# Klinički značaj izraženosti gena BORIS i MYC u karcinomu pločastih stanica hipofarinksa

**Rašić, Ivan**

**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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:667374

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

*Repository / Repozitorij:*

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivan Rašić

# Klinički značaj izraženosti gena BORIS i MYC u karcinomu pločastih stanica hipofarinksa

DISERTACIJA

Zagreb, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivan Rašić

# Klinički značaj izraženosti gena BORIS i MYC u karcinomu pločastih stanica hipofarinksa

DISERTACIJA

Zagreb, 2017.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za epigenomiku Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, na Klinici za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu KBC Sestre milosrdnice te Zavodu za patologiju Ljudevit Jurak u KBC Sestre milosrdnice.

Voditelji rada: Dr. sc. Renata Novak Kujundžić

Prof. dr. sc. Mirko Ivkić

Disertacija ne bi mogla biti moguća bez ideje i provedbe rada za što su zaslužni moji mentori. Posebna zahvala dr. Novak-Kujundžić na svim sugestijama i velikoj strpljivosti prilikom pisanja rada te na uvođenju jednog kliničara u svijet epigenomike. Veliko hvala dr. Pašku Konjevodi na statističkoj obradi podataka te svim starijim i mlađim kolegama na Klinici za ORL i kirurgiju glave i vrata KBC Sestre milosrdnice što su mi davali potporu i bili uvijek “vjetar u leđa”.

Hvala mojim prijateljima i obitelji zbog čega sve ima svoj smisao, svoju vrijednost i svoje puno značenje.

**SADRŽAJ**

1.UVOD

1.1. Karcinom pločastih stanica hipofarinksa 1

1.1.2. Epidemiologija i etiologija karcinoma hipofarinksa 2

1.1.3. Dijagnostička obrada 3

1.1.4. Klasifikacija TNM i određivanje stadijia bolesti u oboljelih od karcinoma hipofarinksa 7

1.1.5. Histološki gradus karcinoma pločastih stanica hipofarinksa 9

1.1.6. Liječenje karcinoma hipofarinksa 10

1.1.7. Prognostički čimbenici 11

1.2. MYC 13

1.2.1. Gen *MYC* 13

1.2.2. Protein MYC 16

1.2.2.1. Stabilnost proteina MYC u stanici 19

1.2.2.2. Protein MYC i karcinogeneza 21

1.3. CTCF 24

1.3.1. Gen *CTCF* 24

1.3.2. Protein CTCF 24

1.3.3. Uloga proteina CTCF u regulaciji transkripcije gena *MYC* 25

1.4. BORIS 29

1.4.1. Gen *BORIS* 29

1.4.2. Protein BORIS 29

2. HIPOTEZA 34

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 35

4. MATERIJALI I METODE 36

4.1. Materijali 36

4.1.1. Bolesnici i uzorci tkiva 36

4.1.2. Kemikalije i puferi 38

4.1.2.1. Izdvajanje ukupne RNA 38
4.1.2.2. Obrnuto prepisivanje (engl. *reverse transcription*) 39
4.1.2.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR) i elektroforeza u gelu agaroze 39
4.1.2.4. Imunohistokemija 40
4.2. Metode 41
4.2.1. Izdvajanje ukupne RNA 41
4.2.2. Obrnuto prepisivanje 41
4.2.3. Određivanje izraženosti gena BORIS 42
4.2.4. Analiza izraženosti proteina BORIS i MYC 43
4.2.5. Statistička analiza podataka 44
5. REZULTATI 46
5.1. Broj ispitanika 46
5.2. Spol ispitanika 46
5.3. Dob ispitanika 46
5.4. Dužina praćenja 47
5.5. Kompletnost praćenja 48
5.6. Analiza izraženosti proteina BORIS 49
5.6.1. Analiza izraženosti proteina BORIS u odnosu na veličinu tumora, zahvaćenost limfnih čvorova i stupanj diferencijacije (gradus) 51
5.7. Analiza izraženosti transkripata gena *BORIS* 53
5.7.1. Analiza izraženost transkripcijske inačice BORISd 54
5.7.1.1.Analiza izraženosti transkripcijsken inačice BORISd u odnosu na veličinu tumora, zahvaćenost limfnih čvorova i stupanj diferencijacije (gradus) 55

5.7.2. Analiza izraženost transkripcijske inačice BORISk 57
5.7.2.1. Analiza izraženosti transkripcijsken inačice BORISk u odnosu na veličinu tumora, zahvaćenost limfnih čvorova i stupanj diferencijacije (gradus) 58
5.8. Analiza izraženosti proteina MYC u jezgri i citoplazmi 60
5.8.1.Izraženost proteina MYC u jezgri 61
5.8.1.1. Analiza izraženosti proteina MYC u jezgri u odnosu na veličinu tumora, zahvaćenost limfnih čvorova i stupanj diferencijacije (gradus) 62
5.8.2.Izraženost proteina MYC u citoplazmi 64
5.8.2.1. Analiza izraženosti proteina MYC u citoplazmi u odnosu na veličinu tumora, zahvaćenost limfnih čvorova i stupanj diferencijacije (gradus) 65
5.9. Patologijski T 67
5.10. Patologijski N 68
5.11. Stupanj diferencijacije - gradus 69
5.12. Klinički T 70
5.13. Klinički N 71
5.14. Multivarijatna analiza 72
5.14.1. rpart 72
5.14.2. party 75
6. RASPRAVA 77
7. ZAKLJUČCI 85
8. SAŽETAK 87
9. ABSTRACT 88
10. POPIS LITERATURE 89
11. ŽIVOTOPIS 112

**POPIS OZNAKA I KRATICA KORIŠTENIH U TEKSTU**

AJCC - Američki zajednički odbor za rak (od engl. *American Joint Committe on Cancer*)

BE - od engl. *Barrier Element*

bHLHzip - od engl. *basic Helix-Loop-Helix leucine zipper*

BORIS - kratica od engl. *Brother Of the Regulator of Imprinted Sites*

CHD8 - od engl. *Chromodomain-Helicase-DNA-binding protein 8*

COX-2 - ciklooksigenaza 2 (od engl. *cyclooxygenase 2*)

CT - kompjuterizirana tomografija (od engl. *Computerized Tomography*)

CTCF - kratica od engl. *CCCTC-binding Factor*

E-box - od engl. *enhancer box*

EGF - od engl. *Epidermal Growth Factor*

FHIT - od engl. *Fragile Histidine Triad*

HDAC - deacetilaza histona (od engl. *Histone Deacetylase*)

Inr - od engl. *initiator*

MAR - od engl. *matrix attachment region*

MINE - izolatorski element gena *MYC* (od engl. *Myc insulator element*)

MR - magnetska rezonanca

mRNA - glasnička ribonukleinska kiselina (od engl. *messenger ribonucleic acid*)

miRNA - nekodirajuća, mala molekula RNA

NCCN - od engl. *National Comprehensive Cancer Network*

NCI - od engl. *National Cancer Institute*

NLS - od engl. *nuclear localization signal*

TNM - klasifikacija proširenosti tumora (od engl. *Tumor, lymph Node metastasis, distant Metastasis*)

UZV - ultrazvuk

# 1. UVOD

## 1.1. Karcinom pločastih stanica hipofarinksa

Ždrijelo je organ gornjeg probavnog i dišnog puta koji se pruža od baze lubanje do ušća u jednjak. Po svojoj građi je mišićno-membranozna cijev duga 12-13 cm. Dijelimo ga u tri dijela, gornji dio (epifarinks ili nazofarinks), srednji dio (mezofarinks ili orofarinks) i donji dio (hipofarinks ili laringofarinks). Sva tri dijela ždrijela komuniciraju s prostorom prema sprijeda i imaju važnu ulogu u fiziologiji gutanja i disanja (aerodigestivno križanje) - zalogaj od ždrijelnoga tjesnaca ždrijelom prolazi u jednjak, a zrak od kohana ždrijelom prolazi u grkljan. Grkljanski dio ždrijela, hipofarinks, povezuje usni dio ždrijela (orofarinks) i jednjak. Topografski zauzima područje od jezične kosti do donjeg ruba prstenaste hrskavice. Hipofarinks je sprijeda omeđen stražnjom plohom prstenaste hrskavice, a nastavlja se iz orofarinksa te seže do vratnog dijela jednjaka. Na prednjoj stijenci se sa svake strane nalazi zaton, *recessus piriformis*, koji nastaje radi različite širine štitne i ostalih grkljanskih hrskavica. Osim navedene podjedinice postoje još dvije: stražnji zid ždrijela i postkrikoidno područje (1).

Tijekom embrionalnog razvoja, hipofarinks se razvija iz 4. i 6. ždrijelnog luka, zajedno s hrskavičnim skeletom grkljana. Ždrijelni lukovi nastaju iz stanica neuralnog grebena, a počinju se razvijati početkom 4. tjedna embrionalnog života (2).

Poput ostalih dijelova gornjeg probavno-dišnog sustava, hipofarinks je obložen sluznicom građenom iz mnogoslojnog pločastog epitela. Sluznica ždrijela sadrži brojne male mukozne žlijezde, smještene unutar sloja gustog vezivnog tkiva (3).

Metaplazija mnogoslojnog pločastog i cilindričnog epitela prethodi karcinomu pločastih stanica, koji se razvija zbog nakupljanja genetskih i epigenetskih promjena uzrokovanih izloženošću kancerogenim utjecajima okoline, združenim sa genetskom sklonošću vezanom uz nedostatke u mehanizmima popravka nastalih oštećenja (4).

Karcinomu pločastih stanica je svojstvena pločasta diferencijacija tumorskih stanica i invazivni rast. Karcinomi ovog anatomskog područja su rijetki, ali uglavnom imaju lošu prognozu zbog kasnog otkrivanja bolesti. Karcinom hipofarinksa je najčešće plosnata tvorba (plak) sa uzdignutim rubovima i površinskom ulceracijom. Često se pojavljuju na više mjesta unutar hipofarinksa i zahvaćaju okolnu sluznicu. Prošireni

karcinom hipofarinksa, sa više žarišta, često površinski zahvaća sluznicu i slabo je diferenciran. Širi se unutar sluznice, ispod intaktnog epitela, u prosjeku 10 mm u piriformnom sinusu i 5 mm u postkrikoidnom području. Tumori, u većini slučajeva, prodiru kroz mišićni sloj do štitne hrskavice, koja je zahvaćena u manjem broju slučajeva. Površinsko širenje karcinoma piriformnog sinusa često uključuje lateralni zid orofarinksa i bazu jezika. Karcinomi piriformnih sinusa često zahvaćaju grkljan i dovode do fiksacije glasnica. Karcinomi stražnje stijenke hipofarinksa su često, prilikom otkrivanja, veliki (u 80% slučajeva >5 cm), i zahvaćaju stražnju stijenku orofarinksa. Karcinomi postkrikoidnog područja imaju sklonost širenja prema naprijed i mogu zahvatiti dušnik kroz krikoidnu hrskavicu ili se proširiti prema jednjaku. Karcinom hipofarinksa može zahvatiti štitnu žlijezdu što je vrlo loš prognostički pokazatelj. Karcinom *in situ* se često nalazi neposredno uz invazivni karcinom. Karcinomi hipofarinksa su obično tipični karcinomi pločastih stanica. Stupanj diferencijacije može biti različit, ali češće su slabo diferencirani karcinomi piriformnih sinusa (4).

Liječenje se planira u skladu sa prihvaćenim kliničkim prognostičkim čimbenicima, uglavnom temeljenim na uznapredovalosti bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze. Vrijednost ovih prognostičkih čimbenika je ograničena jer ne pruža informaciju o biološkom ponašanju tumora niti o njegovoj osjetljivosti na liječenje. Posljedično, usprkos napretku u operativnom tehnikama, metodama radioterapije i kemoterapije, preživljenje bolesnika s ovom bolešću se nije značajno produljilo u posljednjih nekoliko desetljeća (5). Nastanak i razvoj tumora je proces tijekom kojega se svojstva zloćudno promijenjenih stanica i okolnih stanica, na molekularnoj razini, vrlo dinamično mijenjaju. Nužno je bolje razumijevanje hijerarhije tih promjena kako bi se razlučili ključni molekularni biljezi, koji bi mogli pomoći u prevenciji, otkrivanju i planiranju liječenja oboljelih od karcinoma pločastih stanica hipofarinksa.

### 1.1.2. Epidemiologija i etiologija karcinoma hipofarinksa

Karcinom pločastih stanica hipofarinksa je relativno rijetka zloćudna bolest. Iako zloćudni tumori glave i vrata (usne šupljine, larinksa, farinksa, žlijezda slinovnica i nosa) čine oko tri posto svih zloćudnih bolesti u Sjedinjenim Američkim Državama (6), udio karcinoma hipofarinksa je, u ovoj skupini tumora bio 4% u razdoblju od

1990. do 1994. godine, da bi u razdoblju od 2000. do 2004. godine pao na 2.8% (7). Od karcinoma hipofarinksa godišnje u SAD-u oboli 2500 osoba (8).

Prosječna incidencija u svijetu iznosi 1:100 000 stanovnika. Izrazito varira među geografskim regijama, što ukazuje na važnost utjecaja čimbenika okoliša. Incidencija od 2,5:100 000 prisutna je u zemljama poput Brazila, Indije te centralne i zapadne Europe, dok je smanjena incidnecija od 0,5:100 000 pristuna u zemljama istočne Azije, Afrike i sjeverne Europe (9).

Prema Registru za rak Republike Hrvatske Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (10), stopa incidencije karcinoma hipofarinksa na 100 000 stanovnika, u 2013. godini, je bila 4,0 za muškarce i 0,5 za žene. U razdoblju od 2009. do 2013. godine od karcinoma hipofarinksa je u Republici Hrvatskoj oboljelo 483 muškarca i 47 žena.

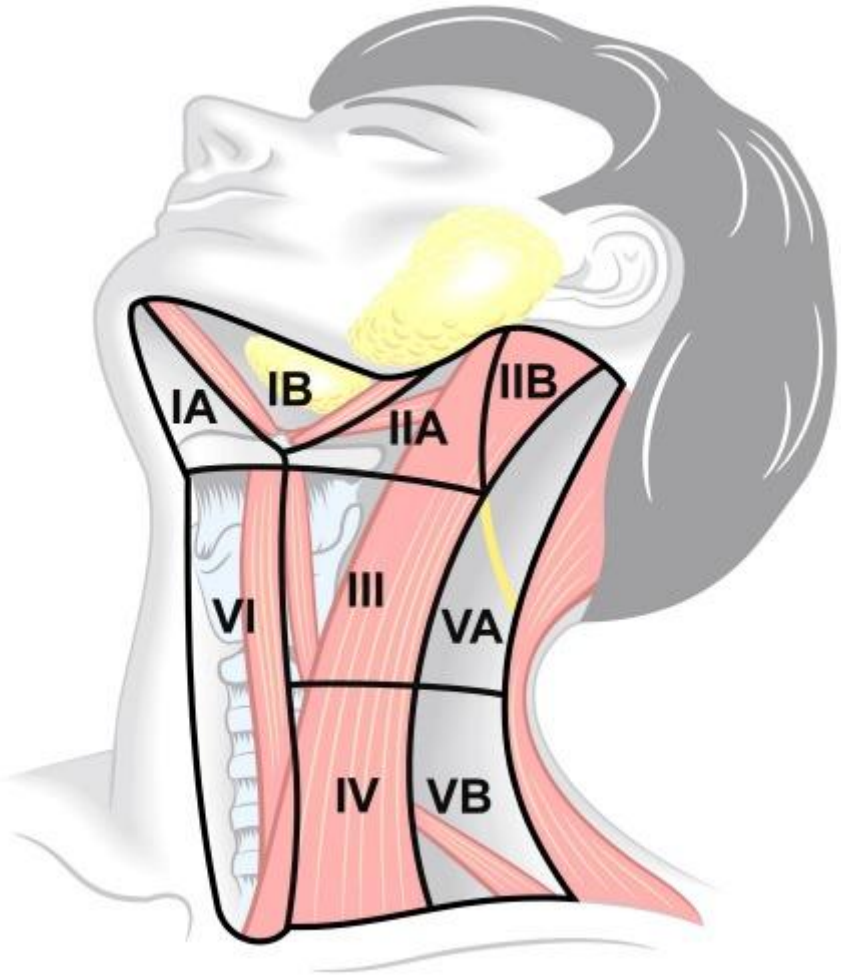
Karcinom hipofarinksa se obično javlja između 50. i 80. godine života, češće u muškaraca. Glavni i dobro istraženi čimbenici rizika su duhanski dim i konzumacija alkohola (9,11,12). Ova dva čimbenika rizika imaju sinergistički učinak, pa je pojavnost karcinoma glave i vrata, uključujući hipofarinks, višestruko veća u pušača koji konzumiraju alkohol (13). Kronična iritacija sluznice ovog anatomskog područja, usljed izloženosti brojnim drugim kancerogenim tvarima iz okoliša, može doprinjeti razvoju karcinoma pločastih stanica (9). Usprkos tome, postoji znatna razlika između broja osoba izloženih čimbenicima rizika i broja osoba u kojih se razvije zloćudna bolest, što ukazuje na važnu ulogu nasljednih čimbenika. Različita osjetljivost na mutagene, temeljena na razlikama u metabolizmu kancerogenih tvari i mehanizmima popravka oštećenja DNA nastalih njihovim djelovanjem, dovodi do razlika u sklonosti oboljevanju od karcinoma glave i vrata (14). Mjerenje razine transkripata gena koji kodiraju proteine uključene u popravak DNA se pokazalo korisnim u određivanju sklonosti razvoju karcinoma pločastih stanica glave i vrata (15,16). Obiteljska povijest karcinoma glave i vrata predstavlja važan čimbenik rizika za nastanak ove bolesti (14,17).

### 1.1.3. Dijagnostička obrada

Zbog svog smještaja, mali tumori hipofarinksa rijetko izazivaju simptome te se često otkrivaju tek u uznapredovalom stadiju. Tumor hipofarinksa manifestira se najčešće

otokom ždrijela i/ili vrata, bolovima u vratu, bolnim i otežanim gutanjem, bolovima u uhu, promjenom boje glasa te otežanim disanjem. Napredovanjem bolesti mijenja se i simptomatologija pa su tako u višim stadijima bolesti oteklina na vratu, promuklost, otežano disanje i bol znaci tumora hipofarinksa (18).

Kliničkim otolaringološkim pregledom se, ukoliko se sumnja na postojanje tumora hipofarinksa, nastoji odrediti vjerojatno anatomsko ishodište bolesti i proširenost. Za postavljanje dijagnoze potrebno je napraviti pregled ultrazvukom uz citološku punkciju i patohistološku analizu uzorka tumora (19). Za procjenu stadija bolesti potrebna je detaljna evaluacija statusa glave i vrata. Pregled otorinolaringologa potrebno je upotpuniti slikovnim metodama kao što su CT (engl. *computerized tomography*), MRI (engl. *magnetic resonance imaging*), koje osim za procjenu primarnog tumora služe i za otkrivanje moguće prisutnog drugog primarnog (sinhronog) tumora u području glave i vrata. Karcinom pločastih stanica hipofarinksa često zahvaća regionalne limfne čvorove te se već kod postavljanja dijagnoze u 60% bolesnika sa tumorom hipofarinksa nalaze pozitivni regionalni limfni čvorovi (20,21). Broj i veličina sumnjivih limfnih čvorova se određuje pregledom ultrazvukom (UZV) te se, pod kontrolom UZV, punktiraju povećani limfni čvorovi. Zbog bogate limfne drenaže, ovi tumori često metastaziraju u regionalne limfne čvorove. Tumori se šire u limfne čvorove postupno, od najbližih do udaljenih, te je njihovo širenje moguće predvidjeti. Limfni čvorovi vrata su, upravo zbog takvog širenja tumora, klasificirani u šest skupina (I-VI) (22). Uz manje modifikacije (23,24) se ova klasifikacija primjenjuje u većini ustanova koje se bave liječenjem tumora glave i vrata.




**Slika 1:** Klasifikacija limfnih čvorova na vratu (prilagođeno iz ref. 24).

Tablica 1: Anatomski smještaj limfnih čvorova vrata

| Razina | Skupina limfnih čvorova | Granice |
|---|---|---|
| IA | Submentalni | Područje između prednjih trbuha dvotrbušnog mišića (*m. digastricus*). |
| IB | Submandibularni | Područje omeđeno prednjim trbuhom dvotrbušnog mišića (*m. digastricus*), stilohioidnim mišićem (*m. stylohyoideus*) i vilicom (*mandibula*). |

| | | |
|---|---|---|
| II | Gornji jugularni limfni čvorovi | Ova skupina uključuje limfne čvorove smještene oko gornje trećine unutarnje jugularne vene (*v. jugularis interna*) i dodatnog živca (*n. accessorius*). Ova skupina limfnih čvorova je smještena u području, s gornje strane omeđenom bazom lubanje, a s donje strane donjim rubom jezične kosti (*os hyoideum*). S prednje strane se ovo područje proteže do stilohioida (*stylohyoideum*), a sa stražnje strane do stražnjeg ruba sternokleidomastoidnog mišića (*m. sternocleidomastoideus*). |
| IIA | | Područje ispred okomite ravnine određene spinalnim dodatnim živcem (*n. accessorius*). |
| IIB | | Područje iza okomite ravnine određene spinalnim dodatnim živcem (*n. accessorius*). |
| III | Srednji jugularni limfni čvorovi | Ova skupina uključuje limfne čvorove smještene oko srednje trećine unutarnje jugularne vene (*v. jugularis interna*) u području koje je, s gornje strane, omeđeno donjim rubom jezične kosti (*os hyoideum*), a s donje strane donjim rubom krikoidne hrskavice. Medijalna granica je lateralni rub sternohioidnog mišića (*m. sternohyoideus*), a lateralna granica je stražnji rub sternokleidomastoidnog mišića (*m. sternocleidomastoideus*). |
| IV | Donji jugularni limfni čvorovi | Ova skupina uključuje limfne čvorove smještene oko donje trećine unutarnje jugularne vene (*v. jugularis interna*) u području koje je, s gornje strane, omeđeno donjim rubom krikoidne hrskavice (*cartilago cricoidea*), a sa donje strane ključnom kosti (*clavicula*). |

| | | |
|---|---|---|
| V | Limfni čvorovi stražnjeg trokuta vrata | Ova skupina uključuje limfne čvorove smještene uzduž donje polovine dodatnog živca (*n. accessorius*) i poprečne vratne arterije (*arteria transversa cervicis*). Ovoj skupini pripadaju i supraklavikularni limfni čvorovi. Ovo područje se, s gornje strane proteže do mjesta gdje se susreću sternokleidomastoidni (*m. sternocleidomastoideus*) i trapezoidni mišić (*m. trapezius*). |
| VA | | Područje iznad vodoravne ravnine određene donjim dijelom krikoidne hrskavice (*cartilago cricoidea*). |
| VB | | Područje ispod vodoravne ravnine određene donjim dijelom krikoidne hrskavice (*cartilago cricoidea*). |
| VI | Limfni čvorovi prednjeg odjeljka vrata | Područje ograničeno, s gornje strane, donji rubom jezične kosti (*os hyoideum*), s donje strane suprasternalna udubina (*fossa jugularis sternalis*), a lateralno karotidnim arterijama (*a. carotis communis dextra et sinistra*). |

Metastaze u limfnim čvorovima su mnogo učestalije kod tumora hipofarinksa nego kod ostalih zloćudnih tumora glave i vrata. Učestalost i raspored širenja tumora su različiti za različita podpodručja hipofarinksa (25).

### 1.1.4. Klasifikacija TNM i određivanje stadijia bolesti u oboljelih od karcinoma hipofarinksa

Veličina primarnog tumora (T) se prema klasifikaciji TNM (26) označava sa:

T1 - mali tumor, ograničen na jednu podjedinicu hipofarinksa, koji u najvećem promjeru nije veći od 2 cm;

T2 - tumor zahvaća više od jedne podjedinice hipofarinksa, ali ne fiksira hemilarinks ili je u najvećem promjeru 2 do 4 cm;

T3 - tumor veći od 4 cm ili tumor koji se proširio na larinks;

T4a - tumor zahvaća okolne strukture (štitna žlijezda, karotidna arterija ili jednjak);

T4b - tumor zahvaća prevertebralnu fasciju, okružuje arterije i proširen je na medijastinum.

Zahvaćenost limfnih čvorova (N) se prema klasifikaciji TNM (26) označava sa:

NX - regionalni limfni čvorovi se ne mogu procijeniti;

N0 - nema znakova širenja tumora u regionalne limfne čvotove;

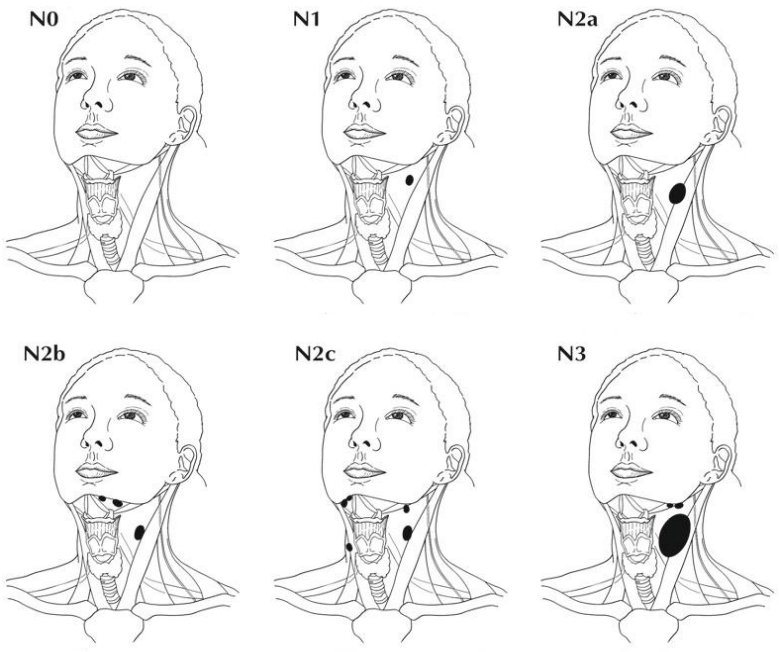
N1 - tumor se proširio u jedan limfni čvor, smješten na istoj strani na kojoj se nalazi primarni tumor (ipsilateralno), i metastaza je manja od 3 cm;

N2a - tumor se proširio u jedan ipsilateralni limfni čvor, a veličine je > 3 cm i ≤ 6 cm;

N2b - metastaze u više ipsilateralnih limfnih čvorova, < 6 cm;

N2c - metastaze u bilateralnim limfnim čvorovima, < 6 cm;

N3 - jedna ili više metastaza u limfni čvor > 6 cm.




**Slika 2:** Klasifikacija limfnih čvorova (prema ref. 27).

Postojanje udaljenih metastaza se prema klasifikaciji TNM (26) označava sa:

MX - postojanje udaljenih metastaza se ne može procijeniti;

M0 - bez udaljenih metastaza;

M1 - tumor se proširio u druge dijelove tijela.

Stadij bolesti u oboljelih od karcinoma hipofarinksa se određuje na temelju podataka sadržanih u klasifikaciji TNM.

Tablica 2: Stadij bolesti u oboljelih od karcinoma hipofarinksa

| **Stadij** | **T** | **N** | **M** |
|---|---|---|---|
| **0** | Tis (*carcinoma in situ*) | N0 | M0 |
| **I** | T1 | N0 | M0 |
| **II** | T2 | N0 | M0 |
| **III** | T3 | N0 | M0 |
| **IVA** | T4a<br>T4a<br>T1<br>T2<br>T3<br>T4a | N0<br>N1<br>N2<br>N2<br>N2<br>N2 | M0<br>M0<br>M0<br>M0<br>M0<br>M0 |
| **IVB** | T4b<br>bilo koji T | bilo koji N<br>N3 | M0<br>M0 |
| **IVC** | bilo koji T | bilo koji N | M1 |

### 1.1.5. Histološki gradus karcinoma pločastih stanica hipofarinksa

Karcinomi pločastih stanica hipofarinksa se uobičajeno, prema stupnju diferencijacije stanica, pleomorfizmu stanica i mitotičkoj aktivnosti, svrstavaju u dobro diferencirane (gradus 1), umjereno diferencirane (gradus 2) i slabo diferencirane (gradus 3).

Tumori gradusa 1 su vrlo slični normalnom pločastom epitelu i sadrže različiti udio velikih, diferenciranih, pločastih stanica nalik keratinocitima, kao i malih stanica bazalnog tipa, koje su obično smještene na periferiji tumorskih otočića/tračaka. Međustanični mostići su uvijek prisutni. Često se nalaze nakupine (perle) keratina, a stanice u mitozi su rijetke.

Tumori gradusa 2 imaju jače izražen pleomorfizam jezgara i povećan udio stanica u mitozi (često atipične mitoze). Slabo su izraženi međustanični mostići.

Tumori gradusa 3 sadrže izrazito polimorfne stanice sa brojnim atipičnim mitozama. Vrlo je oskudna keratinizacija.

Keratinizacija je mnogo češće prisutna u dobro i umjereno diferenciranim karcinomima pločastih stanica, ali se ponekad nalazi i u slabo diferenciranim karcinomima. Većina karcinoma pločastih stanica hipofarinksa je slabo ili umjereno diferencirana. Razlike u stupnju diferencijacije stanica su česte među različitim dijelovima tumora te se gradus određuje prema području, koje je najslabije diferencirano. Postoji nesuglasje o prognostičkoj vrijednosti stupnja diferencijacije stanica. Rezultati nekih istraživanja su ukazivali na značajan utjecaj gradusa tumora na prognozu bolesti (28,29), dok drugi to nisu potvrdili (30).

### 1.1.6. Liječenje karcinoma hipofarinksa

Karcinom pločastih stanica hipofarniksa se, zbog svog anatomskog smještaja i nespecifičnih početnih simptoma, često dijagnosticira tek kada je bolest uznapredovala. Nakon dijagnostičke obrade i procjene općeg stanja bolesnika, ovisno o iskustvu liječnika i dostupnim metodama, planira se liječenje (31). Karcinom hipofarinksa se, prema najnovijim smjernicama National Comprehensive Cancer Network (NCCN), liječi u najvećem broju slučajeva kirurški. U nižim stadijima bolesti, ovisno o statusu vrata, se postoperativno može provesti kemo/radio- ili radio-terapija. U višim stadijima bolesti, prije operativnog liječenja se primjenjuje indukcijska kemoterapija ili kemoterapija združena s radioterapijom. Savjetuje se uključivati bolesnike u kliničke studije (32).

Za ranije stadije bolesti, u što ubrajamo T1N0 i T2N0 tumore hipofarinksa, standardno liječenje je laringofaringektomija i disekcija vrata. Ovisno o regionalnoj proširenosti bolesti (pozitivnim limfnim čvorovima) ponekad je nužna i postoperativna radioterapija (33). Poneki raniji stadiji bolesti (T1 i T2), manji tumori te egzofitični tumori se liječe samo radioterapijom (34). Karcinom hipofarinksa ima sklonost submukoznom širenju i "skip" metastazama, što ih čini agresivnijima i sklonijim stvaranju udaljenih metastaza (4). Viši stadiji bolesti (stadij III i IV) koji u trenutku postavljanje dijagnoze čine 82 do 87% karcinoma hipofarinksa (35) zahtjevaju kombinaciju kirurškog liječenja i postoperativne radioterapije (36) ili neoadjuvantne kemoterapije i radioterapije (37). U uznapredovalim stadijima bolesti, liječenje se ponekad započinje neoadjuvantnom kemoterapijom radi smanjivanja tumora, prije kirurškog zahvata, u svrhu očuvanja organa (37,38). Rezultati dobiveni u okviru velikih prospektivnih randomiziranih istraživanja govore u prilog primjeni laringofaringektomije i postoperativne radioterapije ili kemoradioterapije (39,40).

### 1.1.7. Prognostički čimbenici

Za sada ne postoji prognostički model kojim bi se objektivno mogao predvidjeti rizik od ponovne pojave bolesti nakon primarnog liječenja karcinoma hipofarinksa. Zlatni standard u predviđanju kliničkog ishoda bolesti u bolesnika oboljelih od zloćudnih tumora glave i vrata je određivanje kliničkog stadija bolesti. Veličina tumora (41), metastaze u limfnim čvorovima (42), pozitivan rub nakon kirurškog odstranjivanja (43) i perineuralna invazija (44) su se pokazali pouzdanim pokazateljima lošeg ishoda bolesti u oboljelih od karcinoma pločastih stanica glave i vrata. Ekstrakapsularno širenje tumora u metastatskom limfnom čvoru je najznačajniji negativni prognostički pokazatelj preživljenja (45). Navedeni klinički prognostički pokazatelji doprinose planiranju liječenja, ali imaju vrlo ograničenu vrijednost u procjeni budućeg ponašanja zloćudnih tumora glave i vrata. U nastojanju da se pronađu pokazatelji, koji bi prije resekcije primarnog tumora i limfnih čvorova mogli predvidjeti ponašanje tumora, provode se brojna istraživanja s ciljem otkrivanja i određivanja prognostičke vrijednosti takvih pokazatelja - biomarkera na molekularnoj razini.

Prema definiciji National Cancer Institute, biomarker je *"a biological molecule found in blood, other body fluids, or tissues that is a sign of a normal or abnormal process, or of a condition or disease. A biomarker may be used to see how well the body responds to a treatment for a disease or condition."* Biomarkeri mogu biti dijagnostički, prognostički ili prediktivni. Prognostički biomarkeri su povezani sa ishodom bolesti bez obzira na primijenjeno liječenje, dok su prediktivni biomarkeri vezani uz ishod bolesti nakon određenog liječenja. Kako se ova svojstva međusobno ne isključuju, biomarker može biti ujedno prognostički i prediktivan. Na žalost, unatoč opsežnim istraživanjima usmjerenim na iznalaženje biomarkera raka, vrlo su rijetke biološke molekule koje zadovoljavaju kriterije neophodne da bi ih svrstali među uspješne biomarkere. Manje od 1% potencijalnih biomarkera, koji se spominju u znanstvenim publikacijama, je u kliničkoj primjeni upravo zbog toga što nisu klinički značajni, što njihovo dokazivanje nije tehnički jednostavno izvedivo, što postoji prevelika raznolikost u njihovoj normalnoj izraženosti među ljudima i sl. (46).

Nekoliko biomarkera, kao što su proteini MYC, p53, ciklin D1, p16, enzim COX-2, EGF (engl. *epidermal growth factor*), matriks metaloproteinaze i FHIT (engl. *Fragile Histidine Triad*) se pokazalo korisnim u planiranju liječenja oboljelih od karcinoma pločastih stanica glave i vrata (47,48).

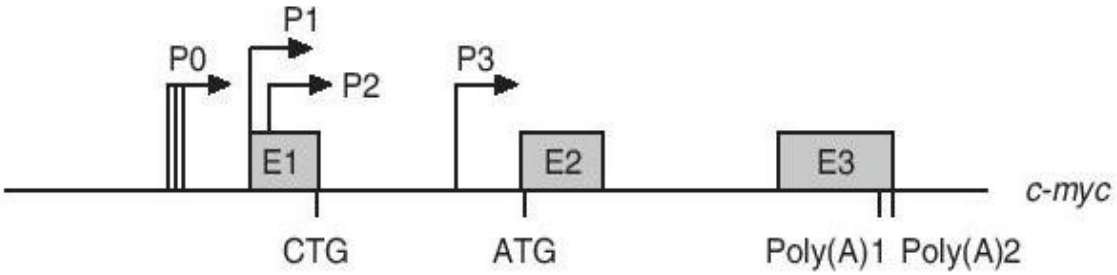
## 1.2. MYC

### 1.2.1. Gen *MYC*

Gen *MYC* se nalazi na kromosomu 8, 8q24.21 (NCBI Reference Sequence: NG_007161.1). Velik je 5366 pb i sadrži tri eksona. Gen *MYC* je prvi put opisan kao onkogen u genomu retrovirusa odgovornog za nastanak mijelocitomatoze. Sheiness i sur. (49) su 1978. godine pokazali da virus MC29 sadrži slijed od oko 1500 nukleotida, koji bi mogao predstavljati gen odgovoran za tumorigenezu uzrokovanu ovim virusom. Sljedeće godine su dokazali da je ovaj slijed porijeklom iz genoma domaćina. S obzirom da se ovaj slijed nukleotida, koji se ugrađuje u genom MC29, prepisuje u mRNA i u neinficiranim pilećim stanicama, pretpostavili su da se radi o genu domaćina (50). Ovaj nalaz je odgovarao pretpostavljenom modelu staničnog porijekla retrovirusnih onkogena (51). Gen *MYC* je kloniran i opisana su mu svojstva 1982. godine (52).

Različiti mehanizmi kao što su insercijska mutageneza, translokacija kromosoma i amplifikacija gena dovode do poremećene aktivnosti gena *MYC* i karcinogeneze (53). U različitim zloćudnim bolestima ljudi poremećena je aktivnost gena *MYC* (54–57).

Prepisivanje gena *MYC* je regulirano sa četiri promotora: P0, P1, P2 i P3 (Slika 3) (58–68). U normalnim stanicama, prepisivanje gena *MYC* uglavnom započinje sa promotora P1 i P2, pri čemu su znatno zastupljeniji transkripti sa promotora P2 (75-90% transkripata potječe sa P2, 10-25% sa P1, manje od 5% sa P0 i približno toliko sa P3). Razlog takve raspodjele korištenja promotora je njihova građa: promotor P2 sadrži optimalni slijed “TATA-box” TATAAAAG (69,70) i dva slijeda “Inr” (od engl. Initiator) (71), dok slijed “TATA-box” u promotoru P1 nije optimalan (TATAATGC) i ovaj promotor ne sadrži sljedove “Inr”. Promotori P0 i P3 nemaju sljedove “TATA-box”. Promotori P1 i P2 međusobno su udaljeni 160 pb (72).

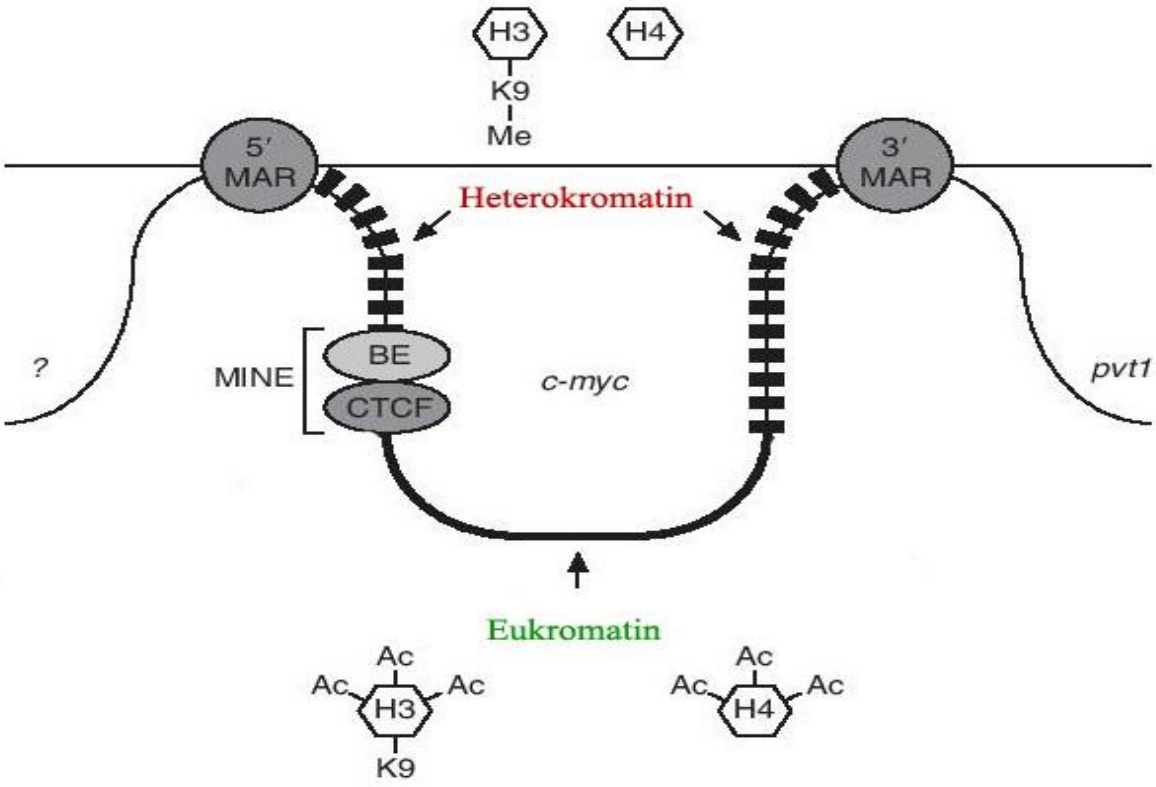



**Slika 3:** Shematski prikaz gena *MYC* sa tri eksona (E1, E2, E3), četiri promotora (P0, P1, P2, P3), dva glavna kodona započinjanja translacije (CTG, ATG) i dva poliadenilacijska signala [poly(A)1 i poly(A)2] (Prilagođeno iz ref. 73).

Smještaj gena *MYC* unutar jezgre je određen pomoću dva područja MAR (od engl. Matrix Attachment Region), smještena 80 kb uzvodno i 50 kb nizvodno od područja gena *MYC,* kojima se njegovo kromosomsko područje veže na proteinsku skelu jezgre, tzv. matriks. Područja MAR, vezanjem kromatinskog vlakna na matriks jezgre, tvore kromosomsku petlju i odvajaju područje gena *MYC* od susjednih gena te omogućavaju doticaj gena *MYC* sa transkripcijski aktivnim područjima jezgre (74). Kromatin u promotorskom području gena *MYC* i dijela koji se prepisuje je otvorene strukture za koju je svojstvena hiperacetilacija histona H3 i H4 te hipometiliranost lizina 9 na histonu 3. Ovo, za transkripciju pogodno područje kromatina, tzv. eukromatin, je s obje strane omeđeno područjem zgusnutog, transkripcijski neaktivnog kromatina, tzv. heterokromatina. Za heterokromatin je svojstvena hipoacetilacija histona H3 i H4 te metilacija lizina 9 na histonu H3 (74). Izolatorsko područje gena *MYC*, MINE (od engl. Myc insulator element) se nalazi 2.5 kb uzvodno od područja inicijacije transkripcije gena *MYC*. Ovo izolatorsko područje razdvaja hiperacetilirano od hipoacetiliranog područja kromatina. Dva sastavna dijela područja MINE su važna za njegovu izolatorsku ulogu: slijed BE (od engl. barrier element) i vezno mjesto za protein CTCF (CCCTC-binding factor) (Slika 4). U genomu su često pojedinačni geni okruženi izolatorima (75). Izolatori su dijelovi DNA koji često stupaju u interakciju sa promotorskim mjestom odnosno sprječavaju interakciju pojačivača i promotora te tako onemogućavaju transkripciju gena (76).

Područje MINE ima ulogu blokatora pojačivača i ulogu kromatinske barijere. Protein CTCF je ključan za ulogu blokatora pojačivača (74,77), koja je neophodna i dostatna za blokiranje pojačivača transkripcije u kralježnjaka (78,79). *In vivo*, se na protein CTCF u području MINE direktno veže protein CHD8 (SNF2-like chromodomain helicase). Eksperimentalno je pokazano da je vezanje CHD8 na CTCF ključno u ulozi kromatinske barijere, koja sprječava širenje susjednog, transkripcijski neaktivnog, heterokromatina (79).

Uz navedene epigenetske modifikacije, acetilaciju histona i hipometilaciju DNA, u području promotora i područja gena *MYC* koja se prepisuju, opisana je fosforilacija histona H3 (80,81), monometilacija lizina 20 na histonu H4 (H4K20 me) (82), trimetilacija lizina 4 na histonu H3 (H3K4me3) (83), dimetilacija lizina 9 na histonu H3 (H3K9me2) umjesto acetilacije H3K9 (84), dimetilacija lizina 20 na histonu H3, metilacija lizina 36 i 79 na histonu H3, kao i uklapanje histonske inačice H2A.Z (85). Aktivnost promotora P1 i P2 može se potaknuti inhibitorima deacetilaze histona. ME1a1 vezno mjesto između P1 i P2 odgovorno je za otvorenu konfiguraciju kromatina te mutacija navedenog mjesta smanjuje osjetljivost promotora i sprječava vezanje polimeraze II na promotor P2 (72).



**Slika 4:** Lokus gena *MYC*. 5'MAR, 80 kb uzvodno, i 3'MAR 50 kb nizvodno od gena *MYC,* ograničavaju 160 kb veliko područje, koje sadrži i hetero- i eukromatin. 5'MAR i 3'MAR razgraničavaju ovo područje od susjednog gena *pvt1* i gena, za sada, nepoznate uloge (?) (74). Transkripcijski aktivni eukromatin obilježava hiperacetilacija histona H3 i H4 i nedostatak metilacije lizina 9 na histonu H3 (H3K9me). Za razliku od eukromatina, transkripcijski inertan heterokromatin je bogat metiliranim lizinom 9 na histonu H3 i hipoacetiliranim histonima H3 i H4 (74). Područja eukromatina i heterokromatina dijeli 1,6 kb MINE, građen od BE i veznog mjesta za CTCF. MINE je smješten otprilike 2,5 kb uzvodno od mjesta započinjanja transkripcije gena *MYC* i ima ulogu izolatora. Eukromatin se proteže na 7 - 7,5 kb i uključuje područje promotora gena *MYC* i sljedove, koji se prepisuju (prilagođeno iz ref. 73).

### 1.2.2. Protein MYC

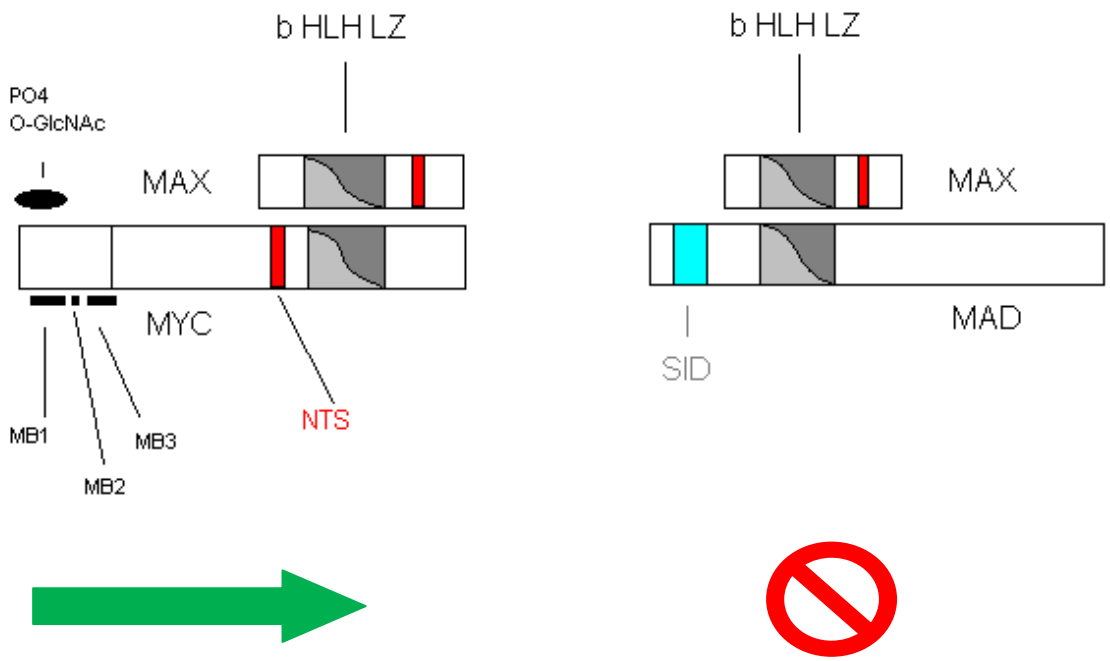
Dvije glavne izoforme proteina MYC nastaju korištenjem alternativnog početnog kodona (engl. *alternative start codon usage*) (86). Izoforma 1 proteina MYC je građena od 439 aminokiseline i mase je 48804 Da (UniProtKB P01106-1). Izoforma 2 proteina MYC je građena od 454 aminokiseline i masa joj je 50565 Da (UniProtKB P01106-2).

Protein MYC je građen od a) nestrukturiranog područja na amino kraju u kojem se nalaze MYC kutije (MBI i MBII), odgovorne za aktivaciju transkripcije; b) srednjeg dijela u kojem se nalaze MBIII i MBIV i slijed važan za smještaj u jezgri NLS (engl. *nuclear localization signal*) i c) karboksi kraja u kojem se nalazi “uzvojnica-omča-uzvojnica” leucinski zatvarač (bHLHzip, engl. *basic helix- loop-helix leucine zipper*) (87,88).

Osim dvije navedene izoforme proteina MYC, nizvodnim započinjanjem translacije unutar MYC mRNA, nastaje MYC-S (engl. *Myc-short*), kojem nedostaje veći dio transaktivacijske domene na amino-kraju, ali sadrži domene važne za dimerizaciju i vezanje na molekulu DNA, smještene na karboksi-kraju. Protein MYC-S je smješten u jezgri i relativno je nestabilan. Prolazno se veća količina proteina MYC-S (približna količini proteina MYC) nalazi u nekim tipovima stanica tijekom brze proliferacije. Protein MYC-S ne može aktivirati transkripciju ciljnih gena već onemogućava

transaktivaciju pomoću duge izoforme proteina MYC. Neki tumori imaju konstitutivno izraženu visoku razinu proteina MYC-S što upućuje na to da oni ne ometaju ulogu promicanja rasta duge izoforme proteina MYC (89). Mjesno-specifičnom proteolizom (engl. *site-specific proteolysis*) nastaje MYC-nick, citoplazmatski oblik proteina MYC koji sadrži konzervirana Myc Box područja, ali mu nedostaje područje važno za smještaj u jezgri (engl. *nuclear localization signal*), heterodimerizaciju sa proteinom Max i vezanje na molekulu DNA (90).

Dimerizacija proteina, koji sadrže bHLHZ, se uobičajeno odvija preko dva HLHZ sučelja na način da ona stvaraju postojani svežanj od četiri uzvojnice. Protein MYC u fiziološkim uvjetima ne stvara homodimere, već heterodimerizira s malim bHLHZ proteinom MAX (Slika 5). Heterodimerizacija proteina MYC sa proteinom MAX je neophodna za njegovo vezanje na CAC(G/A)TG E-box slijed (engl. *enhancer box, E-box*) i poticanje transkripcije ciljnih gena (91,92). Nakon što protein MYC obavi svoju transaktivacijsku ulogu, dolazi do njegove razgradnje i dimerizacije proteina MAX sa skupinom srodnih bHLHZ proteina Mad (Slika 5), za koje se smatra da su antagonisti proteina MYC. Dimeri Mad-MAX se vežu na iste sljedove (*E-box*) na koje su prethodno bili vezani heterodimeri MYC-MAX, što dovodi do represije transkripcije. Aktivacija transkripcije, posredovana proteinom MYC, uključuje privlačenje koaktivatorskog kompleksa, koji sadrži TRRAP (engl. *Transformation/Transcription Domain Associated Protein*) i acetiltransferaze histona (engl. *histone acetyltransferase*, HAT) poput GCN5 (93,94) i TIP60 (95). Acetiltransferaze histona acetiliraju lizine na histonima smještenim u blizini mjesta započinjanja transkripcije. Acetilacija lizina na histonima je povezana sa otvorenom strukturom kromatina (96), te MYC privlačenjem acetiltransferaza histona u područje ciljnih gena pogoduje njihovom prepisivanju. Sukladno antagonističkoj ulozi proteina MYC i Mad, dimeri proteina Mad-Max, preko korepresora Sin3, privlače deacetilaze histona (engl. *histone deacetylase*, HDAC) na ista mjesta (*E-boxes*) na koja su bili vezani dimeri proteina MYC-Max, što dovodi do deacetilacije histona i zatvorenije strukture kromatina te zaustavljanja transkripcije ciljnih gena.




**Slika 5:** Shematski prikaz veznja proteina MYC i MAX u području „helix-loop-helix“ (HLH) pomoću leucinskog zatvrača (leucine zipper-LZ) kao i MAX proteina sa MAD proteinom.

Važnost uloge proteina MAX u ulozi proteina MYC dokazana je inhibicijom ove veze što uzrokuje sporiji rast tumora (96).

Postoji razlika u sklonosti vezanja proteina MYC na *E-box* sljedove u genomu. Pri fiziološkoj (niskoj) razini proteina MYC, on zauzima samo mali broj ovih veznih mjesta u svim tipovima stanica. To su vezna mjesta visokog afiniteta vezanja proteina MYC. Na ostala vezna mjesta u genomu, niskog afiniteta vezanja, MYC se veže samo ukoliko je njegova razina u stanici visoka. Na temelju slijeda nukleotida, u okolini E-box sljedova, nije moguće razlučiti mjesta visokog afiniteta od onih niskog afiniteta vezanja, osim što su mjesta visikog afiniteta vezanja češće smještena u područjima bogatim CpG otočićima. Guccione i sur. (97) su pokazali da su preduvjet za vezanje proteina MYC na njegova ciljna mjesta u genomu modifikacije histona svojstvene eukromatinu (metilacija lizina 4 i lizina 79 na histonu H3 i acetilacija histona H3). Za razliku od primarnih limfocita, u kojima mitogeni potiču transkripciju

većine gena, u tumorskim stanicama MYC dovodi do specifičnog porasta izraženosti skupine gena, ali isto tako i smanjenja izraženosti određenih gena. Walz i sur. (98) navode tri moguća razloga za takav učinak proteina MYC u tumorskim stanicama: prvo, razlika u afinitetu *E-box* sljedova određuje promjene u aktivnosti pojedinih skupina gena ovisno o fiziološkoj ili onkogenoj razini proteina MYC u stanici; drugo, MYC može pozitivno ili negativno regulirati inicijaciju transkripcije, neovisno o njegovom učinku na elongaciju i treće, MYC u kompleksu s proteinom MIZ1 utišava brojne gene te omjer ova dva proteina, vezana na određeni promotor, određuje aktivnost gena.

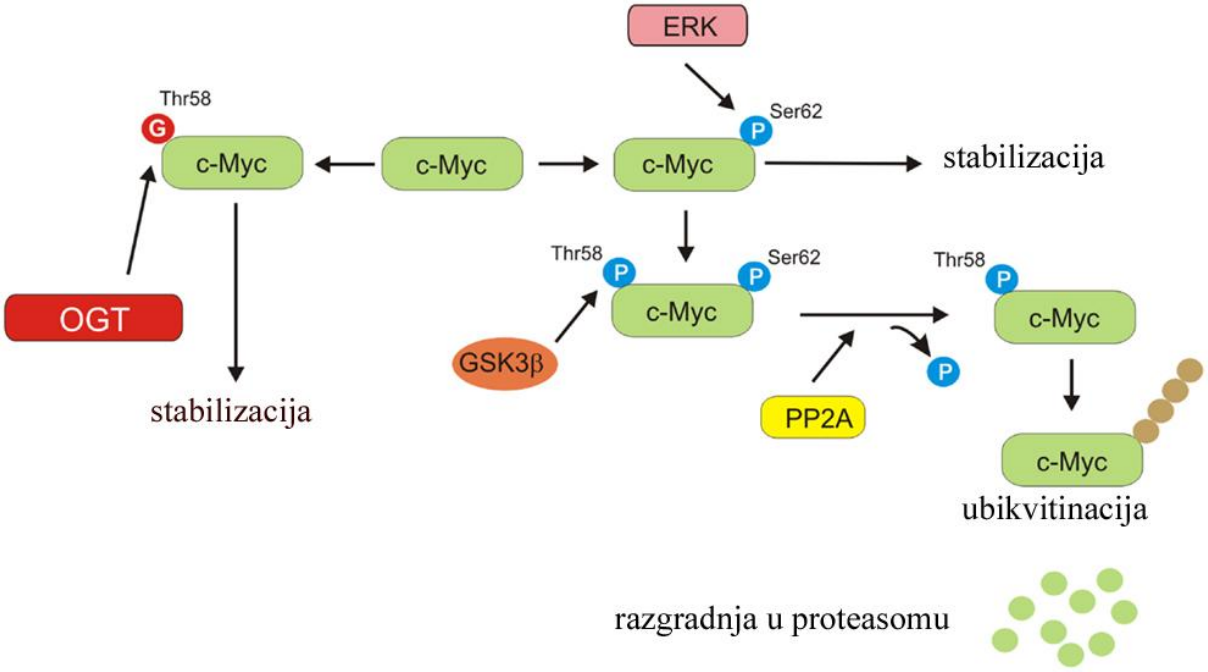
Nedavna istraživanja Thomasa i sur. (99) su pokazala da je povezanost proteina MYC s kromatinom ovisna o njegovom vezanju sa proteinom WDR5. Protein MYC, preko evolucijski dobro sačuvanog "Myc box IIb" motiva, stupa u vezu sa plitkim, hidrofobnim rascjepom na površini proteina WDR5. Nakon što je eksperimentalno onemogućena interakcija proteina MYC i WDR5, opaženo je umanjeno vezanje proteina MYC na otprilike 80% njegovih veznih mjesta u genomu. Na taj je način, protein MYC izgubio sposobnost poticanja stvaranja pluripotentnih matičnih stanica i promicanja zloćudne preobrazbe.

#### 1.2.2.1. Stabilnost proteina MYC u stanici

Onkoprotein MYC je važan čimbenik transkripcije koji snažno promiče rast i proliferaciju stanica te je njegova izraženost, u normalnim stanicama, strogo kontrolirana. Nakon sinteze, protein MYC se brzo razgrađuje - vrijeme poluživota mu je, u stanicama koje nisu zloćudno promijenjene, oko 25 minuta (86).

Jedan od najvažnijih mehanizama kojima je ragulirana razina proteina MYC u stanici je njegova razgradnja u sustavu ubikvitin-proteasom (UPS od engl., *ubiquitin–proteasome system*) (100). Razgradnja posredovana ubikvitinom je vrlo specifičan proces, ovisan o ATPu. Proteini se usmjeravaju na razgradnju u proteasomu kovalentnim vezanjem molekula ubikvitina na ciljni protein. Vezanje ubikvitina na ciljne proteine se odvija u tri koraka, koja uključuju tri enzima. Enzim E1 prvo adenilira molekulu ubikvitina i na taj način je aktivira. Aktivirani ubikvitin se prenosi na ubikvitin-konjugirajući enzim E2 koji zajedno sa ligazom ubikvitina E3, vezanom za

ciljni protein, katalizira prijenos aktiviranog ubikvitina na lizin u ciljnom proteinu. Ponavljanjem ovog niza reakcija nastaju poliubikvitinski lanci na ciljnom proteinu. Nakon poliubikvitinizacije, protein se razgrađuje u 26S proteasomu. Proteasom se veže na proteine koji sadrže određeni broj vezanih molekula ubikvitina (četiri ili više) na određenoj poziciji (K48) te ih deubikvitinira, razmota i razgradi u male odsječke peptida (101). Stanice obično sadrže samo nekoliko E1, oko 50 E2 i otprilike 500 E3 ligaza ubikvitina, koje određuju specifičnost supstrata usmjerenog na razgradnju u sustavu ubikvitin-proteasom (102). Stabilnost proteina MYC u stanici je regulirana fosforilacijom dva evolucijski dobro sačuvana mjesta smještena unutar MBI, treonina 58 i serina 62 (103). Fosforilacija serina 62, koju potiču ERK i/ili CDK kinaze, povećava stabilnost proteina MYC. Nakon prestanka djelovanja signala koji potiču rast stanice, GSK3 β fosforilira treonin 58. Fosforilacija treonina 58 olakšava defosforilaciju serina 62 i privlači kompleks ligaze ubikvitina (E3) Fbw7, ovisan o fosforilaciji treonina 58, promiče ubikvitinaciju proteina MYC i njegovu razgradnju u proteasomu (104).




**Slika 6:** Regulacija stabilnosti proteina MYC (prilagođeno iz ref. 105). ERK fosforilira protein MYC na serinu 62 i stabilizira ga. GSK3β fosforilira protein MYC na treoninu 58 ukoliko je fosforiliran na serinu 62. PP2A defosforilira serin 62 proteina MYC. Protein MYC, monofosforiliran na treoninu 58 privlači kompleks ligaze ubikvitina te nakon poliubikvitinacije dolazi do razgradnje proteina MYC i proteasomu. Ukoliko

enzim polipeptidil transferaza (OGT, od engl. *O-linked β-N-acetylglucosamine transferase*) modificira treonin 58, O-GlcNAcilacija treonina 58 onemogućava fosforilaciju i dovodi do stabilizacije proteina MYC. Modifikacija O-GlcNAcilacijom je kontrolirana enzimima polipeptidil transferazom (OGT), koja dodaje O-GlcNAc sa serinskih i treoninskih ostataka, te OGA enzimima koji ga uklanjaju.

Stres izazvan nedostatkom hranjivih tvari i kisika, koji je čest u tumorima, dovodi do pojačane razradnje proteina MYC. Nedavno su Buren i sur. (106) pokazali da nedostatak glukoze dovodi do aktivacije protein kinaze A (PKA) i fosforilacije proteina URI, koji čini kompleks sa proteinima PP1γ i OGT. Fosforilacija URI na serinu 371 dovodi do otpuštanja PP1γ i inhibicije enzima OGT. Niska aktivnost OGT, nedostatna za O-GlcNAcilaciju i stabilizaciju proteina c-MYC, u nedostatku glukoze dovodi do njegove razgradnje i preživljenja stanice. Slično tome, u nedostatku kisika, prilagodba stanice uključuje smanjenje izraženosti i transaktivacijske uloge proteina MYC. Wong i sur. (107) su pokazali da je jedan od načina smanjenja razine proteina MYC u stanicama izloženim hipoksičnim uvjetima upravo njegova pojačana razgradnja u proteasomima s posljedičnim smanjenjem proliferacije, utišavanjem procesa biosinteze i preživljenjem stanica.

#### 1.2.2.2. Protein MYC i karcinogeneza

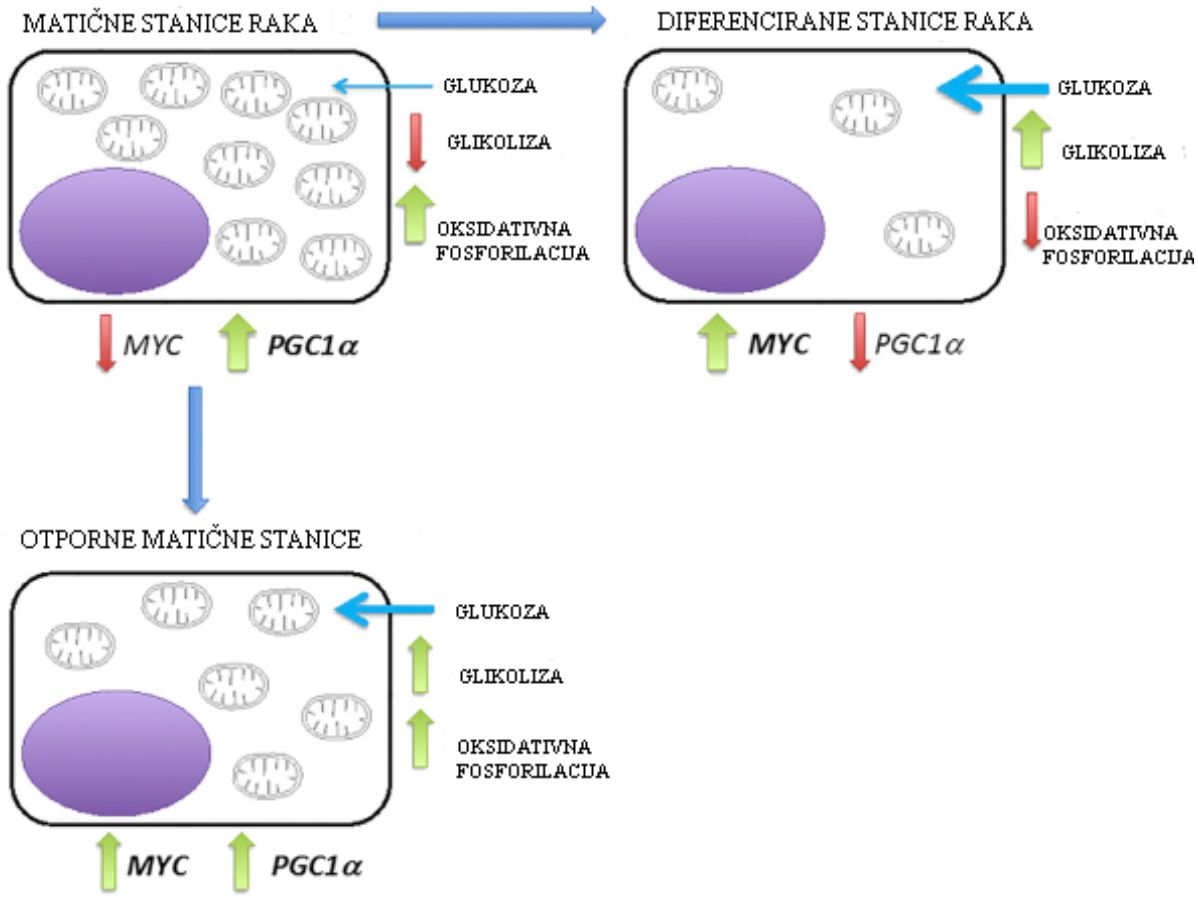
Poveznica između raka i izraženosti MYC otkrivena je na temelju opažanja da limfomi B stanica, potaknuti virusom leukoze ptica (engl. *avian leukosis virus*), sadrže retroviralne insercije u blizini gena *MYC* (108). Iako genom ovog virusa, za razliku od retrovirusa koji sadrže v-myc, nema onkogenih sljedova, među mjestima gdje se virus uklapa u genom domaćina (engl. *virus integration sites*) su pronađeni retroviralni pojačivački/promotorski sljedovi u blizini lokusa *MYC* što dovodi do njegove pojačane izraženosti (109). Zaključeno je da pojačana izraženost gena *MYC* u stanicama domaćina, a ne samo retroviralno prenesen v-myc, ima ulogu u karcinogenezi. Sukladno tome translokacija svojstvena Burkittovom limfomu, koja uključuje gen *MYC* na kromosomu 8 i IgH gen na kromosomu 14, dovodi do konstitutivne aktivacije gena *MYC* time što ga dovodi u vezu sa regulatornim elementima gena IgH (110). Istraživanja, koja su uslijedila su utemeljila snažnu poveznicu brojnih uloga proteina MYC s nastankom i razvojem različitih novotvorina

(111). Onkogena svojstva proteina MYC su posljedica njegovog skupnog učinka na rast i proliferaciju stanica, metabolizam, stabilnost genoma i apoptozu (112). Nije poznat točan broj gena koje regulira ovaj čimbenik transkripcije, ali je poznato da, ovisno o kontekstu, može djelovati kao aktivator ili pak represor transkripcije. Regulacijom gena koji sudjeluju u zaustavljanju staničnog ciklusa, poput p15, p21 i p27, ali i gena koji potiču stanični ciklus, poput cdc25A, cdk4 i ciklina D2 (113), na indirektan način utječe na zloćudnu preobrazbu stanica (114). Protein MYC, uz navedeno, može vezati čimbenik transkripcije Sp1 i inhibirati njegovu aktivnost, što može imati za posljedicu smanjenu transkripciju gena uključenih u zaustavljanje rasta (115).

Vrlo rijetko dolazi do mutacija u kodirajućem dijelu gena *MYC.* U raku gotovo uvijek dolazi do gubitka sposobnosti regulacije razine proteina MYC pod utjecajem staničnih i izvanstaničnih signala. Osim ranije spomenutih promjena u području gena *MYC*, povezanih s rakom, novija istraživanja su pokazala da polimorfizmi u udaljenim regulatornim elemntima koji reguliraju aktivnost promotora gena *MYC* mogu, stvaranjem velikih omči kromatina poremetiti aktivnost ovog gena (116). Poremećena izraženost gena i proteina MYC je posljedica nepravilnosti u putevima prijenosa signala, koji je povećavaju ili smanjuju na razini transkripcije, translacije i post-translacijskih modifikacija. Signalni putevi Wnt-b-katenin, Sonic hedgehog-Gli i Notch dovode do povećane izraženosti MYC i često su poremećeni u raku. Povećana razina proteina MYC doprinosi proliferaciji neovisnoj o čimbenicima rasta, replikaciji DNA, biogenezi proteina, promjenama u metabolizmu stanice, poticanju angiogeneze, smanjenju učinkovitosti kontrolnih mehanizama i izbjegavanju imunološkog odgovora te se stoga smatra molekularnim obilježjem raka (117). Bez obzira na navedeno, aktivacija gena *MYC* sama po sebi ne može dovesti do zloćudne preobrazbe. Stoga, iako je *MYC* jedan od najčešće aktiviranih onkogena povezanih sa patogenezom zloćudnih bolesti, njegova povećana izraženost nije dostatna da potakne proliferaciju i zloćudnu preobrazbu normalnih stanica. U normalnim stanicama učinak povećane izraženosti proteina MYC može izostati ili dovodi do zastoja u proliferaciji, senescencije i apoptoze (118,119). Iako povećana izraženost proteina MYC sama za sebe ne može potaknuti mitozu (120), ona podupire replikaciju DNA i ulazak u S fazu staničnog ciklusa (120,121). Ponekad povećana izraženost proteina MYC u normalnim stanicama dovodi do toga da one

rastu i repliciraju DNA, ali se ne mogu podijeliti te postaju poliploidne (120). Takva replikacija DNA može dovesti do lomova kromosoma i translokacija jer povećana razina proteina MYC uzrokuje poremećaj popravka dvolančanih lomova DNA. Oštećenja kromosoma, izazvana povišenom razinom proteina MYC, promiču zloćudnu preobrazbu (122).

Važna je uloga proteina MYC u reprogramiranju metabolizma stanice. Nedavno je pokazano da je MYC glavni regulator o kojem ovisi da li će u stanici raka prevladavati glikolitički ili oksidativni metabolizam. Kao represor transkripcije gena PGC1α (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), MYC negativno utječe na ulogu mitohondrija. Posljedica ove negativne regulacije aktivnosti mitohondrija je presumjeravanje metabolizma stanica, u kojima je MYC pojačano izražen, na glikolizu (Slika 7) (123).




**Slika 7:** MYC regulira metabolizam stanica raka.

MYC u ulozi represora transkripcije gena *PGC1α* regulira metabolizam pojedinih podskupina stanica raka. Niska razina proteina MYC u matičnim stanicama raka negativno utječe na glikolizu na način da ne utišava transkripciju gena *PGC1α* te na taj način omogućava da PGC1α pozitivno utječe na oksidativnu fosforilaciju. U bolje diferenciranim stanicama raka, povišena razina proteina MYC podržava glikolizu i utišava oksidativnu fosforilaciju. Zbog ovisnosti matičnih stanica raka o oksidativnoj fosforilaciji, inhibicija oksidativne fosforilacije (npr. metforminom) ih specifično uništava, ali konačno te stanice postaju otporne na takav način liječenja uslijed povećanja razine proteina MYC i posljedične sposobnosti korištenja glikolize, kao i oksidativne fosforilacije. (Prilagođeno iz ref. 124).

## 1.3. CTCF

### 1.3.1. Gen *CTCF*

Gen *CTCF* je smješten na kromosomu 16, 16q21-q22.3 (NCBI Reference Sequence: NG_033892). Velik je 76779 baza i sadrži 14 eksona (GeneLoc Integrated Map for Chromosome 16: Exon structure for CTCF). Kodirajuće područje obuhvaća 10 eksona. Alternativnim prekrajanjem može nastati više različitih transkripcijskih inačica gena *CTCF*, od kojih je najdulja veličine 3946 pb (NCBI Reference Sequence: NM_006565.3).

### 1.3.2. Protein CTCF

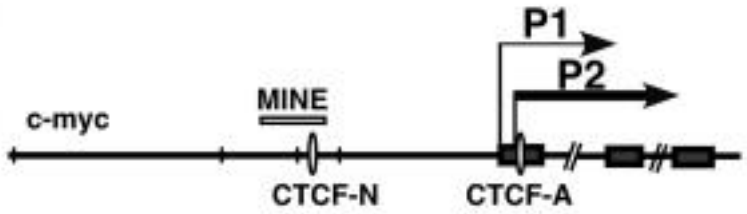
Protein CTCF (od engl. *CCCTC-binding factor*) je građen od 727 aminokiselina i masa mu je 82785 Da (UniProtKB P49711-1). Prvi puta je opisan 1990. godine kao protein koji se veže na tri pravilno razmaknuta CCCTC motiva smještena uz 5' kraj gena *MYC* (125). Protein CTCF je ubikvitarno izražen i smješten u jezgri (126). Ovaj protein sadrži tri domene: karboksi (C)-terminalna domena, amino (N)-terminalna domena i središnje područje građeno od 11 cinkovih prstiju. Domena, kojim se protein CTCF veže na molekulu DNA je područje 11 cinkovih prstiju. Prvih 10 pripada Cys2-His2 tipu cinkovih prstiju građenih od ~30 aminokiselina od kojih su dva cisteina uvijek odvojena sa 12 aminokiselina od para histidina. Ove četiri aminokiseline (dva cisteina i dva histidina) su orijentirane pomoću cinka tako da čine

kompaktnu strukturu α-zavojnice (engl. *α-helix*) komplementarnu velikom utoru (engl. *major groove*) molekule DNA. Jedanaesti cinkov prst pripada tipu Cys2-His-Cys (127,128). Različitim kombinacijama cinkovih prstiju, CTCF se veže na vrlo različite sljedove u molekuli DNA i različite koregulatorne proteine zbog čega se smatra multivalentnim čimbenikom transkripcije (127).

Sve tri domene proteina CTCF mogu biti post-translacijski modificirane, što doprinosi složenosti epigenetske regulacije posredovane ovim proteinom (129). Fosforilacija proteina CTCF ima značajnu ulogu u regulaciji transkripcije gena *MYC*, posredovanu proteinom CTCF. Fosforilacija proteina CTCF mijenja njegovu ulogu represora u ulogu aktivatora transkripcije gena *MYC* (130,131). Poli(ADP-ribozil)acija proteina CTCF je ključna za njegovu ulogu izolatora (132,133). SUMOilacija proteina CTCF doprinosi njegovoj represivnoj ulozi u području promotora P2 gena *MYC* (129).

### 1.3.3. Uloga proteina CTCF u regulaciji transkripcije gena *MYC*

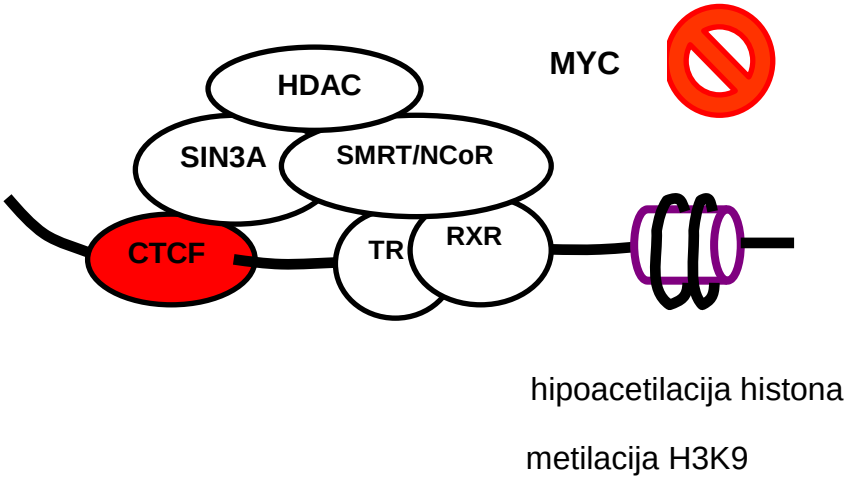
Bell i sur. (78) su 1999. godine pokazali da je protein CTCF neophodan za ulogu blokatora pojačivača izolatorskih područja u genomu kralježnjaka. Izolatori su sljedovi u molekuli DNA koji onemogućavaju utjecaj susjednih regulatornih elemenata i na taj način sprječavaju aktivaciju gena ukoliko su smješteni između pojačivača i promotora gena (78). Izolatori mogu imati ulogu blokatora pojačivača (eng. *enhancer blocker*) i ulogu kromatinske prepreke (eng. *chromatin barrier*), koja onemogućava širenje heterokromatina na susjedne gene ili regulatorna područja gena (76). Raspodjela proteina CTCF u genomu je jedinstvena i razlikuje se od drugih čimbenika transkripcije (134,135). Samo jedna petina veznih mjesta za protein CTCF se nalazi unutar dvije kb od mjesta započinjanja transkripcije, dok su ostala udaljena od promotora gena. Vezna mjesta proteina CTCF u blizini promotora su obično povezana s niskom aktivnošću gena (136), što je u skladu s navodima da je on negativni regulator transkripcije (127,136). Gen *MYC* je smješten u području zgusnutog kromatina, siromašnom genima, koje je, sa obje strane, ograničeno područjima MAR (od engl. *Matrix Attachment Region*). Vezno mjesto za CTCF se nalazi u području vrlo osjetljivom na DNazu I (engl. *DNAse I hypersensitive region*), gdje ima ulogu izolatora (74).




**Slika 8:** Shematski prikaz gena *MYC* - tri eksona (crno ispunjeni pravokutnici), izolatostko područje MINE i položaj CTCF-veznih mjesta N i A. Strelice označavaju mjesta započinjanja transkripcije sa promotora P1 i P2 gena *MYC*. (Prilagođeno iz ref. 137).

Vezno mjesto CTCF-N (slika 8), koje se nalazi u području MINE, poklapa se s granicom hiperacetilacije promotora gena *MYC*. Ovakav smještaj vezanja proteina CTCF upućuje na to ima ulogu prepreke nužne za održavanje strukture kromatina potrebne za normalnu aktivnost gena *MYC*. Drugo vezno mjesto za CTCF u ovom području, CTCF-A (slika 8), je smješteno u blizini mjesta započinjanja transkripcije sa promotora P2. Vezanjem na vezno mjesto CTCF-A, smješteno u području zaustavljanja i oslobađanja RNA polimeraze II, CTCF negativno utječe na transkripciju gena *MYC.* U blizini oko 18% veznih mjesta za CTCF u genomu se nalaze tzv. TRE sljedovi (od engl. *thyroid hormone response element*). Na TRE sljedove se vežu homodimeri receptora hormona štitne žlijezde TR (engl. *thyroid hormone receptor*) ili heterodimeri TR i RXR (engl. *retinoid-X-receptor*). Takvi složeni elemeti imaju izolatorsku ulogu i negativno utječu na transkripciju gena koji su njima regulirani. Za izolatorsku ulogu ovih složenih elemenata je nužno da su CTCF i nuklearni receptori bez liganada vezani za odgovarajuće slijedove gdje privlače represivne komplekse sa deacetilaznom aktivnošću (138). Takav složeni regulatorni element je smješten 2,1 kb uzvodno od gena *MYC* (77). Lutz i sur. (139) su pokazali da protein CTCF posjeduje nekoliko neovisnih represivnih područja. Jedno od njih je područje cinkovih prstiju, koje utišava transkripciju u svim tipovima stanica i neposredno se veže na korepresor SIN3A. Također su primijetili da je u području vezanja proteina CTCF izražena aktivnost deacetilaza histona te su na temelju toga pretpostavili da je utišavanje transkripcije posredovano proteinom CTCF djelomično povezano s privlačenjem deacetilaza histona preko SIN3A. Korepresori

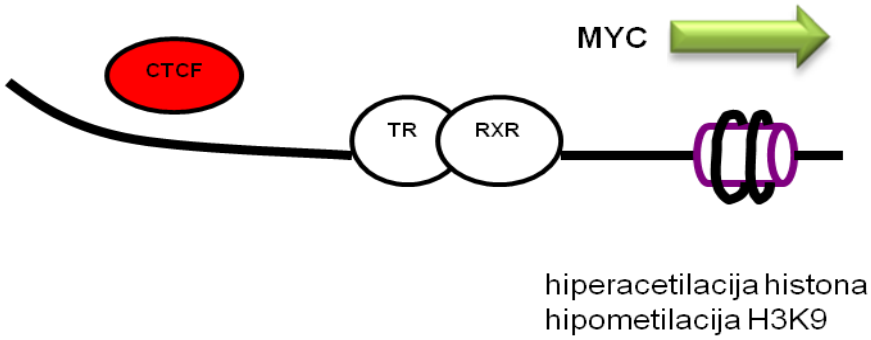
transkripcije SMRT i NCoR se vežu na TR i RXR ukoliko na njih nisu vezani ligandi (140,141). Nagy i sur. (142) su pokazali da se SMRT i NCoR neposredno ulaze u vezu sa SIN3A, te da SIN3A privlači deacetilazu histona HDAC1 i na taj način oblikuju represivni kompleks i utišava transkripciju gena reguliranih preko TR i RXR. (Slika 9).




**Slika 9:** Shematski prikaz represije transkripcije gena *MYC.*

Lutz i sur. (77) su pokazali da vezanje trijodtironina (T3) na TR dovodi do povišene acetilacije ne samo u području veznog mjesta proteina CTCF, pojačivača transkripcije i promotora gena *MYC*. Iz navedenog su zaključili da T3 regulira blokiranje pojačivača, što se smatralo isključivom ulogom proteina CTCF.

Komura i sur. (143) su otkrili da se tijekom mitoze gubi veza između proteina CTCF i regulatornog dijela gena *MYC*, što može biti jedan od uzroka pojačane aktivnosti gena *MYC* u mitozi (Slika 10).




**Slika 10:** Shematski je prikaz aktivacije gena *MYC*.

Gombert i Krumm (137) su, na temelju pokusa brisanja veznih mjesta za CTCF, zaključili da protein CTCF nije nužan za represiju transkripcije gena *MYC*, već da je, suprotno tome, nužan za održavanje normalne razine aktivnosti gena *MYC* u stanici. Ovaj zaključak su izveli na temelju opažanja da nakon brisanja veznih mjesta proteina CTCF, CTCF-N i CTCF-A, ne dovodi do promjena u acetilaciji ovog područja, ali dolazi do metilacije DNA i posljedičnog utišavanja transkripcije gena *MYC*. Ovo nesuglasje o ulozi proteina CTCF u regulaciji transkripcije gena *MYC* je najvjerojatnije posljedica korištenog modela istraživanja, u kojem je brisanjem veznih mjesta za protein CTCF onemogućeno vezanje drugih proteina/proteinskih kompleksa u tom području.

Poli(ADP-riboza)polimeraza 1 (PARP-1), enzim koji ima važnu ulogu u reaktivaciji staničnog ciklusa, je konstitutivno vezan u području promotora gena *MYC*, neovisno o njegovoj aktivnosti (144). Nakon poticanja stanica u mirovanju mitogenima dolazi do aktivacije ovog enzima (145). Razgradnjom svog supstrata, nikotinamid dinukleotida ($NAD^+$), PARP-1 prenosi jedinice ADP-riboze na proteine-primatelje i stvara razgranate polimere ADP-riboze (146). Čimbenik transkripcije SP1, za razliku od proteina CTCF pozitivno regulira transkripciju gena *MYC* (147). Pokazano je da aktivirajuća uloga čimbenika transkripcije SP1 i represivna uloga proteina CTCF, na aktivnost gena *MYC*, ovise o aktivnosti enzima PARP-1. Tretman stanica inhibitorom enzima PARP-1, PJ-34, onemogućava vezanje čimbenika transkripcije SP1 na promotor gena *MYC* i njegovu aktivacijsku ulogu. Isti tretman, bez obzira na poticanje

stanica serumom, onemogućava odvajanje proteina CTCF s istog područja te on zadržava svoju represivnu ulogu u transkripciji gena *MYC* (144).

## 1.4. BORIS

### 1.4.1. Gen *BORIS*

Gen BORIS je smješten na kromosomu 20, 20q13.31 (NCBI Reference sequence: NC_000020.11). Velik je 29688 pb i sadrži 11 eksona. Kodirajuće područje obuhvaća 10 eksona. Alternativnim prekrajanjem mogu nastati 23 različite transkripcijske inačice gena *BORIS*, od kojih je najdulja veličine 4073 pb (NCBI Reference Sequence: NM_006565.3). Ovaj gen je nastao duplikacijom gena *CTCF* prije 210-310 milijuna godina (148).

Regulacija transkripcije gena *BORIS* je složena. Renaud i sur. (149) su identificirali tri promotora gena *BORIS*, A,B i C. Alternativno korištenje ovih promotora rezultira nastankom najmanje 5 različitih transkripcijskih inačica, čiji poluživot ovisi o 5' netranslatiranim područjima (5'UTR). U normalnim sjemenicima se ovaj gen prepisuje sa sva tri promotora, dok su u većini (84%) od 30 ispitanih tumorskih staničnih linija aktivni promotori A i/ili C, a u ostalima B i C. Ovakvu različitu aktivnost promotora autori pripisuju različitim mehanizmima regulacije aktivnosti gena *BORIS* u sjemenicima i tumorskim stanicama. U istom radu je pokazano da metilacija molekule DNA, protein p53 i CTCF negativno utječu na transkripciju gena *BORIS*.

### 1.4.2. Protein BORIS

Protein BORIS/CTCFL (od engl. ***B**rother **O**f The **R**egulator Of **I**mprinted **S**ites/ CCCTC-Binding Factor (Zinc Finger Protein)-Like*) je paralog protein CTCF. Opisano je 11 izoformi ovog proteina, od kojih je izoforma 1 (kanonska) građena od 663 aminokiseline. Masa joj je 75747 Da (UniProtKB Q8NI51). Ukupno je do sada opisano 17 izoformi proteina BORIS, koje se razlikuju u broju cinkovih prstiju, kao i u svojim karboksi- i amino-terminalnim domenama (150).

Ovaj protein je prvi puta opisan 2002. godine kao paralog proteina CTCF izražen u spermatocitima. Svrstan je skupinu “cancer-testis” antigena na temelju toga što je nađen u sjemenicima i određenim tumorima (151). Kasnija istraživanja su pokazala da je, osim u sjemenicima i tumorskim stanicama, BORIS izražen i u brojnim drugim netumorskim tkivima i stanicama (152–155). BORIS je često pojačano izražen u tumorima i tumorskim staničnim linijama (156–177).

Područje cinkovih prstiju je gotovo identično području 11 cinkovih prstiju proteina CTCF. Ne postoji značajna homologija karboksi- i amino-terminalnih domena proteina BORIS i CTCF ili bilo kojeg drugog proteina (178). Ova razlika u karboksi- i amino-terminalnim domenama proteina BORIS i CTCF dovodi do različitih post-translacijskih modifikacija i privlačenja različitih proteina partnera (128,133,151,156,179). Oba ova proteina imaju važnu ulogu u organizaciji kromatina. Zbog skoro istovjetnog područja, kojim se vežu na molekulu DNA, smatralo se da se proteini CTCF i BORIS međusobno natječu za ista vezna mjesta i da imaju oprečnu ulogu u regulaciji transkripcije. Uvriježeno je mišljenje da protein BORIS, za razliku od proteina CTCF, aktivira transkripciju (158), iako novija istraživanja ukazuju na to da je uloga ovih proteina u regulaciji transkripcije gena ovisna o njihovom lokusu (180). Najnovija, komparativna istraživanja ovih proteina su pokazala da u genomu postoje dvije vrste područja vezanja proteina CTCF (CTSs, od engl. *CTCF target sites*). Jedna skupina je građena od dva ili više vrlo blizu položenih veznih mjesta za CTCF (2XCTS), i na ta mjesta se, u normalnim somatskim stanicama, vežu multimeri proteina CTCF, dok se u zametnim i tumorskim stanicamana na njih vežu multimeri proteina CTCF i BORIS ili multimeri proteina BORIS. Protein BORIS se, u stanicama tumora u kojima je izražen, uvijek veže na 2XCTS elemente na način svojstven vezanju proteina BORIS na kromatin u zametnim stanicama. Približno jedna trećina svih CTCF veznih mjesta u genomu pripada skupini 2XCTS. Za razliku od 2XCTS elemenata, druga skupina CTCF veznih mjesta, 1XCTS, sadrži pojedinačna CTCF-vezna mjesta i na njih se isključivo veže CTCF. Skupina 2XCTS je smještena u aktivnim promotorima i pojačivačima transkripcije gena, za razliku od 1XCTS skupine smještene u transkripcijski inertnim područjima, što je u skladu s izolatorskom ulogom proteina CTCF (181).

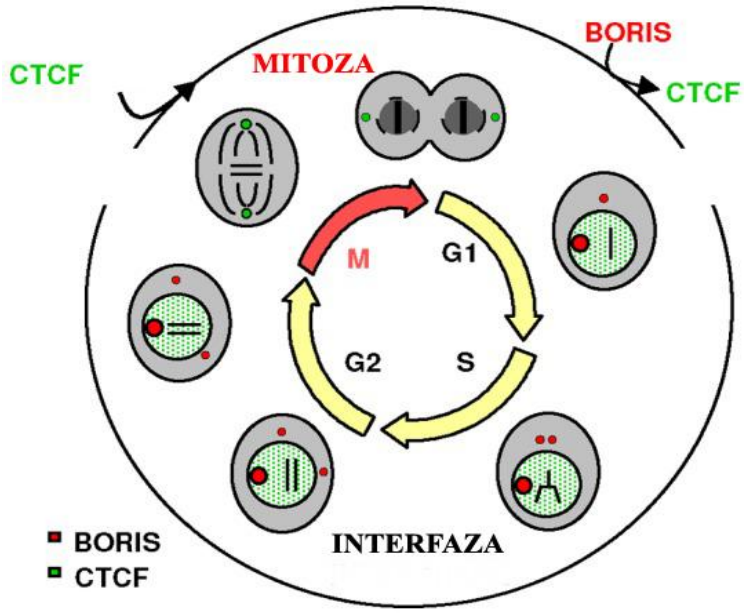
Jelinic i sur. (179) su pokazali da protein BORIS sudjeluje u regulaciji genomskog upisa. Upisani geni se prepisuju samo s jednog roditeljskog alela, što je epigenetski

regulirano metilacijom molekule DNA i modifikacijama histona. Transkripcija upisanih gena Igf2/H19 je regulirana metilacijom područja kontrole genomskog upisa (ICR od engl. *imprinting control region*), koje je smješteno između ta dva gena. Autori su pokazali da se protein BORIS veže na ICR tijekom embrionalnog razvoja muških zametnih stanica, u vrijeme kada dolazi do metilacije tog područja. Proten BORIS je u vezi sa metiltransferazom histona PRMT7, koja simetrično dimetilira arginin 3 na histonu 4, a također je jako izražena u tom razvojnom periodu. Koekspresijom proteina BORIS, PRMT7 i *de novo* metiltransferaza DNA Dnmt3a, Dnmt3b i DnmtL u jajnim stanicama žabe su pokazali da ovi proteini, u kompleksu, dovode do metilacije područja ICR.

Nguyen i sur. (182) su pokazali da protein BORIS ima ulogu u aktivaciji transkripcije gena *MYC* i *BRCA1*, za razliku od negativnog utjecaja proteina CTCF na taj proces. Iako se zbog visokog stupnja homologije u području cinkovih prstiju, odgovornom za vezanje na molekulu DNA, proteini CTCF i BORIS potencijalno mogu vezati na ista vezna mjesta, oni uslijed razlika u amino- i karboksi- krajevima privlače različite proteinske komplekse. Protein BORIS, u području promotora gena *MYC* i *BRCA1*, stvara kompleks s proteinom BAT3 i metiltransferazom SET1A, koja katalizira metilaciju lizina 4 na histonu 3 (H3K4me) što pogoduje aktivaciji ovih gena.

Osim što je izražen u zametnim stanicama, Rosa-Garrido i sur. (153) su pokazali da je protein BORIS izražen u koži i da ima važnu ulogu u staničnom ciklusu. Metodom imunocitokemije je pokazano da je smješten u jezgrici i područjima kromatina rahle strukture, u kojima se odvija transkripcija, što je skladu s rezultatima Kosaka-Suzuki i sur. (183), koji su pokazali da je protein BORIS nužan za aktivaciju transkripcije gena *TSP50* u stanicama tumora, ali bez obzira što se veže neovisno o metilaciji veznih mjesta, njegova aktivacijska uloga ovisi o zauzetosti promotora nukleosomima i posljedično o pristupačnosti veznih mjesta. Naročito jako je izražen u jezgricama stanica, u suprabazalnom sloju epiderme, koje se nastavljaju dijeliti i diferenciraju nakon zastoja u diobi. Smješten je na centrosomima stanica u interfazi, ali ne i u stanicama u mitozi (Slika 11). U stanicama epiderme, prije terminalne diferencijacije, dolazi do zaustavljanja staničnog ciklusa i do nakupljanja ciklina B. U tim stanicama dolazi do nakupljanja proteina BORIS koji onemogućava ulazak stanica u mitozu, stanice se zaustavljaju u S fazi staničnog ciklusa. Eksperimentalno izazvan zastoj u staničnom ciklusu, kao i izlaganje keratinocita genotoksičnom spoju doksorubicinu, dovodi do nakupljanja proteina BORIS u stanicama. Jednako tako eksperimentalno

izazvana ektopična, povećana izraženost ovog proteina dovodi do nakupljanja stanica u S fazi staničnog ciklusa i povećanja broja velikih, poliploidnih stanica. Za nastavak staničnog ciklusa je neophodno da se protein BORIS, kao i drugi regulatori S faze staničnog ciklusa i mitoze (ciklini E, A i B) razgrade. Kako, u fiziološkim uvjetima, mitoza na smije započeti prije dovršetka S faze staničnog ciklusa i razgradnje njezinih regulatora, autori upućuju na moguću ulogu proteina BORIS u usklađivanju S faze staničnog ciklusa sa započinjanjem mitoze. Nadalje, pretpostavljaju da poremećaj ove regulacije dovodi do genomske nestabilnosti.




**Slika 11:** Model izmjene proteina CTCF i BORIS u jezgri i na centrosomima tijekom staničnog ciklusa **.** Protein CTCF je smješten po cijeloj jezgri i vezan uz centrosome stanica u metafazi. BORIS je smješten u jezgricama i vezan uz centrosome u interfazi. Tijekom metafaze BORIS nije vezan uz centrosome. (Prilagođeno iz ref. 153).

Pokazano je da protein BORIS pozitivno regulira transkripciju gena *hTERT* (engl. *human telomerase reverse transcriptase*) (167). Upotrebom metode "molecular beacon" (184) za prikaz izraženosti mRNA, na modelu embrionalnih tumorskih stanica, je pokazano da je *BORIS* izražen u maloj podskupini (3-5%) tumorskih stanica. U stanicama sa izraženim transkriptima gena *BORIS* je izmjerena povišena razina transkripata gena *hTERT*, gena koji kodiraju za biljege matičnih stanica

(*NANOG*, *OCT4* i *SOX2*) te gena koji kodiraju za biljege matičnih stanica raka (*CD44* i *ALDH1*) u odnosu na stanice u kojima *BORIS* nije bio izražen. Utišavanje gena *BORIS* rezultiralo je smanjenjem izraženosti gena *hTERT* i gena za biljege matičnih stanica i matičnih stanica raka (185).

Malo se zna o izraženosti i ulozi proteina BORIS i karcinomu pločastih stanica glave i vrata. Smith i sur. (166) su pokazali da je BORIS izražen ovoj vrsti tumora i karcinomu pluća te da dovodi do povećane izraženosti proto-onkogena i "cancer-testis" gena te pretpostavili da je to posljedica demetilacije njihovih promotora posredovane proteinom BORIS. Cuffel i sur. (186) u svom istzraživanju izraženosti "cancer-testis" gena u tumorima glave i vrata nisu našli povezanost izraženosti proteina BORIS i MAGE-A3/A4. Nekoliko transkripcijskih inačica gena *BORIS*, kao i protein BORIS je izraženo u karcinomima pločastih stanica larinksa. Izraženost transkripcijske inačice koja sadrži ekson 7 gena *BORIS* bila je povezana sa lošijom prognozom bolesti (174).

## 2. HIPOTEZA

Neki od čimbenika rizika nastanka karcinoma pločastih stanica hipofarinksa dovode do globalne hipometilacije molekule DNA, koja može potaknuti transkripciju gena *BORIS*, na temelju čega sam pretpostavio da u ovom tipu tumora dolazi do njegove aktivacije. Opisano je više transkripcijskih inačica ovog gena, koje nastaju razlikovnim prekrajanjem primarnih transkripata (engl. *alternative splicing*). Aktivnost nekih čimbenika izrezivanja je pod utjecajem aktivnosti enzima PARP-1, kojeg aktiviraju oštećenja DNA, koja su česta tijekom zloćudne preobrazbe izazvane štetnim utjecajima okoliša. Pretpostavio sam, stoga, da je u karcinomima pločastih stanica hipofarinksa izraženo više transkripcijskih inačica gena *BORIS*.

Imajući na umu ulogu proteina BORIS u poticanju transkripcije gena *MYC,* pretpostavka je da povećana izraženost proteina BORIS može dovesti do povećane izraženosti proteina MYC, što može utjecati na biološko ponašanje tumora i u konačnosti na ishod bolesti u oboljelih od karcinomima pločastih stanica hipofarinksa.

# 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

OPĆI CILJ:

Istražiti izraženost transkripata i proteina BORIS i MYC u karcinomu pločastih stanica hipofarinksa, utjecaj njihove uzraženosti na petogodišnje preživljenje oboljelih od karcinoma pločastih stanica hipofarinksa te usporediti izraženost navedenih proteina s klasičnim prognostičkim čimbenicima.

SPECIFIČNI CILJEVI:

Dokazati transkripte i protein BORIS u karcinomu pločastih stanica hipofarinksa.

Istražiti koje su transkripcijske inačice gena *BORIS* izražene u karcinomu pločastih stanica hipofarinksa.

Utvrditi aktivira li protein BORIS gen *MYC* i dovodi li do povećane izraženosti proteina MYC u navedenoj vrsti tumora.

Utvrditi postoji li povezanost između izraženosti pojedinih transkripcijskih inačica gena *BORIS* i petogodišnjeg preživljenja oboljelih od karcinoma pločastih stanica hipofarinksa.

Istražiti povezanost izraženosti proteina MYC i BORIS s petogodišnjim preživljenjem oboljelih od karcinoma pločastih stanica hipofarinksa.

# 4. MATERIJALI I METODE

## 4.1. Materijali

### 4.1.1. Bolesnici i uzorci tkiva

U ovo retrospektivno istraživanje izraženosti transkripata i proteina BORIS i MYC je bilo uključeno 59 bolesnika oboljelih od karcinoma pločastih stanica hipofarinksa, operiranih u Klinici za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata KBC Sestre milosrdnice u razdoblju od 2001. do 2006. godine. U istraživanju su korišteni uzorci tkiva tumora, odstranjenih tijekom operativnog zahvata, te uzorci priležećeg netumorskog tkiva, koje je bilo dostupno za 31 tumor. Sav intraoperativni materijal je uzet uz obavješteni pristanak bolesnika i odobrenje Etičkog povjerenstva KBC Sestre milosrdnice. Uzorak tumorskog tkiva za genetsku analizu uzima se sa mjesta iz kojeg je uzeto tkivo za PHD analizu *ex tempore* te potvrđeno da se radi o karcinomu pločastih stanica. Zdravo tkivo za analizu se uzima distalno od *ex tempore* dokazanog negativnog ruba, a na pravcu koji je određen mjestom uzetog tumorskog tkiva i *ex tempore* dokazanog negativnog ruba. Uzorci tkiva uzeti tijekom operativnog zahvata su, zamrznuti u tekućem dušiku, prevezeni na Institut Ruđer Bošković u Zavod za molekularnu medicinu, gdje su do daljnje obrade pohranjeni pri -80$^{o}$C u Hrvatsku banku tumora (187).

**Tablica 1:**

| oznaka uzorka | spol/dob | pT | pN | cTNM | stupanj diferencijacije (gradus) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | M/48 | 2 | 3 | T3N3Mx | III |
| 2 | M/51 | 3 | 1 | T3N1Mx | II |
| 3 | M/57 | 3 | 2 | T4N3Mx | II |
| 4 | M/44 | 3 | 2 | T3N2aMx | II |
| 5 | M/58 | 3 | 2 | T3N2Mx | III |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 6 | M/58 | 1 | 1 | T1N1Mx | II |
| 7 | M/45 | 4 | 2 | T4aN2bMx | II |
| 8 | M/48 | 3 | 2 | T3N2bMx | II |
| 9 | M/41 | 2 | 0 | T3N0Mx | II |
| 10 | M/47 | 4 | 2 | T4aN2bMx | I |
| 11 | M/60 | 4 | 2 | T4aN2bMx | III |
| 12 | M/73 | 1 | 0 | T2N0Mx | II |
| 13 | M/57 | 4 | 2 | T3N2aMx | II |
| 14 | M/69 | 2 | 1 | T3N0Mx | III |
| 15 | M/58 | 3 | 2 | T3N2aMx | II |
| 16 | M/46 | 2 | 0 | T3N0Mx | II |
| 17 | M/59 | 2 | 2 | T3N2cMx | II |
| 18 | M/59 | 3 | 2 | T3N2aMx | II |
| 19 | M/58 | 3 | 2 | T3N2bMx | II |
| 20 | M/71 | 2 | 2 | T3N2aMx | II |
| 21 | M/48 | 2 | 2 | T2N2bMx | III |
| 22 | M/53 | 2 | 2 | T2N2aMx | II |
| 23 | M/76 | 2 | 2 | T2N2bMx | II |
| 24 | M/69 | 2 | 0 | T3N0Mx | II |
| 25 | M/52 | 3 | 2 | T3N2cMx | II |
| 26 | M/65 | 4 | 2 | T4aN2cMx | III |
| 27 | M/62 | 3 | 2 | T3N2bMx | II |
| 28 | M/41 | 2 | 2 | T3N2bMx | II |
| 29 | M/58 | 2 | 2 | T3N2bMx | III |
| 30 | M/44 | 2 | 1 | T2N1Mx | II |
| 31 | Ž/59 | 1 | 2 | T1N2bMx | II |
| 32 | M/50 | 3 | 2 | T3N2cMx | III |
| 33 | M/52 | 2 | 1 | T3N2bMx | II |
| 34 | M/59 | 4 | 2 | T4aN2aMx | I |
| 35 | M/48 | 2 | 3 | T3N3Mx | III |
| 36 | M/48 | 4 | 2 | T4aN2aMx | III |
| 37 | M/49 | 3 | 1 | T3N1Mx | II |
| 38 | M/54 | 2 | 2 | T3N2Mx | III |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 39 | M/56 | 3 | 2 | T3N2cMx | II |
| 40 | M/45 | 2 | 0 | T2N0Mx | II |
| 41 | M/67 | 2 | 2 | T2N2bMx | II |
| 42 | M/52 | 4 | 1 | T4aN1Mx | II |
| 43 | M/61 | 3 | 2 | T3N2bMx | II |
| 44 | M/51 | 3 | 0 | T3N0Mx | II |
| 45 | M/51 | 2 | 2 | T2N2cMx | III |
| 46 | Ž/55 | 3 | 1 | T3N1Mx | III |
| 47 | M/62 | 3 | 0 | T3N0Mx | II |
| 48 | M/56 | 2 | 2 | T3N2cMx | II |
| 49 | Ž/49 | 4 | 2 | T4N2cMx | II |
| 50 | M/69 | 2 | 2 | T2N2bMx | III |
| 51 | M/67 | 2 | 2 | T4aN2bMx | II |
| 52 | M/48 | 4 | 2 | T4aN2bMx | II |
| 53 | M/66 | 2 | 0 | T2N0Mx | II |
| 54 | M/49 | 2 | 1 | T2N1Mx | III |
| 55 | M/49 | 2 | 1 | T2N1Mx | III |
| 56 | M/57 | 3 | 1 | T3N1Mx | II |
| 57 | M/58 | 3 | 2 | T4aN2cMx | II |
| 58 | M/55 | 2 | 1 | T2N1Mx | III |
| 59 | M/72 | 2 | 2 | T3N2bMx | III |

## 4.1.2. Kemikalije i puferi

### 4.1.2.1. Izdvajanje ukupne RNA

Otopina TRI Reagent® koja sadrži gvanidin tiocijanat i fenol (Sigma);

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 1500 U DNaze bez RNaze (eng. RNase free) te odgovarajući pufer.

#### 4.1.2.2. Obrnuto prepisivanje (engl. *reverse transcription*)

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 $MgCl_2$, 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).

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

GoTaq® Green Master Mix, 2 x: DNA polimeraza GoTaq®, 2 x pufer za PCR pH 8,5, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP, 3 mM $MgCl_2$ (Promega);

Voda bez nukleaza (Promega);

Oligonukleotidne početnice, 50 nM (Invitrogen). Sljedovi nukleotida specifičnih početnica, temperature sparivanja i veličine umnoženih odsječaka su prikazani u tablici 2.

Agaroza tipa I, niske endoosmotske jakosti (Sigma);

1 x pufer TAE: 40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8.0;

Etidij bromid (Sigma);

Standard 100 bp DNA Ladder, 1 μg/μl (Invitrogen).

**Tablica 2:** Sljedovi nukleotida početnica, temperature sparivanja (Ta) i veličine odsječaka umnoženih u reakciji PCR.

| ciljni slijed na koji naliježu početnice | | slijed nukleotida početnica | Ta | veličina umnoženog odsječka |
|---|---|---|---|---|
| GAPDH | 3'ekson 1-5' ekson 2 | GAPDH1: 5'-AACGGATTTGGTCGTATTGGGC-3' | 58°C | DNA: 642 pb (GAPDH1 i GAPDH2) cDNA: 605 pb (GAPDH2 i GAPDH3) |
| | ekson 7 | GAPDH2: 5'-AGGGATGATGTTCTGGAGAGCC-3' | | |
| | intron 5 | GAPDH3: 5'-AAGCTGACTCAGCCCGCAAAGG-3' | | |
| MYC | | MYC F: 5′-CCACCAGCAGCGACTCTG-3′ | 61°C | 345 bp |
| | | MYC R: 5′-CCAAGACGTTGTGTGTTC-3′ | | |
| BORIS | | 6ZnP F: 5'-TCACCAGTGGAGAACTCGTCCG-3' | * | |
| | | Fl.B R: 5'-GTGTGGGTACGAATGTGAGCGG-3' | | |

*Temperatura sparivanja (Ta) je u prvom ciklusu iznosila 60°C i smanjivala se za 1°C u sljedećih pet ciklusa, nakon čega je slijedilo 35 ciklusa u kojima je Ta iznosila 55°C.

#### 4.1.2.4. Imunohistokemija

Poliklonsko kunićje protutijelo na BORIS: anti-BORIS, sc-98982, (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, SAD)

Poliklonsko kunićje protutijelo na MYC: c-Myc (C-19): sc-788 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, SAD)

ImmunoCruz ABC Staining System (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, SAD)

DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit (Vector Laboratories, Burlingame, Ca, SAD)

## 4.2. Metode

### 4.2.1. Izdvajanje ukupne RNA

Ukupnu RNA sam izdvojio iz tkiva tumora i pripadajućeg netumorskog tkiva. Komadić tkiva sam homogenizirao u 1 ml otopine TRIZOL Reagent® tiješnjenjem, koristeći sterilni štapić inzulinske šprice. Na homogenat sam dodao 0,2 ml kloroforma i centrifugirao 15 minuta na 12 000 x g, pri 4ºC. Potom sam, iz supernatanta, istaložio RNA dodavanjem jednakog volumena izopropanola te centrifugiranjem na 4°C, 5 minuta pri 12 000 x g. Talog RNA sam isprao s 1 ml 75% etanola i ponovno centrifugirao 5 minuta pri 7 500 x g. Nakon uklanjanja etanola i sušenja, talog RNA sam otopio u 100 µl vode bez RNaza. Koncentraciju izdvojene ukupne RNA u pripravcima sam odredio mjerenjem optičke gustoće pri valnoj duljini 260 nm, a njezinu čistoću na temelju omjera vrijednosti mjerenja pri valnim duljinama 260 i 280 nm. Sva mjerenja sam obavio na uređaju „Nanodrop“ Shimatzu na Institutu Ruđer Bošković.

Po potrebi, izdvojenu RNA sam dodatno pročistio od zaostale DNA kompletima kemikalija "RNeasy® Mini Kit" i "RNase free DNase set®" prema uputama proizvođača (Qiagen).

Nakon pročišćavanja sam, ponovno, izmjerio koncentraciju RNA u pripravcima kao što je ranije opisano. Uzorke RNA sam, do daljnje obrade, pohranio pri -80$^{o}$C.

### 4.2.2. Obrnuto prepisivanje

Metodom obrnutog prepisivanja sam iz ukupne RNA dobio komplementarnu DNA (cDNA), potrebnu za istraživanje izraženosti transkripata gena *BORIS* i *MYC*.

Reakcijska smjesa se sastojala od ukupne RNA (1 µg), 0,025 µg početnice oligo(dT)$_{18}$ (New England BioLabs, Ipswich, MA) te vode bez nukleaza do 16,3 µl. Kako bi se omogućilo nalijeganje početica oligo(dT)$_{18}$ na poliA "rep" glasničke RNA, uzorak sam denaturirao 10 min pri 65°C, nakon čega sam dodao: 2 µl 10 x pufera za obrnuto prepisivanje, 1 µl otopine dNTP (10 mM svaki), 20 U inhibitora RNaza te 40

U reverzne transkriptaze, M-MLV. Nakon inkubacije (jedan sat pri 37ºC), u ovu otopinu novonastale cDNA dodao sam 80 µl demineralizirane vode te pohranio cDNA pri -20°C.

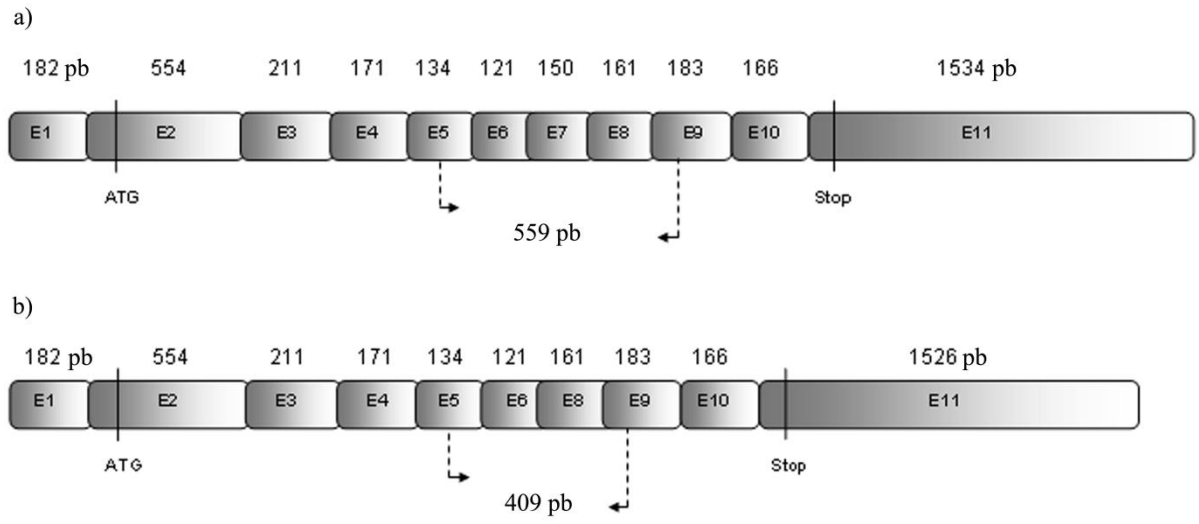
Uspješnost reakcije obrnutog prepisivanja provjerio sam umnažanjem odsječka gena *GAPDH* (gliceraldehid-fosfat dehidrogenaza) koji je ujednačeno izražen u svim stanicama („housekeeping gen“), koristeći dobivenu cDNA kao kalup u lančanoj reakciji polimerazom (PCR). Za umnažanje odsječaka *GAPDH* koristio sam početnice GAPDH1: 5'-AACGGATTTGGTCGTATTGGGC-3' i GAPDH2: 5'-AGGGATGATGTTCTGGAGAGCC-3'. Kako bi isključio postojanje zagađenja genomskom DNA, *GAPDH* sam umnožio korištenjem početnica GAPDH2 i GAPDH3 (komplementarna intronu 5 gena *GAPDH*).

Uzorke cDNA, koji su zadovoljili provjeru kvalitete, koristio sam kao kalup za određivanje izraženosti transkripata gena *BORIS* i *MYC*.

### 4.2.3. Određivanje izraženosti gena *BORIS*

Za analizu transkripata gena *BORIS* sam koristio početnice smještene u eksonu 5 i eksonu 9, pomoću kojih se može umnožiti 13 (A1, A2, A5, A6, B0, B1, B2, B3, B4, B5, C1, C3 i C8) od ukupno 23 opisane transkripcijske inačice (150).

Smještaj početnica i veličine umnoženih odsječaka transkripcijskih inačica su prikazane na slici 12.



**Slika 12:** Shematski prikaz smještaja početnica korištenih u lančanoj reakciji polimerazom i veličine umnoženih odsječaka: a) 559 pb (transkripcijske inačice B0, A1, A2, C1, B1, C3, B2, B3, A5, B4) i b) 409 pb (transkripcijska inačica A3).

Reakcijska smjesa (12.5 μl) se sastojala od 6.25 μl Green master mix (Promega), po 0,4 μl svake 10 μM početnice, cDNA kalupa i $dH_2O$. Lančana reakcija polimerazom se odvijala na sljedeći način: nakon denaturacije 3 min pri 94$^oC$ slijedilo je pet ciklusa u kojima je temperatura nalijeganja smanjivana za 1$^oC$ u svakom narednom ciklusu, počevši od 60$^oC$, nakon čega je slijedilo 35 ciklusa pri temperaturi nalijeganja 55$^oC$. Dobiveni produkti su analizirani elektroforezom u 2%-tnom gelu agaroze s etidij bromidom. Gelovi agaroze su fotografirani.

### 4.2.4. Analiza izraženosti proteina BORIS i MYC

Izraženost i lokalizacija proteina BORIS i MYC određivana je metodom imunohistokemije. Ukratko, formalinom fiksirano, u parafin uklopljeno tkivo je narezano na rezove debljine 3-4 μm. Rezovi su deparafinizirani u ksilenu i rehidrirani u nizu alkohola od 100%, 96%, 80% i 70% te preneseni u destiliranu vodu. Nakon rehidracije rezovi su podvrgnuti postupku demaskiranja antigena, nakon čega su inkubirani u 0,3% $H_2O_2$ kako bi se dokinula endogena aktivnost peroksidaza. Nakon ispiranja, rezovi su inkubirani u normalnom serumu kako bi se izbjeglo nespecifično vezanje protutijela. Potom su rezovi inkubirani u primarnom protutijelu (anti-BORIS, sc-98982, Santa Cruz; anti-MYC, sc-788, Santa Cruz) i isprani. Slijedila je inkubacija u sekundarnom protutijelu označenom biotinom. Nakon ispiranja, uzorci su inkubirani u ImmunoCruz ABC reagensu te isprani. Otopina supstrata za peroksidazu je nakapana na rezove i boja se razvijala pri sobnoj temperaturi. Rezovi su isprani, obojani hematoksilinom, dehidrirani i uklopljeni u Kanada balzam. Rezultati imunohistokemijskog bojenja su analizirani svjetlosnim mikroskopom i prikazani semikvantitativno.

Imunohistokemijsko obojenje proteina MYC je ocijenjeno sa 0 (nema reakcije); + (do 10% pozitivnih stanica); ++ (od 10 do 50% pozitivnih stanica); +++ (više od 50% pozitivnih stanica).

Imunohistokemijsko obojenje proteina BORIS je ocijenjeno kao što je ranije opisano u radovima u kojima je istraživana izraženost ovog proteina (159,164). Rezovi su, prema postotku pozitivnih stanica, svrstani u četiri skupine (<10%=1; 10-50%=2; >50-80%=3; >80%=4). Intenzitet obojenja je ocijenjen od 0 (nema obojenja) do 3 (jako obojenje). Konačna ocjena imunoreaktivnosti (IRS, od engl. *immunoreactivity score*) je izračunata množenjem broja skupine (0-4) i ocjene intenziteta obojenja (0-3) i bila je u rasponu od 0 do 12.

### 4.2.5. Statistička analiza 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 Lincense (188).

Podaci dobiveni prebrojavanjem su prikazani kao brojevi, odnosno postotci. Razlike među njima su testirane uporabom $\chi$ 2 -testa, a p vrijednosti $\leq$ 0,05 smatrane su statistički značajnima. Podaci dobiveni mjerenjem su prikazani kao minimum, prva kvartila (Q1), medijan, treća kvartila (Q3), maksimum, i aritmetička sredina.

Pojava smrtnog ishoda bolesti za pojedinačne parametre prikazana je postupkom po Kaplan-Meieru, a razlika među krivuljama je testirana uporabom Gehan-Wilcoxon testa. Korišten je Gehan-Wilcoxon test jer naglašava prvi dio studije dok u razdoblju iza 60 mjeseci dominiraju cenzorirani bolesnici. P vrijednosti manje ili jednake 0,05 su smatrane statistički značajnima (189).

Multivarijatna analiza povezanosti promatranih varijabli s pojavom smrtnog ishoda bolesti zasnivala se na uporabi različitih oblika rekurzivnog particioniranja (RP) implementiranih kao party (190) i rpart (191) moduli unutar programskog jezika R. Programi zasnovani na RP-u izvrsno razjašnjavaju kompleksne i nelinearne interakcije, te daju pouzdane zaključke i na relativno malom broju ispitanika i/ili

varijabli. Osim toga, algoritmi RP-a daju pouzdane zaključke čak i ako nedostaje dio podataka. Zbog toga se sve više koriste u onkologiji za izdvajanje čimbenika rizika, izradu prognostičkih indeksa, te optimizaciju dijagnostike i terapije. Rezultat rekurzivnog particioniranja izražava se kao omjer rizika (*engl.* hazard ratio) (192).

# 5. REZULTATI

## 5.1. Broj ispitanika

U istraživanje je bilo uključeno 59 bolesnika oboljelih od zloćudnog tumora hipofarinksa, liječenih u razdoblju od 2001.-2006. godine. Veličina uzorka odgovara primjenjenoj metodologiji multivarijatne analize (rekurzivno particioniranje). Iskustvo je pokazalo da kod takvog testiranja broj ispitanika mora biti najmanje 5 puta veći od broja varijabli u analizi. Kako je proučavano 11 varijabli omjer broja bolesnika i varijabli je 5,36 što predstavlja zadovoljavajući omjer.

## 5.2. Spol ispitanika

U tablici 3. je prikazana raspodjela ispitanika po spolu.

**Tablica 3:** Raspodjela ispitanika po spolu.

| **Spol** | **m** | **ž** |
|---|---|---|
| **N** | 56 | 3 |
| **%** | 94,9 | 5,1 |

## 5.3. Dob ispitanika

Detalji deskriptivne statistike za dob u trenutku postavljanja dijagnoze prikazani su u tablici 4.

**Tablica 4:** Deskriptivna statistika dobi u trenutku postavljanja dijagnoze.

| | **N** | $\bar{x}$ | **Medijan** | **Minimum** | **Maksimum** | **Q1** | **Q3** | **SD** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **dob** | 59 | 55.9 | 56.0 | 41 | 76 | 49.0 | 59.0 | 8.78 |

N – broj ispitanika; $\bar{x}$ - aritmetička sredina; Q1 – prva kvartila; Q3 – treća kvartila; SD – standardna devijacija

### 5.4. Dužina praćenja

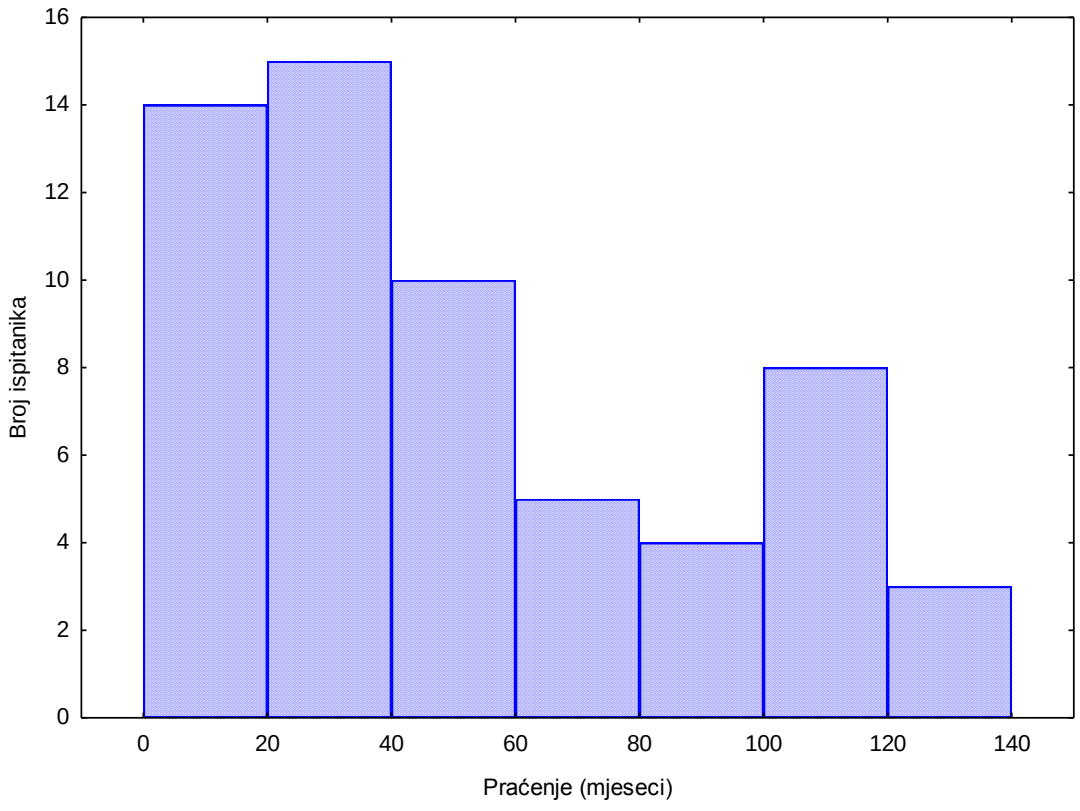
Prosječna dužina praćenja bolesnika, izražena kao aritmetička sredina i standardna devijacija, bila je 52,8+-38,50 mjeseci. Zbog velike standardne devijacije medijan je realnija mjera dužine praćenja i iznosi 43 mjeseca, uz interkvartilni raspon od 21–82 mjeseca. Detalji deskriptivne statistike za praćenje bolesnika prikazani su u tablici 5 i na histogramu duljine praćenja bolesnika na slici 13.

**Tablica 5:** Deskriptivna statistika za praćenje bolesnika.

| | **N** | $\bar{x}$ | **Medijan** | **Minimum** | **Maksimum** | **Q1** | **Q3** | **SD** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Praćenje** | 59 | 52.8 | 43.0 | 6 | 133 | 21.0 | 82.0 | 38.50 |

N – broj ispitanika; $\bar{x}$ - aritmetička sredina; Q1 – prva kvartila; Q3 – treća kvartila; SD – standardna devijacija

**Slika 13:** Histogram duljine praćenja bolesnika (mjeseci)



### 5.5. Kompletnost praćenja

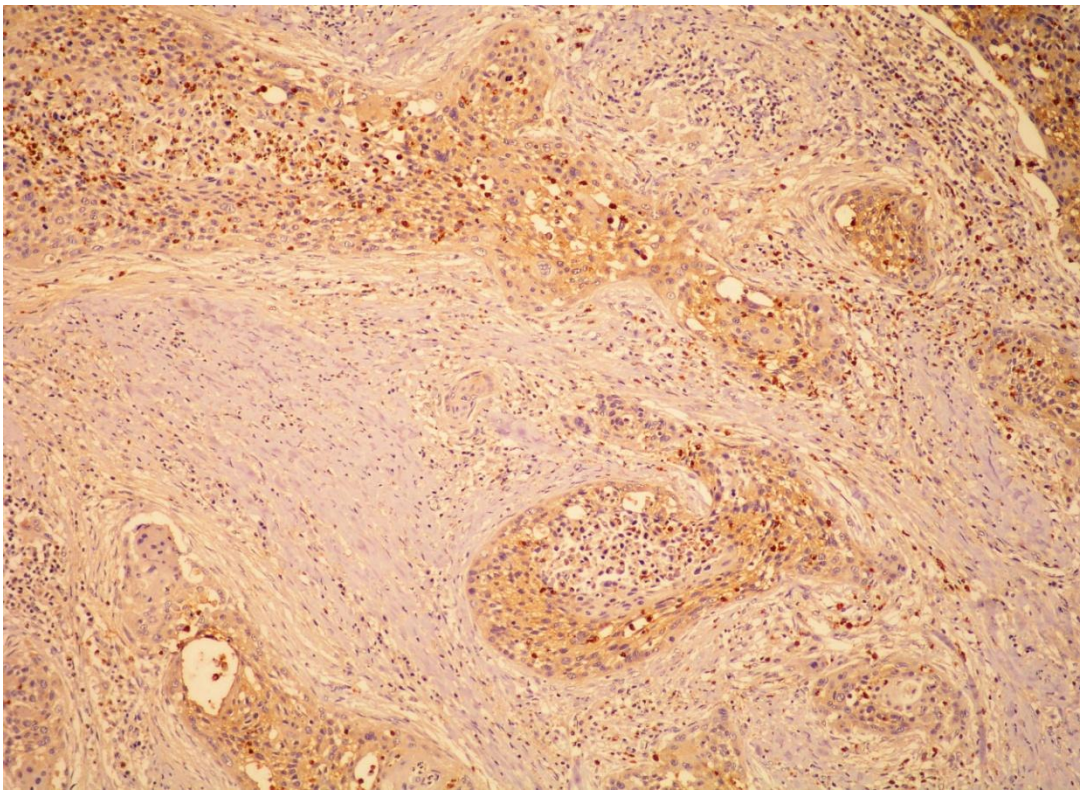
Kompletnost praćenja izražava se kao cenzorirano ili kompletno. Kompletno praćenje je ono kod kojeg je kritični događaj, u ovom slučaju smrt, nastupila u zadanom vremenu praćenja. Cenzorirano praćenje označava ono kod kojeg, u tom vremenu, kritični događaj nije nastupio odnosno bolesnici su živi. U tablici 6 je prikazana raspodjela kompletnosti praćenja.

**Tablica 6:** Raspodjela kompletnosti praćenja.

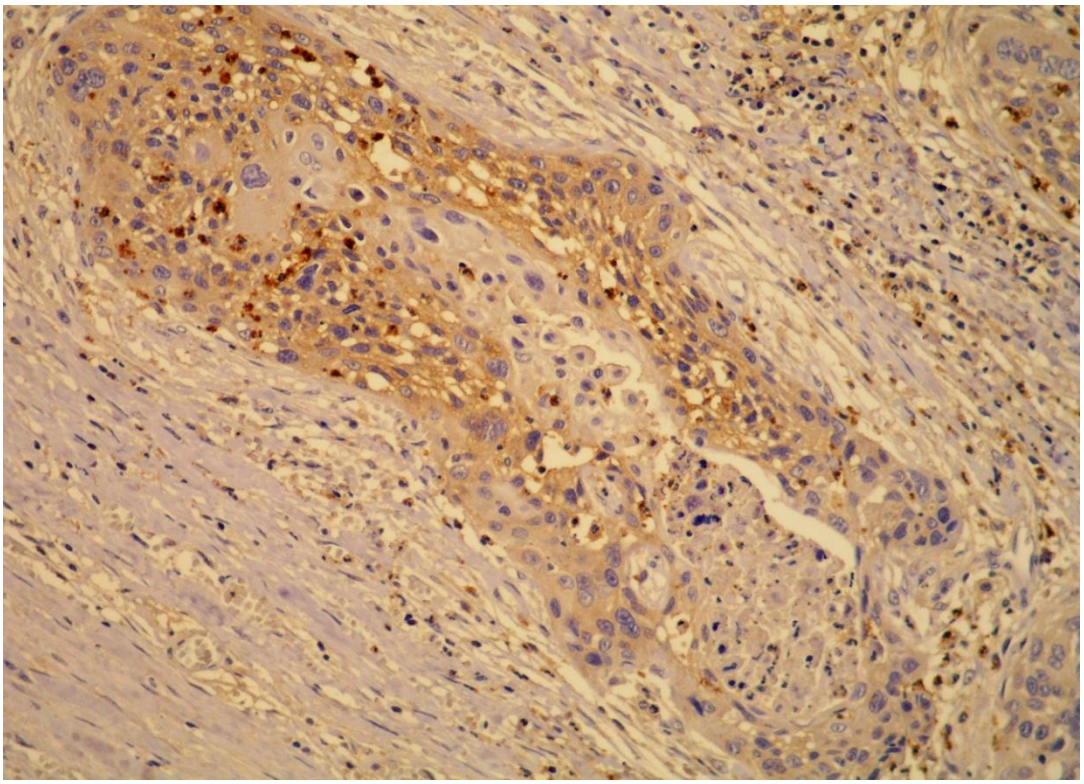
| | **Cenzorirano praćenje (0)** | **Kompletno praćenje (1)** |
|---|---|---|
| **N** | 33 | 26 |
| **%** | 55,9 | 44,1 |

## 5.6. Analiza izraženosti proteina BORIS

**A**



**B**



**Slika 14:** Imunohistokemijsko bojanje proteina BORIS. A) povećanje x100 ; B) povećanje ×200.

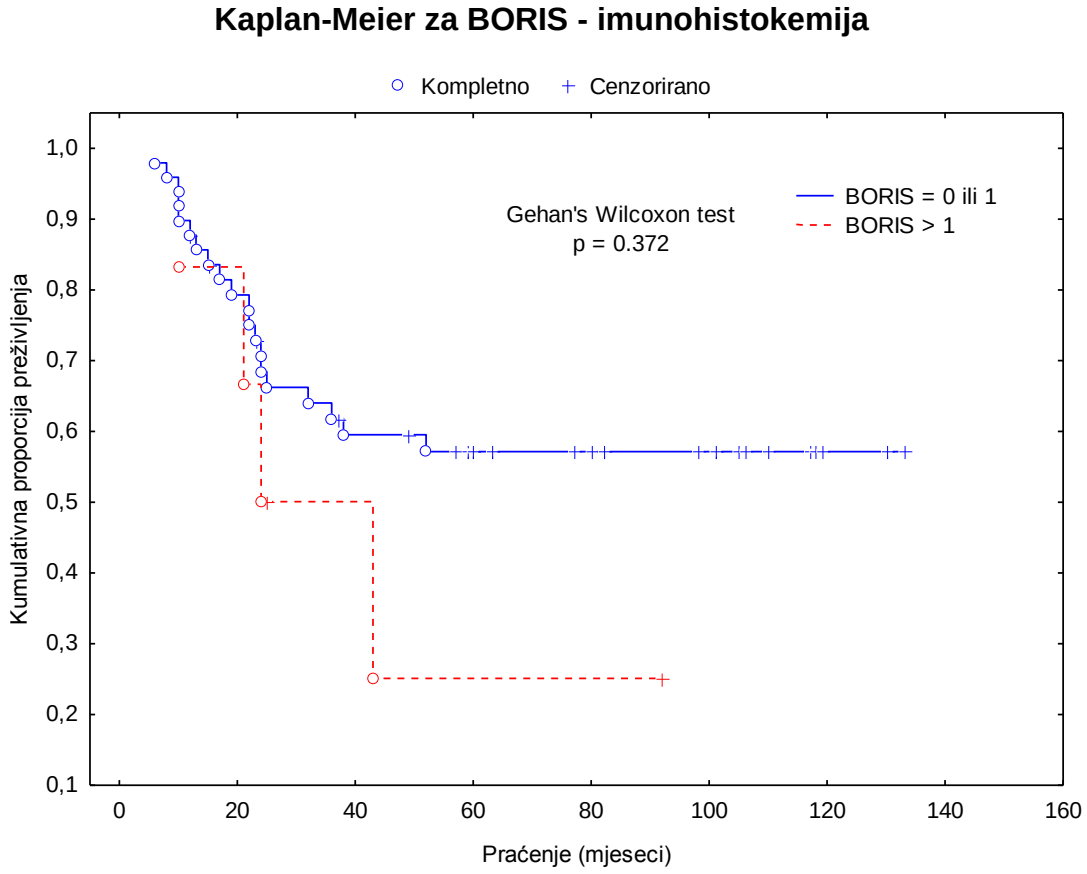
Izraženost proteina BORIS analizirana je metodom imunohistokemije i stupnjevana od 0 do 12. U tablici 7 prikazana je raspodjela bolesnika po jačini obojenja proteina BORIS.

**Tablica 7:** Raspodjela po jačini obojenja proteina BORIS.

| **BORIS** | **0** | **1** | **2** | **4** | **6** | **8** | **12** | **nedostaje** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **N** | 34 | 14 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 4 |
| **%** | 57,6 | 23,7 | 5,1 | 1,7 | 1,7 | 1,7 | 1,7 | 6,8 |

Bolesnici su grupirani u dvije skupine gdje prvu čine oni bez ili sa slabo izraženim proteinom BORIS (BORIS 0/1) dok drugu čine bolesnici u čijim je tumorima protein BORIS znatnije izražen (BORIS>1).

Gehan's Wilcoxon test za izraženost proteina BORIS je pokazao da razlika u proporciji preživljenja, prikazana na slici 15, nije statistički značajna (p = 0,37218).




**Slika 15:** Razlika u proporciji preživljenja između skupina BORIS 0/1 i BORIS>1

### 5.6.1. Analiza izraženosti proteina BORIS u odnosu na veličinu tumora, zahvaćenost limfnih čvorova i stupanj diferencijacije (gradus)

Pomoću $x^2$-testa smo analizirali raspodjelu niske (IRS 0-1) i visoke (IRS >1) izraženosti proteina BORIS u odnosu prema klasičnim prognostičkim čimbenicima: veličini tumora (pT i cT), zahvaćenosti limfnih čvorova (pN i cN), prema klasifikaciji TNM, te stupnju histološke diferencijacije tumora (G).

Nije nađena statistički značajna razlika u raspodjeli niske i visoke izraženosti proteina BORIS u odnosu na veličinu tumora, prikazano u tablicama 8 i 9.

**Tablica 8:** Raspodjela niske i visoke izraženosti proteina BORIS u odnosu na pT.

| Veličina tumora | BORIS IRS 0/1 | BORIS IRS >1 | ukupno |
|---|---|---|---|
| pT1 | 3 (100%) | 0 (0%) | 3 |
| pT2 | 23 (88,5%) | 3 (11,5%) | 26 |
| pT3 | 14 (87,5%) | 2 (12,5%) | 16 |
| pT4 | 8 (80%) | 2 (20%) | 10 |
| ukupno | 48 | 7 | 55 |

$x^2$=0,948; p=0,8139

**Tablica 9:** Raspodjela niske i visoke izraženosti proteina BORIS u odnosu na cT.

| Veličina tumora | BORIS IRS 0/1 | BORIS IRS >1 | ukupno |
|---|---|---|---|
| cT1 | 2 (100%) | 0 (0%) | 2 |
| cT2 | 12 (92,3%) | 1 (7,7%) | 13 |
| cT3 | 24 (85,7%) | 4 (14,3%) | 28 |
| cT4 | 2 (100%) | 0 (0%) | 2 |
| cT4a | 8 (80%) | 2 (20%) | 10 |
| ukupno | 48 | 7 | 55 |

$x^2$=1,417; p=0,8412

Pronađena je statistički značajna razlika u raspodjeli niske i visoke izraženosti proteina BORIS u odnosu na zahvaćenost limfnih čvorova. Značajno je češća niska izraženost proteina BORIS od visoke izraženosti u tumorima višeg pN i cN statusa, prikazano u tablicama 10 i 11.

**Tablica 10:** Raspodjela niske i visoke izraženosti proteina BORIS u odnosu na pN.

| Limfni čvorovi | BORIS IRS 0/1 | BORIS IRS >1 | ukupno |
|---|---|---|---|
| pN0 | 4 (50%) | 4 (50%) | 8 |
| pN1 | 10 (100%) | 0 (0%) | 10 |
| pN2 | 32 (91,4%) | 3 (8,6%) | 35 |
| pN3 | 2 (100%) | 0 (0%) | 2 |
| ukupno | 48 | 7 | 55 |

$x^2$=12,3; **p=0,0064**

**Tablica 11:** Raspodjela niske i visoke izraženosti proteina BORIS u odnosu na cN.

| Limfni čvorovi | BORIS IRS 0/1 | BORIS IRS >1 | ukupno |
|---|---|---|---|
| cN0 | 4 (50%) | 4 (50%) | 8 |
| cN1 | 9 (100%) | 0 (0%) | 9 |
| cN2a | 7 (87,5%) | 1 (12,5%) | 8 |
| cN2b | 18 (100%) | 0 (0%) | 18 |
| cN2c | 7 (77,8%) | 2 (22,2%) | 9 |
| cN3 | 3 (100%) | 0 (0%) | 3 |
| ukupno | 48 | 7 | 55 |

$x^2$=15,1; **p=0,010**

Nije nađena statistički značajna razlika u raspodjeli niske i visoke izraženosti proteina BORIS u odnosu na gradus, prikazano u tablici 12.

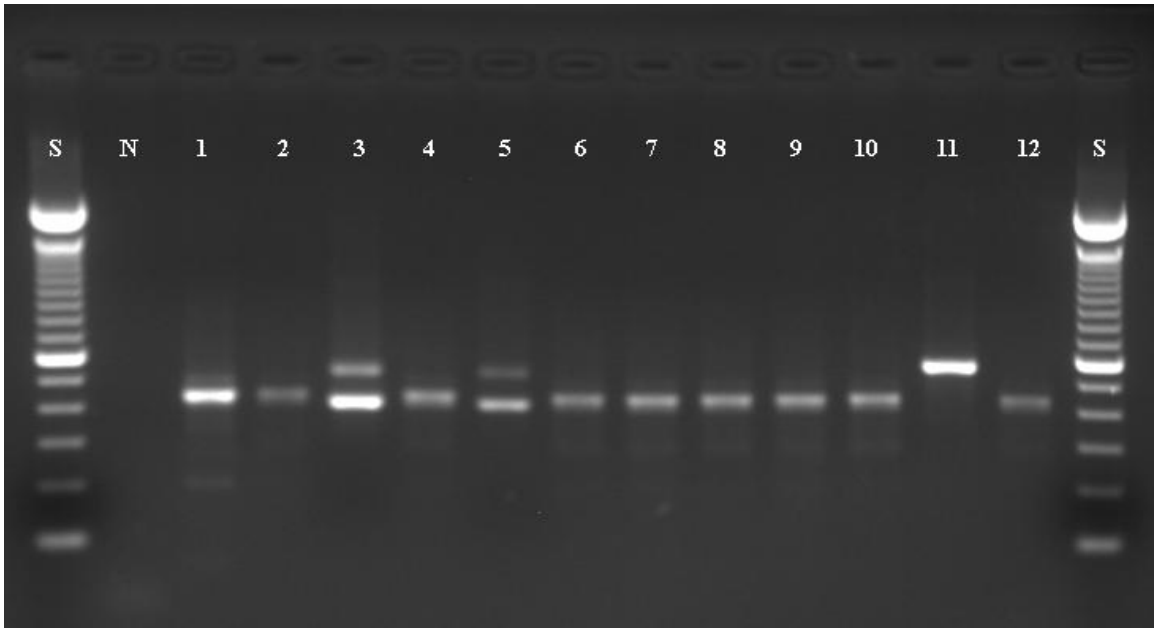
**Tablica 12:** Raspodjela niske i visoke izraženosti proteina BORIS u odnosu na gradus.

| Gradus tumora | BORIS IRS 0/1 | BORIS IRS >1 | ukupno |
|---|---|---|---|
| G1 | 2 (100%) | 0 (0%) | 2 |
| G2 | 32 (86,5%) | 5 (13,5%) | 37 |
| G3 | 14 (87,5%) | 2 (12,5%) | 16 |
| ukupno | 48 | 7 | 55 |

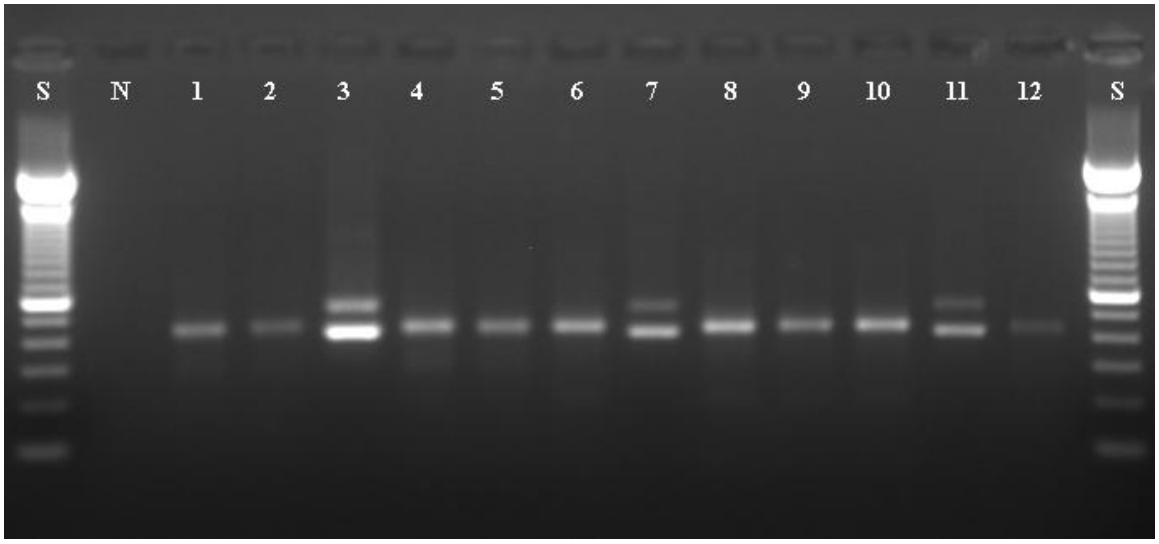
$x^2$=0,313; p=0,8551

## 5.7. Analiza izraženosti transkripata gena *BORIS*

**A**




**B**




**Slika 16: A)** S: standard*; N: negativna kontrola; 1: T*6; 2:OT**6; 3: T7; 4: OT7; 5: T8; 6: OT8; 7: T11; 8: OT11; 9: T13; 10: OT13; 11: T24; 12: OT24; S: standard. **B)** S: standard; N: negativna kontrola; 1: T25; 2: OT25; 3: T29; 4: OT29; 5: T33; 6: OT33; 7: T34; 8: OT34; 9: T40; 10: OT40; 11: T45; 12: OT45; S: standard.

* 100 bp DNA Ladder (Invitrogen);

**tkivo tumora;

***okolno tkivo

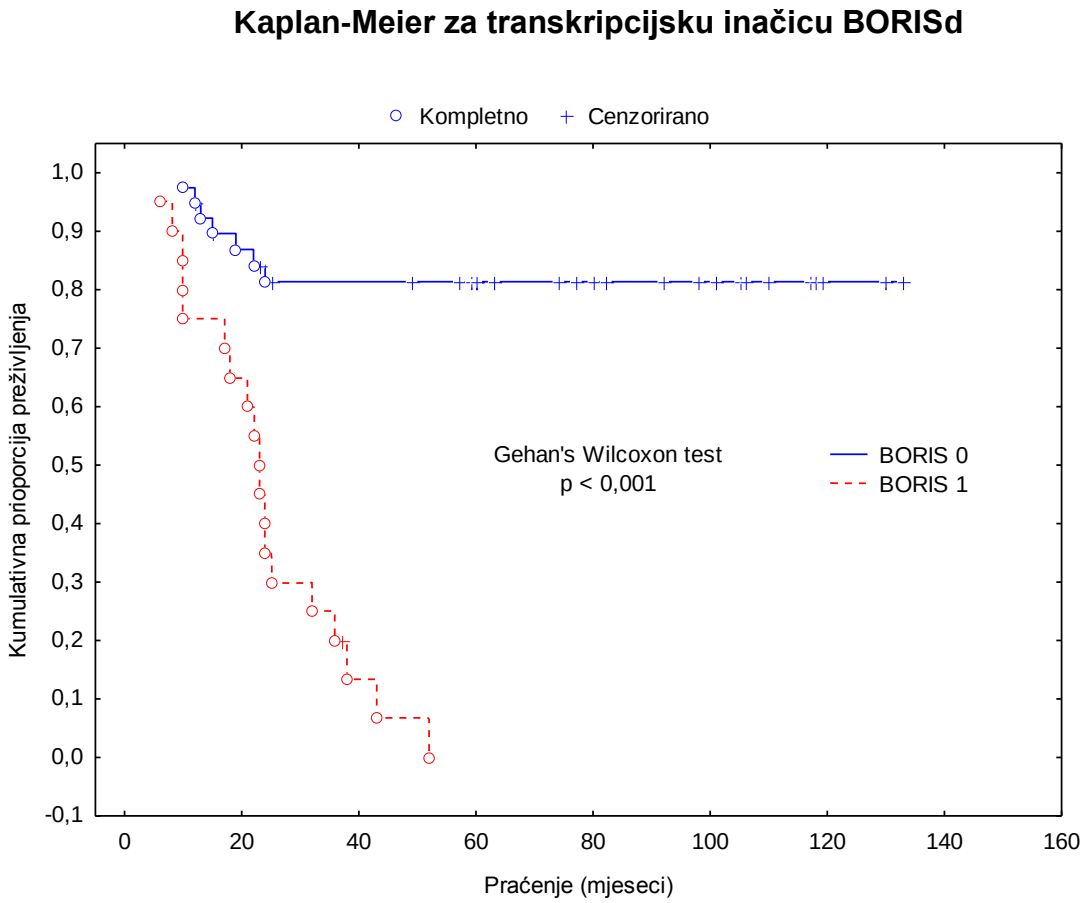
### 5.7.1. Analiza izraženosti transkripcijske inačice BORISd

U uzorcima tumora 20 bolesnika sam otkrio dugačku transkripcijsku inačicu gena *BORIS* (BORISd), koja sadrži ekson 7, dok je u 39 uzoraka tumora nisam uspio dokazati.

**Tablica 13:** Raspodjela po prisutnosti dugačke transkripcijske inačice gena *BORIS.* (**0**: BORISd nije prisutan, **1**: BORISd prisutan).

| BORIS d | N | % |
|---|---|---|
| **0** | 39 | 66,1 |
| **1** | 20 | 33,9 |

Gehan's Wilcoxon test za transkripcijsku inačicu BORISd je pokazao da postoji statistički značajna razlika ($p < 0.001$) u proporciji preživljenja ovih dviju skupina bolesnika, prikazana na slici 17.




**Slika 17:** Razlika u proporciji preživljenja između skupina BORISd 0 i BORISd 1

#### 5.7.1.1. Analiza izraženosti transkripcijske inačice BORISd u odnosu na veličinu tumora, zahvaćenost limfnih čvorova i stupanj diferencijacije (gradus)

Pomoću $x^2$-testa smo analizirali raspodjelu izraženosti transkripcijske inačice BORISd (BORISd izražen = 1; BORISd nije izražen = 0) u odnosu prema klasičnim prognostičkim čimbenicima: veličini tumora (pT i cT), zahvaćenosti limfnih čvorova (pN i cN), prema klasifikaciji TNM, te stupnju histološke diferencijacije tumora (G).

Nije pronađena statistički značajna razlika u raspodjeli izraženosti transkripcijske inačice BORISd u odnosu na veličinu tumora, prikazano u tablicama 14 i 15.

**Tablica 14:** Raspodjela izraženosti transkripcijske inačice BORISd u odnosu na pT.

| Veličina tumora | BORISd 0 | BORISd 1 | ukupno |
|---|---|---|---|
| pT1 | 2 (66,7%) | 1 (33,3%) | 3 |
| pT2 | 18 (66,7%) | 9 (33,3%) | 27 |
| pT3 | 12 (63,2%) | 7 (36,8%) | 19 |
| pT4 | 7 (70%) | 3 (30%) | 10 |
| ukupno | 39 | 20 | 59 |

$x^2$=0,1456; p=0,9859

**Tablica 15:** Raspodjela izraženosti transkripcijske inačice BORISd u odnosu na cT.

| Veličina tumora | BORISd 0 | BORISd 1 | ukupno |
|---|---|---|---|
| cT1 | 1 (50%) | 1 (50%) | 2 |
| cT2 | 11 (84,6%) | 2 (15,4%) | 13 |
| cT3 | 19 (59,4%) | 13 (40,6%) | 32 |
| cT4 | 1 (50%) | 1 (50%) | 2 |
| cT4a | 7 (70%) | 3 (30%) | 10 |
| ukupno | 39 | 20 | 59 |

$x^2$=2,8679; p=0,4125

Nije pronađena statistički značajna razlika u raspodjeli izraženosti transkripcijske inačice BORISd u odnosu na zahvaćenost limfnih čvorova, prikazano u tablicama 16 i 17.

**Tablica 16:** Raspodjela izraženosti transkripcijske inačice BORISd u odnosu na pN.

| Limfni čvorovi | BORISd 0 | BORISd 1 | ukupno |
|---|---|---|---|
| pN0 | 6 (75%) | 2 (25%) | 8 |
| pN1 | 9 (75%) | 3 (25%) | 12 |
| pN2 | 24 (64,9%) | 13 (35,1%) | 37 |
| pN3 | 0 (0%) | 2 (100%) | 2 |
| ukupno | 39 | 20 | 59 |

$x^2$=4,632; p=0,2008

**Tablica 17:** Raspodjela izraženosti transkripcijske inačice BORISd u odnosu na cN.

| Limfni čvorovi | BORISd 0 | BORISd 1 | ukupno |
|---|---|---|---|
| cN0 | 6 (67%) | 3 (33%) | 9 |
| cN1 | 9 (90%) | 1 (10%) | 10 |
| cN2a | 6 (60%) | 4 (40%) | 10 |
| cN2b | 11 (61%) | 7 (39%) | 18 |
| cN2c | 7 (78%) | 2 (22%) | 9 |
| cN3 | 0 (0%) | 3 (100%) | 3 |
| ukupno | 39 | 20 | 59 |

$x^2$=9,314; p=0,0972

U odnosu na gradus tumora, nije pronađena statistički značajna razlika u raspodjeli izraženosti transkripcijske inačice BORISd, prikazano u tablicama 18 i 19.

**Tablica 18:** Raspodjela izraženosti transkripcijske inačice BORISd u odnosu na gradus.

| Gradus tumora | BORISd 0 | BORISd 1 | ukupno |
|---|---|---|---|
| G1 | 2 (100%) | 0 (0%) | 2 |
| G2 | 28 (71,8%) | 11 (28,2%) | 39 |
| G3 | 9 (50%) | 9 (50%) | 18 |
| ukupno | 39 | 20 | 59 |

$x^2$=3,6725; p=0,1594

### 5.7.2. Analiza izraženosti transkripcijske inačice BORISk

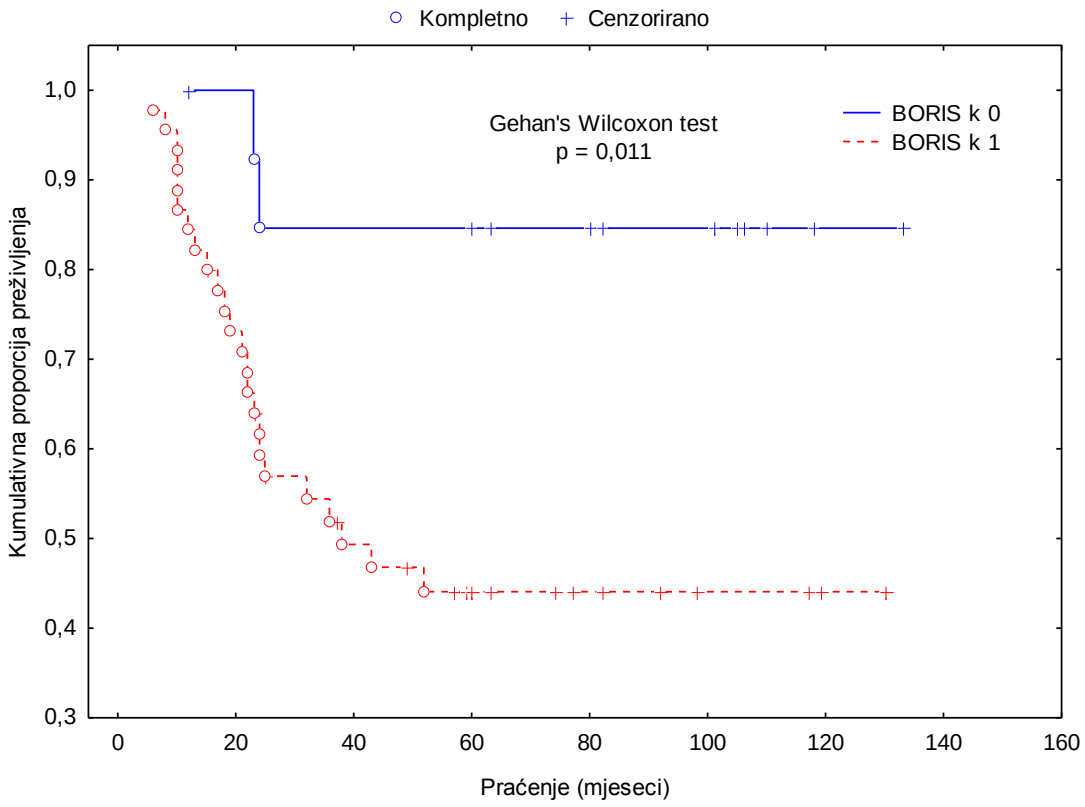
U uzorcima tumora 45 bolesnika sam otkrio kratku transkripcijsku inačicu gena *BORIS* (BORISk), koja ne sadrži ekson 7, dok je u preostalih 14 uzoraka tumora nisam uspio dokazati.

**Tablica 19:** Raspodjela po prisutnosti kratke transkripcijske inačice gena *BORIS.* (**0**: BORIS k nije prisutan, **1**: BORISk prisutan).

| BORIS k | N | % |
|---|---|---|
| **0** | 14 | 23,7 |
| **1** | 45 | 76,3 |

Gehan's Wilcoxon test za transkripcijsku inačicu BORISk je pokazao da je razlika u proporciji preživljenja ovih dviju skupina bolesnika, prikazana na slici 18, statistički značajna (p = 0,01132).

**Kaplan-Meier za transkripcijsku inačicu BORISk**




**Slika 18:** Razlika u proporciji preživljenja između skupina BORISk 0 i BORISk 1

### 5.7.2.1. Analiza izraženosti transkripcijske inačice BORISk u odnosu na veličinu tumora, zahvaćenost limfnih čvorova i stupanj diferencijacije (gradus)

Upotrebom $x^2$-testa smo analizirali raspodjelu izraženosti transkripcijske inačice BORISk (BORISk izražen = 1; BORISk nije izražen = 0) u odnosu prema klasičnim prognostičkim čimbenicima: veličini tumora (pT i cT), zahvaćenosti limfnih čvorova (pN i cN), prema klasifikaciji TNM, te stupnju histološke diferencijacije tumora (G).

Nije pronađena statistički značajna razlika u raspodjeli izraženosti transkripcijske inačice BORISk u odnosu na veličinu tumora, prikazano u tablicama 20 i 21.

**Tablica 20:** Raspodjela izraženosti transkripcijske inačice BORISk u odnosu na pT.

| Veličina tumora | BORISk 0 | BORISk 1 | ukupno |
|---|---|---|---|
| pT1 | 0 (0%) | 3 (100%) | 3 |
| pT2 | 8 (30%) | 19 (70%) | 27 |
| pT3 | 4 (21%) | 15 (79%) | 19 |
| pT4 | 2 (20%) | 8 (80%) | 10 |
| ukupno | 14 | 45 | 59 |

$x^2$=1,605; p=0,6583

**Tablica 21:** Raspodjela izraženosti transkripcijske inačice BORISk u odnosu na cT.

| Veličina tumora | BORISk 0 | BORISk 1 | ukupno |
|---|---|---|---|
| cT1 | 0 (0%) | 2 (100%) | 2 |
| cT2 | 4 (31%) | 9 (69%) | 13 |
| cT3 | 7 (22%) | 25 (78%) | 32 |
| cT4 | 3 (25%) | 9 (75%) | 12 |
| ukupno | 14 | 45 | 59 |

$x^2$=1,0497; p=0,7892

Pronađena je statistički značajna razlika u raspodjeli izraženosti transkripcijske inačice BORISk u odnosu na zahvaćenost limfnih čvorova. Transkripcijska inačica BORISk je značajno češće izražena u tumorima bolesnika sa višim N statusom, prikazano u tablicama 22 i 22a.

**Tablica 22:** Raspodjela izraženosti transkripcijske inačice BORISk u odnosu na pN.

| Limfni čvorovi | BORISk 0 | BORISk 1 | ukupno |
|---|---|---|---|
| pN0 | 5 (63%) | 3 (37%) | 8 |
| pN1 | 6 (50%) | 6 (50%) | 12 |
| pN2 | 3 (8%) | 34 (92%) | 37 |
| pN3 | 0 (0%) | 2 (100%) | 2 |
| ukupno | 14 | 45 | 59 |

$x^2$=16,8315; **p=0,00077**

**Tablica 22a:** Raspodjela izraženosti transkripcijske inačice BORISk u odnosu na cN.

| Limfni čvorovi | BORISk 0 | BORISk 1 | ukupno |
|---|---|---|---|
| cN0 | 6 (67%) | 3 (33%) | 9 |
| cN1 | 5 (50%) | 5 (50%) | 10 |
| cN2a | 0 (0%) | 10 (100%) | 10 |
| cN2b | 2 (11%) | 16 (89%) | 18 |
| cN2c | 1 (11%) | 8 (89%) | 9 |
| cN3 | 0 (0%) | 3 (100%) | 3 |
| ukupno | 14 | 45 | 59 |

$x^2$=19,4013; **p=0,00162**

U odnosu na gradus tumora, nije pronađena statistički značajna razlika u raspodjeli izraženosti transkripcijske inačice BORISk, prikazano u tablici 23.

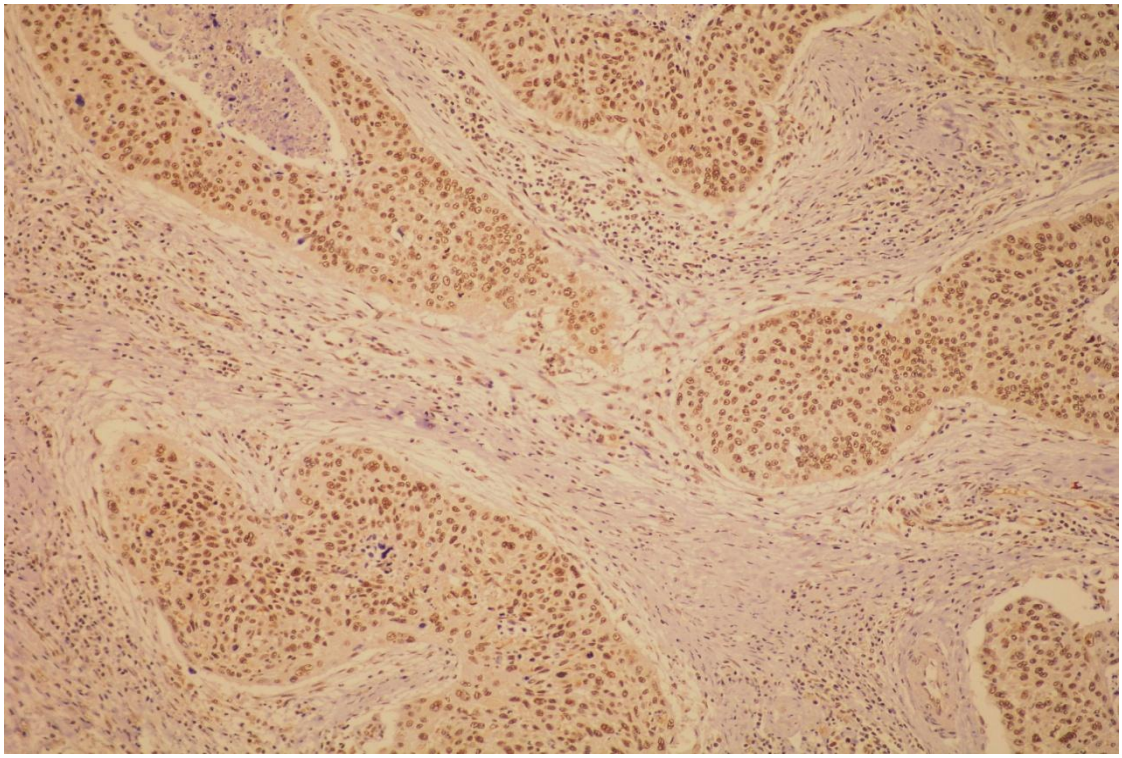
**Tablica 23:** Raspodjela izraženosti transkripcijske inačice BORISk u odnosu na gradus.

| Gradus tumora | BORISk 0 | BORISk 1 | ukupno |
|---|---|---|---|
| G1 | 1 (50%) | 1 (50%) | 2 |
| G2 | 11 (28%) | 28 (72%) | 39 |
| G3 | 3 (17%) | 15 (83%) | 18 |
| ukupno | 15 | 44 | 59 |

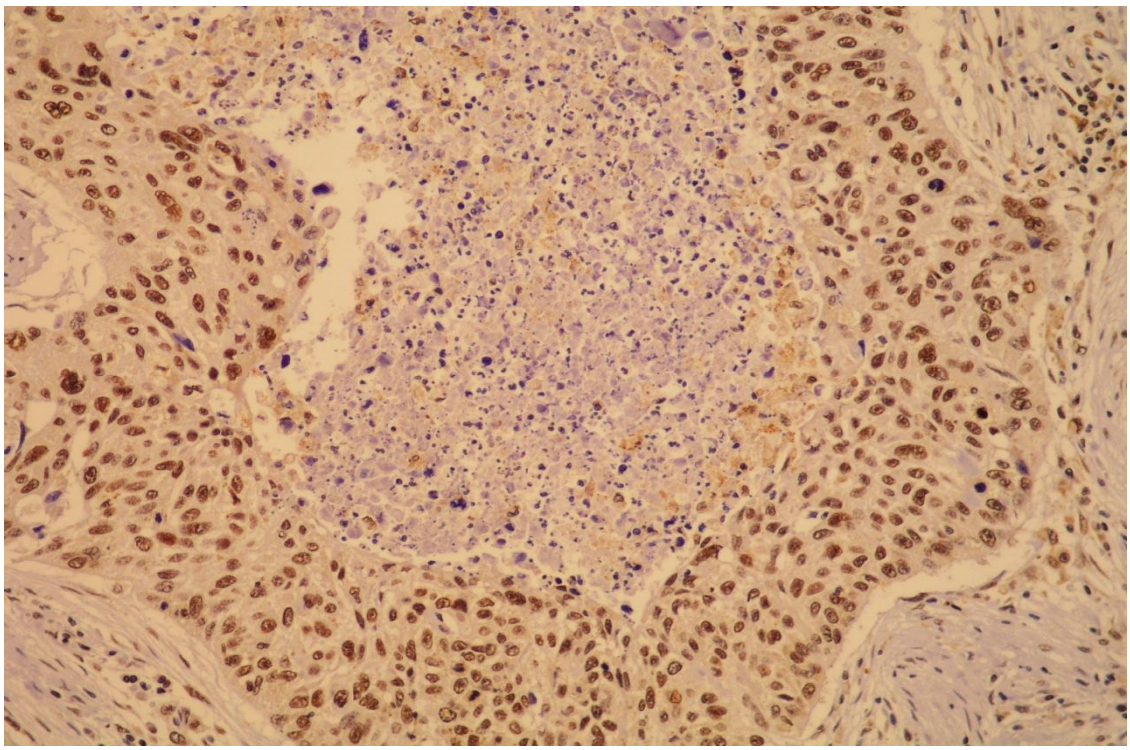
$x^2$=1,3375; p= p=0,5123

## 5.8. Analiza izraženosti proteina MYC u jezgri i citoplazmi

**A**



**B**



**Slika 19:** Imunohistokemijsko bojenje proteina MYC. A) povećanje X 100 ;B) povećanje X 200.

### 5.8.1. Izraženost proteina MYC u jezgri

Metodom imunohistokemije je analizirana unutarstanična raspodjela proteina MYC.

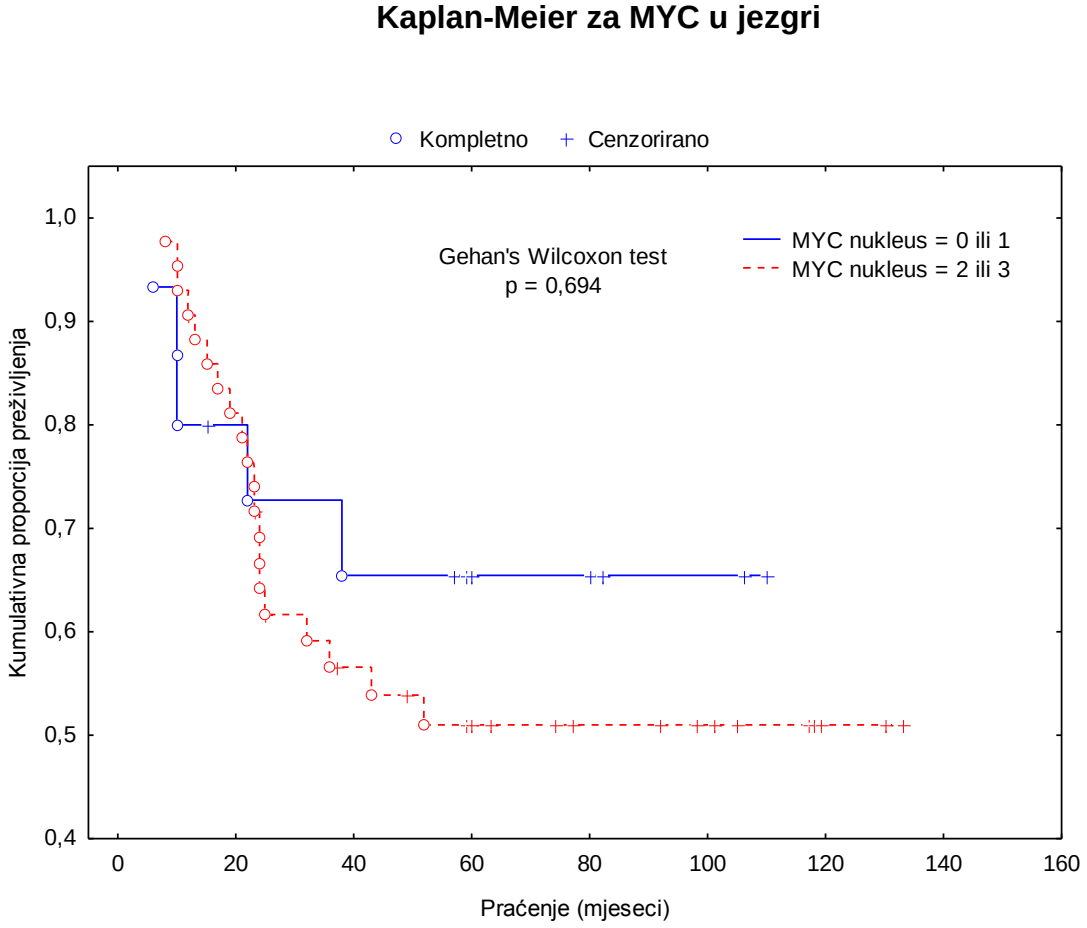
U tablici 24 je prikazana raspodjela izraženosti proteina MYC u jezgri.

**Tablica 24:** Raspodjela izraženosti proteina MYC u jezgri.

| **MYC u jezgri** | **0** | **1** | **2** | **3** | **nedostaje** |
|---|---|---|---|---|---|
| **N** | 6 | 9 | 6 | 37 | 1 |
| **%** | 10,2 | 15,3 | 10,1 | 62,7 | 1,7 |

Za analizu su uzete skupina niže izraženosti proteina MYC (MYC 0/1) kao jedna cjelina te skupina veće izraženosti (MYC 2/3) kao druga cjelina.

Gehan's Wilcoxon test je pokazao da ne postoji statistički značajna razlika u proporciji preživljenja među skupinama (p=0,69398), prikazano na slici 20.




**Slika 20:** Razlika u proporciji preživljenja između skupina MYC 0/1 i MYC 2/3.

### 5.8.1.1. Analiza izraženosti proteina MYC u jezgri u odnosu na veličinu tumora, zahvaćenost limfnih čvorova i stupanj diferencijacije (gradus)

Pomoću $x^2$-testa smo analizirali raspodjelu niske (0/1) i visoke (2/3) izraženosti proteina MYC u jezgri u odnosu prema klasičnim prognostičkim čimbenicima: veličini tumora (pT i cT), zahvaćenosti limfnih čvorova (pN i cN), prema klasifikaciji TNM, te stupnju histološke diferencijacije tumora (G).

Nije nađena statistički značajna razlika u raspodjeli niske i visoke izraženosti proteina MYC u jezgri u odnosu na veličinu tumora pT, prikazano u tablici 25.

**Tablica 25:** Raspodjela niske i visoke izraženosti proteina MYC u jezgri u odnosu na pT.

| Veličina tumora | MYC 0/1 | MYC 2/3 | ukupno |
|---|---|---|---|
| pT1 | 1 (33%) | 2 (67%) | 3 |
| pT2 | 9 (33%) | 18 (67%) | 27 |
| pT3 | 4 (22%) | 14 (78%) | 18 |
| pT4 | 1 (10%) | 9 (90%) | 10 |
| ukupno | 15 | 43 | 58 |

$x^2$=2,31; p=0,5106

Nađena je statistički značajna razlika u raspodjeli niske i visoke izraženosti proteina MYC u jezgri u odnosu na cT. Protein MYC je znatno izraženiji u jezgrama stanica tumora većeg cT statusa, prikazano u tablici 25a.

**Tablica 25a:** Raspodjela niske i visoke izraženosti proteina MYC u jezgri u odnosu na cT.

| Veličina tumora | MYC 0/1 | MYC 2/3 | ukupno |
|---|---|---|---|
| cT1 | 1 (50%) | 1 (50%) | 2 |
| cT2 | 7 (54%) | 6 (46%) | 13 |
| cT3 | 5 (16%) | 26 (84%) | 31 |
| cT4 | 2 (17%) | 10 (83%) | 12 |
| ukupno | 15 | 43 | 58 |

$x^2$=7,9782; **p=0,046465**

Nije pronađena statistički značajna razlika u raspodjeli niske i visoke izraženosti proteina MYC u jezgri stanica tumora u odnosu na zahvaćenost limfnih čvorova, prikazano u tablicama 26 i 27.

**Tablica 26:** Raspodjela niske i visoke izraženosti proteina MYC u jezgri u odnosu na pN.

| Limfni čvorovi | MYC 0/1 | MYC 2/3 | ukupno |
|---|---|---|---|
| pN0 | 1 (13%) | 7 (87%) | 8 |
| pN1 | 3 (25%) | 9 (75%) | 12 |
| pN2 | 10 (28%) | 26 (72%) | 36 |
| pN3 | 1 (50%) | 1 (50%) | 2 |
| ukupno | 15 | 43 | 58 |

$x^2$=3,4807; p=0,3233

**Tablica 27:** Raspodjela niske i visoke izraženosti proteina MYC u jezgri u odnosu na cN.

| Limfni čvorovi | MYC 0/1 | MYC 2/3 | ukupno |
|---|---|---|---|
| cN0 | 1 (11%) | 8 (89%) | 9 |
| cN1 | 3 (30%) | 7 (70%) | 10 |
| cN2a | 5 (56%) | 4 (44%) | 9 |
| cN2b | 3 (17%) | 15 (83%) | 18 |
| cN2c | 2 (22%) | 7 (78%) | 9 |
| cN3 | 1 (33%) | 2 (67%) | 3 |
| ukupno | 15 | 43 | 58 |

$x^2$=6,19; p=0,288

Nije pronađena statistički značajna razlika u raspodjeli niske i visoke izraženosti proteina MYC u jezgri stanica tumora u odnosu na gradus, prikazano u tablici 28.

**Tablica 28:** Raspodjela niske i visoke izraženosti proteina MYC u jezgri u odnosu na gradus.

| Gradus tumora | MYC 0/1 | MYC 2/3 | ukupno |
|---|---|---|---|
| G1 | 1 (50%) | 1 (50%) | 2 |
| G2 | 7 (18%) | 32 (82%) | 39 |
| G3 | 7 (41%) | 10 (59%) | 17 |
| ukupno | 15 | 43 | 58 |

$x^2$=3,9609; p=0,138

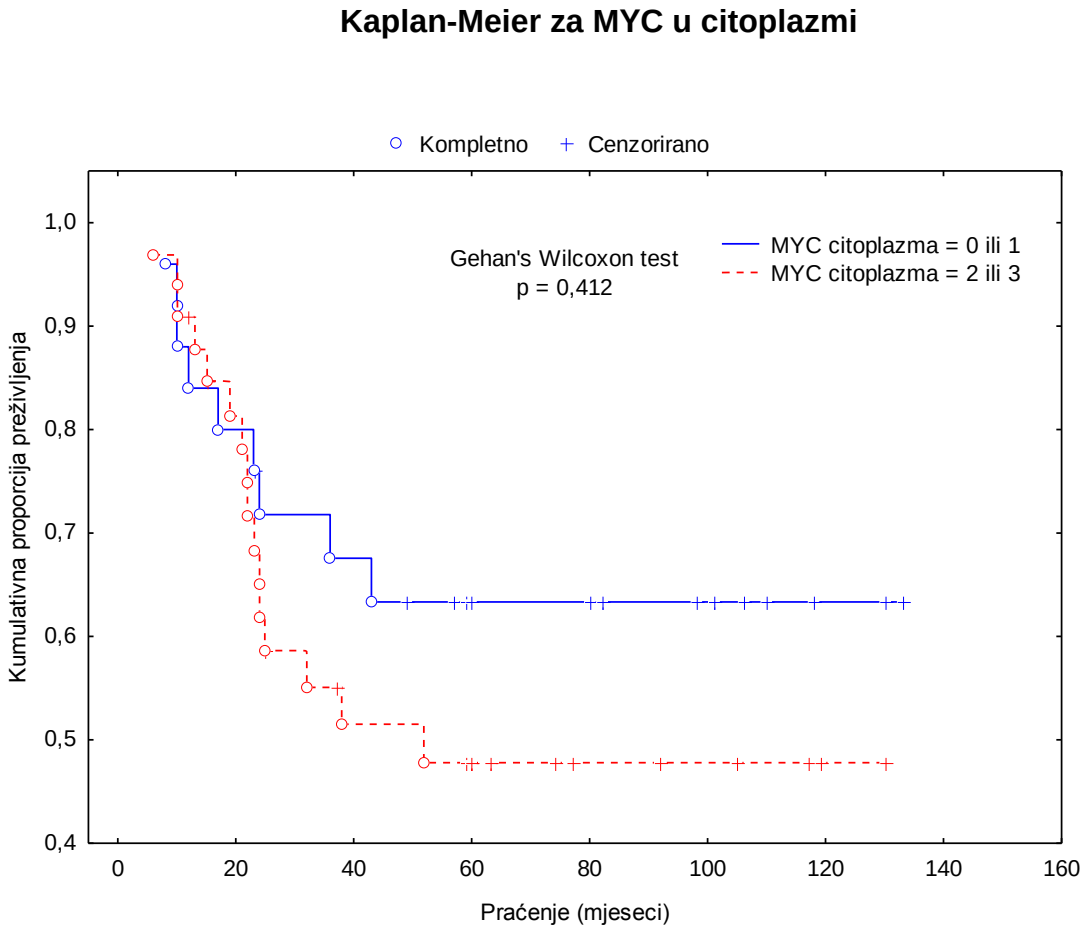
### 5.8.2. Izraženost proteina MYC u citoplazmi

U tablici 29 je prikazana raspodjela izraženosti proteina MYC u citoplazmi.

**Tablica 29:** Raspodjela izraženosti proteina MYC u citoplazmi.

| MYC u citoplazmi | 0 | 1 | 2 | 3 | nedostaje |
|---|---|---|---|---|---|
| N | 8 | 17 | 17 | 16 | 1 |
| % | 13,6 | 28,8 | 28,8 | 27,1 | 1,7 |

Za analizu su uzete skupine niže izraženosti proteina MYC u citoplazmi (MYC 0/1) kao jedna cjelina te skupine veće izraženosti (MYC 2/3) kao druga cjelina. Razlika u proporciji preživljenja među skupinama, prikazana na slici 21, nije statistički značajna (p=0,41865).




**Slika 21:** Razlika u proporciji preživljenja među skupinama MYC 0/1 i MYC 2/3.

### 5.8.2.1. Analiza izraženosti proteina MYC u citoplazmi u odnosu na veličinu tumora, zahvaćenost limfnih čvorova i stupanj diferencijacije (gradus)

Pomoću $x^2$-testa smo analizirali raspodjelu niske (0/1) i visoke (2/3) izraženosti proteina MYC u citoplazmi stanica tumora u odnosu prema klasičnim prognostičkim čimbenicima: veličini tumora (pT i cT), zahvaćenosti limfnih čvorova (pN i cN), prema klasifikaciji TNM, te stupnju histološke diferencijacije tumora (G).

Nije nađena statistički značajna razlika u raspodjeli niske i visoke izraženosti proteina MYC u citoplazmi u odnosu na veličinu tumora, prikazano u tablicama 30 i 31.

**Tablica 30:** Raspodjela niske i visoke izraženosti proteina MYC u citoplazmi u odnosu na pT.

| Veličina tumora | MYC 0/1 | MYC 2/3 | ukupno |
|---|---|---|---|
| pT1 | 1(33%) | 2 (67%) | 3 |
| pT2 | 9 (33%) | 18 (67%) | 27 |
| pT3 | 9 (50%) | 9 (50%) | 18 |
| pT4 | 6 (60%) | 4 (40%) | 10 |
| ukupno | 25 | 33 | 58 |

$x^2$=2,6809; p=0,4435

**Tablica 31:** Raspodjela niske i visoke izraženosti proteina MYC u citoplazmi u odnosu na cT.

| Veličina tumora | MYC 0/1 | MYC 2/3 | ukupno |
|---|---|---|---|
| cT1 | 0 (0%) | 2 (100%) | 2 |
| cT2 | 6 (46%) | 7 (54%) | 13 |
| cT3 | 12 (39%) | 19 (61%) | 31 |
| cT4 | 7 (58%) | 5 (42%) | 12 |
| ukupno | 25 | 33 | 58 |

$x^2$=2,9435; p=0,4004

Nije pronađena statistički značajna razlika u raspodjeli niske i visoke izraženosti proteina MYC u citoplazmi u odnosu na zahvaćenost limfnih čvorova, prikazano u tablicama 32 i 33.

**Tablica 32:** Raspodjela niske i visoke izraženosti proteina MYC u citoplazmi u odnosu na pN.

| Limfni čvorovi | MYC 0/1 | MYC 2/3 | ukupno |
|---|---|---|---|
| pN0 | 5 (63%) | 3 (37%) | 8 |
| pN1 | 5 (42%) | 7 (58%) | 12 |
| pN2 | 13 (36%) | 23 (64%) | 36 |
| pN3 | 2 (100%) | 0 (0%) | 2 |
| ukupno | 25 | 33 | 58 |

$x^2$=4,5951; p=0,204

**Tablica 33:** Raspodjela niske i visoke izraženosti proteina MYC u citoplazmi u odnosu na cN.

| Limfni čvorovi | MYC 0/1 | MYC 2/3 | ukupno |
|---|---|---|---|
| cN0 | 5 (56%) | 4 (44%) | 9 |
| cN1 | 5 (50%) | 5 (50%) | 10 |
| cN2a | 3 (33%) | 6 (67%) | 9 |
| cN2b | 7 (39%) | 11 (61%) | 18 |
| cN2c | 3 (33%) | 6 (67%) | 9 |
| cN3 | 2 (67%) | 1 (33%) | 3 |
| ukupno | 25 | 33 | 58 |

$x^2$=2,27; p=0,810

Nije pronađena statistički značajna razlika u raspodjeli niske i visoke izraženosti proteina MYC u citoplazmi stanica tumora u odnosu na gradus, prikazano u tablici 34.

**Tablica 34:** Raspodjela niske i visoke izraženosti proteina MYC u citoplazmi u odnosu na gradus.

| Gradus tumora | MYC 0/1 | MYC 2/3 | ukupno |
|---|---|---|---|
| G1 | 2 (100%) | 0 (0%) | 2 |
| G2 | 16 (41%) | 23 (59%) | 39 |
| G3 | 7 (41%) | 10 (59%) | 17 |
| ukupno | 25 | 33 | 58 |

$x^2$=2,7344; p=0,2548

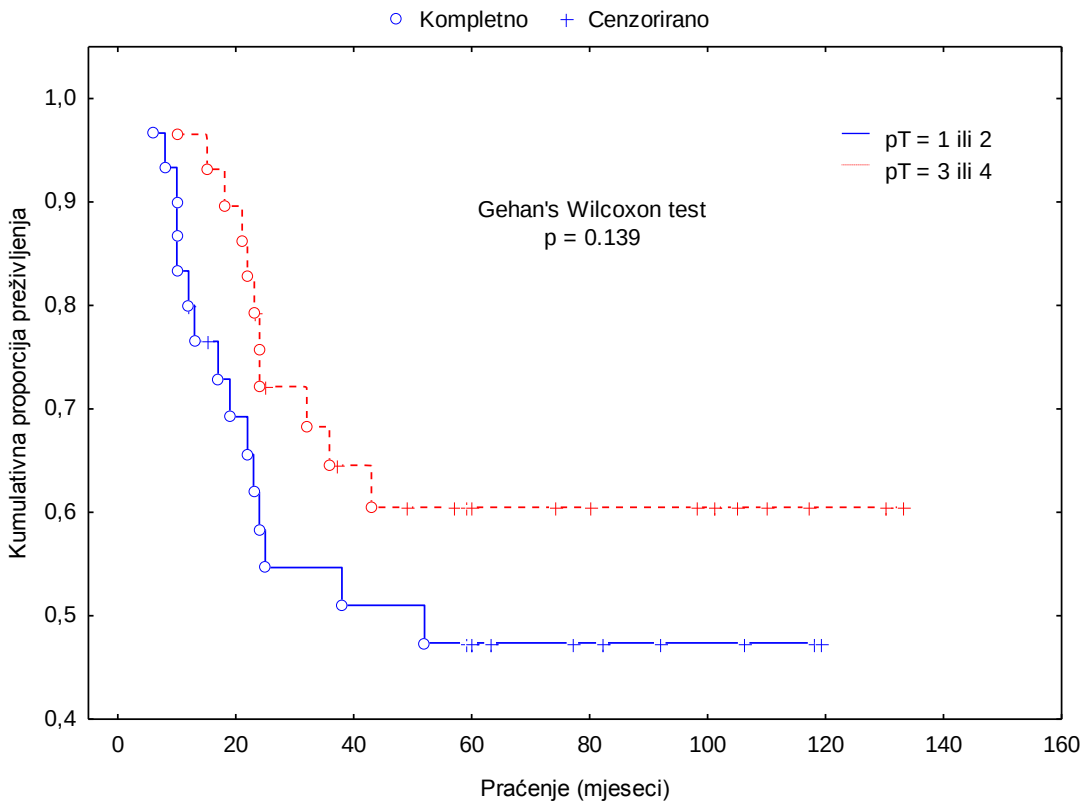
### 5.9. Patologijski T

U klasifikaciji TNM karcinoma hipofarinksa po American Joint Committee on Cancer (7th ed., 2010) tablica broj 1 i 2 (27) patologijski T (pT) se poistovjećuje sa kliničkim T (cT) iako u praksi često dolazi do nesuglasja među njima, odnosno nižeg stupnjevanja pT u odnosu na cT. Najvjerojatnije do ove razlike u stupnjevanju dolazi zbog smanjenja veličine tumora uzrokovane obradom materijala. U tablici 35 je prikazana raspodjela ispitanika po patologijskom T.

**Tablica 35:** Raspodjela ispitanika po patologijskom T.

| **pT** | **1** | **2** | **3** | **4** |
|---|---|---|---|---|
| **N** | 3 | 27 | 19 | 10 |
| **%** | 5,1 | 45,8 | 32,2 | 16,9 |

Patologijski T grupiran je u dvije skupine koje čine pT1 i pT2 te druga skupina gdje su bolesnici sa pT3 i pT4. Razlika u proporciji preživljenja među skupinama je prikazana na slici 22 i statistički nije značajna (p=0,13924).




**Slika 22:** Razlika u proporciji preživljenja između bolesnika sa pT1 i pT2 kao jednom skupinom te bolesnika sa pT3 i pT4 kao drugom grupom.

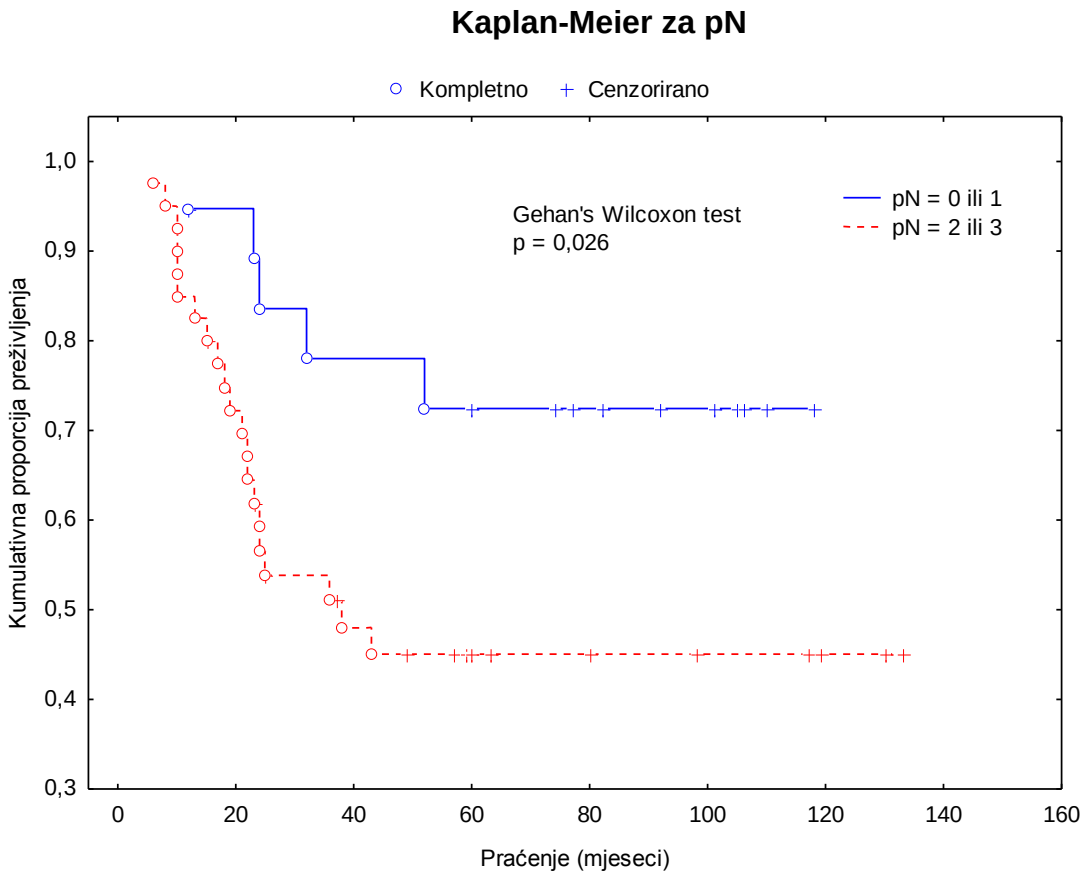
### 5.10. Patologijski N

U TNM klasifikaciji karcinoma hipofarinksa po American Joint Committee on Cancer (7th ed., 2010) tablica broj 1 i 2 (27) patologijski N definira se kao i klinički N samo bez podjele N2 stadija na 3 podstadija (a,b i c). U tablici 36 je prikazana raspodjela ispitanika po patologijskom N.

**Tablica 36:** Raspodjela ispitanika po patologijskom N.

| **pN** | **0** | **1** | **2** | **3** |
|---|---|---|---|---|
| **N** | 8 | 12 | 37 | 2 |
| **%** | 13,6 | 20,3 | 62,7 | 3,4 |

Patologijski N grupiran je u dvije skupine; prvu skupinu čine bolesnici sa N0 i N1 dok drugu čine bolesnici sa N2 i N3. Razlika u proporciji preživljenja među skupinama je prikazana na slici 23 i statistički je značajna (p=0,02565).




**Slika 23:** Razlika u proporciji preživljenja između skupina N0 i N1 te skupine sa N2 i N3.

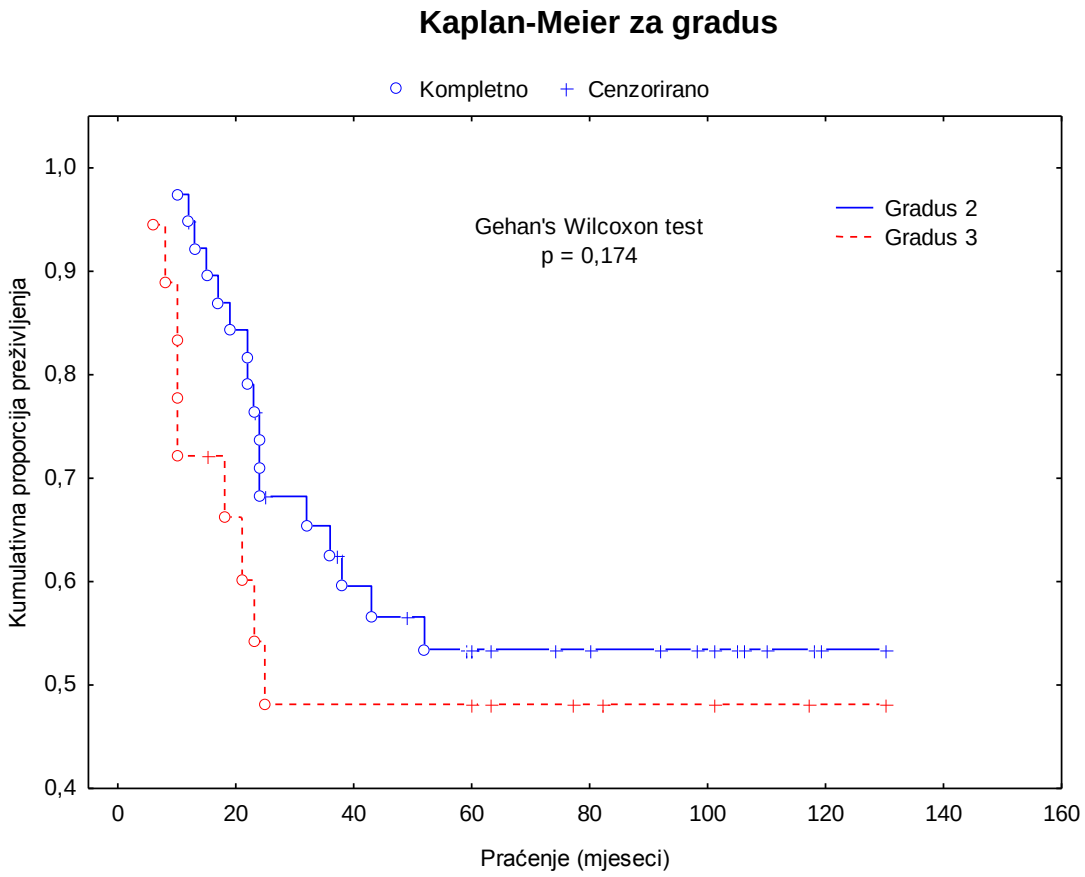
### 5.11. Stupanj diferencijacije - gradus

U tablici 37 je prikazana raspodjela ispitanika po stupnju diferencijacije stanica tumora (gradusu).

**Tablica 37:** Raspodjela ispitanika po gradusu tumora.

| **Gradus** | **1** | **2** | **3** |
|---|---|---|---|
| **N** | 2 | 39 | 18 |
| **%** | 3,4 | 66,1 | 30,5 |

U istraživanoj skupini bolesnika, tumor sa dobro diferenciranim stanicama (gradus 1) nađen je u samo dva ispitanika. Kaplan-Meier krivulja rađena je samo za gradus 2 i gradus 3. Među ovim skupinama nema statistički značajne razlike u kumulativnoj proporciji preživljenja (p=0,17380), prikazano na slici 24.




**Slika 24:** Razlika u proporciji preživljenja bolesnika sa tumorima gradusa 2 i 3.

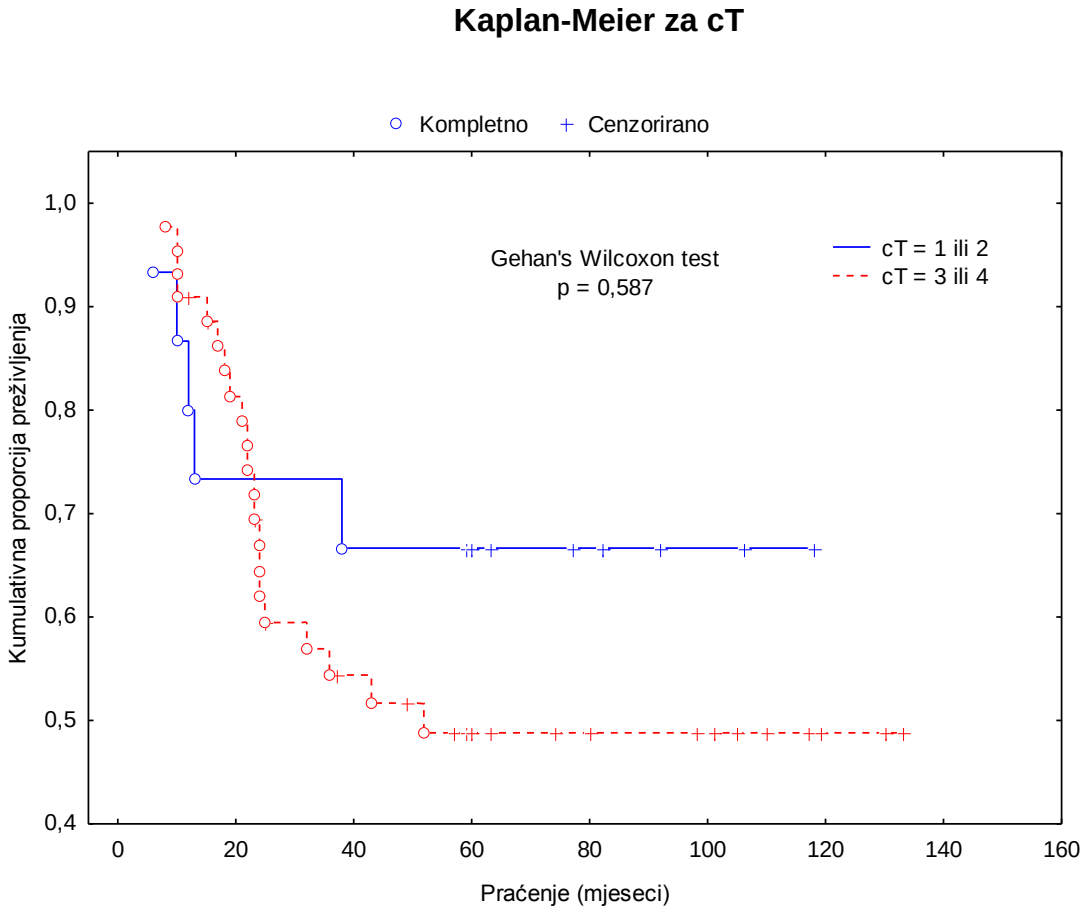
### 5.12. Klinički T

Klinički T (cT) karcinoma hipofarinksa je stupnjevan od jedan do četiri (27).U tablici 38 prikazana je raspodjela ispitanika po cT.

**Tablica 38:** Raspodjela ispitanika po cT.

| **cT** | **1** | **2** | **3** | **4** |
|---|---|---|---|---|
| **N** | 2 | 13 | 32 | 12 |
| **%** | 3,4 | 22,1 | 54,2 | 20,3 |

Ispitanici su prema cT klasifikaciji tumora grupirani u dvije skupine. Jednu skupinu čine bolesnici sa tumorima cT1 i cT2, a drugu skupinu bolesnici sa tumorima klasificiranim cT3 i cT4. Razlika u proporciji preživljenja među skupinama, prikazana na slici 25, nije statistički značajna (p=0,58737).




**Slika 25:** Razlika u proporciji preživljenja između skupine bolesnika sa cT1 i cT2 te skupine bolesnika sa cT3 i cT4 .

### 5.13. Klinički N

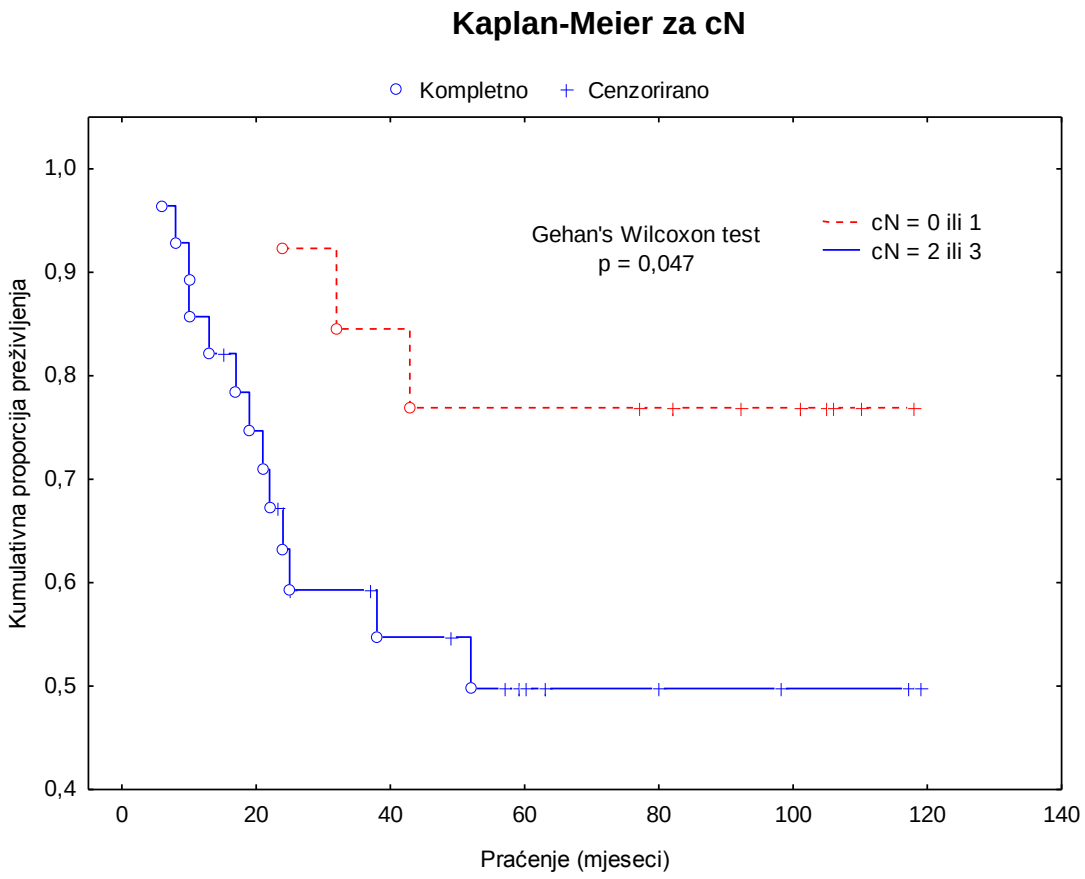
Klinički N (cN) definiran je za karcinom hipofarinksa po stadijima od jedan do tri (27).

U tablici 39 je prikazana raspodjela ispitanika po cN.

**Tablica 39:** Raspodjela ispitanika po kliničkom N.

| **cN** | **0** | **1** | **2a** | **2b** | **2c** | **3** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **N** | 9 | 10 | 10 | 18 | 9 | 3 |
| **%** | 15,3 | 16,9 | 16,9 | 30,5 | 15,3 | 5,1 |

Klinički N grupiran je u dvije skupine; prvu skupinu čine bolesnici sa N0 i N1 dok drugu čine bolesnici sa N2 i N3. Razlika u proporciji preživljenja među skupinama, prikazana na slici 26, je statistički značajna (p=0,04723).




**Slika 26:** Razlika u proporciji preživljenja između skupine sa N0 i N1 te skupine sa N2 i N3.

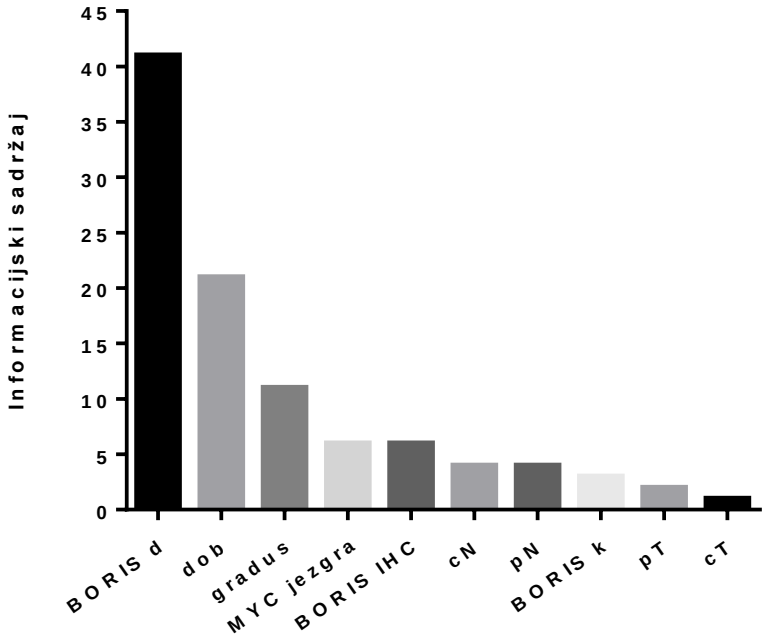
### 5.14. Multivarijatna analiza

Multivarijatna analiza podataka obavljena je uporabom sustava za rekurzivno particioniranje *rpart* i *party* (1.0-25), koji prema kriterijima AJCC predstavljaju optimalnu metodu za analizu prognostičkih čimbenika.

#### 5.14.1. rpart

Za analizu je korištena verzija 4.1-10 *rpart*-a. Rezultati se sastoje od numeričkog i grafičkog dijela. Najvažniji dio numeričkog dijela je opis važnosti varijabli, što je

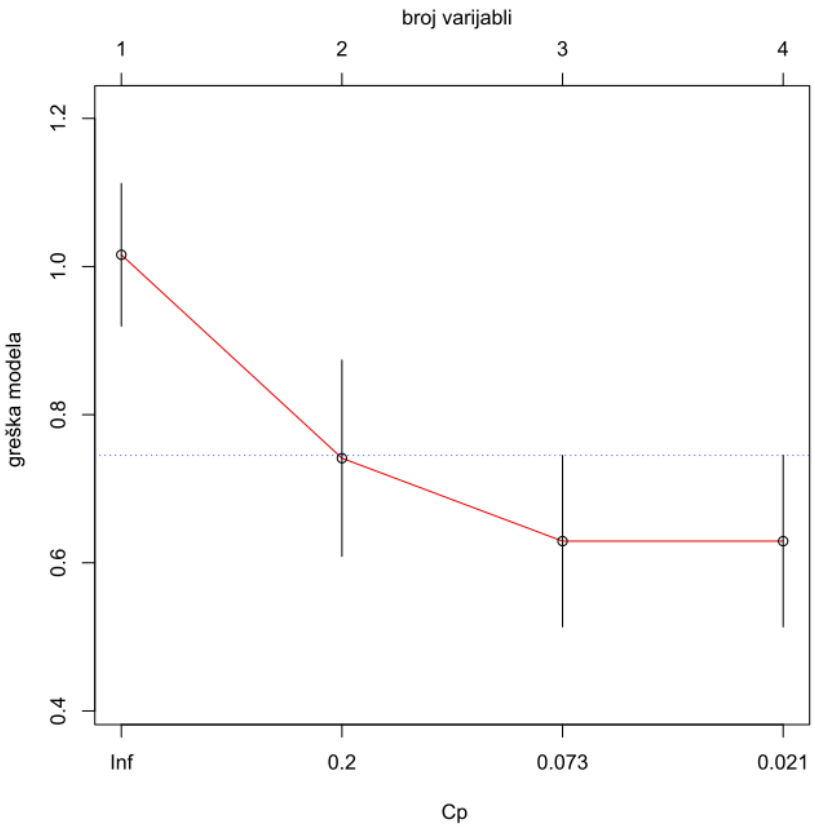
prikazano na slici 27. Varijable BORISd, dob i gradus imaju naglašenu važnost u odnosu na sve ostale varijable.




**Slika 27:** Redoslijed varijabli po važnosti.

Grafički rezultat analize *rpart* prikazuje kao stablo odluke koje prikazuje podskupine s maksimalnom razlikom u omjeru rizika, a kriterij po kojem se određuje veličina stabla jest parametar $C_p$. Važnost ovog parametra je u tome što spriječava pretjeranu detaljnost stabla odluke. Pretjerano detaljna stabla odluke mogu savršeno opisivati pojedinačni skup podataka, ali ne moraju predstavljati opći zaključak. Vrijednost parametra $C_p$ je upravo u tome što omogućava usporedbu učinkovitosti modela s malim brojem varijabli s modelom koji ima veći broj varijabli, te se tako može racionalno donijeti odluka o broju varijabli u modelu. Rezultati analize C*p* parametra u učinkovitost stabla odluke prikazani su na slici 28.

Iz slike je uočljivo da tri najznačajnija parametra sasvim dobro opisuju skup podataka, te da daljnje dodavanje varijabli ne poboljšava učinkovitost stabla odluke.

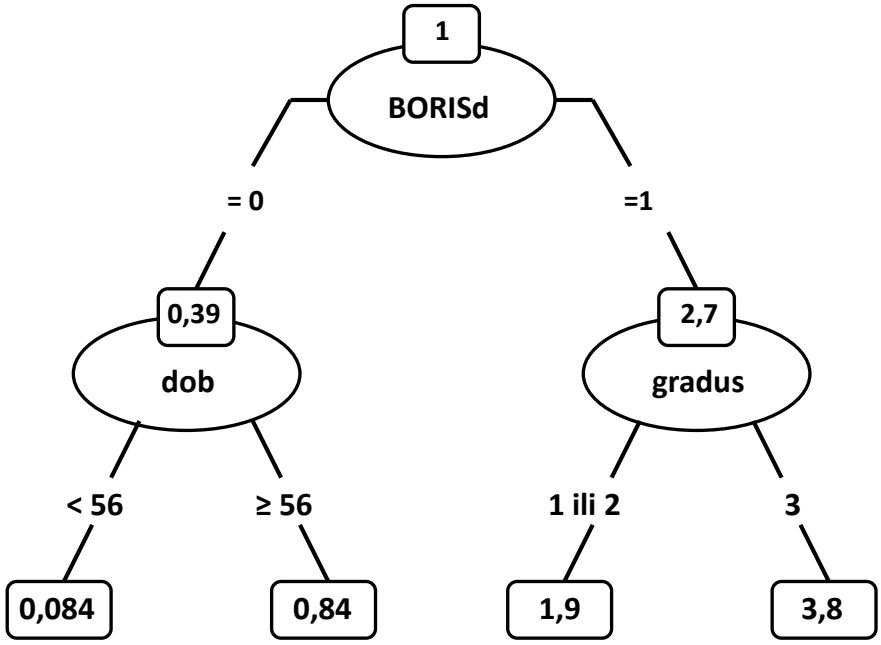



**Slika 28:** Analiza međuodnosa broja varijabli, greške modela i $C_p$.

Stablo odluke koje je *rpart* konstruirao na osnovu optimale vrijednosti $C_p$-a prikazano je na slici 29. Treba ga tumačiti na sljedeći način:

1. Omjer rizika za sve ispitanike (n = 59) iznosi 1, što je polazni čvor.
2. U prvom koraku ispitanike možemo rastaviti u dvije podskupine na osnovu varijable BORIS d. Bolesnici s vrijednošću BORIS d = 0 imaju omjer rizika od 0.39 (u odnosnu na polaznu skupinu, to jest sve ispitanike. Bolesnici s vrijednošću BORIS d = 1 imaju omjer rizika od 2,7 (u odnosnu na polaznu skupinu, to jest sve ispitanike).
3. U drugom koraku bolesnike koji imaju vrijednost varijable BORIS d = 0 možemo rastaviti u dvije podskupine pomoću varijable dob (godine). Bolesnici mlađi od 56 godina imaju omjer rizika od 0,084 (u odnosnu na polaznu skupinu, to jest sve ispitanike). Bolesnici u dobi ≥ 56 godina imaju omjer rizika od 0,84 (u odnosnu na polaznu skupinu, to jest sve ispitanike).

4. U trećem koraku bolesnike koji imaju vrijednost varijable BORIS d = 1 možemo rastaviti u dvije podskupine pomoću varijable gradus. Bolesnici s gradusom 1 ili 2 imaju omjer rizika od 1,9 (u odnosnu na polaznu skupinu, to jest sve ispitanike). Bolesnici s vrijednošću gradusa 3 imaju omjer rizika od 3,8 (u odnosnu na polaznu skupinu, to jest sve ispitanike).




**Slika 29:** Stablo odluke konstruirano uporabom *rpart* algoritma. Prikazani su čvorovi odluke i podskupine s maksimalnom razlikom u omjeru rizika.

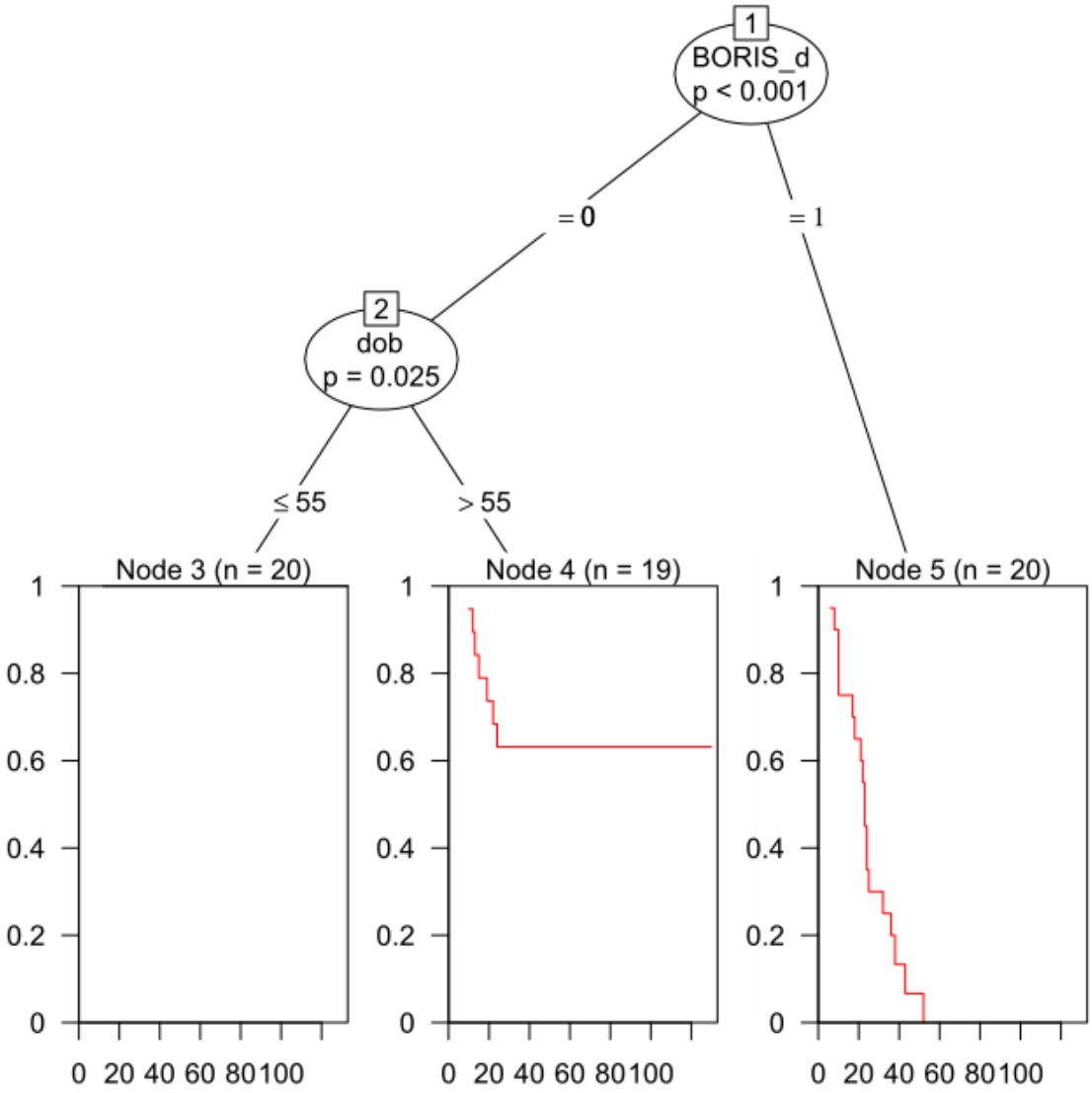
### 5.14.2. party

Za analizu je korištena verzija 1.0-25 *party*-a. Ovaj sustav, poput *rpart*-a, pripada skupini algoritama za rekurzivno particioniranje, pa im rezultati mogu biti identični ili vrlo slični. Ponekad se zna dogoditi da *party* uporabi potpuno različite varijable, s prilično različitim stablom odluke. Zbog toga se *rpart* i *party* sustavi izvrsno nadopunjavaju, jer predstavljaju dva različita kuta gledanja na isti problem.

Rezultati analize su prikazani na slici 30. Iz stabla odluke je vidljivo da je party odabrao samo dvije varijable za izgradnju modela: BORIS d kao najvažniju varijablu, te dob ispitanika (godine) kao drugu najvažniju varijablu. Razlika prema zaključcima

*rpart*-a je u tome što se skupina s vrijednošću BORIS d = 1 dalje ne rastavlja u podskupine, pa je *party* model nešto jednostavniji.

Rezultati usporedbe *rpart* i *party* sustava su navedeni u tablici 40.




**Slika 30:** Stablo odluke konstruirano uporabom *party* algoritma. Prikazani su čvorovi odluke i podskupine s maksimalnom razlikom u *p*-vrijednosti za preživljenje.

**Tablica 40:** Usporedba rpart i party modela.

| Značajnost varijable | rpart | party | konsenzus |
|---|---|---|---|
| 1 | BORISd | BORISd | BORISd |
| 2 | dob (godine) | dob (godine) | dob (godine) |
| 3 | gradus | | gradus |

## 6. RASPRAVA

Karcinom pločastih stanica hipofarinksa pripada skupini zloćudnih bolesti s lošom prognozom. Glavna smjernica u planiranju liječenja oboljelih od karcinoma pločastih stanica hipofarinksa je procjena proširenosti bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze, izražena prema klasifikaciji TNM, i stupanj diferenciranosti tumora (193). Procjena tijeka bolesti i odgovora na nekirurške metode liječenja, temeljena na podatcima sadržanim u klasifikaciji TNM, je manjkava. Zbog značajnih razlika u odgovoru na liječenje bolesnika s tumorima iste skupine T, veliki napori se ulažu u pronalažanje boljih i pouzdanijih metoda procjene bolesti prije početka liječenja. Organizacija AJCC (American Joint Committee on Cancer) je, stoga, pokrenula projekt sistematiziranog i standardiziranog prikupljanja i obrade podataka, uključenih u klasifikaciju TNM i onih koji to nisu, a odnose se na klinička, radiološka, patološka, biološka i molekularna obilježja tumora. Nove metode bioračunarstva bi u budućnosti trebale objediniti prikupljene podatke i uspostaviti pouzdaniji sustav predviđanja ponašanja tumora u trenutku postavljanja dijagnoze. Ovako ambiciozan cilj je moguće ostvarti samo multidisciplinarnim znanstvenim pristupom. Neupitno je da će rezultati istraživanja raka, na molekularnoj razini, u budućnosti doprinijeti boljem razumijevanju stupnjevitih promjena tijekom zloćudne preobrazbe i razvoja zloćudnih tumora te razlučiti molekularne biljege pojedinih faza u razvoju zloćudne bolesti.

Za sada, unatoč iznimno velikom broju istraživanja izraženosti potencijalnih prognostičkih biljega u zloćudnim tumorima, vrlo je oskudan broj onih koji su se pokazali pouzdanima. To je posljedica toga što su istraživanja prognostičkih biljega opažajna te zbog toga nemaju snagu dobro dizajniranog pokusa. U nedostatku dobro isplaniranih kontrolnih skupina, opažajna istraživanja sama po sebi ne mogu potvrditi uzročno-posljedičnu vezu istraživanog prognostičkog biljega i proučavanog ishoda (46). Zbog navedenog, većina takvih istraživanja svoje rezultate uspoređuje s klasičnim prognostičkim čimbenicima i rijetko se koji prognostički biljeg pokaže neovisnim.

Nastanak i razvoj zloćudnih bolesti predstavlja vrlo dinamičan proces, koji uključuje postupne promjene u važnim fiziološkim svojstvima stanica i tkiva. Hanahan i Weinberg (194) su 2000. godine definirali šest temeljnih promjena u fiziologiji

stanice, koje su svojstvene stanicama raka: 1) samodostatne su u održavanju proliferacije; 2) neosjetljive su na inhibiciju rasta; 3) izbjegavaju programiranu staničnu smrt; 4) imaju neograničeni potencijal umnažanja; 5) potiču angiogenezu; 6) svojstven im je invazivni rast i metastaziranje. Stanice raka, za potrebe nekontroliranog rasta, moraju prilagoditi metabolizam u svrhu usklađivanja svojih energetskih potreba sa potrebama sinteze novih biomolekula te osigurati učinkovite mehanizme održavanja odgovarajućeg redoks statusa kako bi preživjele (195-201). Reprogramiranje metabolizma stanica raka je stoga, na temelju rezultata istraživanja proteklih desetak godina, pridruženo ranije navedenom popisu temeljnih obilježja raka, zajedno sa izbjegavanjem imunološkog odgovora. Činjenica da sve zloćudno promijenjene stanice imaju zajednička obilježja i da su ona međusobno usko povezana i ovisna ukazuje na to da je rak posljedica poremećene ravnoteže u važnim staničnim procesima. Podloga svih navedenih obilježja raka i njihova pokretačka snaga su nestabilnost genoma i upala. Zloćudni tumori, osim stanica tumora sadrže i druge stanice, koje nisu zloćudno promijenjene, ali doprinose nastanku mikrookoliša tumora koji podržava njihov rast (198).

Višeslojni pločasti epitel hipofarinksa je pod stalnim utjecajem raznovrsnih štetnih čimbenika okoliša i podložan je genetskim i epigenetskim promjenama/oštećenjima. Pušenje i konzumacija alkohola su najistaknutiji čimbenici rizika za nastanak karcinoma pločastih stanica hipofarinksa. Osim što su genotoksični i mogu dovesti do oštećenja molekule DNA, oni izazivaju globalnu hipometilaciju (202,203). Oštećenje molekule DNA dovodi do aktivacije enzima PARP-1, koji ima važnu ulogu u popravku oštećenja DNA, ali i brojne druge uloge, koje ovisno o kontekstu mogu štititi stanicu od zloćudne preobrazbe ili je promicati (203). Jedna od posljedica aktivacije enzima PARP-1 je upravo smanjenje metilacije DNA (204–210). Hipometilacija regulatornih područja gena *BORIS* i *MYC* potiče njihovu transkripciju (149,160,163,211). Osim negativnog utjecaja na metilaciju DNA, poli-ADP-ribozilacija histona dovodi do razmještanja nukleosoma i otvorenije strukture kromatina (212). Poli-ADP-ribozilacija onemogućava vezanje demetilaze histona KDM5B na kromatin i na taj način održava trimetilaciju lizina 4 na histonu 3, što je modifikacija svojstvena eukromatinu (213).

Za razliku od proteina CTCF, koji je negativni regulator transkripcije gena *MYC*, pokazano je da protein BORIS sudjeluje u njegovoj aktivaciji (182). Aktivacija

enzima PARP-1 dovodi do uklanjanja proteina CTCF i aktivacije transkripcije gena *MYC* (144).

S obzirom na navedeno, proveo sam istraživanje izraženosti transkripata i proteina BORIS i MYC u uzorcima tkiva karcinoma pločastih stanica hipofarinksa.

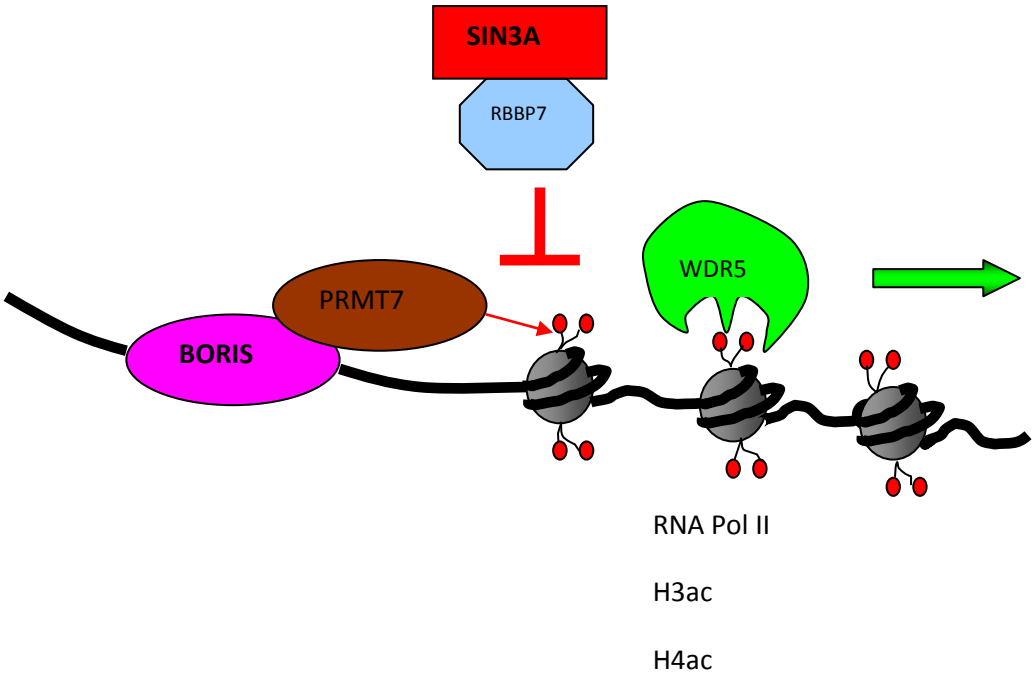
Metodom imunohistokemije sam pokazao da je protein BORIS izražen u 21 (38%) od dostupnih 55 uzoraka tkiva karcinoma pločastih stanica hipofarinksa. Malo je podataka o izraženosti ovog proteina u karcinomima glave i vrata. Smith i sur. (166) su proveli istraživanje uloge proteina BORIS u reaktivaciji epigenetski utišanih proto-onkogena u karcinomima pločastih stanica glave i vrata, ali nisu razlučili o kojim se anatomskim lokacijama točno radi. U karcinomima pločastih stanica larinksa, protein BORIS je pronađen u 44 % (14/32) analiziranih uzoraka tumora (174). U istraživanju sam koristio kunićje poliklonalno protutijelo dobiveno korištenjem antigena smještenog u središnjem dijelu proteina (aminokiseline 91-210), koje vjerojatno nije pogodno za otkrivanje svih izoformi ovog proteina. Na tržištu nisu dostupna protutijela za pojedine izoforme proteina BORIS, što otežava njihovo izučavanje. Moguće je, stoga, da je dobiveni rezultat odraz nemogućnosti prikaza svih izraženih izoformi proteina BORIS. S obzirom na relativno mali broj radova u kojima je metodom imunohistokemije određivana izraženost proteina BORIS, imunohistokemijsko obojenje je ocijenjeno na način opisan u tim radovima i brojčano izraženo kao IRS (159,164,174). Unutar stanica tumora, BORIS se nalazi u jezgri, ali i u citoplazmi nekih stanica. S obzirom da ne znamo o kojim se izoformama proteina radi i nemamo podatke o njihovom unutarstaničnom smještaju, ne možemo sa sigurnošću tvrditi da li je dobiveni nalaz posljedica njegovog premještanja između jezgre i citoplazme ili isključivo posljedica izraženosti različitih izoformi. Opisane uloge proteina BORIS se uglavnom odnose na njegovo vezanje na molekulu DNA, što bi upućivalo na smještaj u jezgri. Smještaj proteina BORIS u citoplazmi nije u suglasju s navodom da se sve izoforme ovog proteina nalaze u jezgri stanica HEK293T, NHDF i HCT-15 (150). Iako većina izoformi proteina BORIS sadrži sljied odgovoran za smještaj u jezgri (engl. *nuclear localization signal*), postoji mogućnost da neke od tih izoformi, zaostaju u citoplazmi zbog vezanja na proteine-partnere. Jedan od proteina s kojim BORIS ulazi u vezu, BAT3 (182), je u normalnim stanicama sisavaca smješten u citoplazmi (214), a tek u zloćudno promijenjenim stanicama u jezgri (215). Nguyen i sur. (182) su proteinu BORIS pripisali ulogu

"platforme" na koju se BAT3 veže i zadržava u jezgri. U zloćudnim tumorima dojke je BORIS smješten i u jezgri i u citoplazmi (164). U tumorima mokraćno-spolnog sustava BORIS je bio smješten u citoplazmi spermatogonija, Leydigovih stanica i epitelnih stanica prostate, a u jezgri spermatocita (160).

U većini uzoraka, pozitivnih na protein BORIS, vrlo je mali broj stanica bio pozitivan. Sličan uzorak imunohistokemijskog bojenja proteina BORIS je opisan i u tumorima dojke, gdje su pojedinačne stanice ili nakupine stanica imale vrlo raznolik intenzitet obojenja, što je rezultiralo niskim IRS u većini uzoraka (164).

Nalaz vrlo malog broja stanica pozitivnih na protein BORIS, u nedostatku podataka dobivenih metodom imunohistokemije, možemo donekle usporediti s rezultatima istraživanja izraženosti transkripata gena *BORIS in situ* u staničnim linijama NCCIT (embrionalne stanice tumora), OVCAR3 (karcinom jajnika) i HeLa (karcinom vrata maternice). Opaženo je da su transkripti gena *BORIS* izraženi u maloj podskupini stanica (3-5%) i da te stanice imaju pojačano izražen *hTERT*, biljege matičnih stanica *NANOG*, *OCT4* i *SOX2* te biljege matičnih stanica raka *CD44* i *ALDH1* u usporedbi sa BORIS-negativnim stanicama (185).

Tijekom embrionalnog razvoja sjemenika protein BORIS dolazi u vezu sa metiltransferazom proteina PRMT7 i sudjeluje u uspostavi DNA metilacije upisanih gena (179). Simetrična metilacija arginina, koju katalizira PRMT7, onemogućava vezanje represivnog kompleksa SIN3A/RBBP7 i omogućava vezanje WDR5 te na taj način može aktivirati transkripciju ciljnih gena (slika 31).




**Slika 31:** Moguća uloga proteina BORIS u aktivaciji ciljnih gena.

Nedavno je pokazano da PRMT7 ima ključnu ulogu u održavanju mišjih embrionalnih matičnih stanica. Mehanizam na kojem se temelji ova uloga proteina PRMT7 uključuje njegov negativan utjecaj na izraženost gena miR-24-2, koji kodira za nastanak miR- 24-3p i miR-24-2-5p, koje negativno utječu na izraženost glavnih čimbenika pluripotentnosti matičnih stanica Oct4, Nanog, Klf4 i MYC (216). Alberti i sur. (217) su pokazali da utišavanje izraženosti proteina BORIS u stanicama karcinoma dojke i debelog crijeva smanjuje izraženost hTERT, biljega matičnih stanica NANOG, OCT4, SOX2 i BMI1 te biljega matičnih stanica raka ABCG2, CD44 i ALDH1. Nasuprot tome, poticanje izraženosti gena *BORIS* je imalo suprotan učinak na aktivnost tih gena. Za razliku od učinka izazvanog utišavanjem gena *BORIS* u stanicama invazivnog karcinoma dojke, u stanicama neinvazivnog karcinoma dojke MCF7 učinak je bio suprotan i doveo je do epitelno-mezenhimalne pretvorbe. Imajući u vidu da BORIS stvara komplekse sa drugim proteinima, poput metiltransferaze histona PRMT7, za pretpostaviti je da njegova aktivnost ovisi o stupnju izraženosti njegovih proteina-partnera. U svom istraživanju nisam uspio potvrditi pretpostavku da će povećana razina uzraženosti proteina BORIS u karcinomima pločastih stanica hipofarinksa dovesti do povećanja izraženosti proteina MYC. Razlog tome, djelomično može biti povezan sa relativno malim brojem uozoraka u kojima je BORIS

bio znatnije izražen (IRS>1, n=7), pa usporedba visoke izraženosti proteina MYC u jezgri (MYC 2/3) i izraženosti proteina BORIS (IRS>1) nije dosegla razinu statističkog značaja (p=0,08). Osim toga, treba uzeti u obzir i ograničenje korištene metode za dokazivanje proteina BORIS, kojom se sa dostupnim protutijelom najvjerojatnije prikazuju samo neke izoforme ovog proteina. Transkripti gena *BORIS*, sa i bez eksona 7, su dokazani u znatno većem broju uzoraka istraživanih tumora (BORISd u 33,9%, a BORISk u 76,3% uzoraka). Vrlo je malo podataka, dobivenih istraživanjima izraženosti transkripata gena *BORIS in vivo.* Nedavno su Asano i sur. (218) objavili rezultate istraživanja izraženosti transkripcijskih inačica gena *BORIS* u stanicama karcinoma vrata maternice. BORIS je bio pojačano izražen u populaciji tzv. matičnim stanicama raka-sličnih stanica, koje su otporne na konvencionalnu radio- i kemoterapiju, i za koje se pretpostavlja da su odgovorne za recidiv bolesti. Pokazano je da skupina kratkih transkripcijskih inačica gena *BORIS* ima važnu ulogu u održavanju tih stanica. U literaturi nema podataka o mehanizmima, koji dovode do razlikovnog prekrajanja transkripata gena *BORIS.* Korištenjem programa za predviđanje mjesta prekrajanja i potencijalnih čimbenika prekrajanja, dostupnog na internetskoj stranici sfmap.technion.ac.il, pronašao sam vezno mjesto za čimbenik prekrajanja hnRNP A1. Vezno mjesto za hnRNP A1, CTCAGGTG, se nalazi na mjestu gdje dolazi do izrezivanja eksona 7 u transkriptu gena *BORIS*. Ovo vezno mjesto je identično u svim nukleotidima veznom mjestu, za koje je dokazano vezanje proteina hnRNP A1 (219). Vezanje ovog proteina i njegova negativna uloga u procesu razlikovnog prekrajanja je regulirana poli(ADP-ribozil)acijom. Aktivnost enzima PARP-1, glavne poliADPriboza polimeraze u stanici je važna u održavanju homeostaze stanice te poremećaj njegove aktivnosti tijekom zloćudne preobrazbe ima ključnu ulogu u reprogramiranju staničnog metabolizma (220). Zbog toga, razlike u aktivnosti ovog enzima u različitim fazama reprogramiranja zloćudno promijenjenih stanica vrlo vjerojatno utječu na izraženost transkripcijskih inačica gena čije prekrajanje je regulirano čimbenicima ovisnima o poli(ADP-ribozil)aciji. Uz naveden učinak povećane izraženosti pojedinih transkripcijskih inačica gena *BORIS* u stanicama tumora, vezan uz održavanje svojstava matičnih stanica, njihova izraženost bi potencijalno mogla ukazivati na određenu fazu u metaboličkom reprogramiranju stanica tumora.

Dobro je dokumentirano da je rak heterogena bolest i da se ta heterogenost ne temelji samo na genski različitim klonovima tumorskih stanica, nego na funkcionalnoj heterogenosti. Stanice raka, pod pritiskom nepovoljnih uvjeta mikrookoliša reprogramiraju svoj metabolizam kako bi preživjele. Otto Warburg je prvi primijetio da stanice tumora metaboliziraju glukozu procesom glikolize i u slučaju kad im je dostupna dovoljna količina kisika za odvijanje oksidativne fosforilacije (221). Razlog reprogramiranja metabolizma na energetski manje učinkovit način je preusmjeravanje dijela glikolitičkih međuprodukata u sintezu biomolekula. Warburg je pretpostavio da do reprogramiranja metabolizma stanica raka dolazi uslijed oštećenja mitohondrija. Kasnija istraživanja su pokazala da to nije slučaj. Reprogramiranje metabolizma energije tijekom zloćudne preobrazbe stanica je stupnjevit proces. Stanice tumora, pod pritiskom nepovoljnih uvjeta uslijed poremećene opskrbe hranjivim tvarima, kisikom, povećane količine reaktivnih kisikovih skupina i upale, reprogramiraju svoj metabolizam kako bi preživjele. Za razliku od pretpostavke da je stanicama tumora svojstvena aerobna glikoliza, de Groof i sur. (222) su pokazali da u početku zloćudne preobrazbe prevladava oksidativna fosforilacija, a da tek u kasnijim stadijima razvoja tumora dolazi do povećanja glikolize. Ključna uloga proteina MYC u reprogramiranju metabolizma stanica tumora je nedavno detaljnije objašnjena. Sancho i sur. (123) su pokazali da unutar tumora postoje populacije stanica različitog metaboličkog profila i sposobnosti metaboličke prilagodbe, koja se očituje u različitoj izraženosti proteina MYC. Protein MYC negativno regulira transkripciju gena *PGC1α* važnog za funkciju mitohondrija. Povišena razina proteina MYC u brzo proliferirajućim, bolje diferenciranim stanicama tumora, ovisnim o aerobnoj glikolizi, negativno utječe na oksidativnu fosforilaciju na način da utišava transkripciju gena *PGC1α*. U matičnim stanicama raka je razina proteina MYC niska i on, stoga, nema negativan utjecaj na oksidativnu fosforilaciju u mitohondrijima. Ove stanice su osjetljive na inhibitore oksidativne fosforilacije jer imaju vrlo ograničenu sposobnost metaboličke prilagodbe, međutim vremenom postaju na njih otporne, što je popraćeno povišenjem razine proteina MYC. S obzirom na navedeno jasno je da, usprkos uključenosti ovog onkogena u nastanak svih ključnih obilježja stanica zloćudnih tumora, mjerenje njegove izraženosti u tumoru ne može imati prognostičku vrijednost. Rezultati koje sam dobio istražujući izraženost proteina MYC u karcinomima pločastih stanica hipofarinksa to potvrđuju. Nije pronađena statistički značajna razlika u petogodišnjem preživljenju bolesnika sa tumorima, u kojima je

protein MYC bio jako izražen i onih u čijim tumorima je MYC bio slabo izražen. Nije pronađena niti statistički značajna razlika u raspodjeli izraženosti proteina MYC u odnosu na zahvaćenost limfnih čvorova i stupanj diferencijacije. Razlika u raspodjeli izraženosti proteina MYC je bila granično statistički značajna samo u odnosu na veličinu tumora (p=0,046).

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem, kao i podatci iz literature, ukazuju na to da je potencijalne molekularne prognostičke biljege potrebno promatrati u kontekstu složenih metaboličkih promjena koje najvjerojatnije nisu, suprotno dugo uvriježenom mišljenju, posljedica zloćudne preobrazbe nego ih treba uzeti u obzir kao pokretačku snagu tog procesa. Bolje razumijevanje hijerarhije događaja i informacijskog sadržaja podataka dobivenih određivanjem molekularnih biljega bi moglo doprinijeti unaprjeđenju ranog otkrivanja i učinkovitijeg liječenja zloćudnih bolesti.

## 7. ZAKLJUČCI

U ovom istraživanju, provedenom na 59 bolesnika oboljelih od karcinoma pločastih stanica hipofarinksa, analizirana je izraženost transkripata i proteina BORIS i MYC. Dobiveni rezultati su analizirani u odnosu na klasične prognostičke pokazatelje, veličinu tumora, zahvaćenost limfnih čvorova i stupanj histološke diferenciranosti tumora. Razlike u preživljenju među skupinama bolesnika sa istraživanim svojstvima su prikazane pomoću Kaplan-Meierovih krivulja. Razlika među krivuljama je testirana pomoću Gehan-Wilcoxon testa. Multivarijantna analiza povezanosti istraživanih svojstava sa smrtnim ishodom bolesti je napravljena uporabom rekurzivnog particioniranja. Na temelju dobivenih rezultata smo došli do sljedećih zaključaka:

1. Metodom imunohistokemije je dokazana izraženost proteina BORIS u 38% dostupnih (n=55) uzoraka karcinoma pločastih stanica hipofarinksa.

2. Nađena je statistički značajno manja izraženost proteina BORIS u tumorima bolesnika sa zahvaćenim limfnim čvorovima.

3. Izraženost proteina BORIS nije neovisan prognostički pokazatelj petogodišnjeg preživljenja bolesnika oboljelih od karcinoma pločastih stanica hipofarinksa.

4. Metodom RT-PCR je dokazana izraženost dvije transkripcijske inačice gena *BORIS*, sa i bez eksona 7, u uzorcima karcinoma pločastih stanica hipofarinksa.

5. Postoji statistički značajna razlika u petogodišnjem preživljenju bolesnika u čijim su tumorima izražene kratka i duga transkripcijska inačica gena *BORIS.*

6. Raspodjela izraženosti duge transkripcijske inačice gena *BORIS* nije statistički značajno različita s obzirom na klasične prognostičke pokazatelje: veličinu tumora, zahvaćenost limfnih čvorova i stupanj histološke diferenciranosti tumora.

7. Kratka transkripcijska inačica gena *BORIS*, koja ne sadrži ekson 7, statistički je značajno češće izražena u uzorcima tumora višeg pN i cN.

8. Metodom imunohistokemije je dokazana izraženost proteina MYC u jezgri i u citoplazmi stanica analiziranih tumora.

9. Jaka izraženost proteina MYC u jezgri je statistički značajno češća u tumorima većeg cT.

10. Raspodjela izraženosti proteina MYC u citoplazmi nije statistički značajno različita s obzirom na klasične prognostičke pokazatelje, veličinu tumora, zahvaćenost limfnih čvorova i stupanj histološke diferenciranosti tumora.

11. Veličina tumora nije neovisan prognostički pokazatelj petogodišnjeg preživljenja bolesnika oboljelih od karcinoma pločastih stanica hipofarinksa.

12. Postoji statistički značajna razlika u preživljenju bolesnika sa pN 0/1 ili cN 0/1 u odnosu na bolesnike sa pN 2/3 ili cN2/3.

13. Gradus tumora nije neovisan prognostički pokazatelj petogodišnjeg preživljenja bolesnika oboljelih od karcinoma pločastih stanica hipofarinksa.

14. *rpart* analiza podataka je pokazala da izraženost duge transkripcijske inačice gena *BORIS*, dob i gradus imaju najveći informacijski sadržaj za predviđanje petogodišnjeg preživljenja.

15. Bolesnici sa tumorima u kojima nije izražena duga transkripcijska inačica gena *BORIS* imaju sedam puta manji rizik od umiranja u petogodišnjem razdoblju od bolesnika u čijim tumorima je ova transkripcijska inačica izražena.

16. Rizik od smrtnog ishoda se u skupini bolesnika sa tumorima, u kojima nije izražena duga transkripcijska inačica gena *BORIS*, razlikuje ovisno o dobi bolesnika - dest puta je manji u bolesnika mlađih od 56 godina.

17. Rizik od smrtnog ishoda se u skupini bolesnika sa tumorima, u kojima je izražena duga transkripcijska inačica gena *BORIS*, razlikuje ovisno o gradusu - dva puta je veći za bolesnike sa slabo diferenciranim tumorima (G3).

## 8. SAŽETAK

Karcinom pločastih stanica hipofarinksa pripada skupini zloćudnih bolesti s lošom prognozom. Glavni čimbenici rizika za nastanak ove bolesti dovode do globalne hipometilacije DNA i posljedične aktivacije gena uključenih u zloćudnu preobrazbu. U zloćudnim tumorima dolazi do aktivacije gena *BORIS*, što se povezuje sa promjenama u aktivnosti gena *MYC*.

Provedeno je retrospektivno istraživanje izraženosti gena i proteina BORIS i MYC na 59 uzoraka karcinoma pločastih stanica hipofarinksa. Analizirana je povezanost izraženosti istraživanih transkripata i proteina sa klasičnim prognostičkim pokazateljima: veličinom tumora, zahvaćenošću limfnih čvorova i diferencijacijom tumora. Provedena je analiza utjecaja izraženosti transkripata i proteina BORIS i MYC na petogodišnje preživljenje oboljelih od karcinoma pločastih stanica hipofarinksa.

Pronađene su dvije transkripcijske inačice gena *BORIS*, izražene u 33,9% (BORISd) i 76,3% (BORISk) uzoraka, koje su statistički značajno utjecale na petogodišnje preživljenje oboljelih (BORISd, p=0,001; BORISk, p=0,011). Protein BORIS je pokazan u 42,4% tumora i nije imao utjecaj na preživljenje, kao niti protein MYC, bez obzira na unutarstanični smještaj. Multivarijatnom analizom podataka metodom rekurzivnog particioniranja pokazano je da izraženost transkripcijske inačice BORIS d najsnažniji prognostički pokazatelj rizika od smrtnog ishoda oboljelih od ove vrste tumora.

## 9. ABSTRACT

Clinical significance of BORIS and MYC expression in hypopharyngeal squamous cell carcinoma

Hypopharyngeal squamous cell carcinoma belongs to malignant diseases with dismal prognosis. The most prominent risk factors for this type of cancer are known to cause global DNA hypomethylation and activate cancer-related genes. *BORIS* is often aberrantly activated in cancer and is involved in activation of *MYC* transcription.

The expression of BORIS and MYC was investigated in retrospective study of 59 hypopharyngeal carcinoma samples. BORIS and MYC expression was analyzed regarding to conventional prognostic factors: tumor size, lymph node involvement and the degree of tumor differentiation. The influence of BORIS and MYC expression on five-year survival rate was analyzed.

Two detected *BORIS* transcript variants, BORISd and BORISk, were expressed in 33.9% and 76.3% of tumor analyzed tumors. The expression of both *BORIS* transcript variants significantly influenced the five-year survival rate (BORISd, p=0,001; BORISk, p=0,011). BORIS protein was detected in 42.4% of tumor samples and its expression had no impact on patients survival rate. The expression of MYC, regardless of its subcellular localization had no influence on patients survival. Multivariate analysis by recursive partitioning profiled BORISd expression as most powerful prognostic factor in this type of cancer.

Ivan Rašić, 2017.

## 10. POPIS LITERATURE


1. Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. Anatomija čovjeka II.dio. Zagreb: Medicinska naklada; 2002. str. 343-346 .

2. Sadler TW. Langmanova medicinska embriologija. Zagreb: Školska knjiga; 1996. str. 311-312,317.

3. Junqueira LC CJ. Osnove histologije. Zagreb: Školska knjiga; 2005. str. 253-54.

4. Helliwell TR. acp Best Practice No 169. Evidence based pathology: squamous carcinoma of the hypopharynx. J Clin Pathol. 2003;56:81–5.

5. Papadimitrakopoulou VA. Carcinogenesis of head and neck cancer and the role of chemoprevention in its reversal. Curr Opin Oncol. 2000;12:240–5.

6. Marur S, Forastiere AA. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. Mayo Clin Proc. 2016;91:386–96.

7. Cooper JS, Porter K, Mallin K, Hoffman HT, Weber RS, Ang KK i sur. National cancer database report on cancer of the head and neck: 10-Year update. Head Neck. 2009;31:748–58.

8. Mendenhall WM, Werning JW PD. Treatment of head and neck cancer. U: DeVita VT Jr, Lawrence TS RS, ur. Cancer Principles and Practice of Oncology. 9th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Wiliams & Wilkins; 2011. str. 729–80.

9. Popescu CR, Bertesteanu SVG, Mirea D, Grigore R, Lonescu D, Popescu B. The epidemiology of hypopharynx and cervical esophagus cancer. J Med Life. 2010;3:396–401.

10. Zdravstvo H zavod za javno. Registar za rak. Incidencija raka u Hrvatskoj 2013. Bilten br. 38. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2015.

11. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S i sur. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. Cancer Res. 1988;48:3282–7.

12. Urashima M, Hama T, Suda T, Suzuki Y, Ikegami M, Sakanashi C i sur. Distinct effects of alcohol consumption and smoking on genetic alterations in head and neck carcinoma. PLoS One. 2013;8:e80828.DOI: 10.1371/journal.pone.0080828. Pristupljeno 06.07.2016.

13. Maier H, Dietz A, Gewelke U, Heller WD, Weidauer H. Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer. Clin Investig. 1992;70:320–7.

14. Jefferies S, Foulkes WD. Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. Oral Oncology. 2001. str. 115–26.

15. Cheng L, Eicher SA, Guo Z, Hong WK, Spitz MR, Wei Q. Reduced DNA repair capacity in head and neck cancer patients. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1998;7:465–8.

16. Liu Z, Liu H, Gao F, Dahlstrom KR, Sturgis EM, Wei Q. Reduced DNA double-strand break repair capacity and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck—A case-control study. DNA Repair (Amst). 2016;40.

17. Lacko M, Braakhuis BJM, Sturgis EM, Boedeker CC, Suárez C, Rinaldo A i sur. Genetic Susceptibility to Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. Int J Radiat Oncol. 2014;89:38–48.

18. Sanderson RJ, Ironside JAD. Squamous cell carcinomas of the head and neck. BMJ. 2002;325:822–7.

19. Turić M, Kolarić K ED. Klinička onkologija. Zagreb: Nakladni zavod Globus; 1996. str. 419-23.

20. Kotwall C, Sako K, Razack MS, Rao U, Bakamjian V, Shedd DP. Metastatic patterns in squamous cell cancer of the head and neck. Am J Surg. Elsevier; 1987;154:439–42.

21. Hoffman HT, Karnell LH, Shah JP, Ariyan S, Brown GS, Fee WE i sur. Hypopharyngeal cancer patient care evaluation. Laryngoscope. 1997;107:1005–17.

22. Shah JP, Strong E, Spiro RH, Vikram B. Surgical grand rounds. Neck dissection:

current status and future possibilities. Clin Bull. 1981;11:25–33.

23. Robbins KT, Shaha AR, Medina JE, Califano JA, Wolf GT, Ferlito A i sur. Consensus statement on the classification and terminology of neck dissection. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2008;134:536–8.

24. Teymoortash A, Werner JA. Current advances in diagnosis and surgical treatment of lymph node metastasis in head and neck cancer. GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg. German Medical Science; 2012;11:Doc04.DOI: 10.3205/cto000086. Pristupljeno 28.07.2016.

25. Magnano M, Bongioannini G, Lerda W, Canale G, Tondolo E, Bona M i sur. Lymphnode metastasis in head and neck squamous cells carcinoma: multivariate analysis of prognostic variables. J Exp Clin Cancer Res. 1999;18:79–83.

26. Compton CC, Byrd DR, Garcia-Aguilar J, Kurtzman SH, Olawaiye A WM, ur. AJCC Cancer Staging Atlas. New York: Springer-Verlag;

27. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL TA, ur. AJCC cancer staging manual. 7th ed. New York: Springer-Verlag; 2010. str. 41-56.

28. Wiernik G, Millard PR, Haybittle JL. The predictive value of histological classification into degrees of differentiation of squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx compared with the survival of patients. Histopathology. 1991;19:411–7.

29. Janot F, Klijanienko J, Russo A, Mamet JP, de Braud F, El-Naggar AK i sur. Prognostic value of clinicopathological parameters in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective analysis. Br J Cancer. 1996;73:531–8.

30. Chiesa F, Mauri S, Tradati N, Calabrese L, Giugliano G, Ansarin M i sur. Surfing prognostic factors in head and neck cancer at the millennium. Oral Oncol. 1999;35:590–6.

31. Thawley SE, Panje WR. Comprehensive management of head and neck tumors, volume 1. W.B. Saunders Co.,Philadelphia, PA; 1987.

32. Pfister DG, Spencer S, Brizel DM, Burtness B, Busse PM, Caudell JJ i sur. Head and

neck cancers, Version 2.2014. Clinical practice guidelines in oncology. J Natl Compr Canc Netw. 2014;12:1454–87.

33. Mendenhall WM, Parsons JT, Devine JW, Cassisi NJ, Million RR. Squamous cell carcinoma of the pyriform sinus treated with surgery and/or radiotherapy. Head Neck Surg. 1987;10:88–92.

34. Pameijer FA, Mancuso AA, Mendenhall WM, Parsons JT, Mukherji SK, Hermans R i sur. Evaluation of pretreatment computed tomography as a predictor of local control in T1/T2 pyriform sinus carcinoma treated with definitive radiotherapy. Head Neck. 1998;20:159–68.

35. Spector JG, Sessions DG, Haughey BH, Chao KS, Simpson J, El Mofty S i sur. Delayed regional metastases, distant metastases, and second primary malignancies in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx. Laryngoscope. 2001;111:1079–87.

36. Tupchong L, Scott CB, Blitzer PH, Marcial VA, Lowry LD, Jacobs JR i sur. Randomized study of preoperative versus postoperative radiation therapy in advanced head and neck carcinoma: long-term follow-up of RTOG study 73-03. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1991;20:21–8.

37. Lefebvre JL, Chevalier D, Luboinski B, Kirkpatrick A, Collette L, Sahmoud T. Larynx preservation in pyriform sinus cancer: preliminary results of a European Organization for Research and Treatment of Cancer phase III trial. EORTC Head and Neck Cancer Cooperative Group. J Natl Cancer Inst. 1996;88:890–9.

38. Harari PM. Why has induction chemotherapy for advanced head and neck cancer become a United States community standard of practice? J Clin Oncol. 1997;15:2050–5.

39. Adelstein DJ, Lavertu P, Saxton JP, Secic M, Wood BG, Wanamaker JR i sur. Mature results of a phase III randomized trial comparing concurrent chemoradiotherapy with radiation therapy alone in patients with stage III and IV squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer. 2000;88:876–83.

40. Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefèbvre J-L, Greiner RH i sur.

Postoperative Irradiation with or without Concomitant Chemotherapy for Locally Advanced Head and Neck Cancer. N Engl J Med. 2004;350:1945–52.

41. Tytor M, Olofsson J. Prognostic factors in oral cavity carcinomas. Acta Otolaryngol Suppl. 1992;492:75–8.

42. Chung E-J, Kim G-W, Cho B-K, Park HS, Rho Y-S. Pattern of lymph node metastasis in hypopharyngeal squamous cell carcinoma and indications for level VI lymph node dissection. Head Neck. 2016;38 Suppl 1:E1969–73.

43. Jacobs JR, Ahmad K, Casiano R, Schuller DE, Scott C, Laramore GE i sur. Implications of positive surgical margins. Laryngoscope. 1993;103:64–8.

44. Joo Y-H, Cho K-J, Lee Y-S, Kim S-Y, Kim M-S. Prognostic impact of perineural invasion in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. Acta Otolaryngol. 2016;1–5.

45. Joo Y-H, Cho K-J, Kim S-Y, Kim M-S. Prognostic Significance of Lymph Node Density in Patients with Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma. Ann Surg Oncol. 2015;22 Suppl 3:S1014–9.

46. Kern SE. Why your new cancer biomarker may never work: recurrent patterns and remarkable diversity in biomarker failures. Cancer Res. 2012;72:6097–101.

47. Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2003;260:502–8.

48. Thomas GR, Nadiminti H, Regalado J. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. Int J Exp Pathol. 2005;86:347–63.

49. Sheiness D, Fanshier L, Bishop JM. Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29. J Virol. 1978;28:600–10.

50. Sheiness D, Bishop JM. DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus. J Virol. 1979;31:514–21.

51. Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. Nature. 1976;260:170–3.

52. Vennstrom B, Sheiness D, Zabielski J, Bishop JM. Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. J Virol. 1982;42:773–9.

53. Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. Nat Rev Cancer. 2008;8:976–90.

54. Adams JM, Harris AW, Pinkert CA, Corcoran LM, Alexander WS, Cory S i sur. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. Nature. 1985 ;318:533–8.

55. Escot C, Theillet C, Lidereau R, Spyratos F, Champeme MH, Gest J i sur. Genetic alteration of the c-myc protooncogene (MYC) in human primary breast carcinomas. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986;83:4834–8.

56. Nupponen NN, Kakkola L, Koivisto P, Visakorpi T. Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostate carcinomas. Am J Pathol. 1998;153:141–8.

57. Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik E V. MYC oncogenes and human neoplastic disease. Oncogene. 1999;18:3004–16.

58. Battey J, Moulding C, Taub R, Murphy W, Stewart T, Potter H i sur. The human c-myc oncogene: structural consequences of translocation into the IgH locus in Burkitt lymphoma. Cell. 1983;34:779–87.

59. Bentley DL, Groudine M. Novel promoter upstream of the human c-myc gene and regulation of c-myc expression in B-cell lymphomas. Mol Cell Biol. 1986;6:3481–9.

60. Bentley DL, Groudine M. A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of c-myc in differentiated HL60 cells. Nature. 1986;321:702–6.

61. Marcu KB, Bossone SA, Patel AJ. myc function and regulation. Annu Rev Biochem. 1992;61:809–60.

62. Ray D, Robert-Lézénès J. Coexistence of a c-myc mRNA initiated in intron 1 with the normal c-myc mRNA and similar regulation of both transcripts in mammalian cells. Oncogene Res. 1989;5:73–8.

63. Spencer CA, Groudine M. Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. Adv Cancer Res. 1991;56:1–48.

64. Spencer CA, LeStrange RC, Novak U, Hayward WS, Groudine M. The block to transcription elongation is promoter dependent in normal and Burkitt's lymphoma c-myc alleles. Genes Dev. 1990;4:75–88.

65. Stewart TA, Bellvé AR, Leder P. Transcription and promoter usage of the myc gene in normal somatic and spermatogenic cells. Science. 1984;226:707–10.

66. Taub R, Moulding C, Battey J, Murphy W, Vasicek T, Lenoir GM i sur. Activation and somatic mutation of the translocated c-myc gene in burkitt lymphoma cells. Cell. 1984;36:339–48.

67. Taub R, Kelly K, Battey J, Latt S, Lenoir GM, Tantravahi U i sur. A novel alteration in the structure of an activated c-myc gene in a variant t(2;8) Burkitt lymphoma. Cell. 1984;37:511–20.

68. Watt R, Nishikura K, Sorrentino J, ar-Rushdi A, Croce CM, Rovera G. The structure and nucleotide sequence of the 5' end of the human c-myc oncogene. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983;80:6307–11.

69. Yean D, Gralla J. Transcription reinitiation rate: a special role for the TATA box. Mol Cell Biol. 1997;17:3809–16.

70. Hoopes BC, LeBlanc JF, Hawley DK. Contributions of the TATA box sequence to rate-limiting steps in transcription initiation by RNA polymerase II. J Mol Biol. 1998;277:1015–31.

71. Krumm A, Hickey LB, Groudine M. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II defines a general rate-limiting step after transcription initiation. Genes Dev. 1995;9:559–72.

72. Albert T, Wells J, Funk JO, Pullner A, Raschke EE, Stelzer G i sur. The chromatin structure of the dual c-myc promoter P1/P2 is regulated by separate elements. J Biol Chem. 2001;276:20482–90.

73. Wierstra I, Alves J. The c-myc Promoter: Still MysterY and Challenge. Advances in cancer research. 2008. str. 113–333.

74. Gombert WM, Farris SD, Rubio ED, Morey-Rosler KM, Schubach WH, Krumm A. The c-myc insulator element and matrix attachment regions define the c-myc chromosomal domain. Mol Cell Biol. 2003;23:9338–48.

75. West AG, Gaszner M, Felsenfeld G. Insulators: many functions, many mechanisms. Genes Dev. 2002;16:271–88.

76. Felsenfeld G, Burgess-Beusse B, Farrell C, Gaszner M, Ghirlando R, Huang S i sur. Chromatin boundaries and chromatin domains. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2004;69:245–50.

77. Lutz M, Burke LJ, LeFevre P, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C i sur. Thyroid hormone-regulated enhancer blocking: cooperation of CTCF and thyroid hormone receptor. EMBO J. 2003;22:1579–87.

78. Bell AC, West AG, Felsenfeld G. The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. Cell. 1999;98:387–96.

79. Ishihara K, Oshimura M, Nakao M. CTCF-dependent chromatin insulator is linked to epigenetic remodeling. Mol Cell. 2006;23:733–42.

80. Chadee DN, Hendzel MJ, Tylipski CP, Allis CD, Bazett-Jones DP, Wright JA i sur. Increased Ser-10 phosphorylation of histone H3 in mitogen-stimulated and oncogene-transformed mouse fibroblasts. J Biol Chem. 1999;274:24914–20.

81. Dunn KL, Espino PS, Drobic B, He S, Davie JR. The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling. Biochem Cell Biol. 2005;83:1–14.

82. Talasz H, Lindner HH, Sarg B, Helliger W. Histone H4-lysine 20 monomethylation is increased in promoter and coding regions of active genes and correlates with

hyperacetylation. J Biol Chem. 2005;280:38814–22.

83. Sierra J, Yoshida T, Joazeiro CA, Jones KA. The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. Genes Dev. 2006;20:586–600.

84. Cheng ASL, Jin VX, Fan M, Smith LT, Liyanarachchi S, Yan PS i sur. Combinatorial analysis of transcription factor partners reveals recruitment of c-MYC to estrogen receptor-alpha responsive promoters. Mol Cell. 2006;21:393–404.

85. Farris SD, Rubio ED, Moon JJ, Gombert WM, Nelson BH, Krumm A. Transcription-induced chromatin remodeling at the c-myc gene involves the local exchange of histone H2A.Z. J Biol Chem. 2005;280:25298–303.

86. Hann SR, Eisenman RN. Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. Mol Cell Biol. 1984;4:2486–97.

87. Blackwood EM, Eisenman RN. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. Science. 1991;251:1211–7.

88. Conacci-Sorrell M, McFerrin L, Eisenman RN. An overview of MYC and its interactome. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014;4:a014357.

89. Spotts GD, Patel S V, Xiao Q, Hann SR. Identification of downstream-initiated c-Myc proteins which are dominant-negative inhibitors of transactivation by full-length c-Myc proteins. Mol Cell Biol. 1997;17:1459–68.

90. Conacci-Sorrell M, Ngouenet C, Eisenman RN. Myc-nick: a cytoplasmic cleavage product of Myc that promotes alpha-tubulin acetylation and cell differentiation. Cell. 2010;142:480–93.

91. Amati B, Brooks MW, Levy N, Littlewood TD, Evan GI, Land H. Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. Cell. 1993;72:233–45.

92. Desbarats L, Gaubatz S, Eilers M. Discrimination between different E-box-binding proteins at an endogenous target gene of c-myc. Genes Dev. 1996;10:447–60.

93. McMahon SB, Van Buskirk HA, Dugan KA, Copeland TD, Cole MD. The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. Cell. 1998;94:363–74.

94. McMahon SB, Wood MA, Cole MD. The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. Mol Cell Biol. 2000;20:556–62.

95. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. Science. 2001;293:1074–80.

96. Annibali D, Whitfield JR, Favuzzi E, Jauset T, Serrano E, Cuartas I i sur. Myc inhibition is effective against glioma and reveals a role for Myc in proficient mitosis. Nat Commun. 2014;5:4632.

97. Guccione E, Martinato F, Finocchiaro G, Luzi L, Tizzoni L, Dall' Olio V i sur. Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. Nat Cell Biol. 2006;8:764–70.

98. Walz S, Lorenzin F, Morton J, Wiese KE, von Eyss B, Herold S i sur. Activation and repression by oncogenic MYC shape tumour-specific gene expression profiles. Nature. 2014;511:483–7.

99. Thomas LR, Wang Q, Grieb BC, Phan J, Foshage AM, Sun Q i sur. Interaction with WDR5 Promotes Target Gene Recognition and Tumorigenesis by MYC. Mol Cell. 2015;58:440–52.

100. Thomas LR, Tansey WP. Proteolytic control of the oncoprotein transcription factor Myc. Adv Cancer Res. 2011;110:77–106.

101. Sorokin A V, Kim ER, Ovchinnikov LP. Proteasome system of protein degradation and processing. Biochem Biokhimii˘a˘. 2009;74:1411–42.

102. Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D. The ubiquitin-proteasome system. J Biosci. 2006;31:137–55.

103. Hann SR. Role of post-translational modifications in regulating c-Myc proteolysis, transcriptional activity and biological function. Semin Cancer Biol. 2006;16:288–302.

104. Yada M, Hatakeyama S, Kamura T, Nishiyama M, Tsunematsu R, Imaki H i sur. Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. EMBO J. 2004;23:2116–25.

105. Jóźwiak P, Forma E, Bryś M, Krześlak A. O-GlcNAcylation and Metabolic Reprograming in Cancer. Front Endocrinol (Lausanne). 2014;5:145.DOI: 10.3389/fendo.2014.00145. Pristupljeno 17.10.2016.

106. Burén S, Gomes AL, Teijeiro A, Fawal M-A, Yilmaz M, Tummala KS i sur. Regulation of OGT by URI in Response to Glucose Confers c-MYC-Dependent Survival Mechanisms. Cancer Cell. 2016;30:290–307.

107. Wong WJ, Qiu B, Nakazawa MS, Qing G, Simon MC. MYC Degradation under Low $O_2$ Tension Promotes Survival by Evading Hypoxia-Induced Cell Death. Mol Cell Biol. 2013;33:3494–504.

108. Hayward WS, Neel BG, Astrin SM. Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. Nature. 1981;290:475–80.

109. Payne GS, Bishop JM, Varmus HE. Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene in bursal lymphomas. Nature. 1982 J;295:209–14.

110. Taub R, Kirsch I, Morton C, Lenoir G, Swan D, Tronick S i sur. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982;79:7837–41.

111. Vita M, Henriksson M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. Semin Cancer Biol. 2006;16:318–30.

112. Tansey WP, Tansey, P. W. Mammalian MYC Proteins and Cancer. New J Sci. Hindawi Publishing Corporation; 2014;2014:1–27.

113. Oster SK, Ho CSW, Soucie EL, Penn LZ. The myc oncogene: MarvelouslY Complex. Adv Cancer Res. 2002;84:81–154.

114. Xiao Q, Claassen G, Shi J, Adachi S, Sedivy J, Hann SR. Transactivation-defective c-MycS retains the ability to regulate proliferation and apoptosis. Genes Dev. 1998;12:3803–8.

115. Gartel AL, Shchors K. Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. Exp Cell Res. 2003;283:17–21.

116. Cole MD. MYC Association with Cancer Risk and a New Model of MYC-Mediated Repression. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014;4:a014316–a014316. DOI: 10.3389/fendo.2014.00145. Pristupljeno 08.12.2016.

117. Gabay M, Li Y, Felsher DW. MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014;4. DOI: 10.1101/cshperspect.a014241. pristupljeno 19.10.2016.

118. Nilsson JA, Cleveland JL. Myc pathways provoking cell suicide and cancer. Oncogene. 2003;22:9007–21.

119. Hoffman B, Liebermann DA. Apoptotic signaling by c-MYC. Oncogene. 2008;27:6462–72.

120. Felsher DW, Zetterberg A, Zhu J, Tlsty T, Bishop JM. Overexpression of MYC causes p53-dependent G2 arrest of normal fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97:10544–8.

121. Dominguez-Sola D, Ying CY, Grandori C, Ruggiero L, Chen B, Li M i sur. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. Nature. 2007;448:445–51.

122. Karlsson A, Deb-Basu D, Cherry A, Turner S, Ford J, Felsher DW. Defective double-strand DNA break repair and chromosomal translocations by MYC overexpression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100:9974–9.

123. Sancho P, Burgos-Ramos E, Tavera A, Bou Kheir T, Jagust P, Schoenhals M i sur. MYC/PGC-1α Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells. Cell Metab. 2015;22:590–605.

124. Viale A, Draetta GF. Sugar? No Thank You, Just a Deep Breath of Oxygen for Cancer Stem Cells. Cell Metab. 2015;22:543–5.

125. Lobanenkov V V, Nicolas RH, Adler V V, Paterson H, Klenova EM, Polotskaja A V i sur. A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene. Oncogene. 1990;5:1743–53.

126. Phillips JE, Corces VG. CTCF: master weaver of the genome. Cell. 2009;137:1194–211.

127. Filippova GN, Fagerlie S, Klenova EM, Myers C, Dehner Y, Goodwin G i sur. An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. Mol Cell Biol. 1996;16:2802–13.

128. Ohlsson R, Renkawitz R, Lobanenkov V. CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. Trends Genet. 2001;17:520–7.

129. MacPherson MJ, Beatty LG, Zhou W, Du M, Sadowski PD. The CTCF insulator protein is posttranslationally modified by SUMO. Mol Cell Biol. 2009;29:714–25.

130. Klenova EM, Chernukhin I V, El-Kady A, Lee RE, Pugacheva EM, Loukinov DI i sur. Functional phosphorylation sites in the C-terminal region of the multivalent multifunctional transcriptional factor CTCF. Mol Cell Biol. 2001;21:2221–34.

131. El-Kady A, Klenova E. Regulation of the transcription factor, CTCF, by phosphorylation with protein kinase CK2. FEBS Lett. 2005;579:1424–34.

132. Yu W, Ginjala V, Pant V, Chernukhin I, Whitehead J, Docquier F i sur. Poly(ADP-ribosyl)ation regulates CTCF-dependent chromatin insulation. Nat Genet. 2004;36:1105–10.

133. Klenova E, Ohlsson R. Poly(ADP-ribosyl)ation and epigenetics. Is CTCF PARt of the plot? Cell Cycle. 2005;4:96–101.

134. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh T-Y, Schones DE, Wang Z i sur. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. Cell. 2007;129:823–37.

135. Kim TH, Abdullaev ZK, Smith AD, Ching KA, Loukinov DI, Green RD i sur. Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. Cell. 2007;128:1231–45.

136. Burcin M, Arnold R, Lutz M, Kaiser B, Runge D, Lottspeich F i sur. Negative protein 1, which is required for function of the chicken lysozyme gene silencer in conjunction with hormone receptors, is identical to the multivalent zinc finger repressor CTCF. Mol Cell Biol. 1997;17:1281–8.

137. Gombert WM, Krumm A. Targeted deletion of multiple CTCF-binding elements in the human C-MYC gene reveals a requirement for CTCF in C-MYC expression. PLoS One. 2009;4:e6109. DOI: 10.1371/journal.pone.0006109. Pristupljeno 05.12.2016.

138. Weth O, Paprotka C, Günther K, Schulte A, Baierl M, Leers J i sur. CTCF induces histone variant incorporation, erases the H3K27me3 histone mark and opens chromatin. Nucleic Acids Res. 2014;42:11941–51.

139. Lutz M, Burke LJ, Barreto G, Goeman F, Greb H, Arnold R i sur. Transcriptional repression by the insulator protein CTCF involves histone deacetylases. Nucleic Acids Res. 2000;28:1707–13.

140. Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. Nature. 1995;377:454–7.

141. Hörlein AJ, Näär AM, Heinzel T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R i sur. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. Nature. 1995;377:397–404.

142. Nagy L, Kao HY, Chakravarti D, Lin RJ, Hassig CA, Ayer DE i sur. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. Cell. 1997;89:373–80.

143. Komura J-I, Ikehata H, Ono T. Chromatin fine structure of the c-MYC insulator element/DNase I-hypersensitive site I is not preserved during mitosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104:15741–6.

144. Mostocotto C, Carbone M, Battistelli C, Ciotti A, Amati P, Maione R. Poly(ADP-ribosyl)ation is required to modulate chromatin changes at c-MYC promoter during emergence from quiescence. PLoS One. 2014;9:e102575. DOI: 10.1371/journal.pone.0102575. Pristupljeno 24.02.2016.

145. Carbone M, Rossi MN, Cavaldesi M, Notari A, Amati P, Maione R. Poly(ADP-ribosyl)ation is implicated in the G0–G1 transition of resting cells. Oncogene. 2008;27:6083–92.

146. Kim MY. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: `PAR-laying' NAD+ into a nuclear signal. Genes Dev. 2005;19:1951–67.

147. Majello B, De Luca P, Suske G, Lania L. Differential transcriptional regulation of c-myc promoter through the same DNA binding sites targeted by Sp1-like proteins. Oncogene. 1995;10:1841–8.

148. Hore TA, Deakin JE, Marshall Graves JA. The evolution of epigenetic regulators CTCF and BORIS/CTCFL in amniotes. PLoS Genet. 2008;4:e1000169. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000169. Pristupljeno 11.04.2016.

149. Renaud S, Pugacheva EM, Delgado MD, Braunschweig R, Abdullaev Z, Loukinov D i sur. Expression of the CTCF-paralogous cancer-testis gene, brother of the regulator of imprinted sites (BORIS), is regulated by three alternative promoters modulated by CpG methylation and by CTCF and p53 transcription factors. Nucleic Acids Res. 2007;35:7372–88.

150. Pugacheva EM, Suzuki T, Pack SD, Kosaka-Suzuki N, Yoon J, Vostrov AA i sur. The Structural Complexity of the Human BORIS Gene in Gametogenesis and Cancer. PLoS One. 2010;5. DOI: 10.1371/journal.pone.0013872. Pristupljeno 11.04.2016.

151. Loukinov DI, Pugacheva E, Vatolin S, Pack SD, Moon H, Chernukhin I i sur. BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:6806–11.

152. Jones TA, Ogunkolade BW, Szary J, Aarum J, Mumin MA, Patel S i sur. Widespread expression of BORIS/CTCFL in normal and cancer cells. PLoS One. 2011;6:e22399. DOI: 10.1371/journal.pone.0022399. Pristupljeno 12.04.2016.

153. Rosa-Garrido M, Ceballos L, Alonso-Lecue P, Abraira C, Delgado MD, Gandarillas A. A cell cycle role for the epigenetic factor CTCF-L/BORIS. PLoS One. 2012;7:e39371. DOI: 10.1371/journal.pone.0039371. Pristupljeno 24.02.2016.

154. Ogunkolade BW, Jones TA, Aarum J, Szary J, Owen N, Ottaviani D i sur. BORIS/CTCFL is an RNA-binding protein that associates with polysomes. BMC Cell Biol. 2013;14:52. DOI: 10.1186/1471-2121-14-52. 12.04.2016.

155. Soltanian S, Dehghani H, Matin MM, Bahrami AR. Expression analysis of BORIS during pluripotent, differentiated, cancerous, and non-cancerous cell states. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2014;46:647–58.

156. Klenova EM, Morse HC, Ohlsson R, Lobanenkov V V. The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. Semin Cancer Biol. 2002;12:399–414.

157. Ulaner GA, Vu TH, Li T, Hu J-F, Yao X-M, Yang Y i sur. Loss of imprinting of IGF2 and H19 in osteosarcoma is accompanied by reciprocal methylation changes of a CTCF-binding site. Hum Mol Genet. 2003;12:535–49.

158. Hong JA, Kang Y, Abdullaev Z, Flanagan PT, Pack SD, Fischette MR i sur. Reciprocal binding of CTCF and BORIS to the NY-ESO-1 promoter coincides with derepression of this cancer-testis gene in lung cancer cells. Cancer Res. 2005;65:7763–74.

159. D'Arcy V, Abdullaev ZK, Pore N, Docquier F, Torrano V, Chernukhin I i sur. The potential of BORIS detected in the leukocytes of breast cancer patients as an early marker of tumorigenesis. Clin Cancer Res. 2006;12:5978–86.

160. Hoffmann MJ, Müller M, Engers R, Schulz WA. Epigenetic control of CTCFL/BORIS and OCT4 expression in urogenital malignancies. Biochem Pharmacol. 2006;72:1577–88.

161. Looijenga LHJ, Hersmus R, Gillis AJM, Pfundt R, Stoop HJ, van Gurp RJHLM i sur. Genomic and expression profiling of human spermatocytic seminomas: primary spermatocyte as tumorigenic precursor and DMRT1 as candidate chromosome 9 gene. Cancer Res. 2006;66:290–302.

162. Risinger JI, Chandramouli GVR, Maxwell GL, Custer M, Pack S, Loukinov D i sur. Global expression analysis of cancer/testis genes in uterine cancers reveals a high incidence of BORIS expression. Clin Cancer Res. 2007;13:1713–9.

163. Woloszynska-Read A, James SR, Link PA, Yu J, Odunsi K, Karpf AR. DNA methylation-dependent regulation of BORIS/CTCFL expression in ovarian cancer. Cancer Immun. 2007;7:21.

164. D'Arcy V, Pore N, Docquier F, Abdullaev ZK, Chernukhin I, Kita G-X i sur. BORIS, a paralogue of the transcription factor, CTCF, is aberrantly expressed in breast tumours. Br J Cancer. 2008;98:571–9.

165. Kholmanskikh O, Loriot A, Brasseur F, De Plaen E, De Smet C. Expression of BORIS in melanoma: lack of association with MAGE-A1 activation. Int J cancer. 2008;122:777–84.

166. Smith IM, Glazer CA, Mithani SK, Ochs MF, Sun W, Bhan S i sur. Coordinated activation of candidate proto-oncogenes and cancer testes antigens via promoter demethylation in head and neck cancer and lung cancer. PLoS One. 2009;4:e4961. DOI: 10.1371/journal.pone.0004961. Pristupljeno 02.3.2016.

167. Renaud S, Loukinov D, Alberti L, Vostrov A, Kwon Y-W, Bosman FT i sur. BORIS/CTCFL-mediated transcriptional regulation of the hTERT telomerase gene in testicular and ovarian tumor cells. Nucleic Acids Res. 2011;39:862–73.

168. Woloszynska-Read A, Zhang W, Yu J, Link PA, Mhawech-Fauceglia P, Collamat G i sur. Coordinated Cancer Germline Antigen Promoter and Global DNA Hypomethylation in Ovarian Cancer: Association with the BORIS/CTCF Expression Ratio and Advanced Stage. Clin Cancer Res. 2011;17:2170–80.

169. Bhan S, Negi SS, Shao C, Glazer CA, Chuang A, Gaykalova DA i sur. BORIS binding to the promoters of cancer testis antigens, MAGEA2, MAGEA3, and MAGEA4, is

associated with their transcriptional activation in lung cancer. Clin Cancer Res. 2011;17:4267–76.

170. Okabayashi K, Fujita T, Miyazaki J, Okada T, Iwata T, Hirao N i sur. Cancer-testis antigen BORIS is a novel prognostic marker for patients with esophageal cancer. Cancer Sci. 2012;103:1617–24.

171. Chen K, Huang W, Huang B, Wei Y, Li B, Ge Y i sur. *BORIS,* Brother of the Regulator of Imprinted Sites, Is Aberrantly Expressed in Hepatocellular Carcinoma. Genet Test Mol Biomarkers. 2013;17:160–5.

172. Link PA, Zhang W, Odunsi K, Karpf AR. BORIS/CTCFL mRNA isoform expression and epigenetic regulation in epithelial ovarian cancer. Cancer Immun. 2013;13:6.

173. Cheema Z, Hari-Gupta Y, Kita G-X, Farrar D, Seddon I, Corr J i sur. Expression of the cancer-testis antigen BORIS correlates with prostate cancer. Prostate. 2014;74:164–76.

174. Novak Kujundžić R, Grbeša I, Ivkić M, Krušlin B, Konjevoda P, Gall Trošelj K. Possible prognostic value of BORIS transcript variants ratio in laryngeal squamous cell carcinomas - a pilot study. Pathol Oncol Res. 2014;20:687–95.

175. Hoivik EA, Kusonmano K, Halle MK, Berg A, Wik E, Werner HMJ i sur. Hypomethylation of the CTCFL/BORIS promoter and aberrant expression during endometrial cancer progression suggests a role as an Epi-driver gene. Oncotarget. 2014;5:1052–61.

176. Velázquez-Hernández N, Reyes-Romero MA, Barragán-Hernández M, Guerrero-Romero F, Rodríguez-Moran M, Aguilar-Duran M i sur. BORIS and CTCF are overexpressed in squamous intraepithelial lesions and cervical cancer. Genet Mol Res. 2015;14:6094–100.

177. Asano T, Hirohashi Y, Torigoe T, Mariya T, Horibe R, Kuroda T i sur. Brother of the regulator of the imprinted site (BORIS) variant subfamily 6 is involved in cervical cancer stemness and can be a target of immunotherapy. Oncotarget. 2016;7:11223–37.

178. Campbell AE, Martinez SR, Miranda JJL. Molecular architecture of CTCFL. Biochem Biophys Res Commun. 2010;396:648–50.

179. Jelinic P, Stehle J-C, Shaw P. The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation. PLoS Biol. 2006;4:e355. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040355. Pristupljeno 11.3.2016.

180. Fiorentino FP, Macaluso M, Miranda F, Montanari M, Russo A, Bagella L i sur. CTCF and BORIS regulate Rb2/p130 gene transcription: a novel mechanism and a new paradigm for understanding the biology of lung cancer. Mol Cancer Res. 2011;9:225–33.

181. Pugacheva EM, Rivero-Hinojosa S, Espinoza CA, Méndez-Catalá CF, Kang S, Suzuki T i sur. Comparative analyses of CTCF and BORIS occupancies uncover two distinct classes of CTCF binding genomic regions. Genome Biol. 2015;16:161. DOI: 10.1186/s13059-015-0736-8. Pristupljeno 24.02.2016.

182. Nguyen P, Bar-Sela G, Sun L, Bisht KS, Cui H, Kohn E i sur. BAT3 and SET1A form a complex with CTCFL/BORIS to modulate H3K4 histone dimethylation and gene expression. Mol Cell Biol. 2008;28:6720–9.

183. Kosaka-Suzuki N, Suzuki T, Pugacheva EM, Vostrov AA, Morse HC, Loukinov D i sur. Transcription factor BORIS (Brother of the Regulator of Imprinted Sites) directly induces expression of a cancer-testis antigen, TSP50, through regulated binding of BORIS to the promoter. J Biol Chem. 2011;286:27378–88.

184. Monroy-Contreras R, Vaca L. Molecular beacons: powerful tools for imaging RNA in living cells. J Nucleic Acids. 2011;2011:741723. DOI: 10.4061/2011/741723. Pristupljeno 08.11.2016.

185. Alberti L, Renaud S, Losi L, Leyvraz S, Benhattar J. High expression of hTERT and stemness genes in BORIS/CTCFL positive cells isolated from embryonic cancer cells. PLoS One. 2014;9:e109921.

186. Cuffel C, Rivals J-P, Zaugg Y, Salvi S, Seelentag W, Speiser DE i sur. Pattern and clinical significance of cancer-testis gene expression in head and neck squamous cell carcinoma. Int J Cancer. 2011;128:2625–34.

187. Spaventi R, Pecur L, Pavelic K, Pavelic ZP, Spaventi S, Stambrook PJ. Human tumour bank in Croatia: a possible model for a small bank as part of the future European tumour bank network. Eur J Cancer. 1994;30A:419.

188. Team RC (R F for SC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria; 2014.

189. Zelterman D. Applied Linear Models With SAS. Cambridge: Cambridge University Press; 2010.

190. Hothorn T, Hornik K, Wien W, Zeileis A. Unbiased Recursive Partitioning: A Conditional Inference Framework. J Comput Graph Stat. 2006;15:651–74.

191. Therneau T, Atkinson B, Ripley B. rpart: Recursive Partitioning and Regression Trees. 2015.

192. Machin D, Cheung YB, Parmar MKB, Parmar MKB. Survival analysis : a practical approach. Wiley; 2006. str.266.

193. Patel SG, Shah JP. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. CA Cancer J Clin. 2005;55:242–58.

194. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100:57–70.

195. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. Science.2009;324:1029–33.

196. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. Nat Rev Cancer. 2011;11:85–95.

197. Hamanaka RB, Chandel NS. Cell biology. Warburg effect and redox balance. Science. 2011;334:1219–20.

198. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. 2011;144:646–74.

199. Kang S, Lee S, Lee E. ROS and energy metabolism in cancer cells: alliance for fast growth. Arch Pharm Res. 2015;38:338-45.

200. Hay N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? Nat Rev Cancer.2016;16:635-49.

201. Potter M, Newport E, Morten K. The Warburg effect: 80 years on. Biochem Soc Trans. 2016;44:1499-1505.

202. Smith IM, Mydlarz WK, Mithani SK, Califano JA. DNA global hypomethylation in squamous cell head and neck cancer associated with smoking, alcohol consumption and stage. Int J cancer. 2007;121:1724–8.

203. Weaver AN, Yang ES. Beyond DNA Repair: Additional Functions of PARP-1 in Cancer. Front Oncol. 2013;3:290.

204. Zardo G, D'Erme M, Reale A, Strom R, Perilli M, Caiafa P. Does Poly(ADP-ribosyl)ation Regulate the DNA Methylation Pattern? Biochemistry. 1997;36:7937–43.

205. Zardo G, Reale A, Matteis G De, Buontempo S, Caiafa P. A role for poly(ADP-ribosyl)ation in DNA methylation. Biochem Cell Biol. 2003;81:197–208.

206. Althaus FR. Poly(ADP-ribose): a co-regulator of DNA methylation? Oncogene. 2005;24:11–2.

207. Reale A, Matteis G De, Galleazzi G, Zampieri M, Caiafa P. Modulation of DNMT1 activity by ADP-ribose polymers. Oncogene. 2005;24:13–9.

208. Guastafierro T, Cecchinelli B, Zampieri M, Reale A, Riggio G, Sthandier O i sur. CCCTC-binding Factor Activates PARP-1 Affecting DNA Methylation Machinery. J Biol Chem. 2008;283:21873–80.

209. Caiafa P, Guastafierro T, Zampieri M. Epigenetics: poly(ADP-ribosyl)ation of PARP-1 regulates genomic methylation patterns. FASEB J. 2009;23:672–8.

210. Caiafa P, Zlatanova J. CCCTC-binding factor meets poly(ADP-ribose) polymerase-1. J Cell Physiol. 2009;219:265–70.

211. Miao Z, Wu L, Lu M, Meng X, Gao B, Qiao X i sur. Analysis of the transcriptional regulation of cancer-related genes by aberrant DNA methylation of the cis-regulation sites in the promoter region during hepatocyte carcinogenesis caused by arsenic. Oncotarget. 2015;6:21493–506.

212. Hottiger MO. ADP-ribosylation of histones by ARTD1: An additional module of the histone code? FEBS Lett. 2011;585:1595–9.

213. Krishnakumar R, Kraus WL. PARP-1 Regulates Chromatin Structure and Transcription through a KDM5B-Dependent Pathway. Mol Cell. 2010;39:736–49.

214. Ozaki T, Hanaoka E, Naka M, Nakagawara A, Sakiyama S. Cloning and Characterization of Rat BAT3 cDNA. DNA Cell Biol. 1999;18:503–12.

215. Tsukahara T, Kimura S, Ichimiya S, Torigoe T, Kawaguchi S, Wada T i sur. Scythe/BAT3 regulates apoptotic cell death induced by papillomavirus binding factor in human osteosarcoma. Cancer Sci. 2009;100:47–53.

216. Lee S-H, Chen T-Y, Dhar SS, Gu B, Chen K, Kim YZ i sur. A feedback loop comprising PRMT7 and miR-24-2 interplays with Oct4, Nanog, Klf4 and c-Myc to regulate stemness. Nucleic Acids Res. 2016;gkw788. DOI: 10.1093/nar/gkw788. Pristupljeno 09.12.2016.

217. Alberti L, Losi L, Leyvraz S, Benhattar J. Different Effects of BORIS/CTCFL on Stemness Gene Expression, Sphere Formation and Cell Survival in Epithelial Cancer Stem Cells. PLoS One. 2015;10:e0132977. DOI: 10.1371/journal.pone.0132977. Prisupljeno 02.12.2016.

218. Asano T, Hirohashi Y, Torigoe T, Mariya T, Horibe R, Kuroda T i sur. Brother of the regulator of the imprinted site (BORIS) variant subfamily 6 is involved in cervical cancer stemness and can be a target of immunotherapy. Oncotarget. 2016;7:11223–37.

219. Abdul-Manan N, Williams KR. hnRNP A1 binds promiscuously to oligoribonucleotides: utilization of random and homo-oligonucleotides to discriminate sequence from base-specific binding. Nucleic Acids Res. 1996;24:4063–70.

220. Novak Kujundžić R, Žarković N, Gall Trošelj K. Pyridine nucleotides in regulation of cell death and survival by redox and non-redox reactions. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2014;24:287–309.

221. Warburg O. On the origin of cancer cells. Science. 1956;123:309–14.

222. de Groof AJC, te Lindert MM, van Dommelen MMT, Wu M, Willemse M, Smift AL i sur. Increased OXPHOS activity precedes rise in glycolytic rate in H-RasV12/E1A transformed fibroblasts that develop a Warburg phenotype. Mol Cancer. 2009;8:54.

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 1983. godine u Zagrebu. Osnovnu školu i sve razrede XV. gimnazije u Zagrebu završio sam s odličnim uspjehom. Studij na Medicinskom fakultetu u Zagrebu započeo sam 2001. godine, završni ispit položio s odličnim uspjehom i diplomirao u srpnju 2007. godine sa summa cum laude nagradom; prosjekom ocjena tijekom studija 4.829. Predmet Otorinolaringologija i sve ostale kirurške predmete položio sam s odličnim uspjehom. Dobitnik sam nagrade „Potvrda o izvrsnosti u patofiziologiji“ u ak. godini 2003./2004. te Dekanove nagrade za ak. godinu 2004./2005. Za vrijeme studija bio sam nagrađivan stipendijama Ministarstva znanosti, Sveučilišta u Zagrebu te Grada Zagreba. Na Klinici za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata Medicinskog i Stomatološkog fakulteta KBC Sestre milosrdnice započeo sam u siječnju 2009. godine specijalizaciju iz Otorinolaringologije i kirurgije glave i vrata, završio poslijediplomski studij iz istog predmeta te specijalistički ispit položio u srpnju 2013. Doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu u Zagrebu započeo sam 2010., uspješno sam položio sve ispite i u siječnju 2012. obranio prijavu teme doktorske disertacije pod naslovom Klinički značaj izraženosti gena BORIS i MYC u karcinomu pločastih stanica hipofarinksa. Aktivno sam sudjelovao na 12 domaćih i međunarodnih skupova te tečajeva uz objavu 3 znanstvena rada koje navodi baza podataka Current Contents.