjem cDNA kao kalupa. Odsjecci PCR moraju se pročistiti od agaroze, zaostalih početnica i zaostalih nukleotida, kako bi bili uspješno sekvencionirani. Za pročišćavanje se koristi komercijalno dostupan komplet kemikalija GeneElute Extraction Kit[®] (Sigma). Vrpce koje se nalaze na očekivanoj visini se izrežu žiletom i prebace u mikroeprevetu od 2 mL. Na izrezani gel doda se do 2 mL otopine za otapanje (engl. *Gel Solubilisation Solution*) i ostavi 5-10 minuta u termobloku na 60°C uz laganu trešnju. Kolona se stavi u epruvetu za sabiranje (engl. *Collection Tube*), na nju se doda 500 µL otopine za pripremu kolone (engl. *Column Preparation Buffer*) nepoznatog sastava i centrifugira se jednu minutu na 13 000 rpm. Sadržaj epruvete za sabiranje se izbací, epruveta se posuši na papiru i zatvori. Iz termobloka se izvadi uzorak s otopljenim gelom, njegov sadržaj se spusti laganim centrifugiranjem i podijeli u

dvije nove mikroeprovete od 2 mL. U svaku se doda po 250 μ L 2-izopropanola i lagano resuspendira. Po 600 μ L uzorka dodaje se na sredinu mrežice, bez dodirivanja kolone i centrifugira 1 minutu na 13 000 rpm. Sadržaj epruvete za sabiranje se izbací, ona se posuši i postupak se ponavlja sve dok se ne potroši sav uzorak iz obje mikroeprovete. Nakon toga se na kolonu dodaje 700 μ L otopine za ispiranje (engl. *Wash Solution*) i centrifugira jednu minutu na 13 000 rpm. Sadržaj se odstrani, epruveta se posuši i centrifugira još jednom pri istim uvjetima. Kolona se prebaci u novu epruvetu za sabiranje. Na sredinu mrežice se pipetira 30 μ L vode, prethodno zagrijane na 90°C. Slijedi centrifugiranje, a sadržaj epruvete se ne baca, nego se ponovno doda 30 μ L vode i ponovno centrifugira. Kolona se baci a uzorak pohrani na +4°C.

Približna količina pročišćenog produkta se provjeri nanošenjem 5 μ L na 2% gel agaroze uz standard DNA i dokumentira. U pravilu, za određivanje slijeda nukleotida odsječka 100 pb, potrebno je 20 ng pročišćenog odsječka.

Svi su uzorci sekvencirani u Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković, korištenjem di-deoksi metode pri čemu su dideksinukleotidi bili obilježeni različitim bojama.

4.3.6. Jedinstvena reakcija koamplifikacije nekoliko gena

Ciljni slijed se u reakciji umnaža specifičnom dinamikom: u početnim ciklusima eksponencijalno, a potom linearno, prema razini zasićenja (engl. *Platou Effect*). U početnim se ciklusima, ako je uspješnost reakcije 100%, broj kopija ciljnog slijeda udvostručuje (eksponencijalna faza). U linearnoj fazi dolazi do usporavanja reakcije zbog toga što su se sastavnice smjese dijelom potrošile, tijekom eksponencijalne faze. U fazi zasićenja, reakcija umnažanja se zaustavlja, bez obzira na to koliko je temperaturnih ciklusa predviđeno zadanim programom. Poznato je da je varijabilnost umnažanja najmanja upravo u eksponencijalnoj, a vrlo velika u linearnoj fazi umnažanja.

Ovo se odražava i na vjerodostojnost postojanja razlika, u fazi zasićenja reakcije. Naime, ako se količina produkta mjeri nakon 35 ciklusa, upravo zbog svega što je malo prije navedeno, mogućnost greške je velika. Stoga smo, kao poveznicu između mjerenja produkta dobivenog klasičnom reakcijom i kvantitativnog PCR, napravili pokus „titracije ciklusa“, kako bismo dobili barem približnu sliku o broju ciklusa u kojima se ciljni slijed umnaža eksponencijalno. Za ovaj tip analize morali smo konstruirati početnice kojima se dobivaju odsječci koji se veličinom značajno razlikuju. Ovo je važno za uspješno (potpuno) odvajanje odsječaka u gelu. Važan čimbenik za uspjeh ove reakcije je i temperatura naližeganja, koja ovisi o sastavu

(omjer baza A+T/G+T) baza. Kao što je i vidljivo u Tablici 5., temperature naližeganja početnica su bile slične, ali ne identične.

Dodatni čimbenik koji se mora odrediti kako bi se točnost zaključivanja o reakcijama koamplifikacije povećala je redni broj ciklusa u kojem se završava eksponencijalna faza.

Zbog toga smo reakcije umnažanja dokidali (vađenjem uzoraka iz instrumenta PCR u duplikatima i stavljanjem u kutiju s ledom) nakon #19, #21, #23, #25, #27, #29, #31, #33 i #35 ciklusa.

Samo smo 0,75 µL uzorka pomiješali s 1,0 µL boje i 9,25 µL vode, te nanijeli u 10% nadenaturirajući gel poliakrilamida. Po završetku elektroforeze koja je trajala četiri sata pri naponu od 275 V i na sobnoj temperaturi, gel smo obojili srebrom prema već opisanom protokolu.

Iznimno slab signal dobiven na cDNA tkiva tumora, koji je veličinom odgovarao amplifikatu JMJD3, pojavljivao se već u ciklusu #23, pa smo stoga uzorke koji su bili umnoženi upravo u ovom ciklusu ponovo nanijeli u 10% gel poliakrilamida, u različitim volumenima: od 0,5 do 5,0 mikrolitara. Ovaj nam je pristup omogućio razlučivanje snage vidljivosti odsječka, u odnosu na ciklus.. U pravilu, u liniji u kojoj su bila nanesena 2,5 µL uzorka, JMJD3 se slabo, ali jasno vidio. Signal za EZH2 nije bio vidljiv. Tek kada se nanijelo 5 mikrolitara uzorka, odsječak koji je veličinom dogovarao EZH2 postao je vidljiv. Na kraju smo, u volumenu od 5 mikrolitara, nanijeli i amplifikate iz reakcija dobivenih nakon #19 i #21 kruga umnažanja. Mogli smo vidjeti odsječak JMJD3, ali ne i EZH2, u tkivu tumora.

U tkivu netumora, signali su bili vidljivi već nanašanjem 2,5 mikrolitra amplifikata, pri čemu je signal za EZH2 bio nešto snažniji. Dio uzoraka analiziran je denzitometrijom, korištenjem javno dostupnog programa Image J. Zbog vrlo malih, ali jasno mjerljivih razlika, koje su bile krajnje neočekivane, dio uzoraka smo analizirali metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (RealTime PCR; qRT-PCR).

4.3.7. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)

Relativno kvantificiranje količine transkripta, u odnosu na *housekeeping* gene, metodom umnažanja u stvarnom vremenu, korištenjem cDNA dobivne obrnutim prepisivanjem RNA najbolje kvalitete te specifičnih početnica i probe smatra se iznimno preciznim. Stoga smo za potrebe naših analiza počeli koristiti četiri različita kompleta početnica i probi (TaqMan® GAPDH, TaqMan® PAPOLA, TaqMan® JMJD3, TaqMan® EZH2), proizvednih u kompaniji

Applied Biosystems, koja je ujedno i nosilac intelektualnog vlasništva za ovu tehnologiju. U osam početnih analiza (četiri uzorka tumora i pripadajućih netumora) PAPOLA se nije pokazala stabilnim biljegom te je stoga isključena iz daljnjih analiza.

Sve su analize napravljene u duplikatu, s cDNA koja je korištena kao početni templat u konzervativnim reakcijama PCR. Za razliku od konzervativnog PCR, u kojem sam koristio 1,2 μ L templat/ 12,5 μ L ukupne reakcije, u reakcijama qRT-PCR sam koristio po 5 μ L cDNA, u ukupnom volumenu od 50 μ L, u optičkim tubicama istog proizvođača, u aparatu 7300 Real-Time PCR System.

Reakcijska smjesa se sastojala od cDNA, 1 mL specifičnog eseja, 10 mL TaqMan® Gene Expression Master Mix pod slijedećim uvjetima: 50°C kroz dvije minute, 95°C kroz 10 minuta te 40 ciklusa od 95°C 15 sekundi, te 60°C 1 minuta. Rezultati su očitani kao Ct (engl. *Threshold Cycle*) vrijednosti, pomoću programa 7300 System SDS Software (Applied Biosystems).

Kako bi se izbjegle greške zbog neminovne razlike u kvaliteti uzoraka, u isto smo vrijeme amplificirali odsječke ciljnih gena i *GAPDH*. Na taj smo način mogli normalizirati izražaj ciljnih gena u odnosu na endogenu kontrolu (*GAPDH*), kako bismo promjene u izražaju ciljnih gena (netumor/tumor) mogli analizirati korištenjem formule komparativne metode Ct (283).

4.3.7.1. Interpretacija rezultata qRT-PCR

U skladu s hipotezom, zanimalo me je da li se u tkivu tumora odnos EZH2/JMJD3 promijenio, i na koji način. Moguće je napraviti izračun, korištenjem metode koja se temelji na na „delta delta Ct“: $FC_{\Delta\Delta Ct} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, u kojoj je:

FC = razlika u izražaju ciljnih gena (engl. *Fold Change*);

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{tumor}} - \Delta Ct_{\text{netumor}};$$

$$Ct = Ct_{\text{ciljni gen}} - Ct_{\text{GAPDH}};$$

Ct = ciklus u kojem fluorescentni signal, dobiven umnažanjem ciljnog gena, prelazi prag detekcije.

Izračun sam napravio na dva načina:

a) Omjer signala GAPDH/EZH2 i GAPDH/JMJD3 sravnio sam na vrijednost „1“, u tkivu netumora. U drugom sam koraku, matematičkim izračunom, pratio promjenu ovih vrijednosti, u tkivu tumora.

b) Omjer signala EZH2 i JMJD3 sveo sam na vrijednost „1“, u tkivu netumora, a zatim matematičkim izračunom pratio promjenu njihovog omjera, u tkivu tumora.

Mogući rezultati ovih analiza mogu biti jednaki „1“ (razina omjera ispoljavanja nepromijenjena u tkivu tumora, u odnosu na ne tumor); manja od „1“ (razina ispoljavanja JMJD3 se smanjila u odnosu na ispoljenost EZH2) ili veća od „1“ (razina ispoljavanja JMJD3 se povećala u odnosu na EZH2).

Za sve analizirane uzorke tumora i pripadajućeg netumora (N=12), matematičke analize sam napravio na oba načina.

4.3.8. Izraženost i lokalizacija proteina EZH2, JMJD3 i TP53

Izraženost i lokalizaciju proteina EZH2, JMJD3 i TP53 analizirali smo metodom imunohistokemije na rezovima tkiva fiksiranog formalinom i uklopljenog u parafin debljine 5 μm . Rezove tkiva prvo smo deparafinizirali u ksilenu, a potom rehidrirali u padajućim koncentracijama etanola (90%, 70%, 50%) te isprali u fosfatnom pufer (PBS, od engl. *phosphate Buffered Saline*). Tako pripremljene rezove podvrgnuli smo postupku “antigen retrieval”: kuhanje preparata u 0.01 M citratnom puferu, pH 6,0, u loncu pod pritiskom tijekom 15 minuta (pet minuta s otvorenim, a 10 minuta sa zatvorenim poklopcem). Lonac smo ohladili pod tekućom vodom. Da bi smo zaustavili endogenu peroksidaznu aktivnost, rezove smo inkubirali s 0,3% H_2O_2 kojeg smo isprali s PBS. Da bismo izbjegli nespecifično vezanje protutijela, rezove smo inkubirali u normalnom serumu. Potom smo višak seruma uklonili s rezova i inkubirali ih u primarnom protutijelu razrijeđenom u 1:200 u 3% normalnom serumu, tijekom 24 sata, +4C.

Rezove smo isprali s PBS i inkubirali u biotiniliranom sekundarnom protutijelu razrijeđenom u omjeru 1:100. Nakon ispiranja, uzorci su inkubirani u VECTASTAIN® Elite ABC Reagensu te ponovno isprati. Otopinu supstrata za peroksidazu (DAB) smo nakapali na rezove i dozvolili da se boja razvije pri sobnoj temperaturi. Rezove smo isprali, umakanjem tri puta po dvije minute u destiliranu vodu i obojili hematoksilinom. Potom smo ih dehidrirali i uklopili u Kanada balzam.

Uzorci su pregledani od strane patologa, na način na koji je to nedavno objavljeno, na ovom tipu karcinoma (284). Svaki preparat je pogledan pod mikroskopom i vrednovan s obzirom na udio pozitivnih stanica i jačinu obojenja, na sljedeći način: 0: nema obojenja; 1: slabo obojenje u manje od 25% stanica; 2: 25-50% srednje jako obojenih stanica; 3. više od 50% jako obojenih stanica.

4.4 Statistička obrada podataka

Organizacija podataka je obavljena uporabom relacijske baze podataka LibreOffice Base (verzija 5.3.2), a analiza podataka uporabom statističkog programa R (verzija 3.12), koji je slobodno dostupan pod *General Public License*.

Podatci dobiveni prebrojavanjem su prikazani kao brojevi, odnosno postotci. Razlike među njima su testirane uporabom testa χ^2 (PCST, od engl. *Pearson's Chi-Squared Test*), a vrijednosti $p \leq 0,05$ smatrane su statistički značajnima. Podatci dobiveni mjerenjem su prikazani kao minimum, prva kvartila (Q1), medijan, treća kvartila (Q3), maksimum, i aritmetička sredina.

Ishod bolesti u odnosu na pojedinačne parametre prikazan je postupkom po Kaplan-Meieru, a razlika među krivuljama je testirana uporabom testa Gehan-Wilcoxon (285). Vrijednosti P manje ili jednake 0,05 smatrane su statistički značajnima.

Multivarijatna analiza povezanosti promatranih varijabli s ishodom bolesti zasnivala se na rekurzivnom particioniranju (RP) implementiranom kao *rpart* modul unutar programskog jezika R (286, 287). Programi zasnovani na RP izvrsno razjašnjavaju kompleksne i nelinearne interakcije, te omogućuju dobivanje pouzdanih zaključaka i na relativno malom broju ispitanika i/ili varijabli. Osim toga, s algoritmima RP mogu se izvesti pouzdani zaključci čak i ako nedostaje dio podataka. Zbog toga se sve više koriste u onkologiji za izdvajanje čimbenika rizika, izradu prognostičkih indeksa, te optimiziranje dijagnostičkih postupaka i liječenja. Rezultat rekurzivnog particioniranja izražava se kao omjer hazarda.

5. REZULTATI

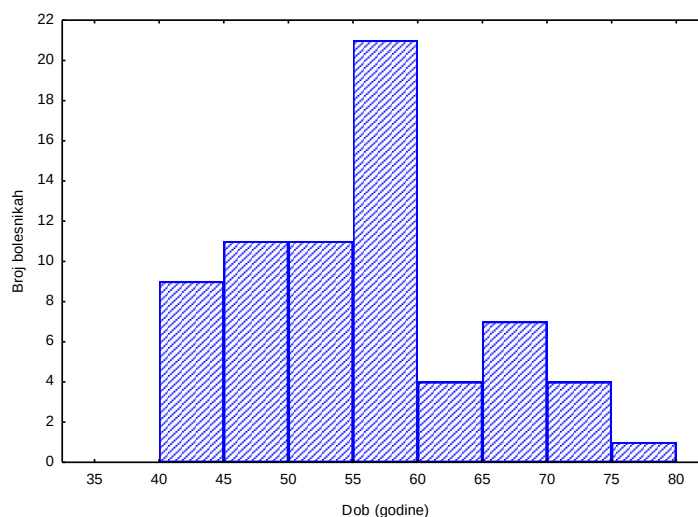
5.1. Obrada podataka vezana uz kliničke parametre

5.1.1. Razdioba bolesnika prema dobi i praćenju

U ovo je istraživanje bilo uključeno 68 bolesnika s karcinomom hipofarinksa; 63 muškarca i pet žena (Tablica 4). Ovi su bolesnici liječeni kirurški u razdoblju od 2001-2006. godine. Aritmetička sredina i medijan dobi bili su gotovo istovjetni; 56 godina (uz relativno širok rasap: $\pm 8,63$ godina) i 56,5 godina. Prema interkvartilnom rasponu (IQR, od engl. *Interquartile Range*), pedeset posto bolesnika (25. - do 75. percentila) je u trenutku postavljanja dijagnoze imala 49 – 59,5 godina. Najmlađi bolesnik uključen u studiju imao je 41, a najstariji 76 godina. Razdioba bolesnika u odnosu na starost prikazana je tablicom 6 i slikom 8.

Tablica 6. Podatci vezani uz dob bolesnika.

	Broj ispitanika	Aritmetička sredina dobi $\pm$ SD	Medijan dobi	Najmlađi bolesnik	Najstariji bolesnik	IQR 25-75. percentila
Podatci vezani uz dob	68	55,9 $\pm$ 8,63	56,5	41	76	49-59,5

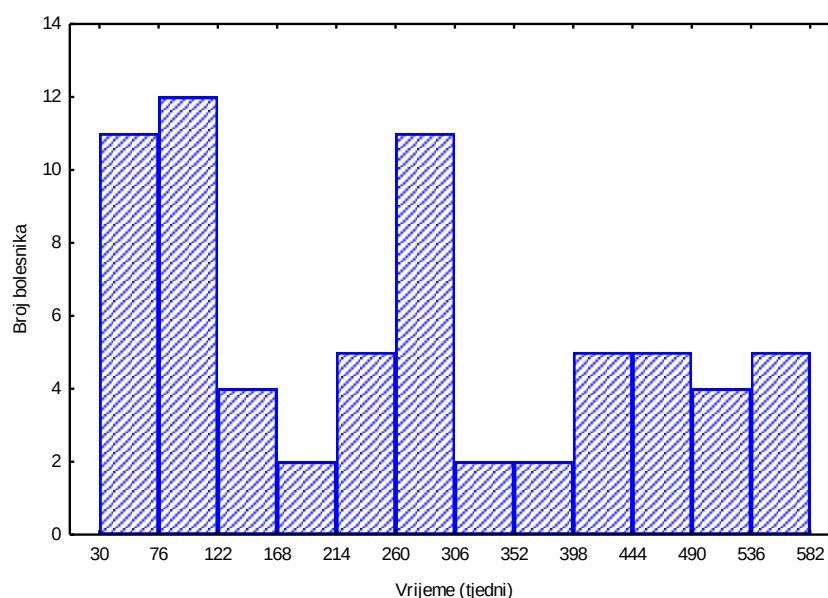


Slika 8. Razdioba bolesnika prema dobi

Duljina praćenja bolesnika izražena je u tjednima. Prosječna duljina praćenja (srednje vrijeme praćenja) iznosila je 260 tjedana, s minimalnom duljinom od 30 tjedana, a maksimalnom duljinom od 582 tjedna. Ovaj široki rasap rezultirao je a) visokom stopom standardne devijacije (173,64 tjedna); b) širokim rasapom vremena praćenja (IQR: $98,5 \pm 431,5$ tjedan). Ovi su parametri prikazani u Tablici 7. i grafički prikazani na slici 9.

Tablica 7. Vrijeme praćenja bolesnika izraženo u tjednima

	Broj ispitanika	Aritmetička sredina vremena praćenja +/- SD	Medijan praćenja	Najkraće praćenje	Najdulje praćenje	IQR 25-75. percentila
Vrijeme praćenja	68	260,2 $\pm$ 173,64	260,5	30	582	98,5 $\pm$ 431,5



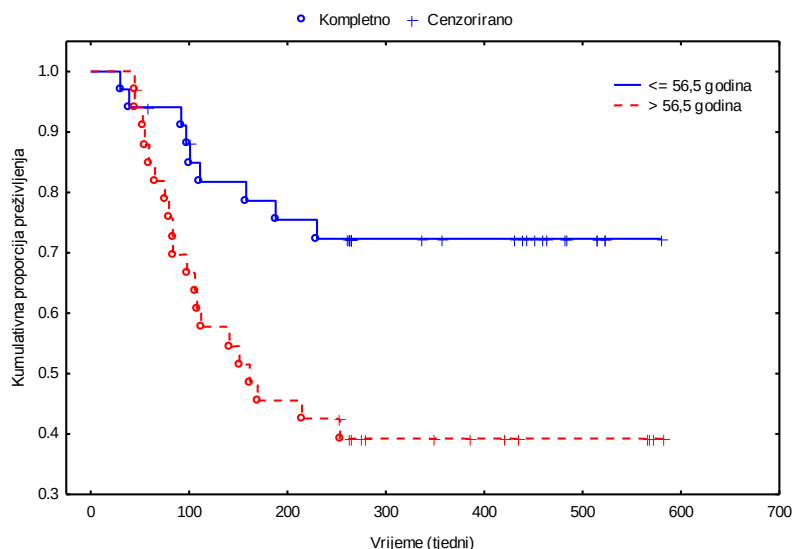
Slika 9. Histogram vremena praćenja bolesnika u tjednima.

Praćenja bolesnika u ovoj studiji izraženo je na dva načina: kao cenzorirano, i kao potpuno (kompletno). Kompletno praćenje je omogućeno ako je kritični događaj (u ovoj studiji je to smrtni ishod), nastupio u zadanom vremenu praćenja. Cenzorirano praćenje definira situaciju u kojoj se kritični događaj, u vremenu praćenja, nije desio. U ovoj je studiji 39 bolesnika (57,4%) bilo potpuno praćeno, a preostali (N=29;42,6%) su bili cenzorirani.

5.1.2. Preživljenje bolesnika u odnosu na dob

Rezultat analize, primjenom statističkog testa Gehan-Wilcoxon, pokazuje da dob značajno utječe na preživljenje. Bolesnici koji su u trenutku postavljanja dijagnoze bili mlađi od 56,5

godina (medijan dobi), imaju statistički značajno duže preživljenje u odnosu na bolesnike starije od 56,5 godina ($p = 0,0086$).



Slika 10. Razlika u preživljenju bolesnika u odnosu na dob.

5.1.3. Razdioba uzoraka u odnosu na veličinu tumora i zahvaćenost limfnih čvorova

Dva parametra, veličina tumora i zahvaćenost limfnih čvorova, bila su određena od strane operatera (cT, cN) i od strane patologa (pT, pN). S obzirom na to da uzorci klasificirani na ova dva načina nisu jednoznačno pridruženi pojedinim skupinama, zasebno su prikazani u tablicama 8 i 9.

Tablica 8. Usporedni prikaz stadija “T”, prema kirurgu (cT) i prema patologu (pT).

	cT					pT			
Stadij “T”	1	2	3	4		1	2	3	4
				4	4a				
Broj uzoraka	2	15	36	1	14	4	29	22	13
(%)	2,94%	22,06%	52,94%	1,47%	20,59%	5,88%	42,65%	32,35%	19,12%
Ukupno	2	15	36	15		4	29	22	13
St, obrada*	cTA; N=17		cTB; N=51			pTA=33		pTB=35	

Tablica 9. Usporedni prikaz stadija “N”, prema kirurgu (cN) i prema patologu (pN).

	cN						pN			
Stadij “N”	0	1	2			3	0	1	2	3
			2a	2b	2c					
Broj uzoraka	9	15	10	11	21	2	9	15	42	2
(%)	13,24%	22,06%	14,71%	16,18%	30,88%	2,94%	13,24%	22,06%	61,76%	2,94%
Ukupno	9	15	42			2	9	15	42	2
St. obrada*	cNA; N=24		cNB; N=44				pNA=24		pNB=44	

Tablica 10. Učestalost nesuglasja između parametara cT i pT.

	Stadij T prema kirurgu (cT)				Ukupno pT
Stadij T prema patologu (pT)	1	2	3	4	
1	2	<u>2</u>	0	0	4
2	0	13	<u>15</u>	<u>1</u>	29
3	0	0	20	<u>2</u>	22
4	0	0	<u>1</u>	12	13
Ukupno cT	2	15	36	15	68

Iz ove je tablice vidljivo da su stadiji cT i pT istovjetno određeni za 47 karcinoma hipofarinksa (69,11%; T1 N=2; T2 N=13; T3 N=20, T4 N=12 – očitavanje po dijagonali, u kurzivu). U preostalim se slučajevima (N=21; 30,89 %) klasificiranje razlikovalo (podvučeno).

Tablica 11. Učestalost nesuglasja između parametara cN i pN.

	Stadij N prema kirurgu (cN)				Ukupno pN
Stadij N prema patologu (pN)	0	1	2	3	
0	9	0	0	0	9
1	0	14	1	0	15
2	0	1	41	0	42
3	0	0	0	2	2
Ukupno cN	2	15	36	15	68

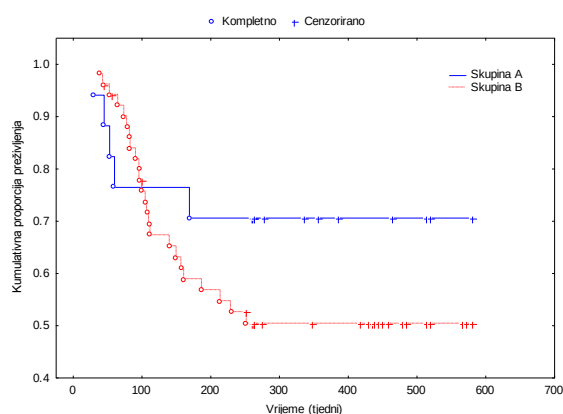
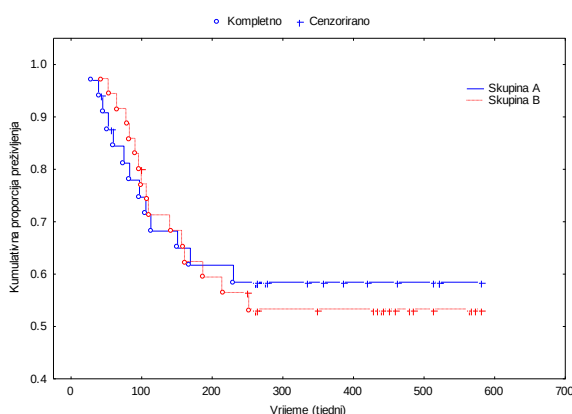
Iz ove je tablice vidljivo da se određivanje stadija “N” od strane kirurga i patologa razlikuju u samo dva slučaja (2,94 %; jedan cN1 je patolog procijenio kao N2, dok je jedan cN2 procijenjen kao pN1).

S obzirom na ova nesuglasja, preživljenje bolesnika u odnosu na parametre “T” i “N” smo analizirali za svaku skupinu posebno.

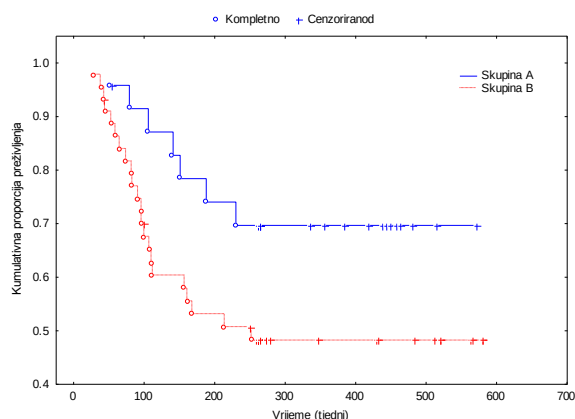
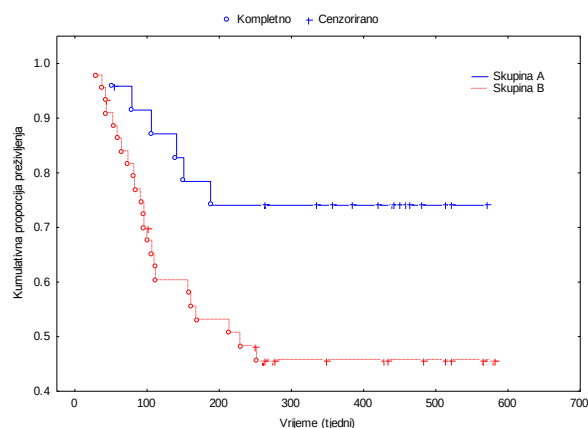
5.1.4. Utjecaj parametara “T” i “N” na preživljenje bolesnika

Za određivanje značaja kliničkih parametara navedenih u Tablicama 8 i 9 na preživljenje bolesnika, korišten je test Gehan-Wilcoxon. Njegova je uporaba u ovom slučaju opravdana zbog toga što se njime, za razliku od testa *log-rank*, matematičkim izračunom, korištenjem informatičkog programa, omogućuje jače vrednovanje bolesnika koji su umrli u vremenskom periodu kraćem od medijana ukupnog vremena praćenja. Ovo je činjenica važna za ovu prognostičku studiju s obzirom na to da nakon 240. tjedna praćenja dominiraju, što je i očekivano, cenzorirani bolesnici. Za potrebe izvođenja ovog testa, parametri cT i pT su prikazani kao dvije skupine podataka, na način da su se združili stadiji 1 i 2 (u skupinu A), te stadiji 3 i 4 (u skupinu B). Sukladno tome, analizom je napravljena usporedna analiza: cTA: cT1+cT2 (N=17) s cTB: cT3+cT4 (N=51), te pTA: pT1+pT2 (N=33) s pTB: pT3+pT4 (N=35). Neovisno o tome da li je procjenu stadija učinio kirurg ili patolog, razlike u preživljenju između ovih skupina nisu bile statistički značajne i iznosile su $p=0,44515$ (skupine cTA i cTB) (Slika 11A), odnosno $p=0,94641$ (pTA i pTB) (slika 11B).

Na istovjetan smo način objedinili i bolesnike u odnosu na zahvaćenost limfnih čvorova: prema kliničkoj procjeni; cNA: cN1+cN2 (N=24) i cNB: cN2+cN3 (N=44), i prema procjeni patologa pNA: pN1+pN2 (N=24) i pNB: pN3+pN4 (N=44). U ovom je slučaju, neovisno o toga da li je procjena rađena od strane kirurga ili strane patologa, statistička razlika u preživljenju između skupina bila značajna uz vrijednosti $p=0,026$ (procjena kirurga) i $p=0,052$ (procjena patologa). Iako bi se iz Tablice 9 dalo zaključiti da bi ove dvije vrijednosti trebale biti jednake s obzirom na to da je broj uzoraka po skupini jednak, tome nije tako zato što je došlo do fenomena “recipročne zamjene”, koja se može uočiti tek detaljnom analizom, kao što je i prikazano u tablici 9. Grafički prikaz ovih rezultata vidljiv je na slikama 11 (A i B) i 12 (A i B).

A**B**

Slika 11. Grafički prikaz preživljenja bolesnika u odnosu na veličinu tumora prema procjeni kirurga (11A) i procjeni patologa (11B). Plava linija predstavlja bolesnike objedinjene u skupini T1+T2 (TA), a crvena bolesnike objedinjene u skupini T3+T4 (TB). Razlike u vremenu preživljenja nisu statistički značajne.

A**B**

Slika 12. Grafički prikaz preživljenja bolesnika u odnosu na zahvaćenost limfnih čvorova, prema procjeni kirurga (cN) i procjeni patologa (pN). Plava linija predstavlja bolesnike objedinjene u skupini N0+N1 (NA), a crvena bolesnike objedinjene u skupini N2+N3 (NB). Razlike u preživljenju su statistički značajne s obzirom na parametar cN ($p=0,026$).

5.1.5. Razdioba uzoraka u odnosu na stupanj diferencijacije

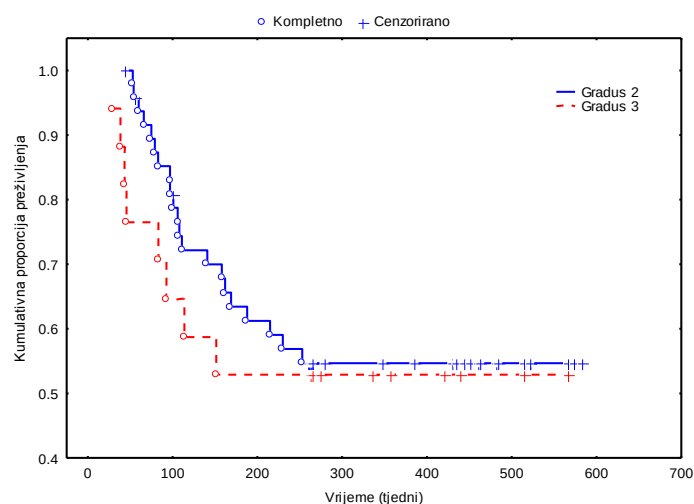
Svakom je tumoru patolog, uz pT i pN, odredio i stupanj diferencijacije (Tablica 12). S obzirom na to da su samo dva tumora bila dobro diferencirana (gradus 1, G1), analiza preživljenja testom Gehan Wilcoxon je napravljena za bolesnike čiji su tumori bili srednje (G2; N=49) i slabo diferencirani (G3; N=17).

Tablica 12. Razdioba uzoraka u odnosu na stupanj diferencijacije (parametar „G“)

Gradus	pT				Ukupno (G)
	1	2	3	4	
1	0	0	0	2	2
2	4	18	19	8	49
3	0	11	3	3	17
Ukupno (G)	4	29	22	13	68

Ove dvije skupine bolesnika se, u odnosu na preživljenje, nisu razlikovale ($p=0,35784$).

Grafički prikaz ove analize vidljiv je na slici 13.



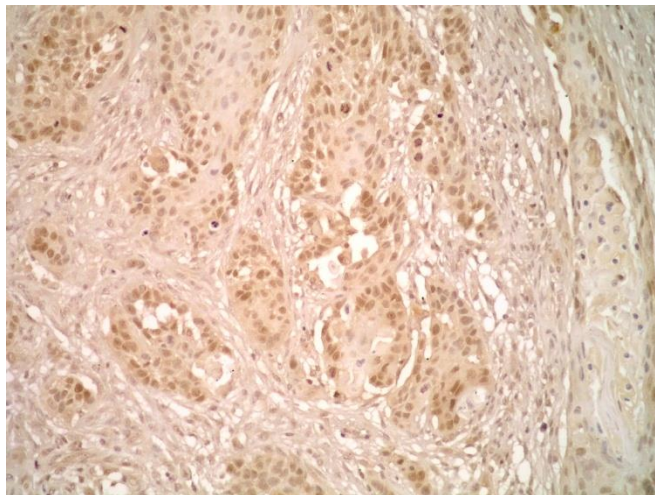
Slika 13. Analiza preživljenja bolesnika s obzirom na diferenciranost tumora. Uspoređeno je preživljenje bolesnika čiji su tumori bili klasificirani kao G2 (N=49) i G3 (N=17).

5.1.6. Analiza izražaja EZH2, JMJD3 i p53

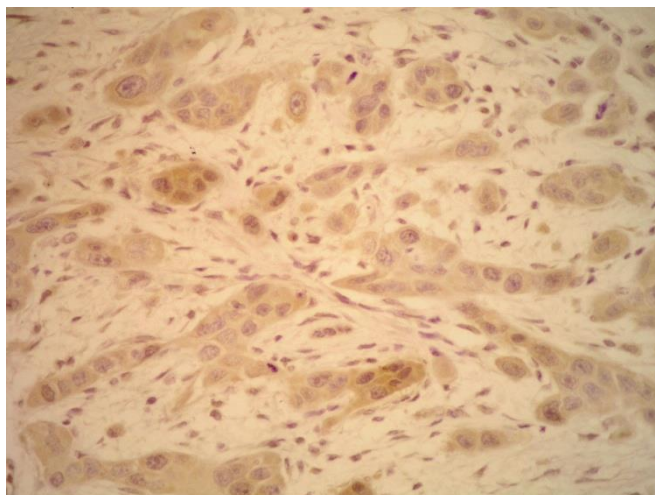
5.1.6.1. Izraženost i značaj EZH2, JMJD3 i p53 u odnosu na parametar cT

Uspješno bojanje na EZH2 (Slika 14), JMJD3 (Slika 15) i p53 (Slika 16) bilo je učinjeno na 52 (EZH2), 56 (JMJD3) i 50 (p53) tumora, na način na koji je to prikazano u Tablicama 13 - 16. Za sve je uzorke napravljena statistička analiza primjenom testa Pearson chi-kvadrat (χ^2), na četiri razine: a) na način da se podatci ne objedinjuju; b) na način da se podatci objedine samo u odnosu na izražaj, kako bi skupine brojčano “ojačale”. Na ovaj su način dobivene sljedeće skupine: EZH2A (N=38): EZH2 0 (N=26) i EZH2 1 (N=12); EZH2B (N=14): EZH2 2 (N=9) i EZH2 3 (N=5); JMJD3 A (N=41): JMJD3 0 (N=41) i JMJD3 B (N=15): JMJD 3 1

(N=13) i JMJD3 2 (N=2); p53 A (N=37): p53 0 (N=28) i p53 1 (N=9) i p53 B (N=13): p53 2 (N=9) i p53 3 (N=4); c) na način da se podatci objedine u odnosu na stadij "T": cTA (N=17): T1+T2; cTB (N=51): T3+T4; d) na način da se podatci objedine i na razini izražaja svih analiziranih proteina, i na razini stadija cT.



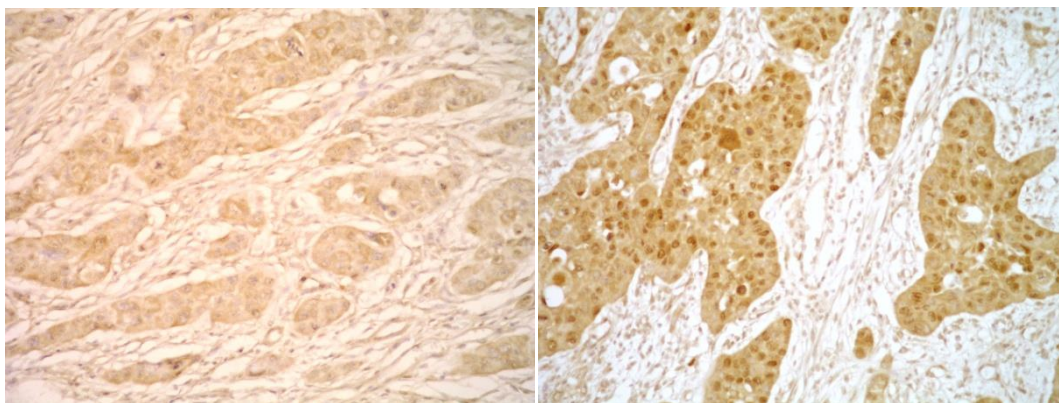
Slika 14. Snažni izražaj EZH2 (T105) u karcinomu hipofarinksa, na povećanju 200.



Slika 15. Umjereno snažan izražaj JMJD3 (T42) u karcinomu hipofarinksa, (400x).

A

B



Slika 16. Slab (A) (T93) i snažan (B) (T19) izražaj p53 (400x).

Tablica 13. Detaljan prikaz izražaja svih ciljnih proteina, dokazanih bojenjem u reakcijama imunohistokemije, u odnosu na parametar cT. Izraženost JMJD3 je statistički značajno povezana s veličinom tumora (cT) ($p=0,00005$).

		Izraženost EZH2				Izraženost JMJD3			Izraženost p53			
cT		0 (N=26)	1 (N=12)	2 (N=9)	3 (N=5)	0 (N=41)	1 (N=13)	2 (N=2)	0 (N=28)	1 (N=9)	2 (N=9)	3 (N=4)
1		1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
		100%	0.00%	0.00%	0.00%	100%	0.00%	0.00%	100.00%	0.00%	0.00%	0.00%
2		4	1	2	1	7	4	0	8	1	0	0
		50.00%	12.50%	25.00%	12.50%	63.64%	36.36%	0.00%	61.90%	9.52%	19.05%	9.52%
3		14	9	5	3	27	5	0	15	7	7	2
		45.16%	29.03%	16.13%	9.68%	84.38%	15.63%	0.00%	33.33%	44.44%	16.67%	5.56%
4	4	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
		0.00%	100%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	100%	0.00%	0.00%	100%	0.00%
	4A	7	1	2	1	6	4	1	4	1	1	2
		63.64%	9.09%	18.18%	9.09%	54.55%	36.36%	9.09%	58.33%	16.66%	16.66%	8.33%
Ukupno		26	12	9	5	41	13	2	28	9	9	4
PCST		χ^2 7,06; df=12; p=0,85362				χ^2 33,47834; df=8; p=0,00005			χ^2 14,00374; df=12; p=0,30049			

Vidljivo je da postoji snažna povezanost između ispoljavanja JMJD3 i kliničkog stadija tumora ($p=0,00005$).

Tablica 14. Prikaz objedinjenog izražaja svih ciljnih proteina, dokazanih bojenjem u reakcijama imunohistokemije.

		Izraženost EZH2		Izraženost JMJD3		Izraženost p53	
cT		EZH2 A	EZH2 B	JMJD3 A	JMJD3 B	p53 A	p53 B
		(N=38)	(N=14)	(N=41)	(N=15)	(N=37)	(N=13)
1		1	0	1	0	1	0
		100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%
2		5	3	7	4	9	0
		62,50%	37,50%	63,64%	36,36%	100,00%	0,00%
3		23	8	27	5	22	9
		74,19%	25,81%	84,38%	15,63%	70,97%	29,03%
4	4	1	0	0	0	0	1
		100,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%
	4A	8	3	6	5	5	3
		72,73%	27,27%	54,55%	62,50%	62,50%	37,50%
Ukupno		38	14	41	15	37	13
PCST		χ^2 1,21; df=4; p=0,87611		χ^2 7,60; df=4; p=0,10734		χ^2 7,06; df=4; p=0,133	

Tablica 15. Značaj izražaja ciljnih proteina u karcinomima hipofarinksa koji su objedinjeni u odnosu na status cT.

	Izraženost EZH2				Izraženost JMJD3			Izraženost p53			
cT	0 (N=26)	1 (N=12)	2 (N=9)	3 (N=5)	0 (N=41)	1 (N=13)	2 (N=2)	0 (N=28)	1 (N=9)	2 (N=9)	3 (N=4)
cTA	5 19,23%	1 8,33%	2 22,22%	1 20%	8 19,51%	4 30,77%	0 0,00%	9 90,00%	1 10,00%	0 0,00%	0 0,00%
cTB	21 80,77%	11 91,67%	7 77,78%	4 80%	33 80,49%	9 69,23%	2 100,00%	19 47,50%	8 20,00%	9 22,50%	4 10,00%
Ukupno	26	12	9	5	41	13	2	28	9	9	4
PCST	χ^2 0,92; df=3; p=0,8268				χ^2 1,31; df=2; p=0,51982			χ^2 6,27; df=3; p=0,9899			

Tablica 16. Povezanost izražaja ciljnih proteina u karcinomima hipofarinksa, u odnosu na objedinjen status cT i objedinjenu razinu izražaja.

	Izraženost EZH2		Izraženost JMJD3		Izraženost p53	
	EZH2 A	EZH2 B	JMJD3 A	JMJD3 B	p53 A	p53 B
cT	(N=38)	(N=14)	(N=41)	(N=15)	(N=37)	(N=13)
cTA	6 66,67%	3 33,33%	8 66,67%	4 33,33%	10 100,00%	0 0,00%
cTB	32 74,42%	11 25,58%	33 75%	11 25%	27 67,50%	13 32,50%
Ukupno	38	14	41	15	37	13
PCST	χ^2 0,22; df=1; p=0,63352		χ^2 0,33; df=1; p=0,56339		χ^2 4,39; df=1; p=0,03611	

Dvostrukim objedinjenjem parametara, izražaj p53 postaje značajan čimbenik u odnosu na parametar cT.

5.1.6.2. Izraženost i značaj EZH2, JMJD3 i p53 u odnosu na parametar pT

Za ovu su analizu podatci objedinjeni na istovjetan način. Međutim, s obzirom na razlike koje su postojale u procjeni (Tablica 10), broj uzoraka u skupinama pTA (pT1+pT2) i pTB (pT) se razlikuju. U ovoj skupini je zbroj tumora bio: za EZH2: pTA=23; pTB=29; za JMJD3: pTA=27; pTB=29; za p53: pTA=25; pTB=25. Prikaz ovih rezultata vidljiv je u Tablicama 17-20.

Tablica 17. Detaljan prikaz izražaja svih ciljnih proteina, dokazanih bojenjem u reakcijama imunohistokemije, u odnosu na parametar pT.

	Izraženost EZH2				Izraženost JMJD3			Izraženost p53			
pT	0 (N=26)	1 (N=12)	2 (N=9)	3 (N=5)	0 (N=41)	1 (N=13)	2 (N=2)	0 (N=28)	1 (N=9)	2 (N=9)	3 (N=4)
1	2	0	0	0	1	1	0	2	0	0	0
	100%	0,00%	0,00%	0,00%	50,0%	50,0%	0,00%	100%	0,00%	0,00%	0,00%
2	13	2	4	2	20	5	0	14	5	2	2
	61,90%	9,52%	19,05%	9,52%	80,00%	20,00%	0,00%	60,87%	21,74%	8,70%	8,70%
3	6	8	3	1	15	3	0	9	3	4	0
	33,33%	44,44%	16,67%	5,56%	83,33%	16,67%	0,00%	56,25%	18,75%	25,00%	0,00%
4	5	2	2	2	5	4	2	3	1	3	2
	45,45%	18,18%	18,18%	18,18%	45,45%	36,36%	18,18%	33,33%	11,11%	33,33%	22,22%
Ukupno	26	12	9	5	41	13	2	28	9	9	4
PCST	$\chi^2 10,18$; df=9; p=0,33598				$\chi^2 11,78$; df=6; p=0,06715			$\chi^2 9,20$; df=9; p=0,41881			

Tablica 18. Prikaz objedinjenog izražaja svih ciljnih proteina, dokazanih bojenjem u reakcijama imunohistokemije, u odnosu na parametar pT. Objedinjeni izražaj JMJD3 je statistički značajno povezan s veličinom tumora (pT) (p=0,00375).

	Izraženost EZH2		Izraženost JMJD3		Izraženost p53	
pT	EZH2 A	EZH2 B	JMJD3 A	JMJD3 B	p53 A	p53 B
	(N=38)	(N=14)	(N=41)	(N=15)	(N=37)	(N=13)
1	2	0	1	1	2	0
	100,00%	0,00%	50,00%	50,00%	100,00%	0,00%
2	15	6	20	5	19	4
	71,43%	28,57%	80,00%	20,00%	82,61%	17,39%
3	14	4	15	3	12	4
	77,78%	22,22%	83,33%	16,67%	75,00%	25,00%
4	7	4	5	6	4	5
	63,64%	36,36%	45,45%	54,55%	44,44%	55,56%
Ukupno	38	14	41	15	37	13
PCST	$\chi^2 1,47$; df=3; p=0,69007		$\chi^2 6,40$; df=3; p=0,00375		$\chi^2 5,68$; df=3; p=0,12810	

Objedinjeni izražaj JMJD3 je statistički značajno povezan s veličinom tumora (pT) (p=0,00375).

Tablica 19. Prikaz ciljnih proteina u karcinomima hipofarinksa koji su objedinjeni u odnosu na status pT.

	Izraženost EZH2				Izraženost JMJD3			Izraženost p53			
pT	0 (N=26)	1 (N=12)	2 (N=9)	3 (N=5)	0 (N=41)	1 (N=13)	2 (N=2)	0 (N=28)	1 (N=9)	2 (N=9)	3 (N=4)
pTA	15	2	4	2	21	6	0	16	5	2	16
	65,22%	8,70%	17,39%	8,70%	77,78%	22,22%	0,00%	64,00%	20,00%	8,00%	64,00%
pTB	11	10	5	3	20	7	2	12	4	7	12
	37,93%	34,48%	17,24%	10,34%	68,97%	24,14%	6,90%	48,00%	16,00%	28,00%	48,00%
Ukupno	26	12	9	5	41	13	2	28	9	9	4
PCST	$\chi^2 5,64$; df=3; p=0,13036				$\chi^2 2,03$; df=2; p=0,36196			$\chi^2 3,46$; df=3; p=0,32595			

Tablica 20. Prikaz ciljnih proteina na karcinomima hipofarinksa, objedinjenih u odnosu na intenzitet obojenja, i u odnosu na status pT.

	Izraženost EZH2		Izraženost JMJD3		Izraženost p53	
	EZH2 A	EZH2 B	JMJD3 A	JMJD3 B	p53 A	p53 B
pT	(N=38)	(N=14)	(N=41)	(N=15)	(N=37)	(N=13)
pTA	17	6	21	6	21	4
	73,91%	26,09%	77,78%	22,22%	84,00%	16,00%
pTB	21	8	20	9	16	9
	72,41%	27,59%	68,97%	31,03%	64,00%	36,00%
Ukupno	38	14	41	15	37	13
PCST	$\chi^2 0,15$; df=1; p=0,90365		$\chi^2 0,55$; df=1; p=0,45682		$\chi^2 2,60$; df=1; p=0,10695	

5.1.6.3. Izraženost i značaj EZH2, JMJD3 i p53 u odnosu na gradus tumora

Analiza značaja izražaja ciljnih proteina u odnosu na gradus tumora također je izvedena korištenjem testa Pearson chi-square. Razdioba uzoraka prema gradusu, u odnosu na izražaj sva tri proteina prikazana je u tablici 21.

Tablica 21. Razdioba uzoraka prema gradusu, u odnosu na izražaj sva tri proteina.

	Izraženost EZH2				Izraženost JMJD3			Izraženost p53			
Gradus	0 (N=26)	1 (N=12)	2 (N=9)	3 (N=5)	0 (N=41)	1 (N=13)	2 (N=2)	0 (N=28)	1 (N=9)	2 (N=9)	3 (N=4)
1	2	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
	7,69%	0,00%	0,00%	0,00%	2,43%	7,69%	0,00%	3,57%	0,00%	0,00%	0,00%
2	17	11	7	3	28	10	2	20	6	6	4
	65,4%	91,6%	77,77%	60,00%	68,29%	76,92%	100,00%	71,42%	66,66%	66,66%	100,00%
3	7	1	2	2	12	2	0	7	3	3	0
	26,9%	8,3%	22,22%	40,00%	29,26%	15,38%	0,00%	25,00%	33,33%	33,33%	0,00%
Ukuno	26	12	9	5	41	13	2	28	9	9	4
PCTS	χ^2 7,56; df=12; p=0,85362				χ^2 1,181; df=9; p=0,33597			χ^2 1,181; df=9; p=0,33597			

I u ovom smo slučaju objedinili uzorke u odnosu na snagu izražaja, na već opisani način.

Rezultati su prikazani u tablici 22.

Tablica 22. Objedinjeni izražaj ciljnih proteina u odnosu na stupanj diferencijacije tumora

	Izraženost EZH2		Izraženost JMJD3		Izraženost p53	
Gradus	EZH2 A (N=38)	EZH2 B (N=14)	JMJD3 A (N=41)	JMJD3 B (N=15)	p53 A (N=37)	p53 B (N=13)
1	2	0	1	1	1	0
	100,00%	0,00%	50,00%	50,00%	100,00%	0,00%
2	28	10	28	12	26	10
	73,68%	26,32%	70,00%	30,00%	72,22%	27,78%
3	8	4	12	2	10	3
	66,67%	33,33%	85,71%	14,29%	76,92%	23,08%
Ukupno	38	14	41	15	37	13
PCST	χ^2 0,99; df=2; p=0,60817		χ^2 1,88; df=2; p=0,39146		χ^2 0,47; df=2; p=0,79128	

Izraženost istraživanih proteina nije statistički značajno povezana s gradusom karcinoma hipofarinksa.

5.1.6.4. Izraženost i značaj EZH2, JMJD3 i p53 u odnosu na parametar cN

Za izvođenje ove analize, objedinjenje uzoraka s obzirom na izražaj ciljnih proteina se ne razlikuje u odnosu na već opisani postupak. Broj uzoraka u skupinama cNA (cN0+cN1) i cNB (cN2+cN3) bio je: za EZH2: cNA=17; cNB=35; za JMJD3: cNA=17; cNB=3; za p53: cNA=16; cNB=34. Rezultati su prikazani u tablicama 23-26.

Tablica 23. Detaljan prikaz izražaja svih ciljnih proteina, dokazanih bojenjem u reakcijama imunohistokemije, u odnosu na parametar cN. Izraženost p53 je statistički značajno povezana s ovim parametrom ($p=0,03695$).

		Izraženost EZH2				Izraženost JMJD3			Izraženost p53			
cN		0	1	2	3	0	1	2	0	1	2	3
		(N=26)	(N=12)	(N=9)	(N=5)	(N=41)	(N=13)	(N=2)	(N=28)	(N=9)	(N=9)	(N=4)
0		4	3	1	0	4	4	0	7	1	0	0
		50,00%	37,50%	12,50%	0,00%	50,00%	50,00%	0,00%	87,50%	12,50%	0,00%	0,00%
1		4	1	2	2	8	1	0	4	3	0	1
		44,44%	11,11%	22,22%	22,22%	88,89%	11,11%	0,00%	50,00%	37,50%	0,00%	12,50%
2	2a	2	3	0	3	6	2	0	1	1	4	0
		25,00%	37,50%	0,00%	37,50%	75,00%	25,00%	0,00%	16,67%	16,67%	66,67%	0,00%
	2b	9	2	4	0	15	3	1	9	4	1	3
		60,00%	13,33%	26,67%	0,00%	78,95%	15,79%	5,26%	52,94%	23,53%	5,88%	17,65%
	2c	5	3	2	0	6	3	1	6	0	3	0
		50,00%	30,00%	20,00%	0,00%	60,00%	30,00%	10,00%	66,67%	0,00%	33,33%	0,00%
3		2	0	0	0	2	0	0	1	0	1	0
		100,00%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%	50,00%	0,00%	50,00%	0,00%
Ukupno		26	12	9	5	41	13	2	28	9	9	4
PCST		χ^2 19,72; df=15; $p=0,18260$				χ^2 7,85; df=10; $p=0,64318$			χ^2 26,11; df=15; $p=0,03695$			

Tablica 24. Prikaz objedinjenog izražaja svih ciljnih proteina, dokazanih bojenjem u reakcijama imunohistokemije, u odnosu na klinički određen status limfnih čvorova (cN).

		Izraženost EZH2		Izraženost JMJD3		Izraženost p53	
cN		EZH2 A	EZH2 B	JMJD3 A	JMJD3 B	p53 A	p53 B
		(N=38)	(N=14)	(N=41)	(N=13)	(N=37)	(N=13)
0		7	1	4	4	8	0
		87,50%	12,50%	50,00%	50,00%	100,00%	0,00%
1		5	4	8	1	7	1
		55,56%	44,44%	88,89%	11,11%	87,50%	12,50%
2	2a	5	3	6	2	2	4
		62,50%	37,50%	75,00%	25,00%	33,33%	66,67%
	2b	11	4	15	4	13	4
		73,33%	26,67%	78,95%	21,05%	76,47%	23,53%
	2c	8	2	6	4	6	3
		80,00%	20,00%	60,00%	40,00%	66,67%	33,33%
3		2	0	2	0	1	1
		100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	50,00%	50,00%
Ukupno		38	14	41	15	37	13
PCST		χ^2 3,69; df=5; $p=0,59544$		χ^2 5,28; df=5; $p=0,38274$		χ^2 9,63; df=5; $p=0,08643$	

Tablica 25. Prikaz izražaja svih ciljnih proteina, dokazanih bojenjem u reakcijama imunohistokemije, u odnosu na objedinjeni stadij cN.

	Izraženost EZH2				Izraženost JMJD3			Izraženost p53			
cN	0	1	2	3	0	1	2	0	1	2	3
	(N=26)	(N=12)	(N=9)	(N=5)	(N=41)	(N=13)	(N=2)	(N=28)	(N=9)	(N=9)	(N=4)
cNA	8	4	3	2	12	5	0	11	4	0	1
	47,06%	23,53%	17,65%	11,76%	70,59%	29,41%	0,00%	68,75%	25,00%	0,00%	6,25%
cNB	18	8	6	3	29	8	2	17	5	9	3
	51,43%	22,86%	17,14%	8,57%	74,36%	20,51%	5,13%	50,00%	14,71%	26,47%	8,82%
Ukupno	26	12	9	5	41	13	2	28	9	9	4
PCST	χ^2 0,17; df=3; p=0,98244				χ^2 1,30; df=2; p=0,52240			χ^2 5,65; df=3; p=0,13001			

Tablica 26. Prikaz objedinjenog izražaja svih ciljnih proteina, dokazanih bojenjem u reakcijama imunohistokemije, u odnosu na objedinjeni stadij cN.

	Izraženost EZH2		Izraženost JMJD3		Izraženost p53	
	EZH2 A	EZH2 B	JMJD3 A	JMJD3 B	p53 A	p53 B
cN	(N=38)	(N=14)	(N=41)	(N=15)	(N=37)	(N=13)
cNA	12	5	12	5	15	1
	70,59%	29,41%	70,59%	29,41%	93,75%	6,25%
cNB	26	9	29	10	22	12
	74,29%	25,71%	74,36%	25,64%	64,71%	35,29%
Ukupno	38	14	41	15	37	13
PCST	χ^2 0,08; df=1; p=0,77796		χ^2 0,09; df=1; p=0,76954		χ^2 4,77; df=1; p=0,02896	

Iz ovih je analiza vidljivo da ja izraženost p53 statistički značajno povezana s metastaziranjem karcinoma hipofarinksa u limfne čvorove (p=0,03695; Tablica 22). Još veća značajnost je pokazana na razini objedinjenih uzoraka i razina obojenja (p=0,02896; Tablica 26).

5.1.6.5. Izraženost i značaj EZH2, JMJD3 i p53 u odnosu na parametar pN

Broj uzoraka u skupinama pNA (pN0+pN1) i pNB (pN2+pN3) bio je: za EZH2: pNA=18; pNB=35; za JMJD3: pNA=17; pNB=39; za p53: cNA=17; cNB=33. Rezultati su prikazani u tablicama 27-30.

Tablica 27 Detaljan prikaz izražaja svih ciljnih proteina, dokazanih bojenjem u reakcijama imunohistokemije, u odnosu na parameter pN.

	Izraženost EZH2				Izraženost JMJD3			Izraženost p53			
pN	0	1	2	3	0	1	2	0	1	2	3
	(N=26)	(N=12)	(N=9)	(N=5)	(N=41)	(N=13)	(N=2)	(N=28)	(N=9)	(N=9)	(N=4)
0	4	3	1	0	4	4	0	7	1	0	0
	50,00%	37,50%	12,50%	0,00%	50,00%	50,00%	0,00%	87,50%	12,50%	0,00%	0,00%
1	4	1	3	2	9	1	0	4	3	0	2
	40,00%	10,00%	30,00%	20,00%	90,00%	10,00%	0,00%	44,44%	33,33%	0,00%	22,22%
2	16	8	5	3	26	8	2	16	5	8	2
	50,00%	25,00%	15,63%	9,38%	72,22%	22,22%	5,56%	51,61%	16,13%	25,81%	6,45%
3	2	0	0	0	2	0	0	1	0	1	0
	100,00%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%	50,00%	0,00%	50,00%	0,00%
Ukupno	26	12	9	5	41	13	2	28	9	9	4
PCST	χ^2 6,70; df=9; p=0,66872				χ^2 6,0; df=6; p=0,42433			χ^2 11,90; df=9; p=0,21916			

Tablica 28. Prikaz objedinjenog izražaja svih ciljnih proteina, dokazanih bojenjem u reakcijama imunohistokemije, u odnosu na parameter pN.

	Izraženost EZH2		Izraženost JMJD3		Izraženost p53	
pN	EZH2 A	EZH2 B	JMJD3 A	JMJD3 B	p53 A	p53 B
	(N=38)	(N=14)	(N=41)	(N=15)	(N=37)	(N=13)
0	7	1	4	4	8	0
	87,50%	12,50%	50,00%	50,00%	100,00%	0,00%
1	5	5	9	1	7	2
	50,00%	50,00%	90,00%	10,00%	77,78%	22,22%
2	24	8	26	10	21	10
	75,00%	25,00%	72,22%	27,78%	67,74%	32,26%
3	2	0	2	0	1	1
	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	50,00%	50,00%
Ukupno	38	14	41	15	37	13
PCST	χ^2 4,35; df=3; p=0,22611		χ^2 4,38; df=3; p=0,22280		χ^2 4,11; df=3; p=0,25011	

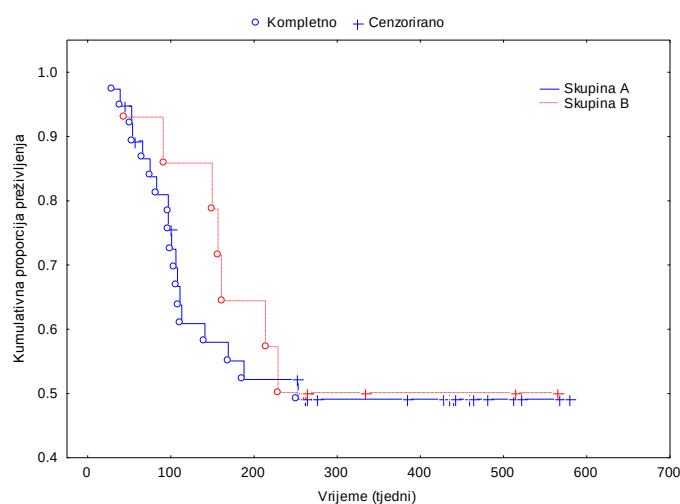
Tablica 29. Prikaz izražaja svih ciljnih proteina, dokazanih bojenjem u reakcijama imunohistokemije, u odnosu na objedinjeni parameter pN.

	Izraženost EZH2				Izraženost JMJD3			Izraženost p53			
pN	0	1	2	3	0	1	2	0	1	2	3
	(N=26)	(N=12)	(N=9)	(N=5)	(N=41)	(N=13)	(N=2)	(N=28)	(N=9)	(N=9)	(N=4)
pNA	8	4	4	2	13	5	0	11	4	0	2
	44,44%	22,22%	22,22%	11,11%	72,22%	27,78%	0,00%	64,71%	23,53%	0,00%	11,76%
pNB	18	8	5	3	28	8	2	17	5	9	2
	52,94%	23,53%	14,71%	8,82%	73,68%	21,05%	5,26%	51,52%	15,15%	27,27%	6,06%
Ukupno	26	12	9	5	41	13	2	28	9	9	4
PCST	χ^2 0,63; df=3; p=0,89025				χ^2 1,20; df=2; p=0,55187			χ^2 5,88; df=3; p=0,11766			

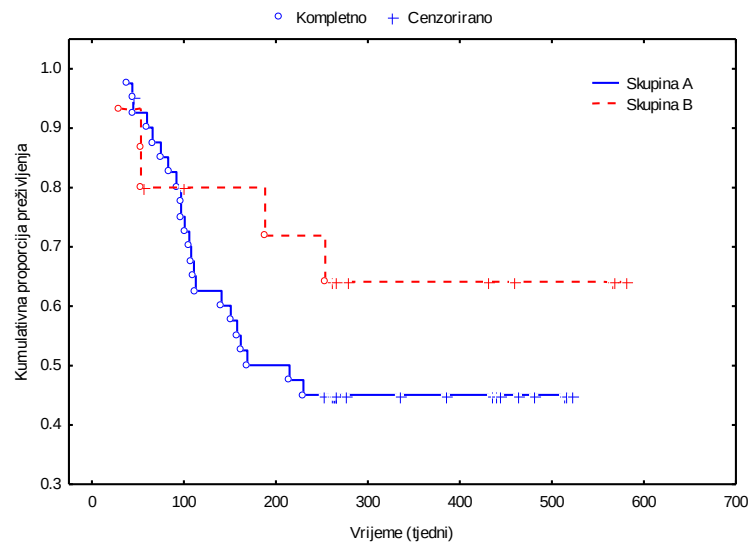
Tablica 30. Prikaz objedinjenog izražaja svih ciljnih proteina, dokazanih bojenjem u reakcijama imunohistokemije, u odnosu na objedinjeni stadij pN.

	Izraženost EZH2		Izraženost JMJD3		Izraženost p53	
	EZH2 A	EZH2 B	JMJD3 A	JMJD3 B	p53 A	p53 B
pN	(N=38)	(N=14)	(N=41)	(N=15)	(N=37)	(N=13)
pNA	12	6	13	5	15	2
	66,67%	33,33%	72,22%	27,78%	88,24%	11,76%
pNB	26	8	28	10	22	11
	76,47%	23,53%	73,68%	26,32%	66,67%	33,33%
Ukupno	38	14	41	15	37	13
PCST	χ^2 0,57; df=1; p=0,44829		χ^2 0,01; df=1; p=0,90814		χ^2 2,71; df=1; p=0,09954	

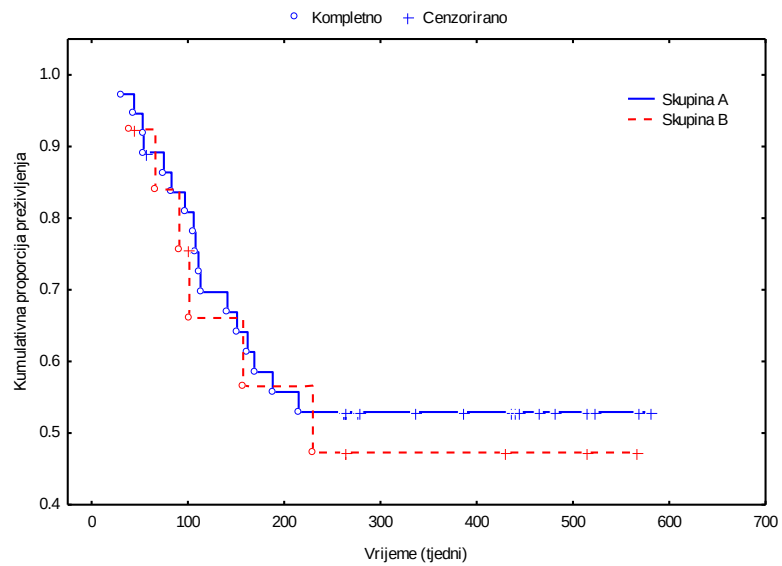
Na kraju smo usporedili značaj razlike skupina EZH2A i EZH2B, JMJD3A i JMJD3B i p53A i p53B u odnosu na preživljenje bolesnika, korištenjem testa Gehan-Wilcoxon. Ovom je analizom pokazano da se niti jedan od ova tri proteina ne može smatrati neovisnim prognostičkim čimbenikom preživljenja u oboljelih od karcinoma hipofarinksa (EZH2: p= 0,53839; JMJD3: p= 0,37726; p53: p=0,73650) (Slike 17-19).



Slika 17. Utjecaj izražaja EZH2 na preživljenje bolesnika (p= 0,53839).



Slika 18. Utjecaj izražaja JMJD3 na preživljenje bolesnika ($p = 0,37726$)



Slika 19. Utjecaj izražaja p53 na preživljenje ($p = 0,73650$).

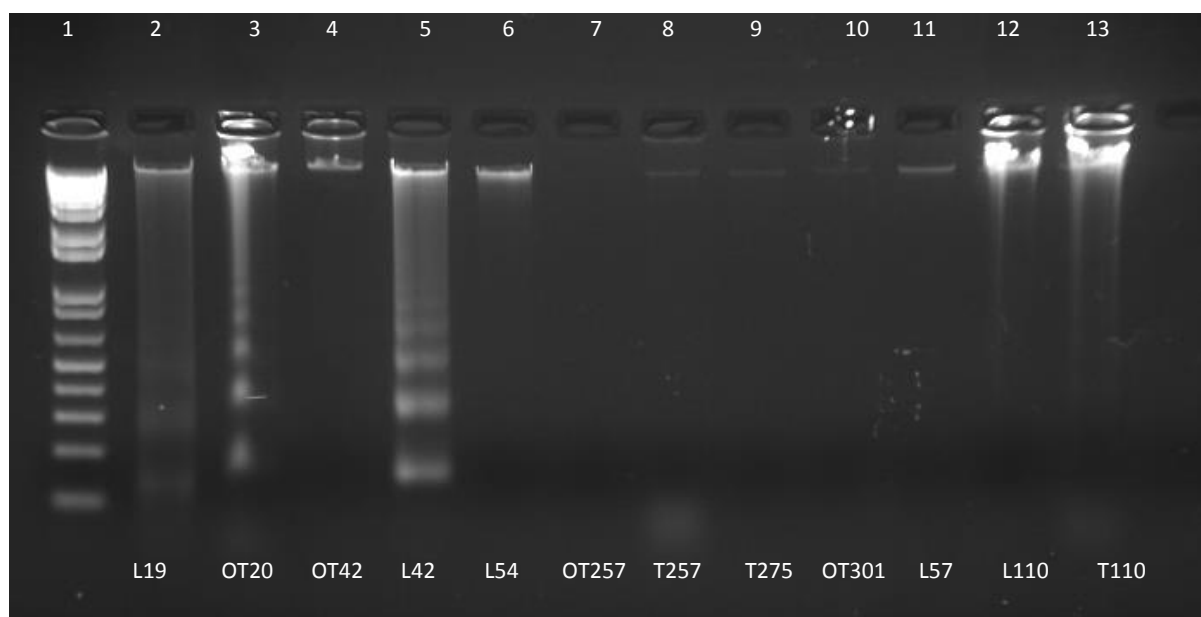
5.2. Molekularno-geničke analize na razini DNA i RNA

Za molekularno-genetičke analize koristili smo 31 uzorak pohranjen na -80°C , u Hrvatskoj banci tumora. Za 27 pohranjenih tumora nam je bilo dostupno i okolno tkivo netumora. Za četiri uzorka smo, kao dodatnu kontrolu tkivu tumora, koristili tkivo limfnog čvora koji je, po kirurgu, bio nezahvaćen tumorom.

5.2.1. Izdvajanje nukleinskih kiselina

5.2.1.1. Izdvajanje DNA

Iako je DNA stabilna molekula, nije bila jednako dobro sačuvana u svim uzorcima (Slika 20). Bez obzira na ovu činjenicu, ponovljenim postupcima ugušćavanja uzoraka i dodatnih postupaka izdvajanja, bili smo u mogućnosti izdvojiti dovoljnu količinu nukleinske kiseline iz svih uzoraka, za reakcije umnažanja. Zanimljiv fenomen je bilo prisustvo apoptoze, koja se vrlo jasno vidjela u dijelu uzoraka (slika 20, linije 3 i 5).

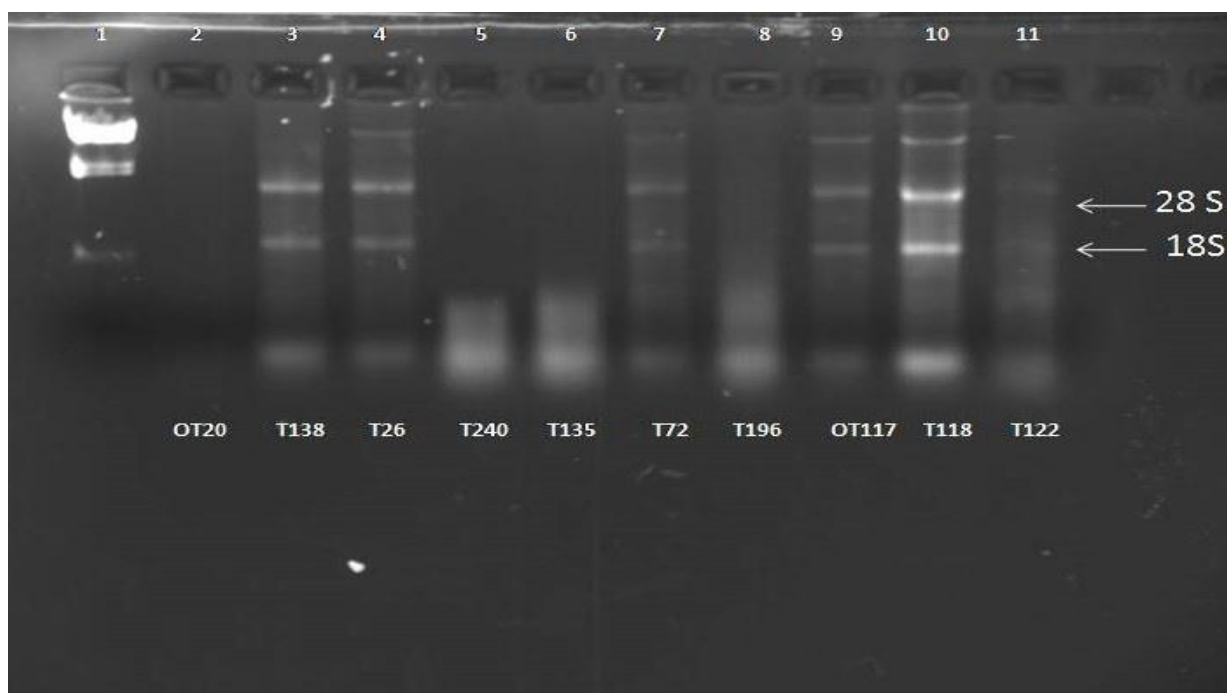


Slika 20. Uzorci genomske DNA izdvojeni iz tkiva tumora („T“), pripadajućeg tkiva netumora („OT“) i četiri limfna čvora. Struktura koja nalikuje ljestvici je fragmentirana DNA, koja je, u ovoj seriji uzoraka, bila prisutna u jednom limfnom čvoru (L42; linija 5) i jednom tkivu netumora (OT 20; linija 3). U liniji 1 nalazi se standard DNA 1 Kb Plus DNA Ladder.

5.2.1.2. Izdvajanje RNA

Princip koji smo primijenili za analizu DNA, primijenili smo i za RNA. Iz uzoraka koji su bili u parovima (tumor i pripadajuće tkivo netumora; 27 sparenih uzoraka) smo izdvojili ukupnu RNA. Provjera njezine koncentracije i kvalitete bila je učinjena spektrofotometrijski i elektroforezom u gelu obojanom etidij-bromidom. Bilo je očekivano da će u dijelu uzoraka

RNA biti razgrađena. S obzirom na to da se glasnička RNA u gelu agaroze ne može vidjeti, o njezinom se integritetu prosuđuje na temelju vrpce ribosomalne RNA, 28S i 18S, čija su veličine 5.0 kb, odnosno 1.9kb.



Slika 21. Različita kvalitete ukupne RNA u uzorcima tkiva pohranjenim u Hrvatsku banku tumora.

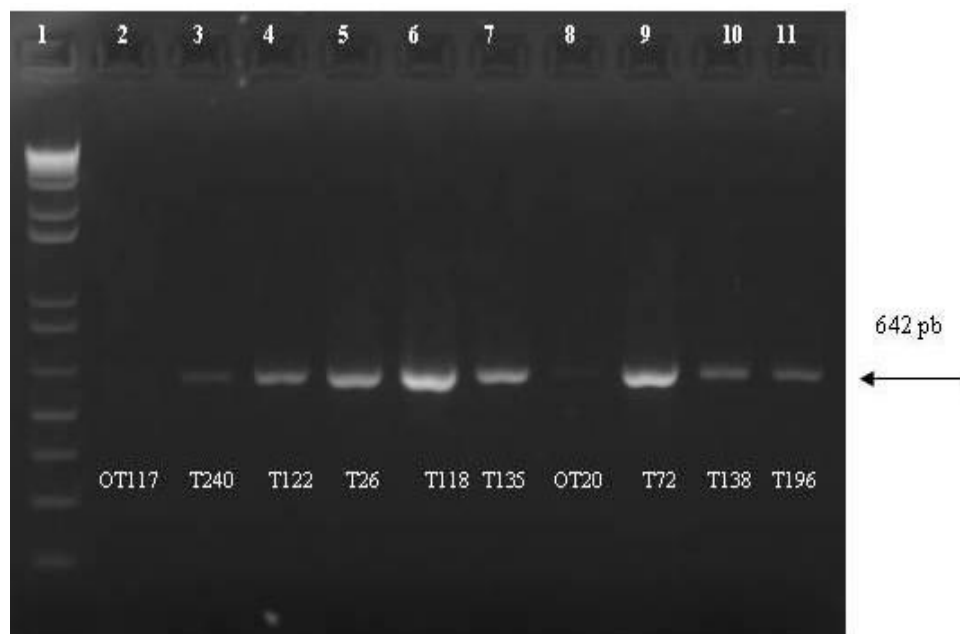
Vidljivo je da je u nekim uzorcima RNA bila u potpunosti (OT20) ili većim dijelom (T240, T135, T196) razgrađena. Bilo je i uzoraka (T118, OT117) u kojima je ukupna RNA bila solidne kvalitete (Slika 21). U njima je bila i zamjetna količina kontaminirajuće genomske DNA.

Za izvođenje semikvantitativnog određivanja količine transkripata (RT-PCR), RNA ne mora biti nužno najviše kvalitete. Međutim, za izvođenje reakcija umnažanja u stvarnom vremenu, kvaliteta mora biti iznimno visoka, što znači da RNA mora biti nerazgrađena, i bez primjesa DNA. Kvaliteta mRNA je provjerena na razini transkripata gena (cDNA) *GAPDH* i *PAPOLA*, dok je zagađenje provjereno korištenjem početnice komplementarne slijedu nukleotida u intronu gena *GAPDH*.

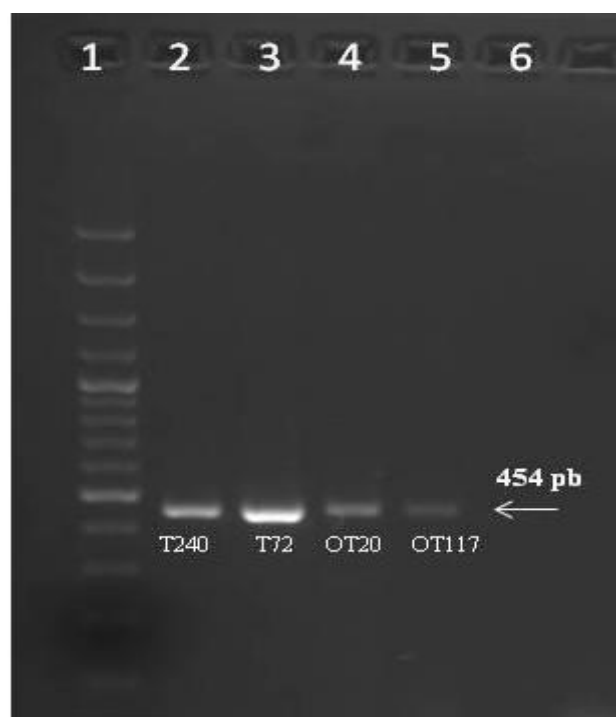
5.2.2. Provjera uspješnosti obrnutog prepisivanja umnažanjem dva ubiktivarno ("housekeeping") ispoljena gena - *GAPDH* i *PAPOLA*

Za provjeru uspješnosti obrnutog prepisivanja koristili smo dva para početnica, *GAPDH* i *PAPOLA*. Očekivano, kvaliteta RNA je utjecala na kvalitetu umnažanja, što je bilo naročito dobro vidljivo prilikom umnažanja odsječka *GAPDH* (645 pb), koji je dulji u odnosu na

PAPOLU (448 pb). Na količinu nastalog odsječka je utjecala i količina RNA koja se koristila u reakciji, što je naročito dobro vidljivo kod uzorka OT20 (slika 21). Umnažanje kraćeg odsječka, za gen PAPOLA (slika 23), bilo je puno uniformnije u odnosu na umnažanje GAPDH (Slika 23).



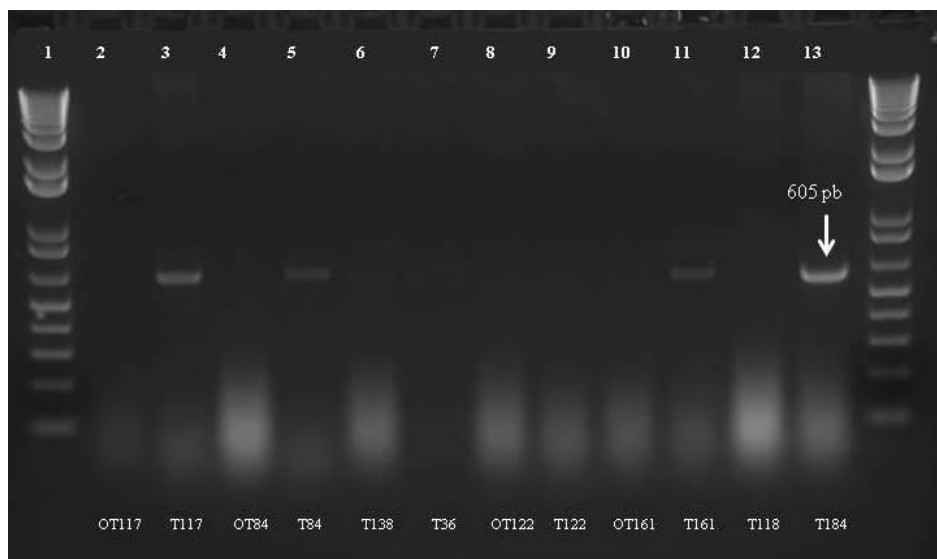
Slika 22. Provjera uspješnosti obrnutog prepisivanja umnažanjem odsječka gena *GAPDH*.



Slika 23. Provjera uspješnosti obrnutog prepisivanja umnažanjem odsječka gena *PAPOLA*.

5.2.3. Provjera prisutnosti kontaminirajuće genomske DNA umnažanjem dijela gena *GAPDH* korištenjem početnice komplementarne slijedu nukleotida u intronu

Kako bismo bili sigurni da su izolati RNA uistinu čisti, bez prisustva kontaminirajuće genomske DNA, odsječak gena *GAPDH* smo umnažali i korištenjem početnice komplementarne slijedu introna (*GAPDH* intr). Ako kontaminacije nema, neće biti amplifikata. Ako se amplifikat pojavi, to znači da je uzorak RNA zagađen (Slika 24). U četvrtini uzoraka RNA smo ovom metodom otkrili postojanje DNA, pa smo stoga uzorke dodatno pročišćavali i provjeravali u odnosu na kvalitetu i zagađenje. U pravilu smo, u svakom dodatnom pročišćavanju, gubili približno petinu količine ukupne RNA.

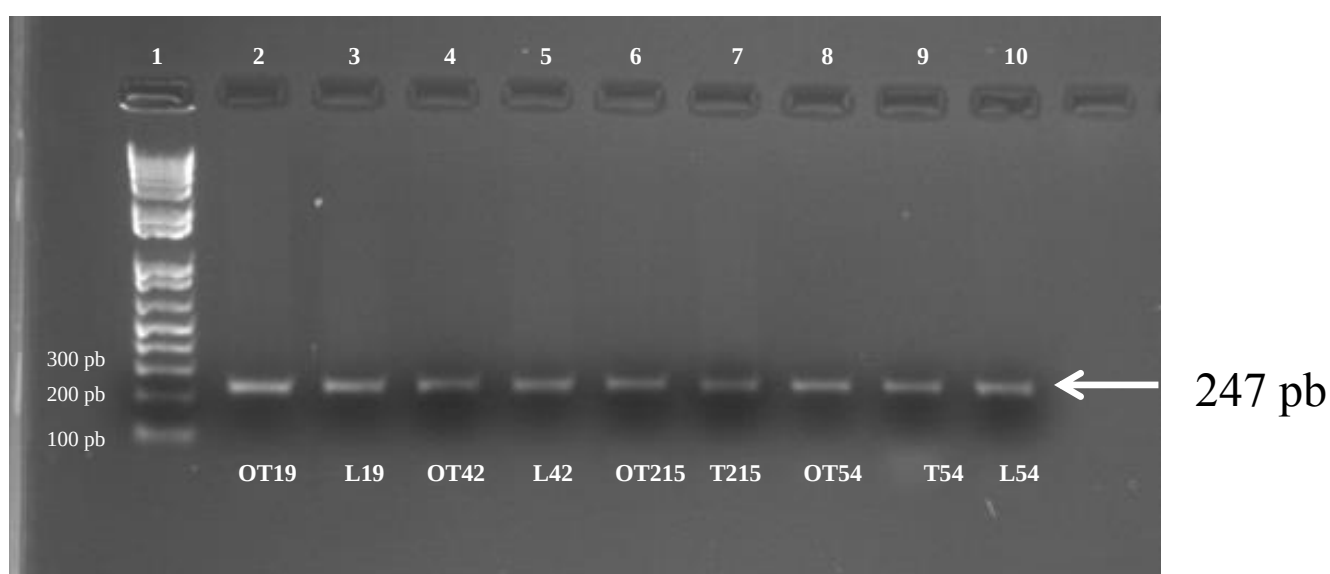


Slika 24. Provjera kontaminacije izdvojene RNA genomskom DNA.

5.2.4. Analiza gubitka heterozigotnosti gena *TP53* – analiza na razini DNA

Za određivanje gubitka heterozigotnosti koristili smo metodu određivanja različite duljine restrikcijskih ulomaka odsječaka dobivenih lančanom reakcijom polimeraze umnažanjem odsječka egzona 4. i introna 6. U egzonu 4. nalazi se polimorfizam CCC-CGC (rs1042522) zbog kojeg se, na razini proteina na položaju 72. mogu nalaziti aminokiseline arginin i/ili prolin. U intronu 6 postoji polimorfizam CCG-CCA (rs1625895). Odredili smo udio informativnih uzoraka – heterozigota. Za ovu smo analizu koristili DNA izdvojenu iz 62 „sparena uzorka (31 tkivo tumora i 27 tkiva netumora + četiri karcinomom nezahvaćena limfna čvora). Kombiniranjem ova dva polimorfna biljega, nakon uspješnih reakcija umnažanja (Slika 25) pokazali smo da je udio heterozigota iznad 58,1 % (18/31). Gubitak

heterozigotnosti je dokazan u 2 (2/18; 11,1%) tumora, koji su u ovoj studiji nazvani T36 i T184. U skupini heterozigota, jedan je tumor bio gradusa 1, 15 gradusa 2, a dva gradusa 3. Upravo smo u ovim, najmanje diferenciranim tumorima, dokazali LOH. U odnosu na parametre pT i pN, ovi su tumori bili pT2pN2/cT3cN2B (T36TP53LOH1) i pT1pN2/T2N2B (T184LOH2). T36LOH1 nije bio analiziran metodom imunohistokemije, a u tumoru T184LOH2 smo dokazali najjaču razinu njegovog izražaja, u odnosu na sve tumore analizirane metodom imunohistokemije. Ove smo rezultate potvrdili na razini RNA, sekvenciranjem odsječaka gena *TP53* unutar kojih se nalazi otkriven LOH. Umnažanje smo izveli početnicama TP532F i TP53 2R (Slika 25).

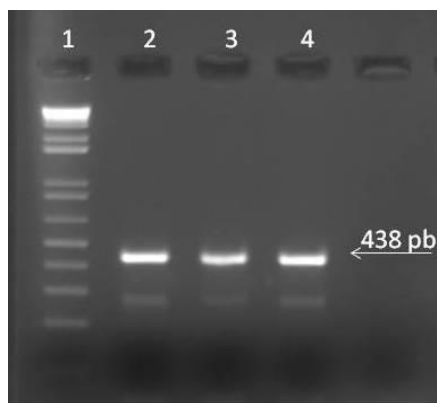


Slika 25. Uspješno umnoženi odsječci egzona 4 gena *TP53*, veličine 247 pb, u pripremi za analizu LOH.

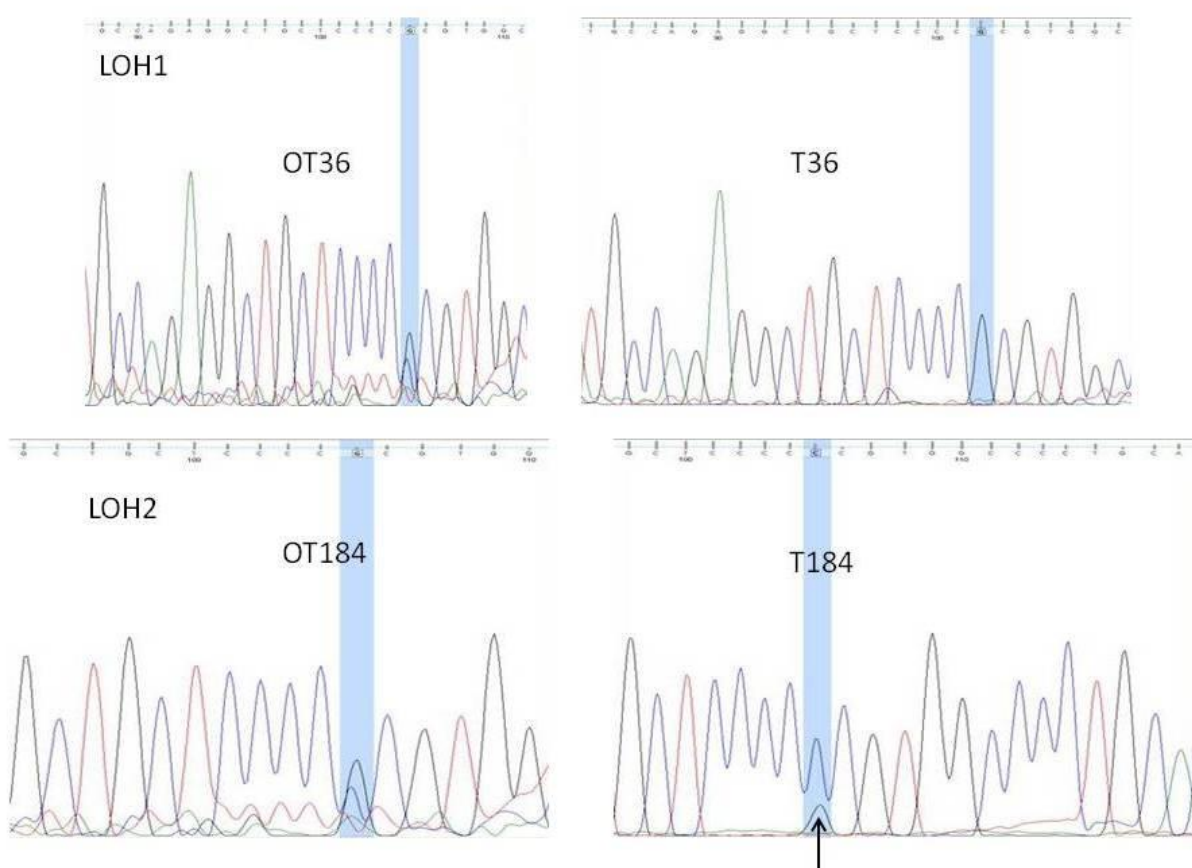
5.2.4.1. Sekvenciranje uzoraka

Ove smo rezultate potvrdili na razini RNA, sekvenciranjem odsječaka gena *TP53* unutar kojih se nalazi polimorfizam kojim je otkriven LOH (egzon 4). Umnažanje smo izveli početnicama TP532F i TP53 2R (Tablica 5), a uspješno umnožene odsječke (Slika 26) smo pročistili i poslali u Servis za sekvenciranje.

U tkivu netumora prisutna su oba lanca molekule DNA (ova je obrazac očekivan zbog toga što *TP53* nije upisani gen), što se, u slučaju postojanja polimorfizma, vidi kao postojanje dva signala/“pika“. U slučaju gubitka jednog alela, gubi se i njegov signal.



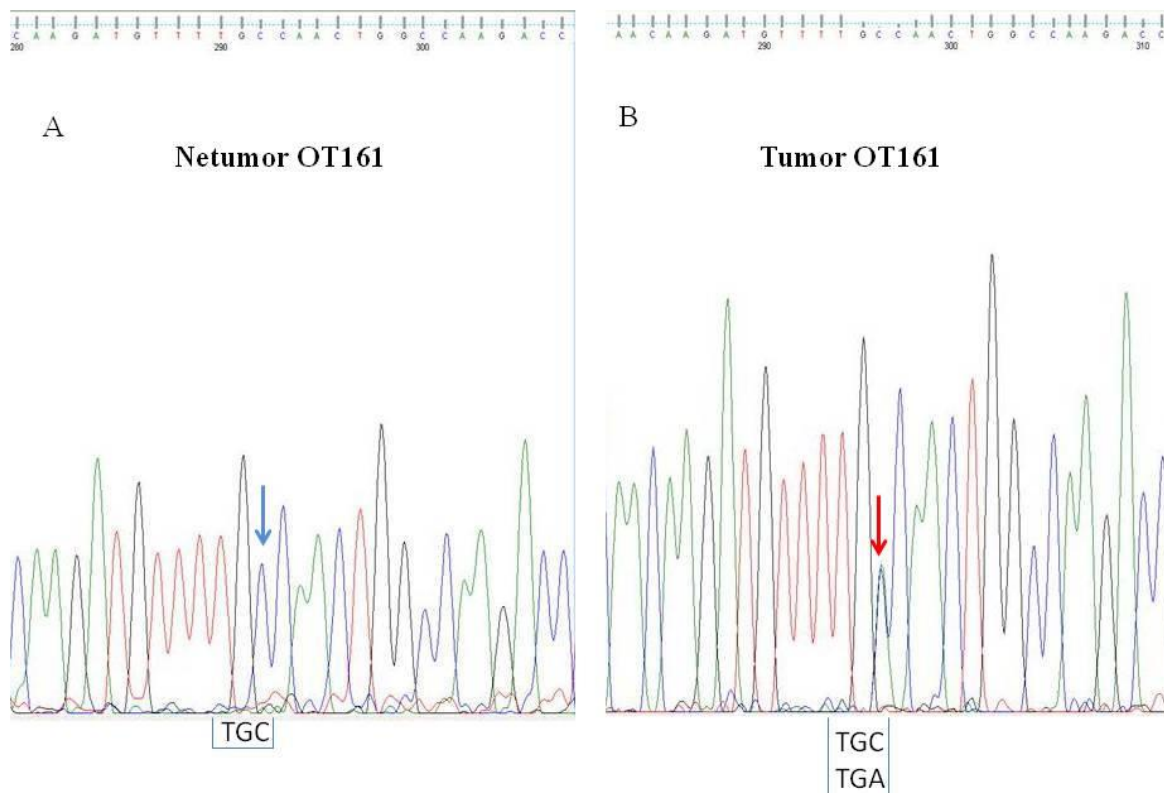
Slika 26. Uspješno umnožen odsječak cDNA dobiven iz tumora T36 (početnice TP532F/TP532R), prije reakcije pročišćavanja.



Slika 27. Gubitak heterozigotnosti gena *TP53* potvrđen reakcijama sekvenciranja. Vidljivo je da se signal dva alela koji je prisutan u tkivu netumora (OT, plavi kvadrati), gubi u tkivu tumora. Slab signal alela „G“ prisutan u tkivu tumora T184 najvjerojatnije predstavlja signal zdravih, upalnih stanica.

S obzirom na to je određivanje slijeda nukleotida u ovim uzorcima planirano u daljnjim istraživanjima, nasumično smo izabrali pet tumora čiju smo cDNA umnožili početnicama TP532F/TP532R i odredili im slijed nukleotida u području koji omeđuju početnice. Dokazali smo postojanje mutacije u jednom tumoru, koji je za analizu LOH *TP53* bio homozigot (neinformativan; T161). Ovaj je tumor klasificiran kao pT3pN2mX/cT3cN2AcM0. Tip

dokazane mutacije je „nonsense“, kojom se umjesto cisteina (TGC) ubacuje STOP kodon (TGA) (Slika 28).



Slika 28. Prisutnost mutacije u kodonu 135 gena *TP53*. Plava strelica ukazuje na jedinstveni signal (A). Crvena strelica ukazuje na postojanje dva signala, na istom položaju (B).

Mutacija se nalazi na kodonu 135, a u bazi IARC je višestruko pohranjena. Njezini prisustvo nije dokazano u karcinomima hipofarinksa, ali jest u karcinomima kože, pluća, prostate, dojke i jednjaka. Neočekivana nazočnost upravo ove mutacije potakla nas je da provjerimo koje su mutacije gena *TP53* najzastupljenije u karcinomima hipofarinksa. Ovu smo analizu napravili izdvajanjem pohranjenih mutacija u bazi ICR. Naše smo podatke usporedili s nedavno objavljenim rezultatima meta-analize spektra mutacija *TP53* u tumorima glave i vrata.

5.2.5. Izdvajanje najčešćih mutacija u genu *TP53*, u karcinomima hipofarinksa

Iz javno dostupnih podataka vezanih uz mutacije gena *TP53* koji su pohranjeni u velikoj datoteci koja je osmišljena i pohranjena na IARC, izdvojeni su podatci vezani samo uz mutacije otkrivene u karcinomima hipofarinksa (Tablica 31), kojima su pridruženi podatci vezani uz dokazivanje proteina, metodom imunohistokemije. Njihova razdioba je prikazana u tablici 31.

Tablica 31. Meta-analiza najčešćih mutacija *TP53* povezanih s razinom obojenja u reakciji imunohistokemije, u karcinomima hipofarinksa.

Mutacije u kodirajućem području gena			Obojenje TP53			
Tip mutacije	Posljedica mutacije		pozitivno	negativno	granično	Nepoznato
Supstitucija	Nastanak STOP-kodona	29	1	8	3	17
	Zamjena aminokiselina	116	36	0	2	78
Male insercije (1-20 baza)	Pomak okvira čitanja	11	0	1	0	10
Male delecije (1-225 baza)	Pomak okvira čitanja	16	1	3	0	12
	Ostalo (nepoznato)	6	2	1	0	3
Mutacije u nekodirajućem području gena						
Tip mutacije	Posljedica mutacije					
Supstitucija	Poremećaj prekrajanja	9	0	1	0	8
Ukupno		187	40	14	5	128

Potom su mutacije gena *TP53* u karcinomima hipofarinksa, koje smo izdvojili vlastitom meta-analizom, uspoređene s rezultatima meta-analize najčešćih mutacija tumora glave i vrata. Usporedba najčešćih mutacija gena *TP53* u tumorima glave i vrata na temelju podataka u bazi TCGA i karcinomima hipofarinksa (vlastita analiza podataka iz Banke IARC).

Tablica 32. Usporedba najčešćih mutacija gena TP53 u tumorima glave i vrata na temelju podataka u bazi TCGA (288 i karcinomima hipofarinksa (vlastita analiza podataka pohranjenih u banku IARC).

Glava i vrat (288)			Hipofarinks (vlastita analiza)		
Broj tumora s mutacijom	Kodon	Tip mutacije	Broj tumora s mutacijom	Kodon	Tip mutacije
18	248	missense	8	248	Missense
18	273	missense	8	220*	Missense
12	175	missense	7	273	Missense
12	213*	missense	6	245	Missense
		nonsense	5	175	Missense
12	179*	missense	4	176*	Missense
11	282	missense	4	146*	Misense
10	245	missense			Nonsense
10	196*	missense	4	242*	Missense
		nonsense	4	282	Missense

Ova analiza pokazuje da se, u oba slučaja, najveći dio mutacija nalazi u području koje kodira dio proteina p53 koji će se vezati na molekulu DNA. Međutim, vidljivo je da se učestalost pojedinih mutacija u karcinomima hipofarinksa razlikuje u odnosu na objedinjenu skupinu zloćudnih tumora glave i vrata.

5.2.6. Promjena omjera izražaja mRNA *EZH2* i *JMJD3* u karcinomima hipofarinksa primjenom koamplifikacijskog protokola

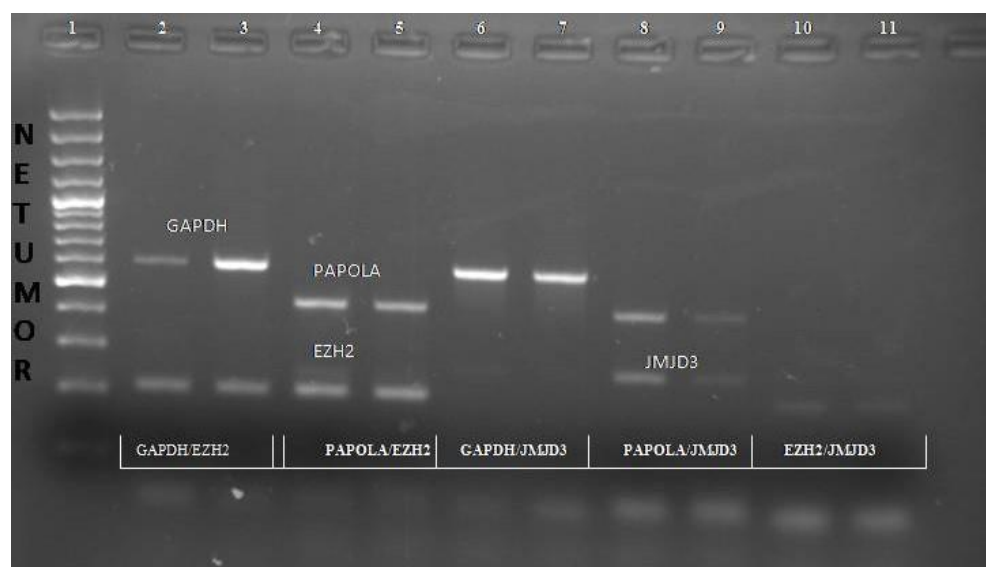
5.2.6.1. Koamplifikacijski protokol i detekcija signala u gelu agaroze

Za procjenu izraženosti mRNA *EZH2* i *JMJD3*, morali smo primijeniti koamplifikacijski protokol (istovremeno umnažanje oba ciljna transkripta). Za njega je karakteristično da mora biti ugođen za svaku kombinaciju početnica posebno. Ovo je bio razlog za pažljivi odabir početnica *EZH2/JMJD3*, s obzirom na to da su sva nalijeganja (engl. *annealing*) morala biti jednako uspješna na istoj temperaturi sparivanja. Prije nego što smo usporedili snagu signala ova dva transkripta, morali smo ih sravniti s izražajem odabranih ubikvitarno ispoljenih gena (*GAPDH* i *PAPOLA*). Važno je napomenuti da se, za dobivanje ponovljivih rezultata, za svaki par početnica odredio i omjer koncentracija početnica u reakciji: omjer početnica za transkripte ciljni/“housekeeping“ gen 1,7/1; omjer početnica za ciljne transkripte 1/1, koje su u reakcijama, kako bi se izbjeglo zasićenje umnažanja, bile iznimno niske (*JMJD3* i *EZH2* 2.5

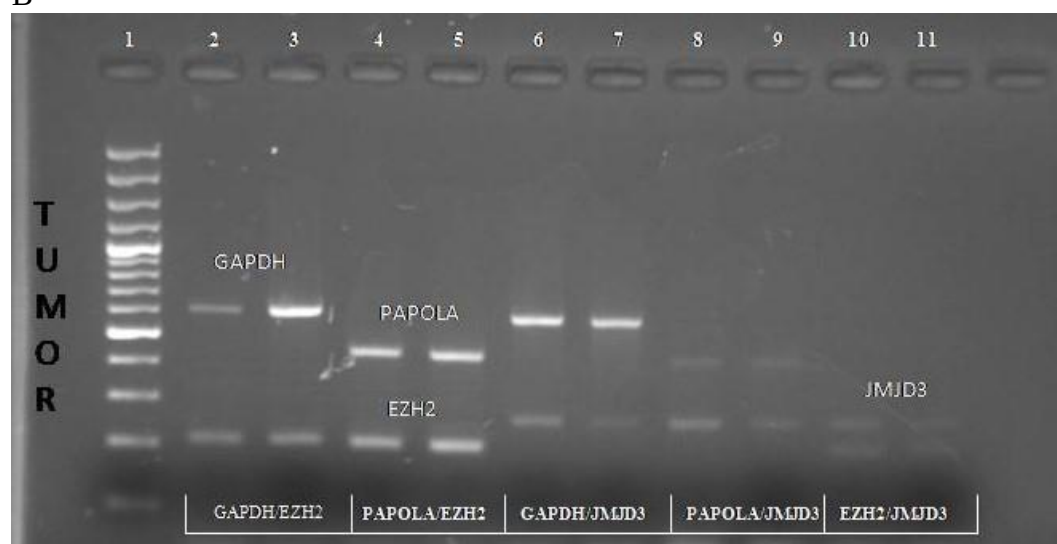
pikomola, GAPDH i PAPOLA 1,4 pikomola). Ovi su parametri definirani kao optimalni, nakon dugotrajnih ugađanja reakcija.

Rezultati ovih analiza su bili iznenađujući, s obzirom na to da se transkript *JMJD3* snažnije ispoljavao u tumoru, u odnosu na netumor. Ovo je jasno vidljivo na slici 29, naročito u linijama 6 i 7, te 10 i 11. Koamplifikacije smo ponovili na 15 sparenih uzoraka (OT i T). Čak se u 10 slučajeva, krajnje neočekivano, desilo da, u tkivu tumora, imamo snažno pojačan izražaj *JMJD3* u odnosu na tkivo netumora. Ovakav obrazac promjene ispoljavanja očekivali smo za *EZH2*.

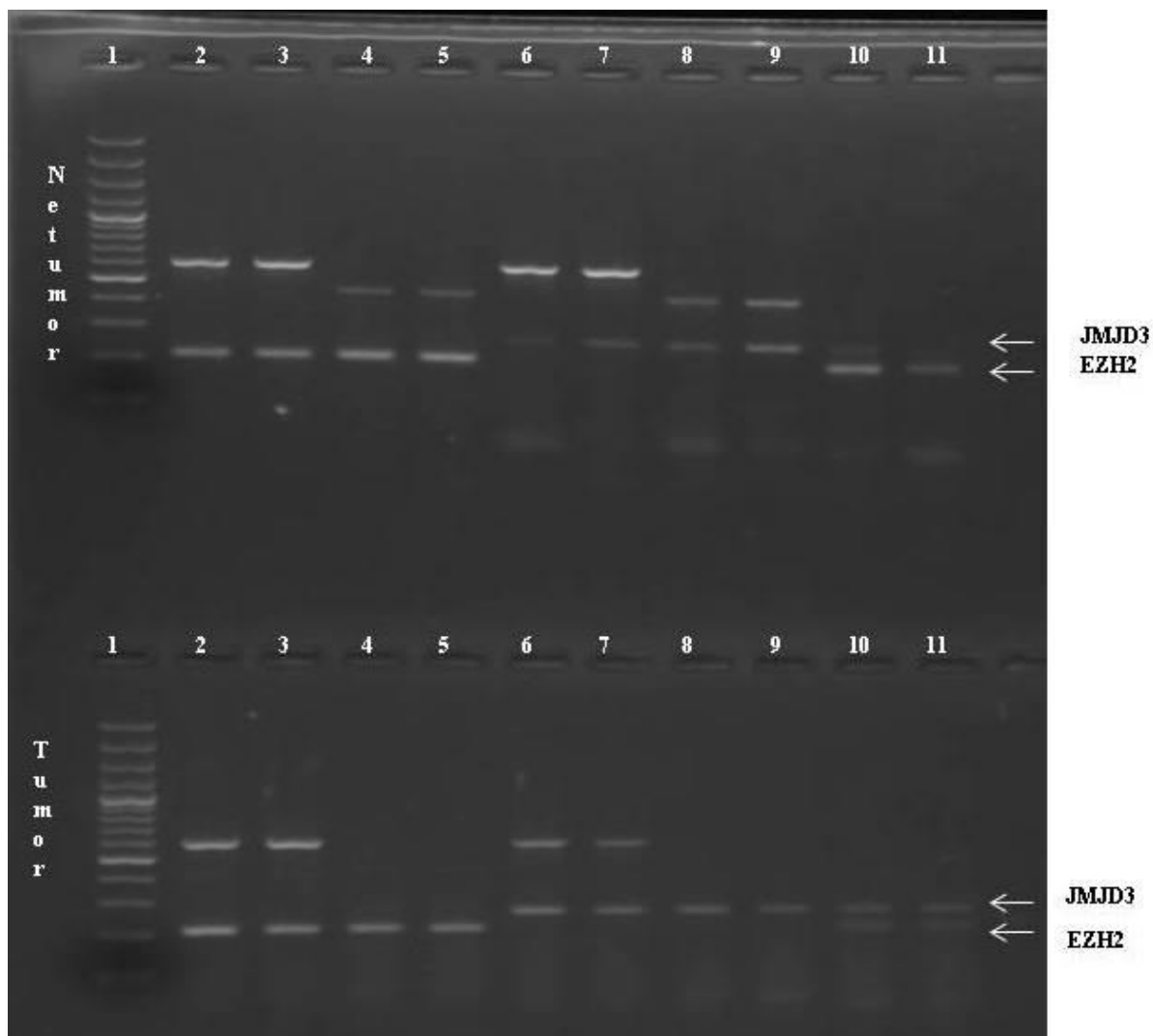
A



B



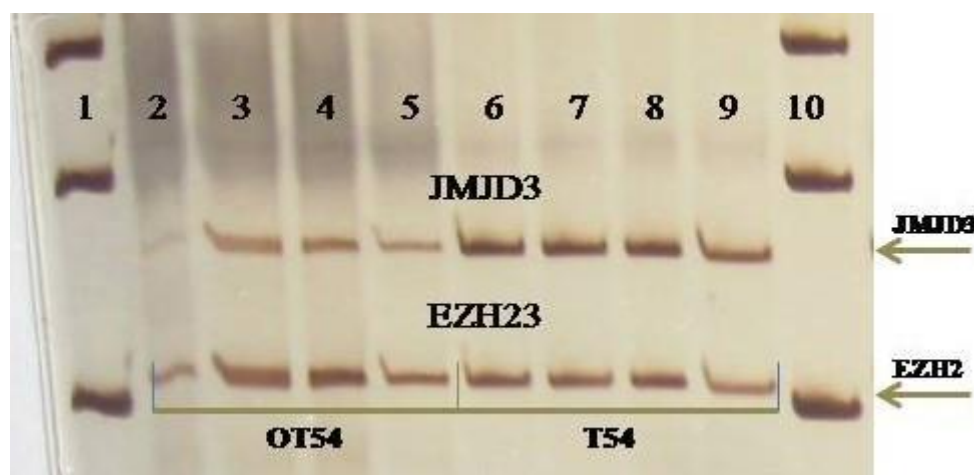
Slika 29. Elektroforeza istovremeno umnoženih odsječaka GAPDH, PAPOLA, EZH2 i JMJD3 korištenjem cDNA dobivene obrnutim prepisivanjem iz mRNA tkiva netumora (A) i tumora (B) #122. U linijama 10 i 11 i vidljivo da se omjer *EZH2/JMJD3* mijenja u korist JMJD3, u tkivu tumora.



Slika 30. Elektroforeza istovremeno umnoženih odsječaka GAPDH, PAPOLA, EZH2 i JMJD3 korištenjem cDNA dobivene obrnutim prepisivanjem iz mRNA tkiva netumora (A) i tumora (B) #54. U linijama 8 i 9 je vidljivo da se u tkivu netumora umnažaju i PAPOLA i JMJD3, dok u tkivu tumora prominira odsječak JMJD3, najvjerojatnije zbog promjene dinamike reakcije, zbog eksponenijalnog porasta količine ciljnog transkripta.

5.2.6.2. Određivanje omjera razine ispoljenosti *EZH2* i *JMJD3* u tkivima netumora i tumora u gelu poliakrilamida obojenim srebrom

Kako bismo se dodatno uvjerali da su ovi rezultati pouzdani, provjerali smo ih metodom koja je znatno osjetljivija, denzitometrijom uzoraka obojenih srebrom, u gelu poliakrilamida. Za razliku od gelova agaroze, u koje smo nanašali po 12,5 mikrolitara amplifikata, u gelove poliakrilamida smo nanašali samo jedan mikrolitar produkta PCR. Reprezentativna slika gela, u kojem su uzorci podrijetlom iz tkiva netumora i tumora #T54 naneseni u četveroplikatu, nakon 23. ciklusa umnažanja, prikazana je na slici 31.



Slika 31. Elektroforeza koamplifikata *EZH2/JMJD3* u 12% gelu poliakrilamida obojanom srebrom. Na prvi je pogled vidljivo da se količina transkripta *JMJD3*, u tkivu tumora (T54), pojačava i postaje snažnija od izražaja *EZH2*.

U ovako osjetljivom sustavu je nanašanje uzoraka u četveroplikatu nužno, kako bi se smanjila vjerojatnost nastanka slučajne pogreške zbog nepreciznog pipetiranja malih volumena. Na ovaj smo način napravili analize dodatna četiri sparena uzorka; #54, #T51, #72 i #26. Denzitometrija vrpce *EZH2* i *JMJD3* u gelu obojanom srebrom ukazala nam je na promjenu omjera signala *EZH2/JMJD3* u tkivu tumora, u odnosu na netumor, u korist snage signala *JMJD3*, u uzorcima #54 (porast 3,4 puta), i #72 (porast 5 puta) te na njihov nepromijenjen odnos u uzorcima #72 i #26.

Svjesni svih limita ove osjetljive metode, odlučili smo napraviti treću razinu provjere, korištenjem metode lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu, koja se smatra zlatnim standardom u ovoj vrsti analiza.

5.2.6.3. Određivanje omjera transkripata *EZH2/JMJD3* u tkivima netumora i tumora lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu

Uzorci RNA za ovaj tip analize moraju biti besprijeckorno dobre kvalitete. Stoga smo odabrali 12 uzoraka tkiva tumora i pripadajućih netumora (ukupno 24 uzorka), ponovili obrnuto prepisivanje i izveli reakcije umnažanja u stvarnom vremenu korištenjem proba TaqMan®. Ova nam je metoda, u velikoj mjeri, potvrdila rezultate koje smo dobili ranije navedenim, manje preciznim metodama.

Tablica 33. Rezultati analize izražaja transkripata EZH2 i JMJD3 u stvarnom vremenu, u odnosu na izražaj GAPDH, u 12 sparenih uzoraka karcinoma hipofarinksa, uz pridružene rezultate analize bojanja reakcijom imunohistokemije.

		EZH2	JMJD3	EZH2/JMJD3	Imunohistokemija
	Uzorci	T/OT	T/OT	T/OT	TUMOR
1	#8	3,8980	1,1425	3,41	ND
2	#14	1,02	9,32	-9,14	ND
3	#20	1,1	1,61	-1,46	0/0
4	#26	-1,25	1,85	-2,31	0/1
5	#36	1	21,61	-21,61	ND
6	#42	1,12	1,12	1	0/1
7	#51	10,1	2,6	3,41	ND
8	#54	-1,19	nemjerljiv	-	0/1
9	#57	-1,16	3,86	-4,5	3/1
10	#72	1,55	10,82	-7,1	0/0
11	#138	-12	-3,46	-3,46	1/0
12	#301	-3,19	nemjerljiv		2/0

Na temelju ove tablice je vidljivo da se vrijednosti veličine razlike koju smo dobili denzitometrijom povećavaju kada se koristi metoda qRT-PCR. Iako je izračun na temelju denzitometrije pokazao da razlika u omjerima izražaja u uzorcima #26 i #51 nema, metodom qRT-PCR je pokazano da su razlike značajne (-2,31 i 3,41). Ovom je metodom također pokazano da se denzitometrijom mogla odrediti promjena snage omjera koja je umnažanjem u realnom vremenu bila minimalno sedam puta snažnija, za JMJD3.

Rezultati prikazani u tablici 33 dobiveni su izračunom koji se uvriježeno koristi u ovom tipu analiza.

Vrlo je važno napomenuti i da je razina izražaja mRNA JMJD3 u tkivu netumora, u pravilu, vrlo mala (Ct vrijednost je, u pravilu veća od 34). Zbog toga čak i vrlo snažan porast izražaja u tkivu tumora ne dovodi nužno do snage izražaja koja je snažnija od izražaja EZH2, iako značajno mijenja omjer EZH2/JMJD3.

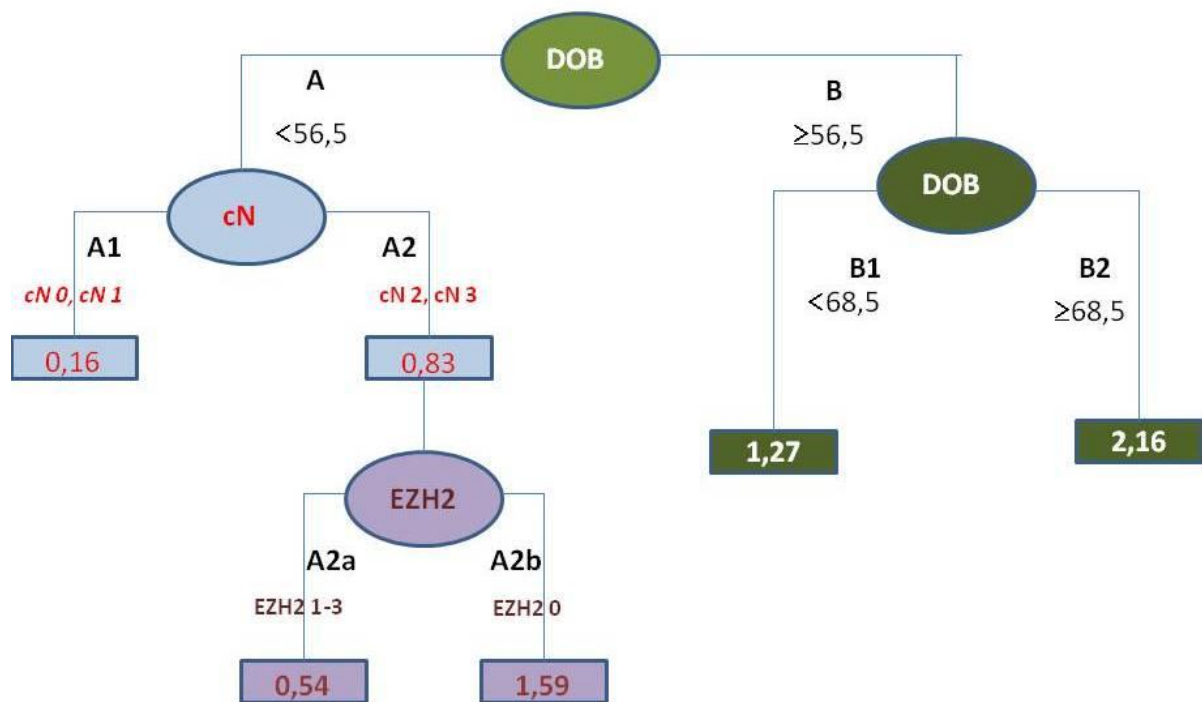
Iako su ovi rezultati jako zanimljivi utoliko više što su neočekivani i čine temelj za daljnja istraživanja, u multivarijatnoj statističkoj analizi su se koristili podatci dobiveni kliničkim praćenjem i izražajem proteina EZH2, JMJD3 i p53.

5.3. Multivarijatna analiza prognostičkih čimbenika

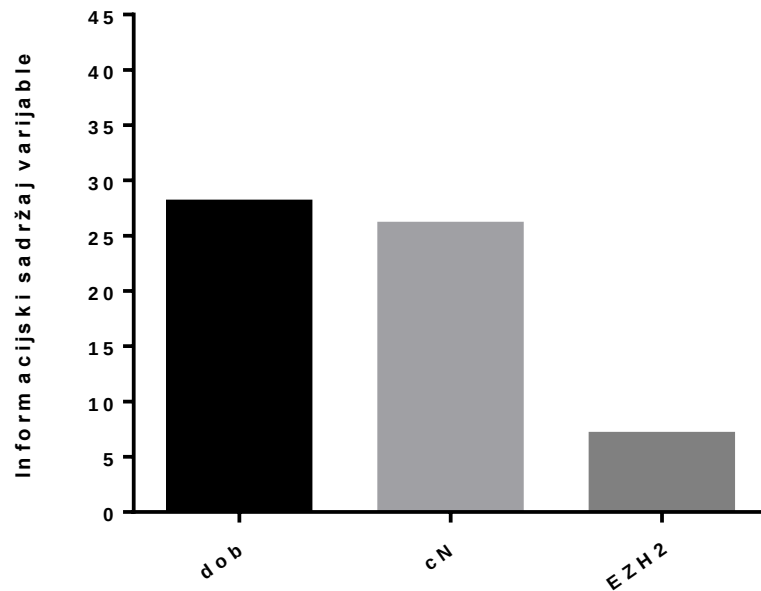
Ova je analiza obavljena uporabom sustava za rekurzivno particioniranje, koji se, prema American Joint Committee on Cancer (AJCC) smatra optimalnom metodom analize prognostičkih čimbenika. Oni se ovom analizom razvrstavaju u stablo odluke (Slika 32) koje se sastoji od čvorova odluke i listova sa završenim rezultatom koji se tumači kao omjer hazarda u odnosu na sve ispitanike kao cjelinu. Rezultati ove analize upućuju da su tri osnovne varijable koje određuju omjer hazarda kao osnovnu mjeru prognoze: dob, klinički status limfnih čvorova i izražaj EZH2, i to upravo navedenim redoslijedom. Informacijski sadržaj u određivanju prognoze prikazan je na slici 33.

Slika 32 tumači se na sljedeći način:

1. Početna vrijednost, s kojom započinje analiza, jest omjer hazarda koji za sve ispitanike u ovoj studiji (N=68) iznosi 1;
2. Računalni program je sve bolesnike razvrstao u dvije skupine: A – skupina mlađih od medijana cjelokupna skupine (56,5 godina) čiji je omjer hazarda u odnosu na cijelu skupinu 0,58 i B – skupina starih i starijih od 56,5 godina, čiji je omjer hazarda u odnosu na cijelu skupinu 1,537;
3. Skupina A (mlađi od 56,5 godina) se dijeli u dvije skupine, s obzirom na zahvaćenost limfnih čvorova, prema parametru cN: u skupini A1 su objedinjeni bolesnici s kliničkim statusom limfnih čvorova (cN) 0 ili 1, čiji je omjer hazarda 0,16, u odnosu na sve ispitanike, U skupini A2 su objedinjeni bolesnici sa statusom cN 2 i više, čiji je omjer hazarda 0,83, u odnosu na sve ispitanike;
4. U skupini A2 postoje dvije podskupine koje se razlikuju u odnosu na izražaj EZH2. Podskupina u kojoj su objedinjeni bolesnici u kojih je EZH2 izražen (EZH2 1, EZH2 2, EZH2 3) imaju omjer hazarda od 0,54, u odnosu na sve ispitanike, U podskupini u kojoj EZH2 nije izražen (EZH2 0) onda je omjer hazarda podskupine, u odnosu na sve ispitanike, 1,59;
5. Bolesnici stariji od medijana dobi (skupina B, točka #2) mogu dodatno objединiti u dvije skupine: B1: mlađi od 68,5 godina i B2: stari 68,5 godina i više, U odnosu na sve ispitanike, omjer hazarda za bolesnike u skupinama B1 i B2 je 1,28 – odnosno, 2,15.



Slika 32. Rezultat multivarijantne analize prognostičkih čimbenika strukturiran kao stablo odluke. Čvorovi odluke s varijablama u analizi su prikazani kao ovali, dok pravokutnici predstavljaju završni rezultat – listove. Brojevi u listovima predstavljaju omjer hazarda, koji je izražen u odnosu na sve ispitanike,



Slika 33. Usporedba informacijskog sadržaja varijabli dob, cN i EZH2 u određivanju prognoze.

6.0 Rasprava

Radom na ovoj disertaciji pokušalo se spoznati da li, i na koji način, izražaj gena *EZH2*, *JMJD3* i *TP53* utječe na preživljenje oboljelih od karcinoma hipofarinksa. Dodatno su istraženi utjecaji izražaja ovih gena u odnosu na kliničke i patohistološke karakteristike ovih tumora. Za određivanje značaja povezanosti kliničkih i patohistoloških podataka s razinom izražaja ova tri proteina u arhivskim preparatima, korištene su standardne statističke analize. Na razini molekularno-genetičkih analiza, ovi su tumor analizirani na razini genomske DNA (gubitak heterozigotnosti *TP53*) i RNA (razina izražaja mRNA *EZH2* i *JMJD3*, sekvenciranje *TP53*), na svježe smrznutim tkivima tumora i netumora koji su pohranjeni u Hrvatsku banku tumora koja se nalazi na Institutu Ruđer Bošković.

6.1. Kliničko-patološki parametri i preživljenje bolesnika

Najznačajniji prognostički čimbenik duljine preživljenja je u ovoj studiji bila dob bolesnika ($N=68$). Pokazali smo da bolesnici mlađi od medijana dobi cijele skupine imaju bolju prognozu (test Gehan-Wilcoxon; $p = 0,0086$; Slika 10). Slični su rezultati dobiveni i u drugim studijama (55, 289).

Za potrebe statističke analize, podatci su objedinjeni u skupine, na način koji smo prikazali u Tablici 8 i objasnili u poglavlju Rezultati .

U ovoj su studiji parametre “T” i “N” određivali kirurzi i patolozi. Njihovo odvojeno prikazivanje je nužno zbog toga što je poznato da se ove dvije procjene ne moraju nužno podudarati. Velikom studijom, kojom je analizirano 560 tumora glave i vrata, podudarnost je pokazana za samo u 52,2% slučajeva za parameter “T” i 53,5% slučajeva za parameter “N”. U čak 40% slučajeva se dešava da se tumori s klinički procijenjenim stadijem “T4”, po patologu razvrstavaju u nižu kategoriju. Slično tome, više od 40% tumora za koje je kirurg procijenio da su u stadiju “T < 4” će, prema patologu, biti razvrstani u skupinu T4. Sličan nesrazmjer postoji i kod određivanja zahvaćenosti limfnih čvorova: samo 69,7% klinički negativnih limfnih čvorova bit će negativno i prema patologu (“*true negative clinical staging*”). Preostalih 30,3% procjena predstavlja lažno negativne rezultate (“*false-negative clinical staging*”). Očekivano, javljaju se i lažno pozitivni rezultati (“*false-positive clinical staging*”) (290).

U našoj je studiji, na razini parametra "T" također došlo do nesuglasja, poglavito u skupinama T2 i T3 (T2: cT2/pT2: 15/29; T3: cT3/pT3:36/22) (Tablice 10 i 11). Dodatno su se dva klinička T1 udvostručila (četiri pT1), prema procjeni patologa. Ovi rezultati kompatibilni su s rezultatima citirane studije (290). Klasifikacija parametra "N" se, razlikovala u samo dva slučaja (Tablica 11). (.

Veličina tumora u trenutku postavljanja dijagnoze nije se pokazala kao značajni prognostički čimbenik preživljenja (test Gehan-Wilcoxon; $p=0,44515$ (skupine cTA i cTB) (slika 11A) i $p=0,94641$ (pTA i pTB) (slika 11B). Iako većina studija govori u prilog boljem preživljenju bolesnika s nižim stadijima T (46, 291), postoje i one koje objašnjavaju slabu povezanost T stadija s preživljenjem i prognozom bolesti. Pokušaj prognoziranja tijeka bolesti uzimanjem u obzir samo stadija T i zanemarivanjem stupnja diferenciranosti tumora, njegove anatomske lokalizacija, debljine i karakteristike resekcijskog ruba, perivaskularne i perineuralne invazije predstavlja vrlo ograničen pristup jednoj vrlo kompliciranoj bolesti. Koliko je važno uzeti što više čimbenika u obzir u prognostičkim studijama, pokazala je studija Lee i suradnika (291), koji nisu našli razliku u stopi recidiva tumora i preživljenju, između skupina bolesnika sa stadijem tumora T3-4 bez dodatnih značajki (engl. *adverse features*) (perineuralna i perivaskularna invazija, gradus i invazija puteva limfne drenaže) u odnosu na bolesnike sa stadijem T2-4 s dodatnim značajkama. Izdvajanje jednog parametra relativno slabe snage (velik tumor ne mora nužno biti zloćudan) može objasniti da u našoj studiji veličina tumora nije pokazala statistički značajnu prognostičku vrijednost.

Razlike u gradusu tumora također nisu dosegle statistički značajnu razliku u odnosu na preživljenje, u našoj skupini bolesnika ($p=0,35784$; Tablica 12, slika 13). S obzirom na samo dva bolesnika koji su imali dobro diferenciran karcinom, usporedba duljine preživljenja s obzirom na gradus je napravljena za bolesnike s tumorima gradusa 2 (N=49) i gradusa 3 (N=17). Izostanak statistički značajne razlike između ove dvije skupine bolesnika pokazan je i u studiji Johansena i suradnika. Međutim, oni su imali dovoljan broj bolesnika oboljelih od tumora gradusa 1 da pokažu razlike u preživljenju između bolesnika koji su imali tumore gradusa 1 (N=19) u odnosu na bolesnike koji su imali tumore gradusa 2 (N=21) i 3 (N=46)(292).

Na preživljenje je značajno utjecala proširenost bolesti u limfne čvorove u trenutku postavljanja dijagnoze, neovisno o tome da li je procjenu statusa limfnih čvorova radio kirurg ili patolog. Za potrebe statističke analize su i ovi podatci objedinjeni u skupine prikazane u Tablici 9 i poglavlju Rezultati. Usporedbom skupine cNA s cNB pokazana je značajna statistička razlika u preživljenju (test Gehan-Wilcoxon; $p=0,02569$; slika 12A). Razlika

između skupina pNA i pNB bila je na rubu statističke značajnosti, ali je nije dosegla (test Gehan-Wilcoxon; $p=0,05210$). Zanimljivo je da rezultati najveće, do danas objavljene studije, u koju je bilo uključeno 14499 oboljelih od lokalno uznapredovalih zloćudnih tumora glave i vrata, pokazuju da metastaze u limfnim čvorovima predstavljaju prognostički čimbenik za oboljele od karcinoma usne šupljine ($N=2463$), orofarinksa ($N=8567$) i larinksa (2332), ali ne i za oboljele od karcinoma hipofarinksa ($N=1137$). Ovi rezultati, koje su objavili istraživači s Harvarda (293), zacijelo će u budućnosti biti velik poticaj za istraživanje usmjerena na razumijevanje ovih razlika.

6.2 Značaj izražaja *EZH2*

EZH2 se primarno smatra onkogenom/onkoproteinom, koji svojom metiltransferaznom aktivnošću katalizira postavljanje metilnih skupina na lizin 27 u histonu H3 ($H3K27me3$), u području promotora tumor supresorskih gena te na taj način dovodi do utišavanja njihove aktivnosti. U zadnje je dvije godine objavljen velik broj radova u kojima se ovaj obrazac ispoljavanja aktivnosti *EZH2* dokumentirao u mnogim vrstama zloćudnih tumora. Na žalost, zanemaruju se znanstvena otkrića koja ne ukazuju na nužnu povezanost razine *EZH2* i trimetilacije $H3K27$. Na primjer, u pet dobro definiranih podtipova karcinoma dojke, najviša razina ispoljavanja *EZH2*, združena s vrlo niskom razinom $H3K27me3$, dokazana je u karcinomima dojke s klinički najgorom prognozom (trostruko negativnim karcinomima dojke) (294). Nedavno objavljenom studijom je pokazano da i u karcinomima dojke koji su pozitivni na receptor za estrogen, recipročan odnos ($EZH2\uparrow$, $H3K27me3\downarrow$) između *EZH2* i njegovog najbolje proučenog supstrata, $H3K27$, predstavlja loš prognostički čimbenik (295). Postoje i studije na temelju kojih je zaključeno da bi aktivnost *EZH2* trebala samo (pasivno) osigurati stalnu razinu $H3K27me3$ u proliferirajućoj stanici i na taj način spriječiti nastanak genomske nestabilnosti (296). Pozitivna korelacija između *EZH2* i Ki-67, koji se standardno smatra "klasičnim" biljekom proliferacije, pokazana je i u najvećoj studiji na *EZH2* kojom je, metodom imunohistokemije, njegovo ispoljavanje analizirano u čak 12 427 zloćudnih tumora prostate. Na žalost, niti u ovoj studiji nije mjerena učinkovitost *EZH2*, mjerenjem $H3K27me3$ (297).

Ako je sve ovo točno, onda *EZH2* ne mora nužno biti shvaćen kao ultimativni utišavač tumor supresorskih gena. *EZH2*, naime, može metilirati i neke druge proteine i na taj način mijenjati njihovu funkciju. Na primjer, dio onkogene aktivnosti *EZH2* ovisi o aktiviranom AKT, koji, preko *EZH2*, fosforilira i aktivira onkogeni STAT3 (141).

Na razini ispoljavanja proteina, dokazali smo ispoljavanje EZH2 u 50% analiziranih uzoraka, nevezano uz status T (cT/pT; Tablice 13-20), N (cN/pN; Tablice 23-30) ili gradus tumora (Tablice 21 i 22). Njegovo ispoljavanje nije se pokazalo značajnim niti za preživljenje bolesnika (test Gehan-Wilcoxon; $p = 0,53839$; Slika 17). Ove rezultate trebalo bi povezati s istraživanjima koja nisu pokazala jednoznačne rezultate:

a) smanjeno ispoljavanje IKK α čini temelj za nastanak nediferenciranog fenotipa karcinoma nazofarinksa. U ovom modelu, utišavanje IKK α nastaje zbog EZH2-posredovane trimetilacije H3K27. Ako se EZH2-posredovana trimetilacija H3K27 suprimira retinoičnom kiselinom, dolazi do pojačanog izražaja IKK α i posljedične diferencijacije združene sa smanjenom tumorigeničnošću. U ovom slučaju, nizak IKK α i visok EZH2 združeni su sa slabijom diferencijacijom nazofaringealnog karcinoma (185). Obrazac pokazan za ovaj model ne bi trebao vrijediti za druge vrste tumora. Poznato je, naime, da je IKK α snažan poticatelj pro-onkogenog i upalnog puta NF- κ B, aktivacija kojeg bi se (a ovo još nije istraženo), ako je ovaj mehanizam regulacije prisutan u stanici, mogla dokinuti metiltransferaznom aktivnošću EZH2. U tom bi slučaju aktivnost EZH2 za domaćina bila anti-onkogeni.

b) Studija Kima i suradnika nije pokazala statistički značajnu povezanost izražaja EZH2 i preživljenja na velikoj seriji od 118 zloćudnih tumora glave i vrata, od toga 23 karcinoma hipofarinksa (186). U ovoj je studiji korištena metoda imunohistokemije kojom je izražaj EZH2 pokazan u samo pet karcinoma hipofarinksa (5/23; 21,8%), što je duplo manje od udjela pozitivnih uzoraka u našem istraživanju (26/52; 50%). Za razliku od nas, Kim je pokazao statistički značajnu povezanost između visokog izražaja EZH2 i pojave metastaza u limfnim čvorovima, u analizi kojem je analizirao sve dostupne uzorke. Jedno od vrijednih opažanje bilo je i da se EZH2 najčešće ispoljava u karcinomima orofarinksa (više od 50% pozitivnih tumora).

c) Rezultati izražaja EZH2 u 90 zloćudnih tumora glave i vrata, od toga 10 karcinoma hipofarinksa, pokazali su visok udio uzoraka u kojima se mogao detektirati EZH2 (70/90; 77,8%), pri čemu je snažno obojenje bilo prisutno u 53,3% uzoraka. Statističkom analizom, koja je bila objedinjena za sve tumore, pokazano je da visoka razina ispoljavanja EZH2 statistički značajno korelira sa zahvaćenošću limfnih čvorova, limfovaskularnom invazijom i parametrom „T“ (187).

Usporedna analiza rezultata studija Kima i suradnika i Changa i suradnika (186, 187) u kontekstu naših rezultata nije jednostavna. Najveći problem predstavlja objedinjavanje tumora glave i vrata u jednu cjelinu pri čemu se zanemaruje da je svaki tumor jedinstven – ne samo u

odnosu na stanice od kojih je nastao, nego i u odnosu jedinstveni genom domaćina koji je od tog tumora obolio.

Hipoteza vezana uz eventualno postojanje molekularno-genetičke osobitosti karcinoma larinksa i hipofarinksa, u odnosu na zdravo tkivo, koje bi ih razlikovalo od drugih tumora glave i vrata provjerena je i na dvije relativno malene skupine tumora “Discovery Group”: 13 tumora (larinks 9, hipofarinks 4, hipofarinks – druga lokacija 3; “Validation group”: 18 tumora (uključujući 13 tumore iz prve skupine i pet dodatnih tumora), korištenjem metoda sekvenciranja transkriptoma i malih molekula RNA (299). Ovim je pristupom otkriveno da se, na razini transkripata gena *ACPP*, *BRDT*, *DSC1*, *IFIT3* (u starijim studijama pokazan kao loš prognostički čimbenik) (298), *MAGEC2*, *MX1*, *TFF1* i *WIF1*, karcinomi larinksa i hipofarinksa značajno razlikuju od karcinoma usne šupljine. Pokazano je, također, da se gen *WIF1*, koji posjeduje tumor supresorsku ulogu u karcinomima larinksa i hipofarinksa, utišava zbog hipermetilacije promotora (299). Iako su proteinski produkti nekih od ovih gena (npr. *MAGEC2*) izravno povezani sa signalnim putevima koje regulira p53(300), promjena izražaja transkripta p53, koja bi omogućila odvajanje karcinoma larinksa i hipofarinskog u zasebnu skupinu tumora glave i vrata (“diskriminativni parametar”), nije pokazana.

U svakom slučaju, „jedinstvenost genoma“ je, u kontekstu obolijevanja od različitih bolesti, povezana s polimorfizmima molekule DNA koji su karakteristični za pojedine populacijske skupine.

d) Ova je jedinstvenost najbolje pokazana rezultatima meta-analize temeljene na 10 studija. u kojima se određivala važnost ispoljenosti *EZH2* u prognozi karcinoma pluća na ukupno 1 695 oboljelih. Kada se statistička analiza primijenila na podatke dobivene od svih ispitanika, pokazano je da je prekomjerno ispoljavanje *EZH2* uistinu združeno s kraćim ukupnim preživljenjem (HR=1,68, 95% CI: 1,42–1,93). Kada su se, međutim, izdvojile podskupine bolesnika u odnosu na podrijetlo, bilo je vidljivo da postoji nesrazmjer između zastupljenosti bijelaca i Azijaca (654/1041; 38.6%/61.4%). Objedinjavanjem bolesnika u dvije skupine i statističkom analizom podataka, *EZH2* je pokazan kao čimbenik loše prognoze samo u Azijaca koji su imali adenokarcinom pluća u stadiju I (301).

Imajući u vidu ove podatke, postavlja se pitanje smislenosti usporedbe određenog biljega u bolesnika koji potječu iz različitih populacija.

U multivarijantnoj analizi koju smo primijenili u našem istraživanju, kako bi u matematički izračun uključili sve parametre istraživanja, ispoljavanje *EZH2* u bolesnika mlađih od 56,5 godina, sa statusom limfnih čvorova cN2/cN3 (Slika 32) se pokazuje kao čimbenik bolje prognoze.

Ovaj je rezultat iznimno zanimljiv i treba ga interpretirati imajući u vidu jedan rad koji je objavljen 2014. godine, u prestižnom časopisu FEBS Letters (172). Umnažanjem u realnom vremenu je pokazano da zloćudni tumori nemalih stanica pluća imaju manju razinu mRNA EZH2, u odnosu na pripadajuća tkiva netumora. Analizom je dodatno pokazano da bolesnici (N=54) čiji tumori ispoljavaju manje mRNA EZH2 imaju lošiju prognozu (ukupno preživljenje i preživljenje bez pojave bolesti), u odnosu na bolesnike u kojih je EZH2 mRNA snažnije ispoljena. Niža razina EZH2 mRNA je bila statistički značajno povezana s većim tumorima, tumorima sa sklonošću metastaziranju i uznapredovalom fazom bolesti. Ovi su rezultati potvrđeni i na razini proteina: smanjen izražaj EZH2 → lošija prognoza.

Molekularno-genetičkim analizama je otkriveno da antionkogen funkcija EZH2 u ovom modelu ovisi o aktivnosti gena/proteina *NRF2*, čiju smo funkciju opisali u Uvodu. Ukratko: pojačano ispoljavanje EZH2 povezano je s postavljanjem supresivne oznake na histonu H3 (H3K27m3) u području promotora gena *NRF2* koji se zbog toga utiša. Posljedica ovog utišavanja je gubitak mRNA *NRF2* koji je, u modelu *in vitro* (linija stanica A549), pokazan kao izuzetno snažan pokretač proliferacije ovih stanica zbog toga što potiče gene koji kodiraju proteine uključene u održavanje redoks-sustava stanice.

Zaključno, analizom podataka testom Pearson chi-square (PCST) nismo pokazali povezanost izražaja EZH2 i dostupnih kliničkih parametara. Pokazali smo, međutim da postoje tumori u kojima se razina mRNA EZH2, u odnosu na netumore, smanjuje (Tablica 33; T26, T54, T57, T138, T301). Sličan je rezultat dobiven na karcinomima nemalih stanica pluća, i na razini mRNA, i na razini proteina. Svi drugi podatci iz literature su, uglavnom, dijametralno suprotni našim rezultatima.

6.3. Značaj izražaja p53

Najnovijim podacima dobivenim sekvenciranjem i analizom cijelog genoma u 74 tumora glave i vrata (devet karcinoma hipofarinksa), pokazano je da je broj mutacija gena *TP53*, iskazan kao broj mutacija na milijun baza, najviši u karcinomima larinksa (N=15), za kojim slijedi HPV-negativan karcinom hipofarinksa (N=7), usne šupljine (N=36) i orofarinska (N=4) te sinuonazalni karcinom (N=1) (302). U ovim je tumorima najčešći tip mutacije transverzija G→T, koja je u velikom broju studija povezana s pušenjem, odnosno izlaganjem molekule DNA policikličkim aromatskim ugljikovodicima (303).

U datoteci Međunarodne agencije za istraživanje raka (International Agency for Research on Cancer) trenutno su pohranjene 29 794 mutacije gena *TP53*, dokazane sekvenciranjem

(podatci nisu filtrirani, tako da se neke mutacije višestruko ponavljaju). Uz 7 878, na ovaj način dokazanih mutacija, postoje i podatci vezani uz rezultate bojanja metodom imunohistokemije. Razdioba podataka s obzirom na obojenje, ukazuje da se u približno jednoj četvrtini tumora s mutiranim *TP53* istoimeni protein ne može dokazati ovom metodom, dok se u preostale tri četvrtine tumora s mutacijama *TP53* protein dokazuje. Nedavno objavljen studijom (304) pokušalo se objasniti na koji način određeni tip mutacije *TP53* utječe na interpretaciju podataka dobivenih bojanjem metodom imunohistokemije. Kao što je bilo i očekivano, mutacije tipa “nonsense” su, u pravilu (71,20 %), za posljedicu imale izostanak bojanja u reakciju imunohistokemije. S druge strane, mutacije tipa zamjene nukleotida (“supstitucije”) su, u pravilu rezultirale pozitivnim obojenjem (80,70%).

Detaljna analiza podataka dobivenih sekvenciranjem gena *TP53* u karcinomima hipofarinksa, deponiranih u bazi ICR (N=187), upućuje na prilično velik rasap mutacija koje se vrlo rijetko grupiraju u pojedinim kodonima. Drugim riječima, teško bi se moglo zaključiti da u karcinomima hipofarinksa postoje “vruće točke” s obzirom na status gena *TP53*. Dodatni problem analize ovih podataka predstavlja nepotpunost datoteke u odnosu na kliničke podatke o bolesnicima. Na primjer, iako su mutacije, kojima se uvodi STOP-kodon u 29 uzoraka dobro definirane, u ovoj skupini su klinički podatci vezani uz status TNM prikazani samo za 19 bolesnika, a stupanj diferencijacije za samo 14 bolesnika. Dodatno, čak za 40 različitih mutacija, pokazanih u ovim uzorcima ne postoji pouzdano predviđanje posljedica na razini proteina. Na primjer, u slučaju mutacija koje se nalaze u intronu (N=7) i imaju potencijal za remećenje mehanizama prekrajanja, nije jasno da li će se transkript uopće prevesti u protein. O ovome, naravno, ovisi i konačan rezultat bojanja preparata metodom imunohistokemije. Dodatno, interpretacija rezultata imunohistokemije je, u većini slučajeva, subjektivna. Stoga i ne čudi da se obojenje, u dva različita tumora s istovjetnom, “nonsense” mutacijom interpretiraju i kao negativni, i kao rubno pozitivni (R213→STOP kodon).

Iako su u ovoj datoteci pohranjeni podatci studija kojima se pokušao povezati status gena *TP53* i prognoze heterogene skupine tumora glave i vrata, ne postoje posebno izdvojeni podatci za karcinome hipofarinksa. Rezultati ovih 11 studija kojima je praćeno preživljenje (N=7); odgovor na liječenje (N=22); preživljenje i odgovor na liječenje (N=2) su, u nekim dijelovima, kontradiktorni. Na primjer, u dvije se studije pokazuje da samo prisustvo mutacija u području koje kodira domenu DBD (ne i drugi tipova mutacija) pozitivno korelira s uznapređovalim stadijem tumora (84,6% vs 62%), većom incidencijom metastaziranja u limfne čvorove (91,7% vs 56%; P=0,014), skraćenim vremenom do povrata bolesti (8,1 vs 23,7 mjeseci; P=0,047) i ukupnim preživljenjem (11 mjeseci vs. 29,2 mjeseca; p=0,003)

(305,280). Postoji i studija koja dodatno potvrđuje negativan prognostički značaj prisustva mutacije *TP53*, ali ne potvrđuje značaj “snage” mutacija u pojedinim domenama (306). Konačno, iako je prisustvo gubitka heterozigotnosti, odnosno točkastih mutacija *TP53*, u velikoj studiji kojom je bilo analizirano 106 oboljelih od tumora glave i vrata, pokazalo *TP53* kao prognostički značajan u odnosu na neoadjuvantno liječenje s 5-FU (307), postoje i podatci kojima nije pokazana povezanost kliničko-patoloških parametara tumora glave i vrata i statusa gena *TP53* (308). Zanimljivo je da se u zadnje dvije godine sve češće pokazuje, u različitim vrstama zloćudnih tumora, da prisustvo mutiranog oblika proteina p53 može biti čimbenik bolje prognoze, zbog bolje odgovora na liječenje, primarno kemoterapeutcima, kao dio neoadjuvantnog liječenja (308, 309).

Iako se tumori glave i vrata nerijetko istražuju kao cjelina, ne treba nikada zaboraviti da ovi tumori, s obzirom na ishodišni organ imaju određene specifičnosti. Ovo se odnosi i na mutacije gena *TP53*: u Tablici 32 smo prikazali usporedbu osam najčešćih mutacija gena *TP53* u tumorima hipofarinksa (baza IARC) u odnosu na sve tumore glave i vrata (251). Vidljivo je da su u obje skupine tumora, uz najčešće mutirani kodon 248, često mutirani i kodoni 273, 245, 175 i 282. Međutim, čini se da se u karcinomima hipofarinksa, u odnosu na cjelokupnu skupinu zloćudnih tumora glave i vrata, češće pojavljuju mutacije u kodonima 220, 146, 176 i 242. Značajno je, i u literaturi se sve češće navodi, da se tumori glave i vrata ne bi trebali smatrati jedinstvenom cjelinom. Umjesto toga, tumori glave i vrata za koje je pouzdano poznato ishodište, trebaju se analizirati u kontekstu anatomske lokacije na kojoj su se pojavili (310). U tom bi se slučaju možda mogli objasniti dodatni paradoksi vezani uz p53, kao što je i onaj, vezan uz studiju iz 2010. godine kojom je napravljena sistematska analiza prognostičke vrijednosti izražaja p53 na preživljenje bez bolesti i ukupno preživljenje u oboljelih od četiri skupine tumora glave i vrata (usna šupljina, larinks, oro- i hipofarinks). Rezultati dobiveni meta-analizom 41 studije, pokazali su da prekomjerno ispoljavanje p53 u karcinomima orofarinska predstavlja dobar prognostički čimbenik u odnosu na preživljenje, dok u usnoj šupljini njegova prekomjerna ispoljenost predstavlja loš prognostički čimbenik (311). Iako autori su autori ovo otkriće djelomično povezali s neuniformnim podacima s kojima su radili, ne može se isključiti mogućnost da p53, upravo kao i druge signalne molekule u stanici, funkcionira u skladu s homeostazom stanice. Otkrića objavljena tijekom 2015. i 2016. godine sve više ukazuju na važnost metaboličkih procesa na koje p53 utječe, pri čemu i ti procesi utječu na njegovo ispoljavanje (312).

Ove je podatke gotovo nemoguće interpretirati u kontekstu rezultata starijih studija, na primjer studije koju su 1996. godine objavili Shin i suradnici. Analizom ispoljavanja gena p53

u 69 zloćudnih tumora glave i vrata (usna šupljina (N=39); orofarinks (N=6); hipofarinks (N=2); larinks (N=18), ostali (N=4)) pokazali su, univarijatnom analizom, da njegovo pojačano ispoljavanje korelira s kraćim preživljenjem (313). Tri godine kasnije, Taylor i suradnici su objavili studiju temeljenu na dokazivanju proteina metodom imunohistokemije, a statusa gena sekvenciranjem DNA, na 85 zloćudnih tumora glave i vrata nespecificirane lokacije. Pokazali su da se pozitivno obojenje na p53, detektirano u 63% (N=53) uzoraka, može povezati s prisutnošću mutacija gena (egzoni 5-9) u 51% slučajeva (N=27). Ovom studijom nije dokazana povezanost snage izražaja TP53 s ukupnim preživljenjem, odnosno preživljenjem bez pojave bolesti (314).

Studija, kojom su u zloćudnim tumorima glave i vrata (pri čemu su karcinomi larinksa i hipofarinksa bili grupirani kao jedna cjelina (N=40; usna šupljina N=166; orofarinks=87) određeni p53 i status HPV, pokazala je da su tumori pozitivni na p53, u kojima nema virusa HPV, statistički značajno povezani s kraćim preživljenjem koje se može povezati s povratom bolesti (315).

Analizom obojenja p53 metodom imunohistokemije na 43 karcinoma hipofarinksa, pozitivno obojenje je pokazano u 37% (N=16) uzoraka. Nije pokazana povezanost ispoljenosti p53 i sljedećih parametara: a) medijan preživljenja; b) ukupnog preživljenja; c) diferenciranosti tumora. Zbog toga, što je značajnost ispoljavanja pokazana značajno povezanom samo s dobi bolesnika (jači izražaj u mlađoj životnoj dobi i u uznapredovalom kliničkom stadiju), zaključeno je da izraženost p53 nema snažan klinički značaj u oboljelih od zloćudnog tumora hipofarinksa (*“although abnormalities of the p53 oncoprotein are common in this cancer, this finding is of little clinical significance”*) (316). Međutim, kada se ispoljavanje p53 analiziralo samo u uznapredovalim stadijima karcinoma hipofarinksa (N=75), onda je njegov pojačan izražaj snažno korelirao s lošijom prognozom bolesti (petogodišnje preživljenje; 73% (p53 negativni) vs 48% (p53 pozitivni); $P=0,008$) (39). Postavlja se pitanje: da li su autori sigurni da su dokazivali divlji tip proteina?

Udio tumora s LOH je u našoj skupini uzoraka bio znatno manji od očekivanog (samo 2 od 19; 11,1%). Pretpostavljamo da se LOH desio u barem još 6-7 uzoraka, no ne možemo ga detektirati zbog toga što nemamo čistu populaciju stanica tumora. Ovaj bi se problem mogao riješiti (i riješit će se) analizom na razini DNA iz nekoliko rezova debljine 5 mikrometara tkiva arhiviranog tumora za koji će patolog potvrditi „čistoću“ s obzirom na udio netumorskih, upalnih stanica (prihvatljivo je da za ovaj tip analize u rezu tkivo tumora bude zastupljeno s najmanje 70%). S obzirom na mali udio LOH, nismo analizirali LOH JMJD3,

iako smo to planirali. Stoga smo zaključivanje o izražaju JMJD3, u odnosu na EZH2, napravili s tri različite metode umnažanja transkripta/detekcije dobivenih signala.

U našem istraživanju je izražaj p53 bio povezan s kliničkim određenom veličinom tumora (cT) ($p=0,03611$), ali samo kada su tumori bili objedinjeni su skupine A i B (Tablica 16; $p=0,03611$) i sklonošću metastaziranju karcinoma u limfne čvorove ($p=0,03695$; Tablica 23, $p=0,02896$, Tablica 26). Nije se pokazao značajnim prognostičkim čimbenikom u analizi preživljenja (test Gehan-Wilcoxon; $p=0,73650$; slika 19).

6.4. Značaj izražaja JMJD3

Reakcijama imunohistokemije određen je i izražaj trećeg ciljnog proteina, JMJD3, koji se pokazao statistički značajno povezan s veličinom primarnog tumora, bez obzira na to da li je procjenu učinio kirurg ($p=0,00005$; Tablica 13) ili patolog, u slučaju objedinjenog izražaja ($p=0,00375$; Tablica 18). Pretraživanjem baze PubMed može se (datum zadnjeg pretraživanja: 8.12.2016) naći samo jedna klinička studija kojom se pokušao povezati izražaj JMJD3 s kliničkim parametrima, na razini mRNA, i na razini proteina (215). Studija je provedena na uzorcima 151 kolorektalnog karcinoma. Zanimljivo je da su se autori susreli s istim problemom kao i mi: zbog difuznog obojenja i malih razlika u intenzitetu signala, nisu uspjeli objединiti skupine sa slabim, umjerenim i snažnim izražajem JMJD3 pa su ih stoga objединili kao pozitivne i negativne (nisu naveli zbog čega se ovaj problem mogao javiti, a nisu naveli niti protutijelo koje su koristili). Slično nama, i ovi su autori odredili razine transkripata JMJD3 u u 20 sparenih (tumor u odnosu na netumor) uzoraka. Obradom dobivenih podataka su pokazali da je JMJD3 snažnije izražen u zdravom tkivu, u odnosu na pripadajuće tkivo tumora ($P=0,004$). Statističkom analizom podataka su pokazali da je niski izražaj JMJD3, na razini proteina, statistički značajno povezan s kraćim ukupnim preživljenjem. Na razini mRNA se ova razlika nije pokazala značajnom.

U našim smo uzorcima, korištenjem metode qRT-PCR, pokazali da se razina JMJD3 mRNA u dijelu tumora značajno povećava (#T14, #T36, #T54, ##T57, #T72, #T138), u odnosu na tkivo netumora. U kontekstu ranije navedene studije (215), ovo je nemoguće objasniti.

Međutim, ovdje je dobro postaviti pitanje smislenosti analize samo jednog od dva enzima antagonističkih funkcija, a da se pri tome ne mjeri promjena na ciljnom supstratu. Drugim riječima, kako shvatiti samo pojačani izražaj JMJD3, demetilaze histona, u kontekstu jedne komplekse bolesti kao što je karcinom, a da se pri tome ne mjeri izražaj njegovog antagonista, EZH2 metiltransferaze histona, uz, idealno mjerenje razine metiliranosti H3K27.

Istovremena analiza izražaja EZH2 i JMJD3

Smatrali smo da je za istraživanje ovog tipa potrebno istražiti na koji se način mijenja omjer izražaja ova *EZH2* i *JMJD3*, u istom tumoru, na istoj mRNA, u istoj reakciji. Dodatno, željeli smo istražiti na koji se način ovaj podatak može korelirati s njihovim izražajem na razini proteina (metoda imunohistokemije). Na temelju postojećih podataka u literaturi, nismo mogli očekivati snažan porast *JMJD3* u tkivu tumora, na razini ekspresije gena. Međutim upravo to smo otkrili (Tablica 33). Moguće objašnjenje mogla bi biti jaka upalna reakcija u tkivu tumora, posredovana signalnim putem NF- κ B (202). Da u tumorima s kojima smo radili ima netumorskih stanica nije prijepono. Najvjerojatnije je i zaostali signal u jednog alela, pokazan reakcijom sekvenciranja gena *TP53*, signal zloćudno nepromijenjene stanice (Slika 27). U makrofazima je pokazano da je *JMJD3* izravna meta za dimer Rel-A-NF- κ B, pa stoga snažno ispoljavanje *JMJD3* u karcinomu hipofarinksa (često združenim s pušenjem i upalom) možda ne bi trebalo čuditi. S druge strane, ne smije se zaboraviti da se osjetljiva regulacija epigenoma specifična za tip stanice, u određenom vremenskom intervalu. Najnoviji podatci pokazuju da bi uloga *JMJD3* u melanomu mogla biti toliko snažno protumorigenična, da potakne promišljanje o „pametnom lijeku“ koji bi dokinuo aktivnost *JMJD3* („...*Our findings reveal a novel epigenetic mechanism by which JMJD3 promotes melanoma progression and metastasis, and suggest JMJD3 as a potential target for melanoma treatment.*”) (317).

Konačno, prije nekoliko mjeseci je izašao rad u kojem su se, upravo kao i našem istraživanju, izražaji *EZH2* i *JMJD3* istražili istovremeno; na razini mRNA, i na razini proteina, na modelu karcinoma prostate. Pokazan porast količine transkripta i proteina, i za *JMJD3*, i za *EZH2* bio je naročito snažan kada su se usporedili tumori s Gleason-indeksom 7 i 8 s pripadajućim zdravim tkivom. U ovom je istraživanju izmjereno i vezanje ova dva proteina za ciljne promotore. Jedan od njih je promotor gena *RAR β 2*. Čini se da *EZH2* i *JMJD3* kompetiraju za vezanje, a s obzirom na njihov omjer u stanici, prevladava djelovanje *JMJD3*. Poticanjem aktivnosti *RAR β 2* koji pozitivno regulira biosinteza androgena, došlo se do zaključka da „*JMJD3 and RAR β 2 could therefore have a key role in prostatic tumorigenesis and thus be a potential therapeutic target*“ (318). S obzirom da u literaturi postoji tek nekoliko podataka o izražaju *JMJD3* u zloćudnim tumorima čovjeka (i niti jedan na tumorima glave i vrata), nemoguće je o utjecaju ove demetilaze histona raspravljati bez dodatnog eksperimentalnog rada. Ovo se odnosi i na sve druge parametre koji su se u ovoj studiji pokazali kao značajni ili neočekivani.

6.5. Značaj multivarijatne analize

Velik je broj istraživanja u onkologiji kojima se pokušava odrediti biljeg koji će biti „prognostički“ za neko stanje, odgovor na liječenje ili ranu dijagnostiku. Činjenica je da za većinu karcinoma, uključujući i hipofarinks, „predikcijski biljeg“ odgovora na liječenje ili preživljenja ne postoji. Ovo je izuzetno frustrirajuće s obzirom na to da postoji vrlo velik broj studija u kojima autori, nerijetko, objavljuju kontradiktorne rezultate. Prediktivna (bio)medicina je dodatno stigmatizirana velikim brojem lažnih ili plagiranih studija. US National Library of Medicine je upravo objavio da su, samo u 2016. godini, iz baze Medline povučena 664 znanstvena rada (ovo je pad od 3% u odnosu na 2015. godinu) (319). U skladu s ovim podatkom, ponekad je uistinu teško procijeniti koja je studija vjerodostojna.

Dodatni problem je što velik broj studija u području onkologije, koje pokušavaju biti prognostičke, nerijetko procjenjuju važnost jednog „biljega“ s dobro znanim kliničkim parametrom. Međutim, mi još uvijek, prema tim „obećavajućim“ parametrima, ne možemo predvidjeti osnovne značajke budućeg ponašanja tumora. Vrijednost sravnjivanja parametara „jedan na jedan“ najbolje je vidljiva na rezultatima multivarijatne analize, kojom je pokazano nešto iznimno zanimljivo: niti jedan parametar koji se testom χ^2 pokazao značajnim u odnosu na pojedine karakteristike tumora (snaga izražaja JMJD3/p53 i parametar „T“ - tablice 13 i 16; snaga izražaja p53 i parametar „N“: tablice 23 i 26), nije imao dovoljnu snagu informacijskog sadržaja za procjenu preživljenja. Umjesto JMJD3 i p53, jedini „molekularni“ čimbenik prognoze bio je EZH2 (slike 32 i 33), koji se niti u jednoj analizi testom χ^2 nije pokazao značajnim. Ovo ukazuje da treba biti iznimno oprezan pri odlučivanju o primjeni pojedinih statističkih metoda kada se želi predvidjeti ishod bolesti, u kontekstu dobro poznatih stremljenja prediktivno-integrativno-personaliziranoj medicini, u kliničkoj, ali i molekularnoj onkologiji.

7. Zaključak

Na temelju detaljne analize rezultata dobivenih istraživanjem na 68 tkiva karcinoma hipofarinksa dobro praćenih bolesnika, može se zaključiti:

1. Dob je najznačajniji prognostički čimbenik u odnosu na preživljenje: bolesnici koji su u trenutku postavljanja dijagnoze bili mlađi od 56,5 godina, imali su statistički značajno duže preživljenje u odnosu na bolesnike stare i starije od 56,5 godina ($p=0,0086$);
2. Status limfnih čvorova, procijenjen od strane kirurga, statistički značajno utječe na preživljenje: bolesnici sa stadijem čvorova cN2/3 imaju lošije preživljenje od bolesnika sa stadijem N0/1 ($p = 0,0086$);
3. U univarijatnoj analizi, izraženost JMJD3 i p53 je značajno povezana s veličinom tumora i statusom limfnih čvorova ($p=0,00005$; $p=0,03695$);
4. EZH2, JMJD3 i p53 nisu neovisni prognostički čimbenici preživljenja u oboljelih od karcinoma hipofarinksa;
5. Najveći dio mutacija gena *TP53* nalazi se u području koje kodira dio proteina p53 koji će se vezati na molekulu DNA, a učestalost najčešćih mutacija *TP53* u karcinomima hipofarinksa razlikuje se u odnosu na objedinjenu skupinu zloćudnih tumora glave i vrata
6. Omjer transkripata EZH2/JMJD3 često se smanjuje u tkivu tumora, u odnosu na netumorsko tkivo;
7. Izražaj EZH2 smanjuje omjer hazarda u podskupini bolesnika mlađih od 56,5 godina sa statusom limfnih čvorova cN2/cN3 (omjer hazarda: 0,54 vs 1,59, u odnosu na sve oboljele);
8. Osnovne varijable koje određuju omjer hazarda kao osnovnu mjeru prognoze su dob, klinički status limfnih čvorova i izražaj EZH2.

8. Sažetak

Karcinomi hipofarinksa čine 10% tumora glave i vrata. Najčešće se pojavljuju u starijoj životnoj dobi i otkrivaju u uznapredovalom stadiju bolesti. Poznato je da se u njima nalaze višestruke genetičke promjene. Ovim smo istraživanjem ispitali značaj izraženosti epigenetičkih modulatora metilacije lizina 27 u histonu H3, antagonista EZH2 i JMJD3, u odnosu na kliničke osobitosti tumora i preživljenje 68 bolesnika.

Istraživanje za ova dva gena napravljeno je na razini mRNA i proteina. Određen je i izražaj gena *TP53* metodom imunohistokemije (protein), združeno s određivanjem gubitka heterozigotnosti (analiza na razini DNA).

Preživljenje u odnosu na pojedinačne parametre (starost bolesnika, veličina tumora, zahvaćenost limfnih čvorova, gradus, izražaj EZH2, JMJD3 i p53) prikazan je postupkom po Kaplan-Meieru, a razlika među krivuljama je testirana uporabom testa Gehan-Wilcoxon. Testom χ -kvadrat su testirane razlike između podataka dobivenih prebrojavanjem. Multivarijatna analiza povezanosti promatranih varijabli s ishodom bolesti zasnivala se na rekurzivnom particioniranju, rezultat kojeg se izrazio kao omjer hazarda. Najznačajniji klinički parametri u procjeni preživljenja su dob i status limfnih čvorova. Iako niti jedan od ciljnih proteina nije pokazan kao neovisni prognostički čimbenik preživljenja, u univarijatnoj analizi je izraženost JMJD3 i p53 bila značajno povezana s veličinom tumora (JMJD3) i statusom limfnih čvorova (p53). Neočekivan rezultat je otkriće relativno stabilne transkripcije EZH2 u tumoru u odnosu na tkivo netumora, praćeno snažnim porastom izražaja JMJD3, u tkivu tumora. Izražaj EZH2 smanjuje omjer hazarda u podskupini bolesnika mlađih od 56,5 godina sa statusom limfnih čvorova cN2/cN3 (omjer hazarda: 0,54 (EZH 2 1-3) vs 1,59 (EZH2 0), u odnosu na sve oboljele), čime postaje treća varijabla (nakon dobi i statusa limfnih čvorova) koja određuje omjer hazarda za preživljenje ovih bolesnika.

8. Summary

Clinical Significance of Methyltransferase

EZH2 and Demethylase JMJD3 Expression in Malignant Hypopharyngeal Tumors

Hypopharyngeal carcinomas account for 10% of all head and neck tumors. The highest incidence of this tumor is recorded in older population, in which it is commonly presented in an advanced stage. It has been known that these tumors contain multiple genetic abnormalities. This research was focused on investigating the relevance of expression of two epigenetic modulators with antagonistic functions on H3K27, EZH2 and JMJD3, in a setting of a clinical features of the tumor and survival in a cohort of 68 patients. Both, EZH2 and JMJD3, were explored at the level of mRNA and protein. The expression of p53 was determined at the protein level by immunohistochemistry, joined with analyses at the level of genomic DNA (loss of heterozygosity). Kaplan Maier method was used for analysis of overall survival in relation to standard clinical data (age, size of the tumor, presence of lymph node metastases, tumor grade) and expression of the target proteins (EZH2, JMJD3 and p53). The difference between survival curves was tested with Gehan-Wilcoxon test. The χ^2 test was used for determine whether there is a significant difference between the expected frequencies related to standard clinical features of the tumor. Multivariate analysis based on recursive partitioning was presented as the hazard ratio. The most important clinical parameters for survival of this patient cohort are age and the lymph node status. Although not shown as independent prognostic factors for survival, the high expression of JMJD3 and p53 was significantly associated with the tumor size (JMJD3) and the status of lymph nodes (p53), in univariate analysis. An unexpected phenomenon has been presented in a high proportion of samples, by discovery of unchanged EZH2 expression when tumor and non-tumor tissues were compared. At the same time, JMJD3 was significantly increased in the tumor tissue (when compared to non-tumorous tissue). On a protein level, EZH2 expression decreases the hazard ratio in a subgroup of patients younger than 56,5 years with affected lymph nodes (cN2/cN3) (hazard ratio 0,54 (EZH21-3) vs 1,59 (EZH2 0), in relation to the whole cohort). This discovery profiles EZH2 as the third factor (after the age and lymph node involvement) involved in determination of the hazard ratio for these patients.

Alan Pegan, 2017.

9. Literatura

1. Krmpotić-Nemanić J. Anatomija čovjeka. Zagreb: Medicinska naklada; 1993, str. 738-43.
2. Sadler T W. Langmanova medicinska embriologija. VII izdanje. Zagreb: Školska knjiga; 1996, str. 312-47
3. Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. Anatomija čovjeka. II. dio. Zagreb: Medicinska naklada; 2002, str. 343-7.
4. <http://emedicine.medscape.com/article/1375268-overview#a1> Pristupljeno 09.09.2016.
5. Junqueira LC, Carneiro J i Kelly RO. Osnove histologije. Zagreb: Školska knjiga; 1999, str. 54-9.
6. Kim S, Weber RS. Hypopharyngeal Cancer. U: Bailey B i sur. ur. Head and Neck Surgery- Otorhinolaryngology. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins; 2004, str. 1691-1710.
7. <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Sites-Types/head-and-neck> Pristupljeno 09.09.2016.
8. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2011;61:69-90.
9. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf> Pristupljeno 09.09.2016.
10. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H i sur. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. Eur J Cancer. 2013;49:1374-403.
11. Znaor T, Vučemilo L, Kulis T, Znaor A. Incidence and mortality trends of head and neck cancer in Croatia in the period 1988-2008. Acta Otolaryngol. 2013;133:305-12.
12. Popescu CR, Bertesteanu SVG, Mirea D, Grigore R, Ionescu D, Popescu B. The epidemiology of hypopharynx and cervical esophagus cancer. J Med Life. 2010;3:396-401.
13. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak. Incidencija raka u Hrvatskoj 2013, Bilten 38, Zagreb; Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2015. str.18-22.
14. Khan NR, Khan AN. Insight in to squamous cell carcinoma of head and neck region: current statistics. J Dent App. 2015;2:232-9.
15. Vineis P, Caporaso N. Tobacco and cancer: epidemiology and the laboratory. Environ Health Perspect. 1995;103:156-60.
16. Lee CH, Wu CH, Ho YS. From smoking to cancers: novel targets to neuronal nicotinic acetylcholine receptors. J Oncol. 2011;2011;doi:10.1155/693424. Pristupljeno 12.09.2016

-
17. Lee YC, Marron M, Benhamou S, Bouchardy C, Ahrens W, Pohlabein H i sur. Active and involuntary tobacco smoking and upper aerodigestive tract cancer risks in a multicenter case control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18:3353-61.
 18. Berthiller J, Starif K, Agudo A, Ahrens W, dos Sanots AB, Boccia S. Low frequency of cigarette smoking and the risk of head and neck cancer in the INHANCE consortium pooled analysis. *Int J Epidemiol.* 2016;45:835-45.
 19. Bosetti C, Gallus S, Peto R, Negri E, Talamini R, Tavani A, i sur. Tobacco smoking, smoking cessation, and cumulative risk of upper aerodigestive tract cancers. *Am J Epidemiol.* 2008;167:468-73.
 20. Lortet-Tieulent J, Renteria E, Sharp L, Weiderpass E, Comber H, Baas P i sur. Convergence of decreasing male and increasing female incidence rates in major tobacco-related cancers in Europe in 1988-2010. *Eur J Cancer.* 2015;51:1144-63.
 21. Maldovsky P, Allin S, Masseria C, Hernandez-Quevedo C, McDaid D, Mossialos E. Health in the European Union: Trends and Analysis. Observatory Studies Series N° 19. Copenhagen, WHO Regional Office. 2009. str 21. Pristupljeno 04. 03. 2014.
 22. Testino G. The burden of cancer attributable to alcohol consumption. *Maedica (Buchar).* 2011;6:313-20.
 23. Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, Corrao G. A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *Br J Cancer.* 2001;85:1700–5.
 24. Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Tramacere I, Islami F , Fedirko V i sur. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose–response meta-analysis. *Br J Cancer.* 2015;112:580–93.
 25. Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhönen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg.* 1983;12:418-24.
 26. Lajer CB, von Buchwald. The role of human papillomavirus in head and neck cancer. *APMIS* 2010;118:510-9.
 27. Munger K, Howley PM. Human papilloma immortalization and transformation functions. *Virus Res.* 2002;89:213-28.
 28. Fehrman F, Laimonis AL. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene.* 2003;22:5201-7.
 29. de Villers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papilloma viruses. *Virology.* 2004; 324:17-27.

-
30. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010; 401:70-9.
 31. Pannone G, Santoro A, Papagerakis S, Lo Muzio L, De Rosa, Bufo P. The role of human papillomavirus in the pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma: an overview. *Infect Agent Cancer*. 2011;6:4.doi: 1750-9378-6-4. Pristupljeno 12. 11. 2015.
 32. Syrjanen S. HPV infections and tonsillar carcinoma. *J Clin Pathol*. 2004;57:449-55.
 33. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S.. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14:467-75.
 34. Ribeiro KB, Levi JE, Pawlita M, Koifman S, Matos E, Eluf-Neto J i sur. Low human papillomavirus prevalence in head and neck cancer: results from two large case-control studies in high-incidence regions. *Int J Epidemiol*. 2011;40:489-502.
 35. Westra WH. The morphologic profile of HPV- related head and neck squamous carcinoma: implications for diagnosis, prognosis and clinical management. *Head Neck Pathol*. 2012;6:48-54.
 36. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H i sur. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100:261-9.
 37. Vokes EE, Agrawal N, Seiwert TY. HPV-associated head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107:djv344
 38. Lee LA, Huang CG, Liao CT, Lee LY, Hsueh C, Chen TC i sur. Human papillomavirus-16 infection in advanced oral cavity cancer patients is related to an increased risk of distant metastases and poor survival. *PloS One*. 2012;2011:e40767. doi: 10.1371.
 39. Ernoux-Neufcoeur P, Arafa M, Decaestecker C, Duray A, Remmelink M, Leroy X i sur. Combined analysis of HPV DNA, p16, p21 and p53 to predict prognosis in patients with stage IV hypopharyngeal carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011;137:173-81.
 40. Wendt M, Romanitan M, Näsman A, Dalianis T, Hammarstedt L, Ramqvist T i sur. Presence of human papillomaviruses and p16 expression in hypopharyngeal cancer. *Head Neck*. 2014;36:107-12.
 41. Maruyama H, Yasui T, Ishikawa-Fujiwara T, Morii E, Yamamoto Y, Yoshii T i sur. Human papillomavirus and TP53 mutations in head and neck squamous cell carcinoma among Japanese population. *Cancer Sci*. 2014;105:409-17.

-
42. Plummer S: Diffuse dilatation of the esophagus without anatomic stenosis (cardiospasm). A report of ninety-one cases. *J Am Med Assoc.* 1912;58:2013-5.
 43. Novacek G. Plummer –Vinson syndrome. *Orphanet Journal of Rare Disease* 2006;1:36 doi:10.1186/1750-1172-1-36. Pristupljeno 04.06. 2012.
 44. Larsson LG, Sandstrom A, Westling P. Relationship of Plummer Vinson disease to cancer of the upper alimentary tract in Sweden. *Cancer Res.* 1975;35:3308-16.
 45. Uppaluri R, Sunwoo JB. Neoplasms of the hypopharynx and cervical oesophagus. U: Cummings CW ur. *Cummings Otolaryngology and Head and Neck Surgery.* Philadelphia: Mosby, Inc.; 2005. str.1899-1931.
 46. Hoffman HT, Karnell LA. Shah JP, Ariyan S, Brown GS, Fee WE i sur. Hypopharyngeal cancer patient care evaluation. *Laryngoscope.* 1997;107:1005-17.
 47. Bonkowsky V. Disease of Oral Cavity, Oropharynx, Hypopharynx, Cervical Oesophagus. U: Anniko M i sur. *Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery.* Heidelberg: Springer;2010. str. 405-57.
 48. Piazza C, Dessouky O, Peretti G, Cocco D, De Benedetto, Nicolai P. Narrow-band imaging: a new tool for evaluation of head and neck squamous cell carcinomas. Review of the literature. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2008; 28: 49-54.
 49. Becker M. Larynx and hypopharynx. *Radiol Clin North Am.* 1998;36:891-920.
 50. Edge S, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Green FL, Trotti .A, ur. *AJCC Cancer Staging Manual.* 7th ed. Chicago: Springer; 2010.
 51. Robbins KT, Shaha AR, Medina JE, Califano JA, Wolf GT, Ferlito A. Consensus statement on the classification and terminology of neck dissection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008;134:536-8.
 52. Broders AC. Squamous cell cancer of the lip: a study of five hundred and thirty-seven cases. *JAMA.* 1920;74:656–64.
 53. Wright JR. Albert C. Broders' paradigm shifts involving the prognostication of definition of cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2012;136:1437–46.
 54. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/head-and-neck.pdf. Pristupljeno 04.06.2012.
 55. Kuo P, Chen MM, Decker RH, Yarbrough WG, Judson BL. Hypopharyngeal cancer incidence, treatment, and survival: temporal trends in the United States. *Laryngoscope.* 2014;124:2064-9.

-
56. Pingree TF, Davis RK, Reichemfan O, Derrick L. Treatment of hypopharyngeal carcinoma: a 10-year review of 1 362 cases. *Laryngoscope*. 1987;97:901-4.
57. Ferlito A, Shaha AR, Silver CE, Rinaldo A, Mondin V. Incidence and sites of distant metastases from head and neck cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2001;63:202-7.
58. Waddington C. The epigenotype. *Endeavour*. 1942;1:18-20.
59. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhata R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev*. 2009;23:781-3.
60. Gall Trošelj K, Novak R, Grbeša I. Epigentika i fiziologija gena. *Medicina*. 2009;45:127-35.
61. Leonhardt H, Page AW, Weier H-U, Bestor TH. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA Replication in mammalian nuclei. *Cell*. 1992;71:865-73.
62. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99:247-57.
63. Yan XJ, Xu J, Gu ZH, Pan CM, Lu G, Shen Y, Shi JY. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet*. 2011;43:309-15.
64. Hansen RS, Wijmenga C, Luo P, Stanek AM, Canfield TK, Weemaes CM i sur. The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:14412-7.
65. Daniel FI, Cerubini K, Soares Yurgel L, Zancanaro de Figueiredo MA, Goncalves Salum F. The role of epigenetic transcription repression and DNA Methyltransferases in cancer. *Cancer*. 2011;117:677-87.
66. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*. 1987;196:261-82.
67. Espada J, Esteller M. Epigenetic control of nuclear architecture. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64:449-57.
68. Bock C, Walter J, Paulsen M, Lengauer T. CpG island mapping by epigenome prediction. *PloS Comput Biol*. 2007;3:e110. doi:10.1371. Pristupljeno 09.09. 2014.
69. Demokan S, Dalay N. Role of DNA methylation in head and neck cancer. *Clin Epigenet*. 2011;2:123-50.
70. Colacino JA, Dolinoy DC, Duffy SA, Sartor MA, Chepeha DB, Bradford CR i sur. Comprehensive analysis of DNA methylation in head and neck squamous cell carcinoma

indicates differences by survival and clinicopathologic characteristics. PLoS One. 2013;8:e54742. doi: 10.1371.

71. Yang B, Miao S, Zhang LN, Sun HB, Xu ZN, Han CS. Correlation of *CCNA1* promoter methylation with malignant tumors: a meta-analysis introduction. Biomed Res Int. 2015;2015:134027. doi: 10.1155/2015/134027. Pristupljeno 13.12.2015.

72. Bhasin M, Reinherz EL, Reche Pa. Recognition and classification of histones using support vector machine. J Comput Biol. 2006;13:102–12.

73. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. Nature. 1997;389:251-60.

74. Brait M, Sidransky D. Cancer epigenetics: above and beyond. Toxicol Mech Methods. 2011;24:275-88.

75. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. Carcinogenesis. 2010;31:27-36.

76. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. Nature. 2000;403:41-5.

77. Taby R, Issa JP. Cancer epigenetics. CA Cancer J Clin. 2010;60:376-92.

78. Leidecker O, Bonfiglio JJ, Colby T, Zhang Q, Atanassov I, Zaja R i sur. Serine is a new target residue for endogenous ADP-ribosylation on histones. Nat Chem Biol. 2016;12:998-1000.

79. Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. Genes Dev. 1998;12:599–606.

80. Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P i sur. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. Science. 2002;298:1039-43.

81. Peters AH, Mermoud JE, O'Carroll D, Pagani M, Schweizer D, Brockdorff N i sur. Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. Nat Genet. 2002;30:77-80.

82. Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC i sur. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. Nature. 2002;419:407-11.

83. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J i sur. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. Cell. 2006;125:315-26.

84. Di Martile M, Del Bufalo D, Trisciuglio D. The multifaceted role of lysine acetylation in cancer: prognostic biomarker and therapeutic target. Oncotarget. 2016;2016. doi: 10.18632/oncotarget.10048. Pristupljeno 17.09.2016.

-
85. Dambacher S, Hahn M, Schotta G. Epigenetic regulation of development by histone lysine methylation. *Heredity*. 2010;105:24-37.
86. Tie F, Banerjee R, Saiakhova AR, Howard B, Monteith KE, Scacheri PC, Cosgrove MS, Harte PJ. Trithorax monomethylates histone H3K4 and interacts directly with CBP to promote H3K27 acetylation and antagonize Polycomb silencing. *Development*. 2014;141:1129-39.
87. Grossniklaus U, Paro R. Transcriptional silencing by polycomb-group proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6. doi: 10.1101/cshperspect.a019331. Pristupljeno 09.03.2015.
88. Hauri S, Comoglio F, Seimiya M, Gerstung M, Glatter T, Hansen K i sur. High-density map for navigating the human polycomb complexome. *Cell Rep*. 2016;17:583-95.
89. Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell*. 2007;128:735-45.
90. Fanti L, Perrini B, Piacentini L, Berloco M, Marchetti E, Palumbo G i sur. The trithorax group and Pc group proteins are differentially involved in heterochromatin formation in *Drosophila*. *Chromosoma*. 2008;117:25-39.
91. Gall Trošelj K, Novak Kujundzic R, Ugarkovic D. Polycomb repressive complex's evolutionary conserved function: the role of EZH2 status and cellular background. *Clin Epigenetics*. 2016;8:55. doi: 10.1186/s13148-016-0226-1. Pristupljeno 26.05.2016.
92. Poynter ST, Kadoch C. Polycomb and trithorax opposition in development and disease. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2016;5:659-88.
93. Ringrose L. Polycomb comes of age: genome-wide profiling of target sites. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19:290-7.
94. Kuzmichev A, Margueron R, Vaquero A, Preissner TS, Scher M, Kirmizis A i sur. Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:1859-64.
95. Schoeftner S, Sengupta AK, Kubicek S, Mechtler K, Spahn L, Koseki H i sur. Recruitment of PRC1 function at the initiation of X inactivation independent of PRC2 and silencing. *EMBO J*. 2006;25:3110-22.
- 96 Ku M, Koche RP, Rheinbay E, Mendenhall EM, Endoh M, Mikkelsen TS i sur. Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet*. 2008;4:e1000242. doi: 10.1371/journal.pgen.1000242. Pristupljeno 17.11.2015.

-
97. Majewski IJ, Ritchie ME, Phipson B, Corbin J, Pakusch M, Ebert A i sur. Opposing roles of polycomb repressive complexes in hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2010;116:731-9.
98. Richly H, Aloia L, Di Croce L. Roles of the Polycomb group proteins in stem cells and cancer. *Cell Death Dis*. 2011;2:e204. doi: 10.1038/cddis.2011.84. Pristupljeno 17.11.2015.
99. O' Hagan HM, Mohammad HP, Baylin SB. Double strand breaks can initiate gene silencing and SIRT1- dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter CpG islands. *Plos Genet*. 2008;4:e1000155. doi:10.1371/journal.pgen.1000155.
100. Wakeling LA, Ions LJ, Escolme SM, Cockell SJ Su T5, Dey M i sur. SIRT1 affects DNA methylation of polycomb group protein target genes, a hotspot of the epigenetic shift observed in ageing. *Hum Genomics*. 2015;9:14. doi: 10.1186/s40246-015-0036-0. Pristupljeno 17.11.2015.
101. Gao Z, Zhang J, Bonasio R, Strino F, Sawai A, Parisi F i sur. PCGF homologs, CBX proteins, and YBP define functionally distinct PRC1 family complexes. *Mol Cell*. 2012;45:344-56.
102. Schwartz YB, Pirrota V. Ruled by ubiquitylation: an order for polycomb recruitment. *Cell Reports*. 2014;8:321-5.
103. Kondo Y, Shen L, Cheng AS, Ahmed S, Bumber Y, Charo C i sur. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat Genet*. 2008;40:741-50.
104. Brinkman AB, Gu H, Bartels SJ, Zhang Y, Matarese F, Simmer F i sur. Sequential ChIP-bisulfite sequencing enables direct genome-scale investigation of chromatin and DNA methylation cross-talk. *Genome Res*. 2012;22:1128-38.
105. Haupt Y, Bath ML, Harris AW, Adams JM. Bmi-1 transgene induces lymphomas and collaborates with myc in tumorigenesis. *Oncogene*. 1993;8:3161-4.
106. Song LB, Zeng MS, Lia WT, Zhang L, Mo HY, Liu WL i sur. Bmi-1 is a novel molecular marker of nasopharyngeal carcinoma progression and immortalizes primary human nasopharyngeal epithelial cells. *Cancer Res*. 2006;66:6225-32.
107. Allegra E, Puzzo L, Zuccala V, Trapasso S, Vasquez E, Garozzo A i sur. Nuclear BMI-1 expression in laryngeal carcinoma correlates with lymph node pathological status. *World J Surg Oncol*. 2012;10:206. doi:10.1186/1477-7819-10-206. Pristupljeno 01.12.2015.

-
108. Liu W, Guo X, Zhang L, Wang JY, Zhang G, Guan S i sur. Prognostic relevance of Bmi-1 expression and autoantibodies in esophageal squamous cell carcinoma. BMC Cancer. 2010;10:467. doi: 10.1186/1471-2407-10-467. Pristupljeno 12.12.2015.
109. Hayry V, Makinen LK, Atula T, Sariola H, Mäkitie A, Leivo I i sur. Bmi-1 expression predicts prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. Br J Cancer. 2010;102:892-7.
110. Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P i sur. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. Science. 2002;298:1039-43.
111. Nayak V, Xu C i Min J. Composition, recruitment and regulation of the PRC2 complex. Nucleus. 2011;2:277-82.
112. Aldiri I, Vetter ML. PRC2 during vertebrate organogenesis: a complex in transition. Dev Biol. 2012;367:91-9.
113. Dillon SC, Zhang X, Trievel RC, Cheng X. The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. Genome Biol. 2005;6:227. doi:10.1186/gb-2005-6-8-227. Pristupljeno 16.08.2012.
114. Pasini D, Bracken AP, Jensen MR, Denchi EL i Helin K. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. EMBO J. 2004;23:4061-71.
115. Margueron R, Justin N, Ohno K, Sharpe ML, Son J, Drury WJ 3rd, i sur. Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. Nature. 2009;461:762-7.
116. Satrimafitrah P, Barman HK, Ahmad A, Nishitoh H, Nakayama T, Fukagawa T i sur. RbAp48 is essential for viability of vertebrate cells and plays a role in chromosome stability. Chromosome Res. 2016;24:161-73.
117. Bai X, Wang D, Ji H, Zheng L, Lu Y, Tang W, i sur. RbAp48 is critical for the proliferation of hypopharyngeal carcinoma. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 2015;77:310-9.
118. Sanulli S, Justin N, Teissandier A, Ancelin K, Portoso M, Caron M i sur. Jarid2 methylation *via* the PRC2 complex regulates h3k27me3 deposition during cell differentiation. Mol Cell. 2015;57:769-83.
119. Puda A, Milosevic JD, Berg T, Klampfl T, Harutyunyan AS, Gisslinger B, i sur. Frequent deletions of JARID2 in leukemic transformation of chronic myeloid malignancies. Am J Hematol. 2012;87:245-50.

-
120. Kim H, Ekram MB, Bakshi A, Kim J. AEBP2 as a transcriptional activator and its role in cell migration. *Genomics*. 2015;105:108-15.
121. Margueron R, Reinberg D. The polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*. 2011;469:343-9.
122. Hobert O, Jallal B, Ullrich A. Interaction of Vav with ENX-1, a putative transcriptional regulator of homeobox gene expression. *Mol Cell Biol*. 1996;16:3066-73.
123. Cardoso C, Mignon C, Hetet G, Grandchamps B, Fontes M, Colleaux L. The human *EZH2* gene: genomic organisation and revised mapping in 7q35 within the critical region for malignant myeloid disorders. *Eur J Hum Genet* 2000;8:174-80.
124. Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J*. 2003;22:5323-5.
125. Grzenda A, Lomberg G, Svingen P, Mathison A, Calvo E, Iovanna J i sur. Functional characterization of EZH2 β reveals the increased complexity of EZH2 isoforms involved in the regulation of mammalian gene expression. *Epigenetics Chromatin*. 2013;6:3. doi: 10.1186/1756-8935-6-3. Pristupljeno 04.04.2014.
126. Guglielmelli P, Biamonte F, Score J, Hidalgo-Curtis C, Cervantes F, Maffioli M i sur. EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood*. 2011;118:5227-34.
127. Abel KJ, Brody LC, Valdes JM, Erdos MR, McKinley DR, Castilla LH i sur. Characterization of EZH1, a human homolog of Drosophila Enhancer of Zeste near BRCA1. *Genomics*. 1996;37:161–71.
128. Margueron R, Li G, Sarma K, Zavadil J, Woodcock CL, Dynlacht BD i sur. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell*. 2008;32:503-18.
129. Morin RD, Johnson NA, Severson TN, Mungall AJ, An J, Goya R i sur. Somatic mutation of EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal center origin. *Nat Genet*. 2010;42:181-5.
130. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP i sur. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*. 2012;150:251-63.
131. McCabe MT, Graves AP, Ganji G, Diaz E, Halsey WS, Jiang Y i sur. Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:2989-94.

-
132. Majer CR, Jin L, Scott MP, Knutson SK, Kuntz KW, Keilhack H i sur. A687V EZH2 is a gain-of-function mutation found in lymphoma patients. *FEBS Lett.* 2012;586:3448-51.
133. Sneeringer CJ, Porter Scott M, Kuntz KW, Knutson SK, Pollock RM, Richon VM i sur. Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:20980-5.
134. Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV i sur. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet.* 2010;42:722–6.
135. Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, Knops R, Massop M, Tönnissen ER i sur. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 2010;42:665–7.
136. Chase A, Cross NCP. Aberrations of *EZH2* in cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17:2613-8.
137. Khan SN, Jankowska AM, Mahfouz R, Dunbar AJ, Sugimoto Y, Hosono N i sur. Multiple mechanisms deregulate EZH2 and histone H3 lysine 27 epigenetic changes in myeloid malignancies. *Leukemia.* 2013;27:1301-9.
138. Mochizuki-Kashio M, Aoyama K, Sashida G, Oshima M, Tomioka T, Muto T i sur. Ezh2 loss in hematopoietic stem cells predisposes mice to develop heterogeneous malignancies in an Ezh1-dependent manner. *Blood.* 2015;126:1172-83.
139. Cha TL, Zhou BP, Xia W, Wu Y, Yang CC, Chen CT i sur. Akt-mediated phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of lysine 27 in histone H3. *Science.* 2005;310:306-10.
140. Kikuchi J, Koyama D, Wada T, Izumi T, Hofgaard PO, Bogen B i sur. Phosphorylation-mediated EZH2 inactivation promotes drug resistance in multiple myeloma. *J Clin Invest.* 2015;125:4375-90.
141. Kim E, Kim M, Woo DH, Shin Y, Shin J, Chang N i sur. Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Cancer Cell.* 2013;23:839-52.
142. Chen S, Bohrer LR, Rai AN, Pan Y, Gan L, Zhou X i sur. Cyclin-dependent kinases regulate epigenetic gene silencing through phosphorylation of EZH2. *Nat Cell Biol.* 2010;12:1108-14.

-
143. Kaneko S, Li G, Son J, Xu CF, Margueron R, Neubert TA i sur. Phosphorylation of the PRC2 component Ezh2 is cell cycle-regulated and upregulates its binding to ncRNA. *Genes Dev.* 2010;24:2615–20.
144. Ma YB, Song DW, Nie RH, Mu GY. MicroRNA-32 functions as a tumor suppressor and directly targets EZH2 in uveal melanoma. *Genet Mol Res.* 2016;15. doi: 10.4238/gmr.15027935. Pristupljeno 02.10.2016.
145. Zhang Y, Lin C, Liao G, Liu S, Ding J, Tang F i sur. MicroRNA-506 suppresses tumor proliferation and metastasis in colon cancer by directly targeting the oncogene EZH2. *Oncotarget.* 2015;6:32586-601.
146. Varambally S, Cao Q, Mani RS, Shankar S, Wang X, Ateeq B i sur. Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science.* 2008;322:1695-9.
147. Wang P, Li Z, Liu H, Zhou D, Fu A, Zhang E. MicroRNA-126 increases chemosensitivity in drug-resistant gastric cancer cells by targeting EZH2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;479:91-6.
148. Aoto T, Saitoh N, Sakamoto Y, Watanabe S, Nakao M. Polycomb group protein-associated chromatin is reproduced in post-mitotic G1 phase and is required for S phase progression. *J Biol Chem.* 2008;283:18905-15.
149. Su I, Dobenecker MW, Dickinson E, Oser M, Basavaraj A, Marqueron R i sur. Polycomb group protein EZH2 controls actin polymerization and cell signaling. *Cell* 2005;121:425-36.
150. Gunawan M, Venkatesan N, Loh JT, Wong JF, Berger H, Neo WH i sur. The methyltransferase Ezh2 controls cell adhesion and migration through direct methylation of the extranuclear regulatory protein talin. *Nat Immunol.* 2015;16:505-16.
151. Loh JT, Su IH. Post-translational modification-regulated leukocyte adhesion and migration. *Oncotarget.* 2016;7:37347-60.
152. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J i sur. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell.* 2006;125:315-26.
153. Kassis JA, Brown JL. Polycomb group response elements in Drosophila and vertebrates. *Adv Genet.* 2013;81:83-118.
154. Kim H, Kang K, Kim J. AEBP2 as a potential targeting protein for polycomb repression complex PRC2. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:2940-50.

-
155. Li G, Margueron R, Ku M, Chambon P, Bernstein BE, Reinberg D. Jarid2 and PRC2, partners in regulating gene expression. *Genes Dev.* 2010;24:368-80.
156. Song J-J, Garlick JD, Kingston RE. Structural basis of histone H4 recognition by p55. *Genes Dev.* 2008;22:1313-8.
157. Kondo Y, Shen L, Cheng AS, Ahmed S, Bumber Y, Charo C i sur. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat Genet.* 2008;40:741-50.
158. Blackledge NP, Farcas AM, Kondo T, King HW, McGouran JF, Hanssen LL i sur. Variant PRC1 complex-dependent H2A ubiquitylation drives PRC2 recruitment and polycomb domain formation. *Cell.* 2014;157:1445-59.
159. Cooper S, Dienstbier M, Hassan R, Schermelleh L, Sharif J, Blackledge NP i sur. Targeting polycomb to pericentric heterochromatin in embryonic stem cells reveals a role for H2AK119u1 in PRC2 recruitment. *Cell Rep.* 2014;7:1456-70.
160. Sarma K, Cifuentes-Rojas C, Ergun A, Del Rosario A, Jeon Y, White F i sur. ATRX directs binding of PRC2 to Xist RNA and polycomb targets. *Cell.* 2014;159:869-83.
161. San B, Chrispijn ND, Wittkopp N, van Heeringen SJ, Lagendijk AK, Aben M i sur. Normal formation of a vertebrate body plan and loss of tissue maintenance in the absence of ezh2. *Sci Rep.* 2016;6:24658. doi: 10.1038/srep24658 Pristupljeno 01.12.2016.
162. O'Carroll D, Erhardt S, Pagani M, Barton SC, Surani MA, Jenuwein T. The polycomb-group gene *Ezh2* is required for early mouse development. *Mol Cell Biol.* 2001;21:4330-6.
163. Pasini D, Bracken AP, Jensen MR, Lazzerini Denchi E, Helin K. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *EMBO J.* 2004;23:4061-71.
164. Takeuchi T, Yamazaki Y, Katoh-Fukui Y, Tsuchiya R, Kondo S, Motoyama J, Higashinakagawa T. Gene trap capture of a novel mouse gene, *Jumonji*, required for neural tube formation. *Genes Dev.* 1995;9:1211-22.
165. Yamaguchi H, Hung MC. Regulation and roll of EZH2 in cancer. *Cancer Res Treat.* 2014;46:209-22.
166. Chang CJ, Yang JY, Xia W, Chen CT, Xie X, Chao CH i sur. EZH2 promotes expansion of breast tumor initiating cells through activation of RAF1- β -catenin signaling. *Cancer Cell.* 2011;19:86-100.
167. Marchesi I, Bagella L. Targeting Enhancer of Zeste Homolog 2 as a promising strategy for cancer treatment. *World J Clin Oncol.* 2016;7:135-48.

-
168. Koh CM, Iwata T, Zheng Q, Bethel C, Yegnasubramanian S, De Marzo AM. Myc enforces overexpression of EZH2 in early prostatic neoplasia *via* transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Oncotarget*. 2011;2:669-83.
169. Zhang X, Zhao X, Fiskus W, Lin J, Lwin T, Rao R i sur. Coordinated silencing of MYC-mediated miR-29 by HDAC3 and EZH2 as a therapeutic target of histone modification in aggressive B-cell lymphomas. *Cancer Cell*. 2012;22:506-23.
170. Suvà ML, Riggi N, Janiszewska M, Radovanovic I, Provero P, Stehle JC i sur. EZH2 is essential for glioblastoma cancer stem cell maintenance. *Cancer Res*. 2009;69:9211-8.
171. Holland D1, Hoppe-Seyler K, Schuller B, Lohrey C, Maroldt J, Dürst M, i sur. Activation of the Enhancer of Zeste Homologue 2 gene by the Human Papillomavirus E7 oncoprotein. *Cancer REs*. 2008;68:9964-72.
172. Li Z, Xu L, Tang N, Xu Y, Ye X, Shen S i sur. The polycomb group protein EZH2 inhibits lung cancer cell growth by repressing the transcription factor Nrf2. *FEBS Lett* 2014; 588: 3000-7.
173. Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem*. 2015;266:11632-9.
174. DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ, Gopinathan A, Wei C, Frese K i sur. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature*. 2011;475:106-9.
175. DeNicola GM, Chen PH, Mullarky E, Sudderth JA, Hu Z, Wu D i sur. NRF2 regulates serine biosynthesis in non-small cell lung cancer. *Nat Genet*. 2015;47:1475-81.
176. Cao W, Younis RH, Li J, Xia R, Mao L, Chen W i sur. EZH2 promotes malignant phenotypes and is a predictor of oral cancer development in patients with oral leukoplakia. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011;4:1816-24.
177. Cao W, Fng Z, Cui Z, Zhang C, Sun Z, Mao L i sur. Up-regulation of enhancer of zeste homolog 2 is associated positively with cyclin D1 overexpression and poor clinical outcome in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2012;118:2858-71.
178. Wang C, Liu X, Chen Z, Huang H, Jin Y, Kolokythas A i sur. Polycomb group protein EZH2-mediated E-chaderin repression promotes metastasis of oral tongue squamous cell carcinoma. *Mol Carcinog*. 2013;52:229-36.

-
179. Tong ZT, Cai MY, Wang XG, Kong LL, Mai SJ, Liu YH i sur. EZH2 supports nasopharyngeal carcinoma cell aggressiveness by forming a co-repressor complex with HDAC1/HDAC2 and Snail to inhibit E-cadherin. *Oncogene*. 2012;31:583-94.
180. Li Z, Wang Y, Qiu J, Li Q, Yuan C, Zhang W i sur. The polycomb group protein EZH2 is a novel therapeutic target in tongue cancer. *Oncotarget*. 2013;4:2532-49.
181. Zhou X, Ren Y, Kong L, Cai G, Sun S, Song W i sur. Targeting EZH2 regulates tumor growth and apoptosis through modulating mitochondria dependent cell-death pathway in HNSCC. *Oncotarget*. 2015;6:33720-32.
182. Alajez NM, Shi W, Hui AB, Bruce J, Lenarduzzi M, Ito E i sur. Enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2) is overexpressed in recurrent nasopharyngeal carcinoma and is regulated by miR-26a, miR-101, and miR-98. *Cell Death Dis* 2010;1:e85. doi: 10.1038/cddis.2010.64. *Pristupljeno*: 14.09.2013.
183. Lu J, He ML, Wang L, Chen Y, Liu X, Dong Q i sur. MiR-26a inhibits cell growth and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma through repression of EZH2. *Cancer Res*. 2011;71:225-33.
184. Yu L, Lu J, Zhang B, Liu X, Wang L, Li SY, Peng XH i sur. miR-26a inhibits invasion and metastasis of nasopharyngeal cancer by targeting EZH2. *Oncol Lett* 2013;5:1222-8.
185. Yan M, Zhang Y, He B, Xiang J, Wang ZF, Zheng FM. IKK α restoration via EZH2 suppression induces nasopharyngeal carcinoma differentiation. *Nat Commun*. 2014;5:3661. doi: 10.1038/ncomms4661. *Pristupljeno*: 16.09.2013.
186. Kim KH, Kim L, Choi SJ, Han JY, Kim JM, Chu YC i sur. The clinicopathological significance of epithelial mesenchymal transition associated protein expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Korean J Pathol*. 2014;48:263-9.
187. Chang JW, Gwank SY, Shim GA, Liu L, Lim YC, Kim JM i sur. EZH2 is associated with poor prognosis in head-and-neck squamous cell carcinoma via regulating the epithelial-to-mesenchymal transition and chemosensitivity. *Oral Oncol*. 2016; 52:66-74.
188. Huang Y, Wang X, Niu X, Wang X, Jiang R, Xu T i sur. EZH2 suppresses the nucleotide excision repair in nasopharyngeal carcinoma by silencing XPA gene. *Mol Carcinog*. 2017; 56:447-63.
189. Huang J, Zhou L, Chen H, Wu C, Duo 1, Zhang Y. EZH2 is overexpressed in laryngeal squamous cell carcinoma and enhances the stem-like properties of AMC-HN-8 cells. *Oncol Lett*. 2016;12:837-46.

-
190. Liu M, Scanlon CS, Banerjee R, Russo N, Inglehart RC, Willis AL i sur. The histone methyltransferase EZH2 mediates tumor progression on the chick chorioallantoic membrane assay, a novel model of head and neck squamous cell carcinoma. *Trans Oncol.* 2013;6:273-81.
191. Banerjee R, Mani RS, Russo N, Scanlon CS, Tsodikov A, Jing X i sur. The tumor suppressor gene RAP1GAP is silenced by miR-101-mediated EZH2 overexpression in invasive squamous cell carcinoma. *Oncogene.* 2011 30:4339-49.
192. Luo H, Jiang Y, Ma S, Chang H, Yi C, Cao H, Gao Y, Guo H, Hou J, Yan J, Sheng Y, Ren X6. EZH2 promotes invasion and metastasis of laryngeal squamous cells carcinoma via epithelial-mesenchymal transition through H3K27me3. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;479:253-9.
193. Xin Y, Lu Q, Li Q. IKK1 control of epidermal differentiation is modulated by Notch signaling. *Am J Pathol.* 2011;178:1568-77.
194. Bannister AJ, Schneider R, Kouzarides T. Histone methylation: dynamic or static? *Cell.* 2002;109:801-6.
195. Xiang Y, Zhu Z, Han G, Lin H, Xu L, Chen CD. JMJD3 is a histone H3K27 demethylase. *Cell Res.* 2007;17:850-7.
196. Labbe RM, Holowatyj A, Yang ZQ. Histone lysine demethylase (KDM) subfamily 4: structures, functions and therapeutic potential. *Am J Transl Res.* 2013;6:1-15.
197. Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, i sur. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell.* 2004;119:941-53.
198. Klose RJ, Yamane K, Bae Y, Zhang D, Erdjument-Bromage H, Tempst P i sur. The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature.* 2006;442:312-6.
199. Kampranis SC, Tschlis PN. Histone demethylases and cancer. *Adv Cancer Res.* 2009;102:103-69.
200. Arcipowski KM, Martinez CA, Ntziachristos P. Histone demethylases in physiology and cancer: a tale of two enzymes, JMJD3 and UTX. *Curr Opin Genet Dev.* 2016;36:59-67.
201. Hong SH, Cho YW, Yu LR, Yu H, Veenstra TD, Ge K. Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:18439-44.

-
202. De Santa F, Totaro MG, Prosperini E, Notarbartolo S, Testa G, Natoli G: The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell*. 2007;130:1083-94.
203. Anderton JA, Bose S, Vockerodt M, Vrzalikova K, Wei W, Kuo M i sur. The H3K27me3 demethylase, KDM6B, is induced by Epstein-Barr virus and over-expressed in Hodgkin's lymphoma. *Oncogene*. 2011;30:2037-43.
204. Walport LJ, Hopkinson RJ, Vollmar M, Madden SK, Gileadi C, Oppermann U i sur.: Human UTY (KDM6C) is a male-specific N-epsilon-methyl lysyl demethylase. *J Biol Chem*. 2014;289:18302-13.
205. Manna S, Kim JK, Baugé C, Cam M, Zhao Y, Shetty J i sur. Histone H3 lysine 27 demethylases Jmjd3 and Utx are required for T-cell differentiation. *Nat Commun*. 2015;6:8152. doi: 10.1038/ncomms9152.
206. Zhao W, Li Q, Ayers S, Gu Y, Shi Z, Zhu Q i sur. Jmjd3 inhibits reprogramming by upregulating expression of INK4a/Arf and targeting PHF20 for ubiquitination. *Cell*. 2013;152:1037-50.
207. Kim WY, Sharpless NE. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* 2006;127:265-75.
208. Agger K, Cloos PA, Rudkjaer L, Williams K, Andersen G, Christensen J, i sur. The H3K27me3 demethylase JMJD3 contributes to the activation of the INK4A-ARF locus in response to oncogene- and stress-induced senescence. *Genes Dev*. 2009;23:1171-6.
209. Ntziachristos P, Tsirigos A, Welstead GG, Trimarchi T, Bakogianni S, Xu L i sur. Contrasting roles of histone 3 lysine 27 demethylases in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2014;514:513-7.
210. De Santa F, Narang V, Yap ZH, Tusi BK, Burgold T, Austenaa L i sur. Jmjd3 contributes to the control of gene expression in LPS-activated macrophages. *EMBO J*. 2009;28:3341-52.
211. Cousin, P, Billotte J, Chaubert P, Shaw P. Physical map of 17p13 and the genes adjacent to TP53. *Genomics*. 2000;63:60-8.
212. Hong S, Cho YW, Yu LR, Yu H, Veenstra TD, Ge K. Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:18439-44.

-
213. Shen Y, Guo X, Wang Y, Qiu W, Chang Y, Zhang A i sur. Expression and significance of histone H3K27 demethylases in renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 2012;12:470. doi: 10.1186/1471-2407-12-470.
214. Kamikawa YF, Donohoe ME. The localization of histone H3K27me3 demethylase Jmjd3 is dynamically regulated. *Epigenetics*. 2014;9:834-41.
- 215 Tokunaga R, Sakamoto Y, Nakagawa S, Miyake K, Izumi D, Kosumi K i sur. The prognostic significance of histone lysine demethylase JMJD3/KDM6B in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2016;23:678-85.
216. Daures M, Ngollo M, Judes G, Rifaï K, Kemeny JL, Penault-Llorca F, i sur. The JMJD3 histone demethylase and the EZH2 histone methyltransferase in prostate cancer. *OMICS*. 2016;20:123-5.
217. Pereira F, Barbachano A, Silva J, Bonilla F, Campbell MJ, Muñoz A i sur. KDM6B/JMJD3 histone demethylase is induced by vitamin D and modulates its effects in colon cancer cells. *Hum Mol Genet*. 2011;20:5655-65.
218. Ramadoss S, Chen X, Wang CY. Histone demethylase KDM6B promotes epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2012; 287:44508-17.
219. McLaughlin-Drubin ME, Crum CP, Munger K. Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:2130-5.
220. Williams K, Christensen J, Rappsilber J, Nielsen AL, Johansen JV, Helin K. The histone lysine demethylase JMJD3/KDM6B is recruited to p53 bound promoters and enhancer elements in a p53 dependent manner. *PLoS One*. 2014;9:e96545. doi: 10.1371/journal.pone.0096545. Pristupljeno: 13.05. 2015.
221. Ene CI, Edwards L, Riddick G, Baysan M, Woolard K, Kotliarova S i sur. Histone demethylase Jumonji D3 (JMJD3) as a tumor suppressor by regulating p53 protein nuclear stabilization. *PLoS One*. 2012;7:e51407. doi: 10.1371/journal.pone.0051407. Pristupljeno: 13.05. 2015.
222. Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992;358:15-6.
223. Vousden KH. p53: death star. *Cell*. 2000;103:691-4.
224. Shrapless NE, DePhino RA. P53 good cop/bad cop. *Cell*. 2002;110:9-12.
225. Aylon Y, Oren M. The paradox of p53: what, how, and why? *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6. doi: 10.1101/cshperspect.a026328.

-
226. M. Oren. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ.* 2003;10:431-42.
227. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells. *Nature.* 1979;278:261-3.
228. Finlay CA, Hinds PW, Eliyahu S. The p53 protooncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell.* 1989;57:1083-93.
229. Koshland DE Jr. Molecule of the year. *Science.* 1993;262:1953.
230. El-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler Kw, Vogelstein B. Definition of consensus binding site for p53. *Nat Genet.* 1992;1:45-9.
231. Hainaut P, Pfeifer GP. Somatic TP53 mutations in the era of genome sequencing. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6. doi: 10.1101/cshperspect.a026179. Pristupljeno 15.11.2016.
232. Courtois S, Verhaegh G, North S, Luciani MG, Lassus P, Hibner U i sur. Delta N-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53. *Oncogene.* 2002;21:6722-8.
233. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157>. Pristupljeno: 01.10.2016.
234. Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, i sur. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev.* 2005;19: 2122–37.
235. Marcel V, Perrier S, Aoubala M, Ageorges S, Groves MJ, Diot A i sur. Delta 160TP53 is a novel N-terminal TP53 isoform encoded by Delta133p53 transcript. *FEBS Lett.* 2010;584:4463-8.
236. Marcel V, Dichtel-Danjoy ML, Sagne C, Hafsi H, Ma D, Ortiz-Cuaran S i sur. Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models. *Cell Death Diff.* 2011;18:1815–24.
237. Harms KL, Chen X. The C terminus of TP53 proteins is a cell fate determinant. *Mol Cell Biol.* 2005;25:2014-30.
238. Zorić A, Horvat A, Slade N. Obitelj gena P53 – uloga u razvoju organizma i tumorigenezi. *Medicina fluminensis.* 2010;46:135-43.
239. Mahmoudi S, Henriksson S, Corcoran M, Méndez-Vidal C, Wiman KG, Farnebo M. Wrap53p53, a natural p53 antisense transcript required for p53 induction upon DNA damage. *Mol Cell.* 2009;33:462-71.
240. Boldrup L, Bourdon JC, Coates PJ, Sojstrom B, Nylander K. Expression of p53 isoforms in squamous cell carcinoma of head and neck. *Eur J Cancer.* 2007;43:617-23.

-
241. Khoury MP, Bourdon JC. P53 isoforms: An intracellular microprocessor? *Genes Cancer*. 2011;4:453-65.
242. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A i sur. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*. 1997;90:809-19.
243. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V i sur. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*. 1998;2:305-16.
244. George J, Lim JS, Jang SJ, Cun Y, Ozretić L, Kong G i sur. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*. 2015;524:47-53.
245. Chan I, McGrath JA, Kivirikko S. Rapp-Hodgkin syndrome and the tail of p63. *Clin Exp Dermatol*. 2005;30:183-6.
246. Rinne T, Spadoni E, Kjaer KW, Danesino C, Larizza D, Kock M i sur. Delineation of the ADULT syndrome phenotype due to arginine 298 mutations of the p63 gene. *Eur J Hum Genet*. 2006;14:904-10.
247. Monti P, Campomenosi P, Ciribilli Y, Iannone R, Inga A, Abbondandolo A, i sur. Tumour p53 mutations exhibit promoter selective dominance over wild type p53. *Oncogene*. 2002;21:1641-48.
- 248 Strano S, Fontemaggi G, Costanzo A, Rizzo MG, Monti O, Baccarini A i sur. Physical interaction with human tumor-derived p53 mutants inhibits p63 activities. *J Biol Chem*. 2002;277:18817-26.
249. Monti P, Campomenosi P, Ciribilli Y, Iannone R, Aprile A, Inga A i sur. Characterization of the p53 mutants ability to inhibit p73 beta transactivation using a yeast-based functional assay. *Oncogene*. 2003;22:5252-60.
250. Billant O, Léon A, Le Guellec S, Friocourt G, Blondel M, Voisset C. The dominant-negative interplay between p53, p63 and p73: A family affair. *Oncotarget*. 2016. doi: 10.18632/oncotarget.11774 Pristupljeno: 05.10.2016.
251. <http://p53.iarc.fr/slectedstatistics.aspx> Pristupljeno: 10.12.2016.
252. Li FP, Fraumeni JF. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms: a familial syndrome? *Ann Intern Med*. 1969;71:747-52.
253. Malkin D. Li-Fraumeni syndrome. *Genes Cancer*. 2011;2:475-84.
254. Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Important milestone at various steps of tumorigenesis. *Genes cancer*. 2011;2:4666-74.

-
255. Miller C, Mohandas T, Wolf D, Prokocimer M, Rotter V, Koeffler HP. Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. *Nature* 1986;319:783-4.
256. Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M. Mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J* 1993; 12:461-8.
257. Nie L, Sasaki M, Maki CG. Regulation of p53 nuclear export through sequential changes in conformation and ubiquitination. *J. Biol. Chem.* 2007;282:14616-25.
258. Kruse JP, Gu W. Modes of p53 regulation. *Cell.* 2009;137:609–22.
259. Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell.* 1997;91:325–34.
260. Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, et al. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science.* 2000;287:1824–7.
261. Teufel DP, Bycroft M, Fersht AR. Regulation by phosphorylation of the relative affinities of the N-terminal transactivation domains of p53 for p300 domains and Mdm2. *Oncogene.* 2009;28:2112–8.
262. Sakaguchi K, Sakamoto H, Lewis MS, Anderson CW, Erickson JW, Appella E, et al. Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry.* 1997;36:10117–24.
263. Poon GM, Brokx RD, Sung M, Gariépy J. Tandem dimerization of the human p53 tetramerization domain stabilizes a primary dimer intermediate and dramatically enhances its oligomeric stability. *J Mol Biol.* 2007;365:1217–31.
264. Li M, Luo J, Brooks CL, Gu W. Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J Biol Chem.* 2000;277:50607–11.
265. Dai C, Gu W. p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol Med.* 2010; 16:528-36.
266. Meek DW, Knippschild U. Posttranslational modification of MDM2. *Mol Cancer Res.* 2003;1:1017–26.
267. He C, Li L, Guan X, Xiong L, Miao X. Mutant p53 gain of function and chemoresistance: the role of mutant p53 in response to clinical chemotherapy. *Chemotherapy.* 2016;62:43-53.
268. Ozaki T, Nakagawara A. p53: the attractive tumor suppressor in the cancer research field. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011: 603925. doi: 10.1155/2011/603925. Pristupljeno: 12.09.2012.

-
269. Suzuki K, Matsubara H. Recent advances in p53 research and cancer treatment. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:978312. doi: 10.1155/2011/978312.
270. Maddocks OD, Vousden KH. Metabolic regulation by p53. *J Mol Med.* 2011;89:237-45.
271. Laptenko O, Beckerman R, Freulich E, Prives C. P53 binding to nucleosomes within the p21 promoter *in vivo* leads to nucleosome loss and transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:10385-90.
272. Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:8493-7.
273. Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene.* 2001;20:1803-15.
274. Peltonen JK, Vahakanqas KH, Helppi HM, Bloigu R, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Specific TTP53 mutations predict aggressive phenotype in head and neck squamous cell carcinoma: a retrospective archival study. *Head Neck Oncol.* 2011;3:20. doi: 10.1186/1785-3284-3-20. Pristupljeno: 14.09.2012.
275. Blons H, Laurent-Puig P. TP53 and head and neck neoplasms. *Hum Mut.* 2003;21: 252-7.
276. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* 2002; 21:7435-51.
277. Brennan JA; Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ i sur. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 1995; 332:712-7.
278. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 1993;75:495-505.
279. Suvarna M, Lalith prakash Chandra K, Chadra Sekhar P, Reddy BVR. HPV induced head and neck cancer- an insight into the molecular pathogenesis. *J Orolfac Sci.* 2010;2:71-6.
280. Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N, Califano JA i sur. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2007;357:2552-61.
281. Maruyama H, Yasui T, Ishikawa-Fujiwara T, Morii E, Yamamoto Y, Yoshii T i sur. Human papillomavirus and p53 mutations in head and neck squamous cell carcinoma among

Japanese population. *Cancer Sci.* 2014;105: 409-17. doi: 10.1111/cas.12369. Pristupljeno: 16.02.2015.

282. Sang-Hyuk Lee SH, Lee NH, Jin SM, Rho YS, Jo SJ. Loss of heterozygosity of tumor suppressor genes (p16, RB, E-cadherin, p53) in hypopharynx squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011;145:64-70.

283. Livak KJ1, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))}. *Methods.* 2001;402-8.

284. Ge N, Lin HX, Xiao XS, Guo L, Xu HM, Wang X, i sur. . Prognostic significance of Oct4 and Sox2 expression in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *J Transl Med.* 2010;8:94.

285. Zelterman D. *Applied Linear Models With SAS.* Cambridge, Cambridge University Press, 2010.

286. Therneau T, Atkinson B, Ripley B.r (2015). *rpart: Recursive Partitioning and Regression Trees.* R package version 4.1-10. URL <https://CRAN.R-project.org/package=rpart>

287. R Core Team (2016). *R: A language and environment for statistical computing.* R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
rpart

288. Zhou G, Liu Z, Myers JN. TP53 mutations in head and neck squamous cell carcinoma and their impact on disease progression and treatment response. *J Cell Biochem.* 2016;117:2682-92.

289. Wahlberg PC, Andersson KE, Björklund AT, Möller TR. Carcinoma of the hypopharynx: analysis of incidence and survival in Sweden over a 30-year period. *Head Neck.* 1998;20:714-9.

290. Koch WM, Ridge JA, Forastiere A, Manola J. Comparison of clinical and pathological staging in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009;135:851–8.

291. Lee CC, Ho HC, Su YC, Yu CH, Yang CC. Modified tumor classification with inclusion of tumor characteristics improves discrimination and prediction accuracy in oral and hypopharyngeal cancer patients who underwent surgery. *Medicine (Baltimore).* 2015;94: e1114. doi: 10.1097/MD.0000000000001114. Pristupljeno 20.01.2016.

292. Johansen LV, Grau C, Overgaard J. Hypopharyngeal squamous cell carcinoma--treatment results in 138 consecutively admitted patients. *Acta Oncol.* 2000;39:529-36.

-
293. Xing Y, Zhang J, Lin H, Gold KA, Sturgis EM, Garden AS, Lee JJ, William WN Jr. Relation between the level of lymph node metastasis and survival in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2016;122:534-45.
294. Holm K, Grabau D, Lövgren K, Aradottir S, Gruvberger-Saal S, Howlin J i sur. Global H3K27 trimethylation and EZH2 abundance in breast tumor subtypes. *Mol Oncol*. 2012;6:494-506.
295. Bae WK, Yoo KH, Lee JS, Kim Y, Chung IJ, Park MH, i sur. The methyltransferase EZH2 is not required for mammary cancer development, although high EZH2 and low H3K27me3 correlate with poor prognosis of ER-positive breast cancers. *Mol Carcinogenesis*. 2015;54:1172-80.
296. Wassef M, Rodilla V, Teissandier A, Zeitouni B, Gruel N, Sadacca B, i sur. Impaired PRC2 activity promotes transcriptional instability and favors breast tumorigenesis. *Genes Dev*. 2015;29:2547–62.
297. Melling N, Thomsen E, Tsourlakis MC, Kluth M, Hube-Magg C, Minner S, i sur. Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) characterizes an aggressive subset of prostate cancers and predicts patient prognosis independently from pre- and postoperatively assessed clinicopathological parameters. *Carcinogenesis*. 2015;36:1333-40.
298. Gunduz M, Beder LB, Gunduz E, Nagatsuka H, Fukushima K, Pehlivan D, i sur. Downregulation of ING3 mRNA expression predicts poor prognosis in head and neck cancer. *Cancer Sci*. 2008;99:531-8.
299. Nair J, Jain P, Chandola U, Palve V, Vardhan NR, Reddy RB i sur. Gene and miRNA expression changes in squamous cell carcinoma of larynx and hypopharynx. *Genes Cancer*. 2015;6:328-40.
300. Yang B, O'Herrin SM, Wu J, Reagan-Shaw S, Ma Y, Bhat KM, i sur. MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines. *Cancer Res*. 2007;67:9954–62.
301. Wang X, Zhao H1, Lv L1, Bao L1, Wang X1, Han S. Prognostic significance of EZH2 expression in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Sci Rep*. 2016;6:19239. doi: 10.1038/srep19239. Pristupljeno 02.11.2016.
302. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, i sur. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science*. 2011;333:1157-60.

-
303. Pfeifer GP, Hainaut P. On the origin of G --> T transversions in lung cancer. *Mutat Res.* 2003;526:39-43.
304. Murnyák B, Hortobágyi T. Immunohistochemical correlates of TP53 somatic mutations in cancer. *Oncotarget.* 2016;7:64910-20. doi: 10.18632/oncotarget
305. Erber R, Conradt C, Homann N, Enders C, Finckh M, Dietz A i sur. TTP53 DNA contact mutations are selectively associated with allelic loss and have a strong clinical impact in head and neck cancer. *Oncogene.* 1998;16:1671-9.
306. Alsner J, Sørensen SB, Overgaard J. TP53 mutation is related to poor prognosis after radiotherapy, but not surgery, in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol.* 2001;59:179-85.
307. Cabelguenne A1, Blons H, de Waziers I, Carnot F, Houllier AM, Soussi T, Brasnu D, Beaune P, Laccourreye O, Laurent-Puig P. p53 alterations predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective series. *J Clin Oncol.* 2000;18:1465-73.
308. Wang Y, Xu Y, Chen J, Ouyang T, Li J, Wang T, i sur. TP53 mutations are associated with higher rates of pathologic complete response to anthracycline/cyclophosphamide-based neoadjuvant chemotherapy in operable primary breast cancer. *Int J Cancer.* 2016;138:489-96.
309. Freier CP, Stiasny A, Kuhn C, Mayr D, Alexiou C, Janko C, i sur. Immunohistochemical evaluation of the role of p53 mutation in cervical cancer: Ser-20 p53-mutant correlates with better prognosis. *Anticancer Res.* 2016;36:3131-7.
310. Kyzas PA, Loizou KT, Ioannidis JP. Selective reporting biases in cancer prognostic factor studies. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97:1043–55.
311. Tandon S, Tudur-Smith C, Riley RD, Boyd MT, Jones TM. A systematic review of p53 as a prognostic factor of survival in squamous cell carcinoma of the four main anatomical subsites of the head and neck. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19:574-87.
312. Humpton TJ, Vousden KH. Regulation of cellular metabolism and hypoxia by p53. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6:pii a026146 doi: 10.1101/cshperspect.a026146. Pristupljeno 12.10.2016.
313. Shin DM, Lee JS, Lippman SM, Lee JJ, Tu ZN, Choi G, i sur. p53 expressions: predicting recurrence and second primary tumors in head and neck squamous cell carcinoma *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:519-29.

-
314. Taylor D, Koch WM, Zahurak M, Shah K, Sidransky D, Westra WH. Immunohistochemical detection of p53 protein accumulation in head and neck cancer: correlation with p53 gene alterations. *Hum Pathol.* 1999;30:1221-5.
315. Smith EM, Wang D, Rubenstein LM, Morris WA, Turek LP, Haugen TH. Association between p53 and human papillomavirus in head and neck cancer survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17:421-7.
316. Frank JL, Bur ME, Garb JL, Kay S, Ware JL, Sismanis A, Neifeld JP. p53 tumor suppressor oncogene expression in squamous cell carcinoma of the hypopharynx. *Cancer.* 1994;73:181-6.
317. Park WY, Hong BJ, Lee J, Choi C, Kim MY. H3K27 Demethylase JMJD3 employs the NF- κ B and BMP signaling pathways to modulate the tumor microenvironment and promote melanoma progression and metastasis. *Cancer Res.* 2016;76:161-70
318. Daures M, Ngollo M, Judes G, Rifaï K, Kemeny JL, Penault-Llorca F, i sur. The JMJD3 histone demethylase and the EZH2 histone methyltransferase in prostate cancer. *OMICS.* 2016;20:123-5.
319. https://www.nlm.nih.gov/bsd/bsd_key.htm. Pristupljeno 09.12.2016.

11. ŽIVOTOPIS

Alan Pegan rođen je 1981. u Zagrebu gdje je završio osnovnu školu i gimnaziju. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirao je 2006. Na fakultetu je kao demonstrator sudjelovao u nastavi patologije i interne medicine. Kao student pokazao je interes za znanstveno istraživanje. Nagradjen je Rektorovom nagradom za rad „Utjecaj BPC 157 na tupu ozljedu mišića“.

Nakon završenog pripravničkog staža i položenog državnog ispita 2007. godine započeo je specijalizaciju na Klinici za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata Medicinskog i Stomatološkog fakulteta u KBC „Sestre Milosrdnice“.

Specijalistički ispit položio je 2012. i zatim je primljen u stalni radni odnos kao liječnik specijalist.

Za asistenta na Katedri za otorinolaringologiju Medicinskog fakulteta izabran je 2013. godine. Vodi vježbe, drži seminare i demonstracije u operacijskim dvoranama za studente medicine u dodiplomskoj nastavi, a kao predavač sudjeluje i u postdiplomskoj nastavi.

U središtu njegovog stručnog interesa je kirurgija glave i vrata, a posebno mikrovaskularna kirurgija.

Subspecijalizaciju iz Plastično-rekonstruktivne kirurgije glave i vrata završio je 2016.g.

U svrhu usavršavanja boravio je na vrhunskim ustanovama u Americi i Europi. U Toronto General Hospital boravio je u sklopu „fellowshipa“ 4 mjeseca 2009. godine. Boravio je na sveučilišnim klinikama u Stuttgartu, Leipzigu i Beču.

Objavio je dva znanstvena rada u CC indeksiranim časopisima. Aktivno je sudjelovao u više od 20 međunarodnih i domaćih kongresa i simpozija, te sudjelovao u organizacijskim odborima stručnih i znanstvenih skupova.