

Univerzitet u Beogradu

Medicinski Fakultet

Jelena M. Filipović

**EKSPRESIJA PROTEIN ARGININ METIL
TRANSFERAZE 1 (PRMT1) I NJENIH
KO-EFEKTORA U TUMORIMA
BUBREŽNIH ĆELIJA KOD ODRASLIH**

doktorska disertacija

Beograd, 2020.

University of Belgrade
Faculty of Medicine

Jelena M. Filipović

**EXPRESSION OF PROTEIN ARGININE
METHYL TRANSFERASE-1 (PRMT1)
AND ITS CO-EFFECTORS IN RENAL
CELL TUMORS IN ADULTS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020.

Mentor:

Prof. dr Jasmina Marković-Lipkovski, redovni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije za ocenu završne doktorske disertacije:

1. Prof. dr Svetislav Tatić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Doc. dr Duško Dunderović, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Ljubinka Janković-Veličković, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

Istraživanja sprovedena u doktoratu finansirana su sredstvima sa projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod nazivom „Karakterizacija bubrežnih stem/progenitor ćelija kod čoveka: identifikacija novih površinskih markera multipotentnih bubrežnih ćelija koje mogu imati regenerativnu ulogu kod oštećenja bubrega“, broj OI 175047, a pod rukovodstvom prof. dr Jasmine Marković-Lipkovski.

ZAHVALNICA

Najpre bih želela da se zahvalim svom mentoru profesorki Jasmini Marković-Lipkovski, na poverenju, pomoći, strpljenju, mogućnosti da učim i da se usavršavam, na beskrajnom razumevanju i lekcijama koje su me oblikovale kao patologa i čoveka. Zahvaljujem se doc. dr Martini Bosić na savetima i dragocenim sugestijama koje su mi neizmerno pomogle u svim segmentima naučnog rada i izradi doktorske teze. Hvala prijateljici i kolegini dr sci. med. molekularnom biologu Sanji Ćirović koja je uz mene bila od samog početka, bodrila me, razumela i nesebično delila svoje naučno znanje, laboratorijske veštine i životne savete. Veliku zahvalnost dugujem prijateljici i kolegini dr sci. med. asist. Maji Životić na bezrezervnoj pomoći, strpljenju i savetima koji su mi olakšavali put tokom rada na doktoratu. Zahvalna sam kolegi i stručnjaku dr Dejanu Đorđeviću na nesebičnoj pomoći oko prikupljanja uzoraka za doktorat i beskrajnom poverenju, kao najlepšem poklonu koji mladi patolog može imati. Veliko hvala profesoru Svetislavu Tatiću na lepim rečima i podršci pruženoj svih ovih godina. Hvala profesorki Ljubinki Janković-Veličković, kao dragocenom članu komisije. Takođe, hvala dragom kolegi doc. dr Dušku Dunđeroviću na razumevanju i stručnoj pomoći onda kada mi je bila najpotrebnija. Najlepše hvala laborantima Dušici, Veri, Dragani, Zorici, Dušanu, Dušku i Bobanu na beskrajnoj podršci, stručnosti, predusretljivosti i pomoći u važnim momentima. Zahvaljujem se dr Isidori Filipović na prijateljskoj pomoći, razumevanju i korisnim savetima. Hvala doc. dr Ivanu Soldatoviću na motivaciji, nesebičnoj podršci i volji da me uvede u svet statistike. Posebno hvala profesoru Hesu Ondreju, koji je obogatio moje znanje iz urološke patologije i svojim savetima neizmerno doprineo kvalitetu doktorske disertacije.

Veliko hvala mojim roditeljima Sladi i Miloradu i sestri Dragani, koji su moj oslonac, podrška i ohrabrenje.

Beskrajno hvala čoveku mog života, prijatelju i suprugu Zoranu, na razumevanju, podršci, stručnoj pomoći oko doktorata i savetima koji čine moj život lepšim.

Rezime:

Uvod: Tumori bubrežnih ćelija (engl. Renal cell tumors, RCT) čine 80% primarnih tumora bubrega. Najučestaliji RCT su: svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija (engl. clear cell renal cell carcinoma, ccRCC), papilarni RCC (engl. papillary renal cell carcinoma, pRCC), hromofobni RCC (engl. chromophobe renal cell carcinoma, chRCC), bubrežni onkocitomi (engl. renal oncocytoma, RO) i karcinomi sabirnih kanalića- Bellini (engl. collecting duct carcinoma- Bellini, CDC). Pokazano je da epitelno-mezenhimalna transformacija (EMT) utiče na nastanak i progresiju tumora bubrežnih ćelija. Protein arginin metiltransferaza-1 (PRMT1) je dominantni tip PRMT-aza koji se eksprimira u zdravom tkivu različitih organa, ali i u karcinomima dojke, pluća, debelog creva, prostate i mokraćne bešike, uglavnom dovodeći do njihove progresije. Smatra se da PRMT1 učestvuje u regulaciji EMT kroz interakciju sa ZEB1 (engl. Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1), TWIST1 (engl. Twist Family BHLH Transcription Factor 1) i RUNX1 (engl. Runt-related transcription factor 1) transkripcionim faktorima. EMT je delimično regulisana Wnt/ β -katenin signalnim putem, koji se odlikuje translokacijom β -katenina sa ćelijske membrane u citoplazmu ili nukleus, smanjenom ekspresijom E-kadherina i povećanom ekspresijom N-kadherina. Ovakva interakcija markera epigenetske regulacije i transkripcionih faktora bi mogla uticati na patogenezu tumora bubrežnih ćelija.

Materijal i metode: Istraživanje je obuhvatilo 311 slučajeva različitih tipova tumora bubrežnih ćelija (ccRCC, pRCC, chRCC, RO, MLCRN-LMP i CDC). Za formiranje tkivnog mikroniza (TMN) korišćeno je 208 slučajeva, od kojih su za potvrdu rezultata analizirani celi preseci 45 slučajeva. Ekspresija PRMT1, ZEB1, RUNX1, TWIST1, N-, E-kadherina i β -katenina je analizirana imunohistohemijski (IHH). Analiziran je obim (broj pozitivnih ćelija određivan semikvantitativnom metodom) i intenzitet PRMT1, ZEB1, RUNX1, TWIST1, kao i prisustvo ili odsustvo N-kadherin i E-kadherin IHH ekspresije. Lokalizacija imunopozitivnosti je određivana za TWIST1 i β -catenin. PRMT1, ZEB1, RUNX1 i TWIST1 IHH ekspresija je poređena sa osobinama tumora i kliničko-patološkim parametrima pacijenata. Za detaljnije ispitivanje distribucije PRMT1 i ZEB1, korišćeni su celi preseci 103 dodatna slučaja različitih patohistoloških tipova tumora bubrega: ccRCC niskog gradusa, klasičnog RO, atipičnog RO (aRO) i MLCRN-LMP. Za semikvantitativnu RT-PCR (qRT-PCR) analizu, 8 slučajeva različitih RCC (ccRCC,

pRCC i chRCC) bilo je postoperativno smrznuto u tečnom azotu. Rezultati iRNK PRMT1 ekspresije su bili poređeni sa iRNA PRMT1 transkripcionim podacima u javno dostupnim bazama podataka TCGA (engl. The Human Cancer Genome Atlas) i u GTEx kohorti (engl. Genotype- Tissue Expression- GTEx cohort). Metodom fluorescentne in situ hibridizacije (FISH) analizirane su hromozomske aberacije na slučajevima aRO, a potom su poređene sa PRMT1 i ZEB1 IHH ekspresijom na istim slučajevima.

Rezultati: PRMT1 ekspresija je uočena u različitim strukturama korteksa i medule svih uzoraka bubrežnog parenhima. Većina ccRCC, RO, svi MLCRN-LMP i manji broj chRCC ekspresirali su PRMT1 ($p=0.044$). PRMT1 imunopozitivnost je bila heterogena u većini slučajeva ($p<0.001$). Na dodatnim slučajevima celih preseka, PRMT1 je bio difuzno ekspresiran u skoro svim slučajevima MLCRN-LMP i svim slučajevima ccRCC niskog gradusa ($p<0.001$). U većini RO, PRMT1 ekspresija je takođe bila difuzna, dok je fokalna distribucija primećena u većini chRCC ($p<0.001$). Homogeni gubitak PRMT1 je bio udružen sa ccRCC visokog gradusa, većih dimenzija, višeg stadijuma i smrtnim ishodom ($p=0.015$; $p=0.005$; $p=0.040$; $p=0.044$, respektivno). Ekspresija PRMT1 je bila udružena sa boljim tumor-specifičnim preživljavanjem kod pacijenata sa ccRCC ($p=0.029$). ZEB1 imunoreaktivnost je bila prisutna u endotelnim ćelijama krvnih sudova svih uzoraka bubrežnog parenhima. Skoro svi RO i manji broj chRCC je ekspresirao ZEB1, dok je njegovo odsustvo primećeno u svim slučajevima MLCRN-LMP ($p<0.001$). Homogeni gubitak ZEB1 bio učestaliji kod umrlih pacijenata ($p=0.009$). Na celim presecima dodatnih uzoraka ZEB1 je bio difuzno ekspresiran na skoro svim RO, a homogeno odsutan u većini chRCC ($p<0.001$). Ekspresija ZEB1 je bila udružena sa boljim tumor-specifičnim preživljavanjem kod pacijenata sa ccRCC ($p=0.009$). U multivarijantnoj analizi, ZEB1 ekspresija je bila nezavistan prognostičkih faktora za tumor-specifično preživljavanje ([HR] (količnik hazarda, engl. hazard ratio) 0.367; $p=0.026$). RUNX1 je u slabom intenzitetu bio ekspresiran u pojedinačnim ćelijama različitih struktura korteksa i medule, u većini ccRCC i svim MLCRN-LMP. TWIST1 je pokazao difuznu i jaku citoplazmatsku imunopozitivnost u različitim strukturama korteksa i na membrani sabirnih kanalića medule i skoro svim slučajevima analiziranih tipova tumora. Veći broj slučajeva ccRCC bez ekspresije PRMT1, bio je negativan i na ZEB1, a ekspresirao je TWIST1 u citoplazmi ($p=0.028$; $p<0.001$, respektivno). PRMT1 pozitivni slučajevi ccRCC su učestalije ekspresirali RUNX1 ($p=0.019$). PRMT1, ZEB1 i TWIST1

imunohistohemijska ekspresija nije bila udružena sa markerima Wnt/ β katenin EMT signalnog puta: aberantnom β -katenin ekspresijom, povećanom ekspresijom N-kadherina ili gubitkom E-kadherin ekspresije. Samo je RUNX1 bio udružen sa povećanom ekspresijom N-kadherina ($p=0.003$). Relativna iRNA-PRMT1 ekspresija je bila niža u tumorskom tkivu nego u netumorskom parenhimu, u ccRCC visokog gradusa i ccRCC visokog stadijuma ($p<0.001$, $p=0.043$, $p=0.028$, respektivno). Većina atipičnih RO pokazivali su poliploidiju svih hromozoma, uz difuznu ekspresiju PRMT1 i ZEB1 u svim slučajevima.

Zaključak: PRMT1 je ubikvitarno eksprimiran u različitim strukturama bubrežnog parenhima. Gubitak PRMT1 ekspresije može biti karakterističan za ccRCC visokog gradusa i stadijuma, a njegova ekspresija za tumore bubrega sa povoljnom prognozom, kao što su MLCRN-LMP i RO. Homogeni gubitak PRMT1 i/ili ZEB1 ekspresije, može biti udružen sa kraćim preživljavanjem pacijenata sa ccRCC. Gubitak ZEB1 ekspresije, može biti zavisian od PRMT1 ekspresije, dok njihova ekspresija može biti značajna u diferencijalnoj dijagnozi između RO i chRCC. Gubitak PRMT1 u ccRCC, mogao bi uticati na TWIST1 ekspresiju u citoplazmi, karakterističnu za agresivne ccRCC. Uloga PRMT1 u tumorima bubrežnih ćelija, kao epigenetskog markera najverovatnije nije udružena sa WNT/ β -katenin posredovanom EMT, budući da ni jedan od EMT udruženih kadherina ili β -katenin nisu bili udruženi sa PRMT1 ekspresijom. Moguće je da PRMT1 učestvuje u epigenetskoj regulaciji normalnog razvoja bubrega, te da bilo koja promena u njegovoj ekspresiji može voditi ka nastanku tumora, nepredvidivom ponašanju i nepovoljnoj prognozi. Detaljna istraživanja na kulturama ćelija mogla bi da rasvetle precizan mehanizam dejstva PRMT1 i njegov značaj u dijagnostičkim, prognostičkim, kao i novim terapijskim smernicama tumora bubrežnih ćelija.

Ključne reči: PRMT1, EMT, tumori bubrežnih ćelija

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina

UDK broj: _____

Summary:

Background: Renal cell tumors (RCT) comprise 80% of primary kidney tumors. The most frequent RCT are clear cell renal cell carcinomas (ccRCC), papillary RCC (pRCC), chromophobe RCC (chRCC), renal oncocytomas (RO) and collecting duct carcinomas-Bellini (CDC). It has been shown that epithelial to mesenchymal transformation (EMT) leads to RCT and their aggressive behavior. Protein arginine N-methyltransferase 1 (PRMT1) is a dominant PRMT type, expressed in normal tissue and carcinomas of various organs, such as breast, lungs, colon, prostate, and urinary bladder, mostly leading to their progression. It is considered that PRMT1 regulates EMT through the interaction with ZEB1 (Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1), TWIST1 (Twist Family BHLH Transcription Factor 1) and RUNX1 (Runt-related transcription factor 1) transcription factors. EMT is partially regulated by Wnt/ β -catenin signaling pathways, whose hallmark is membrane dissociation of β -catenin and its translocation into the cytoplasm or nucleus, which then leads to N-cadherin overexpression and reduced E-cadherin expression. Such an interaction between epigenetic regulators and transcription factors could be potentially related to the pathogenesis of renal cell tumors.

Material and methods: The study included 311 cases of different types of renal cell tumors (ccRCC, pRCC, chRCC, RO, MLCRN-LMP, and CDC). A total of 208 cases were used for tissue microarray (TMN) construction, of which 45 sections were analyzed to confirm the results. Expression of PRMT1, ZEB1, RUNX1, TWIST1, N-, E-cadherin expression, and β -catenin was evaluated using immunohistochemistry (IHC). We analyzed extent (i.e. the number of positive cells, that is measured using semi-quantitative techniques) and the intensity of PRMT1, ZEB1, RUNX1, TWIST1, as well as presence or absence of N-cadherin and E-cadherins IHC expression. The localization was determined for TWIST1 and β -catenin. PRMT1, ZEB1, RUNX1, and TWIST1 IHC expression were compared with tumor characteristics and clinical-pathological parameters of patients. For a more detailed examination of the PRMT1 and ZEB1 distribution, whole sections of 103 additional cases of different RCT: low-grade ccRCC, classical RO, atypical RO (aRO), and MLCRN-LMP were used. For semi-quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysis, 8 cases of different RCC (ccRCC, pRCC, and chRCC) were postoperatively frozen in liquid nitrogen. The results of mRNA PRMT1 expression were

compared with mRNA PRMT1 transcriptional data in publicly available TCGA (Human Human Cancer Genome Atlas) databases and in the GTEx (Genotype-Tissue Expression-GTEx) cohort. Chromosomal aberrations on aRO cases were analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH) and further compared with PRMT1 and ZEB1 IHH expression.

Results: PRMT1 expression was observed in different structures of the renal cortex and medulla. The majority of ccRCC, RO, all MLCRN-LMP and a smaller number of chRCC expressed PRMT1 ($p=0.044$). PRMT1 immunopositivity was heterogeneous in the majority of cases ($p < 0.001$). In additional cases of whole sections, PRMT1 was diffusely expressed in almost all cases of MLCRN-LMP and all cases of low-grade ccRCC ($p < 0.001$). In most RO, PRMT1 expression was also diffuse, however, PRMT1 focal distribution was noted in most chRCC ($p < 0.001$). Homogeneous loss of PRMT1 was associated with ccRCC in high-grade, increased tumor size, higher-stage, and in died patients ($p= 0.015$; $p= 0.005$; $p= 0.040$; $p= 0.044$, respectively). PRMT1 expression was associated with better tumor-specific survival in patients with ccRCC ($p = 0.029$). ZEB1 immunoreactivity was present in blood vessel endothelial cells of the renal parenchyma. Almost all RO and the minority of chRCC expressed ZEB1, while its absence was observed in all cases of MLCRN-LMP ($p < 0.001$). Homogeneous loss of ZEB1 was more frequent in dead patients ($p=0.009$). In the additional cohort, ZEB1 was diffusely expressed on whole sections of almost all ROs, and homogeneously negative in most chRCCs ($p < 0.001$). ZEB1 expression was associated with better tumor-specific survival in patients with ccRCC ($p = 0.009$). The multivariate analysis had revealed that ZEB1 expression was an independent prognostic factor for tumor-specific survival ([HR] 0.367; $p = 0.026$). RUNX1 was expressed at low intensity on individual cells of different cortico-medullary structures, in most ccRCCs and in all MLCRN-LMPs. TWIST1 showed diffuse and strong cytoplasmic immunopositivity in different structures of the cortex and on the membrane of the collecting ducts of the medulla and in almost all cases of analyzed tumor types. The majority of ccRCC cases without PRMT1 expression was negative for ZEB1 and expressed TWIST1 in the cytoplasm ($p= 0.028$; $p < 0.001$, respectively). PRMT1 positive ccRCC cases more frequently expressed RUNX1 ($p=0.019$). PRMT1, ZEB1, and TWIST1 immunohistochemical expression were not associated with markers of the Wnt/ β catenin EMT signaling pathway: aberrant β -catenin expression, N-cadherin overexpression, or loss of E-cadherin expression. Only RUNX1 was associated with N-

cadherin overexpression ($p=0.003$). Relative mRNA-PRMT1 expression level was lower in tumor tissue than in non-tumor parenchyma, in high-grade ccRCC, and in high-grade ccRCC ($p < 0.001$, $p = 0.043$, $p = 0.028$, respectively). Most atypical ROs showed polyploidy of all chromosomes, with the diffuse expression of PRMT1 and ZEB1 in all cases.

Conclusion: PRMT1 is ubiquitously expressed in various structures of the renal parenchyma. Loss of PRMT1 expression may be characteristic of high-grade and high-stage ccRCCs, while its expression may be associated with the tumors with favorable prognoses, such as MLCRN-LMP and RO. Homogeneous loss of PRMT1 and/or ZEB1 expression may be associated with shorter survival of patients with ccRCC. The loss of ZEB1 expression may be dependent on PRMT1 expression, whereas their expression may be significant in the differential diagnosis between RO and chRCC. The loss of PRMT1 in ccRCC could affect TWIST1 expression in the cytoplasm, which is characteristic of aggressive ccRCC. The role of PRMT1 in renal cell tumors, as an epigenetic marker, is unlikely to be associated with WNT/ β -catenin-mediated EMT, since none of the EMT-associated cadherins or β -catenin were associated with PRMT1 expression. It can be hypothesized that PRMT1 participates in the epigenetic regulation of normal renal development and that any change in its expression may lead to tumor formation, unpredictable behavior, and adverse prognosis. Detailed studies on cell cultures could shed light on the precise mechanism of action of PRMT1 and its importance in the diagnostic, prognostic and new therapeutic guidelines of renal cell tumors.

Keywords: PRMT1, EMT, renal cell tumors

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Molecular medicine

UDK number: _____

Skraćenice i akronimi

PRMT1	Protein arginine methyltransferase-1
ZEB1	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1
TWIST1	Twist Family BHLH Transcription Factor 1
RUNT1	Runt-related transcription factor 1
EMT	Epitelno-mezenhimna transformacija
IHH	Imunohistohemija
H&E	Hematoksilin eozin
DAB	Diaminobenzidine
TMN	Tkivni mikroniz
RCT	Renal cell tumors
RCC	Renal cell carcinomas
pRCC	Papilarni RCC
chRCC	Chromophobe renal cell carcinomas
RO	Renalni onkocitomi
aRO	Atipični renalni onkocitomi
CDC	Collecting duct carcinoma
MLCRN-LMP	Multilocular cystic renal cell neoplasms of low malignant potential
WHO	World Health Organisation
ISUP	International Society of Urological Pathology
AJCC	American Joint Committee on Cancer
TNM	Tumour, Node, Metastasis
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
RNK	Ribonukleinska kiselina
qRT-PCR	Quantitative Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
FPKM	Fragment Per Kilo Base Million

TCGA	The Cancer Genome Atlas
GTE _x	Genotype-Tissue Expression
FISH	Fluorescentna in situ hibridizacija
AdoMet	S-Adenosylmethionine
VHL	Von Hippel Lindau
HIF	Hipkosija inducibilni faktor
BHD	Birt-Hogg-Dubé
SDHB	Sukcinat dehidrogenaza B
SDHD	Sukcinat dehidrogenaza D
VEGF	Vascular endothelial growth factor
PDGF	Platelet-derived growth factor
Ub	Ubukvitin
PTM	Posttranslaciona modifikacija
HMT	Histon metil transferaza
HDMT	Histon demetilaze
CpG	Cytosine phosphate guanine
RHD	Runt homologni domen
NLS	Nuklearni lokalizujući signal
NMTS	Nukleus matriks target signal
AD	Aktivirajući domen
ID	Inhibitorni domen
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
BTG 1	B-ćelijski translokacioni gen 1

Sadržaj:

1. Uvod.....	1
1.1. Kliničko-patološke osobine tumora bubrežnih ćelija	3
1.1.1. Svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija.....	4
1.1.2. Papilarni karcinom bubrežnih ćelija	9
1.1.3. Hromofobni karcinom bubrežnih ćelija.....	12
1.1.4. Onkocitom bubrega	16
1.1.5. Karcinom sabirnih kanalića-Bellini.....	19
1.1.6. Multilokularna cistična renalna neoplazma niskog malignog potencijala	21
1.2. Diferencijalno dijagnostičke i prognostičke dileme u praksi.....	23
1.3. Genetske karakteristike tumora koje su bitne za patogenezu	24
1.4. Epigenetska regulacija u patogenezi tumora bubrežnih ćelija.....	26
1.5. Familija protein arginin metil-transferaza	29
1.6. PRMT1.....	31
1.6.1. EMT i PRMT1	32
1.6.2. ZEB1 i PRMT1	34
1.6.3. RUNX1 i PRMT1	35
1.6.4. TWIST1 I PRMT1	37
2. Ciljevi.....	38
3. Materijal i metode	39
3.1. Uzorci tumora i karakteristike pacijenata	39
3.2. Patološki evaluacioni kriterijumi	42
3.3. Konstrukcija tkivnog mikroniza	43
3.4. Imunohistohemijska analiza	45
3.4.1. Analiza imunohistohemijskog bojenja na TMN presecima	46
3.4.2. Analiza imunohistohemijskog bojenja na celim presecima	47
3.5. Izolacija iRNK i qRT-PCR analiza iRNK PRMT1 ekspresije	48
3.6. TCGA i GTEx kohorta.....	48
3.7. Fluorescentna in situ hibridizacija	50
3.8. Statistička analiza	52
4. Rezultati	53
4.1. Imunohistohemijska ekspresija markera u netumorskom parenhimu.....	53
4.2. Ekspresija markera u tumorskom tkivu i korelacija sa kliničko-patološkim parametrima i preživljavanjem	56
4.2.1. PRMT 1	56
4.2.2. ZEB 1.....	70
4.2.3. RUNX 1.....	79
4.2.4. TWIST1	82

4.3.	Ko-ekspresija PRMT1 sa ZEB1, RUNX1 i TWIST1	85
4.4.	Ekspresija PRMT1, RUNX1, ZEB1 i TWIST 1 i markera EMT	86
4.5.	qRT-PCR PRMT1 ekspresija u cRCC, chRCC i pRCC	88
4.6.	iRNA PRMT1 ekspresija u TCGA i GTEx kohorti.....	91
4.7.	FISH analiza aRO	92
5.	Diskusija.....	95
6.	Zaključci.....	104
7.	Literatura	106

1. Uvod

Tumori bubrežnih ćelija čine oko 80% primarnih tumora bubrega. Najučestaliji tumori bubrega kod odraslih su karcinomi bubrežnih ćelija (engl. renal cell carcinoma, RCC), među kojima svetloćelijski RCC (engl. clear cell RCC, ccRCC) čini 65-70%. Sledeći po učestalosti su papilarni RCC (engl. papillary RCC, pRCC) tip I i tip II, koji čine 18%, hromofobni RCC (engl. chromophobe RCC, chRCC) i bubrežni onkocitomi (engl. renal oncocytoma, RO) po 5-7%, karcinom sabirnih kanalića-Bellini (engl. collecting duct carcinoma-Bellini, CDC) 1,5-4% i multilokularna cistična neoplazma niskog malignog potencijala (engl. multilocular cystic renal cell neoplasm of low malignant potential, MLCRN-LMP). Prognoza kod pacijenata sa karcinomima bubrega zavisi od patohistološkog tipa, nuklearnog gradusa i stadijuma tumorske bolesti (1).

Mutacije različitih gena predstavljaju jedan od značajnih faktora za nastanak tumora bubrežnih ćelija. Međutim, poslednjih godina, ispitivanje epigenetske kontrole genske ekspresije u bubrežnoj karcinogenezi zaokupila je pažnju naučnika (2–4). Epigenetska regulacija genske ekspresije podrazumeva promene koje utiču na ekspresiju gena, bez promena u DNK sekvenci. Ovakva regulacija se može postići metilacijom DNK i/ili histonskih proteina, kao i regulacijom signalne mikro RNK (3). Enzimi koji učestvuju u metilaciji histonskih proteina su protein arginin metiltransferaze (PRMT). Od 11 do sada izolovanih PRMT-aza, za 8 je pokazano da obavljaju funkciju u humanim tkivima, a od kojih je najzastupljenija PRMT- tip 1 (PRMT1) (5). Primarna uloga PRMT1 je da vrši transfer metil (-CH₃) grupe sa S-Adenozin Metionina (engl. S-Adenosyl-Methionin (AdoMet) na aminokiselinu arginin različitih supstrata u ćeliji, uključujući histone, RNK-vezujuće proteine i proteine koji se aktiviraju tokom oštećenja DNK. Metilacija arginina potom dovodi do epigenetske regulacije transkripcije gena, isecanja iRNK, popravke oštećene DNK i regulacije signalnih procesa u ćeliji. Promene u PRMT1 ekspresiji su uočene u različitim malignim tumorima pluća, debelog creva, dojke, prostate, mokraćne bešike, želuca, u leukemijama i gliomima (6–13). Pokazano je da PRMT1 može učestvovati u indukciji epitelno-mezenhimalne transformacije (EMT) i ćelijskog starenja u nesitnoćelijskim karcinomima pluća i karcinomu dojke (14,15). EMT je proces prelaska epitelnog fenotipa ćelije u mezenhimalni. Ovaj proces podrazumeva gubitak

međucelijskih veza, ćelijske organizacije i orijentacije, sa gubitkom ekspresije E-kadherina, povećanjem ekspresije N-kadherina, dovodeći do povećane ćelijske pokretljivosti (16). Smatra se da je EMT značajan u nastanku i progresiji tumora bubrežnih ćelija (17). Wnt/ β -katenin signalni put je jedan od signalnih puteva kojim se reguliše EMT. Aktivacija ovog puta se odlikuje membranskom disocijacijom β -katenina i njegovom translokacijom u citoplazmu ili jedro, što onda dovodi do prekomerene ekspresije N-kadherina i smanjene ekspresije E-kadherina (16). Uloga PRMT1 u regulaciji EMT pokazana je kroz regulaciju ZEB1 (engl. Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1) u karcinomu dojke i kroz regulaciju TWIST1 (engl. Twist Family BHLH Transcription Factor 1) u nesitnoćelijskim karcinomima pluća (14,15). Takođe, pokazano je da PRMT1 direktno vrši metilaciju RUNX1 (engl. Runt-related transcription factor 1) u hematopoetskim ćelijskim linijama (18).

Manji broj dosadašnjih istraživanja se bavio epigenetskim regulatorima, kao faktorima patogeneze i progresije tumora bubrežnih ćelija. Budući da je značaj PRMT1 ekspresije, kao epigenetskog regulatora, do sada pokazan u mnogim tumorima, značaj njegove ekspresije je ispitivan na tumorima bubrežnih ćelija koji se u populaciji javljaju u različitoj učestalosti. S obzirom na značaj EMT u tumorima bubrega, ispitivana je imunohistohemijska (IHH) ekspresija PRMT1 i markera Wnt/ β -katenin EMT signalnog puta. IHH analize su upotpunjene analizom qPCR iRNA-PRMT1 ekspresije u najučestalijim tipovima RCC. Takođe, analizirano je prisustvo hromozomskih aberacija na slučajevima benignih tumora - atipičnih onkocitoma, metodom fluorescentne in situ hibridizacije (FISH) i poredili ih sa IHH ekspresijom PRMT1 i ZEB1.

1.1. Kliničko-patološke osobine tumora bubrežnih ćelija

Karcinomi bubrega se nalaze na 9. mestu po učestalosti svih maligniteta kod muškaraca i na 14. mestu kod žena, a procenjuje se i da su njihova incidenca i mortalitet u porastu (1). Tabela 1. prikazuje osnovne literaturne epidemiološke podatke različitih tipova tumora bubrežnih ćelija analiziranih u ovoj studiji (1). Kao osnovni faktori rizika za nastanak tumora bubrežnih ćelija navode se gojaznost, pušenje, hipertenzija, stečena cistična bolest bubrega (engl. acquired cystic kidney disease, ACKD) i profesionalna izloženost trihlor etilenu. Većina karcinoma bubrega se javlja sporadično, međutim 2-4% su hereditarni, nastalih kao posledica naslednih genetskih mutacija (1).

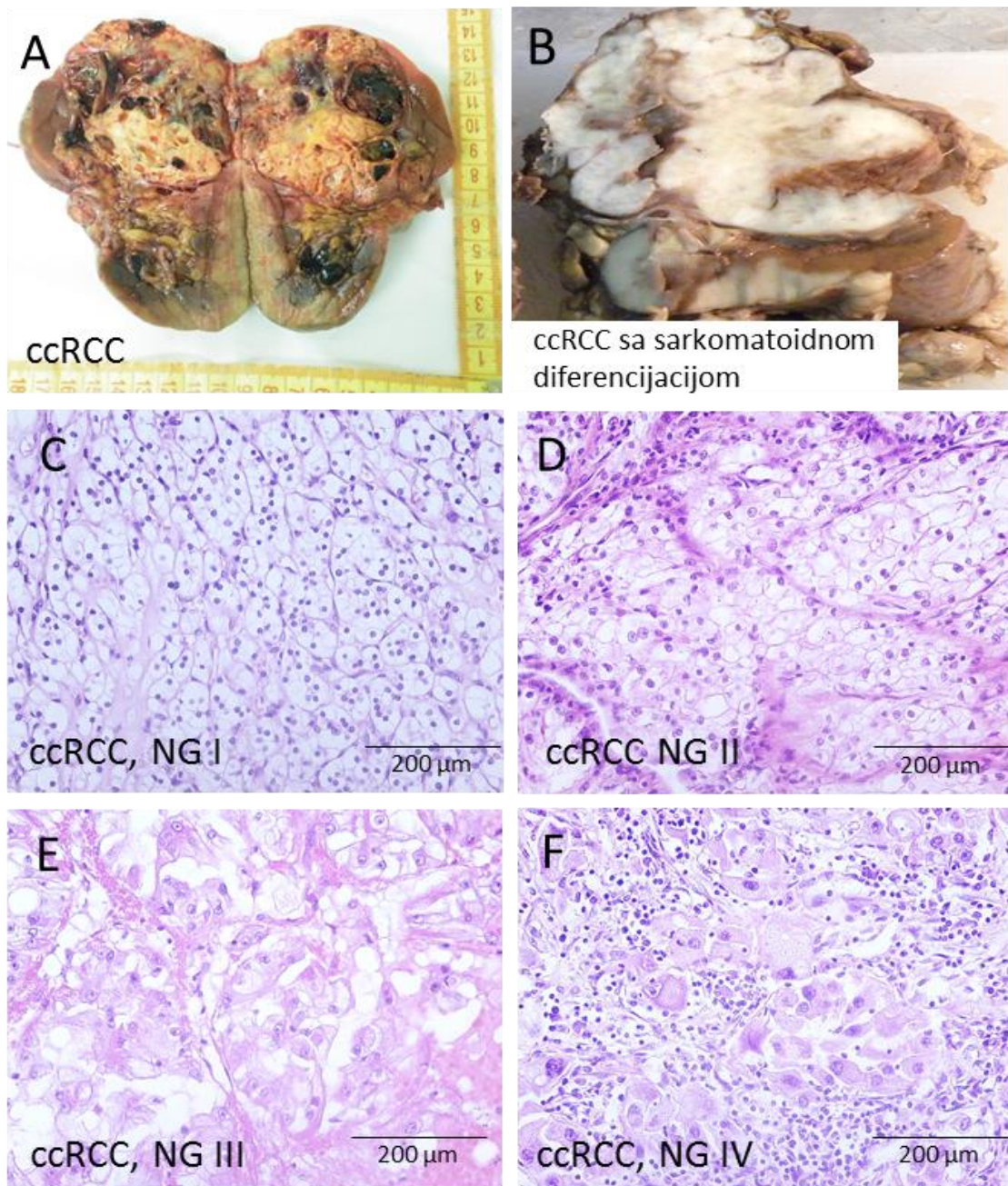
Tabela 1. Osnovni epidemiološki podaci najučestalijih tumora bubrežnih ćelija, po WHO, 2016.

PH tip	Učestalost	(M:Ž)	Starost	5-ogodišnje preživljavanje
ccRCC	70%	1.5:1	59-63	50-69%
pRCC	18%	2.4:1	59-63	67-87%
chRCC	5-7%	1:1	23-86	78-87%
RO	5-7%	1.7:1	10-94	100%
CDC	1-2%	2:1	6-87	17%
MLCRN-LMP	<1%	1.2:1	30-80	100%

Skraćenice: ccRCC- svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija; pRCC- papilarni karcinom bubrežnih ćelija; chRCC- hromofobni karcinom bubrežnih ćelija; RO- renalni onkocitomi; CDC- karcinom sabirnih kanalića; MLCRN-LMP, multilokularna cistična neoplazma niskog malignog potencijala; M- muškarci; Ž- žene; PH-patohistološki.

1.1.1. Svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija

Svetloćelijski RCC predstavljaju heterogenu grupu malignih tumora građenih iz ćelija svetle ili granulirane citoplazme. Uglavnom se javlja sporadično, unilateralno, a ređe u sklopu familijarnih sindroma, kao što je Von Hippel Lindau (VHL) sindrom, kada može biti multifokalan i bilateralan (1). Makroskopski su u većini slučajeva jasno ograničeni, lobuliranog izgleda, sa pseudokapsulom. Često protrudiraju sa površine i lokalizovani su na gornjem polu bubrega. Na preseku su žute boje, sa varijabilnim procentom nekroze i krvarenja. Polja sa višim gradusom se karakterišu belom površinom na preseku i čvršćom konzistencijom (Slika 1A-B) (19). Patohistološki, tumor je građen od ćelija svetle citoplazme, različitog stepena pleomorfizma sa jasnim ćelijskim membranama. Citoplazma svetlog izgleda je posledica prisustva lipida ili glikogena. Nukleusi mogu biti različite veličine, sa varijabilno prominentnim nukleolusima, u zavisnosti od gradusa (Slika 1C-F). Nuklearni gradus se određuje po preporukama Svetske zdravstvene organizacije i Internacionalnog udruženja za urološku patologiju (engl. World Health Organisation/ International Society for Urologic Pathology, WHO/ISUP, 2016.)(Tabela 2)(1). Tumorske ćelije grade solidne plaže, alveolarne, acinarne, cistične i mikrocistične strukture, ispunjene eozinofilnim sadržajem, sa mrežom malih krvnih sudova i varijabilnom inflamatornom reakcijom, nekrozom ili krvarenjem. U oko 5% slučajeva prisutne su ćelije sa rabdoidnom ili sarkomatoidnom diferencijacijom (Slika 1F) (1). Stadijum tumorske bolesti za ccRCC, se kao i za ostale RCC određuje po osmom izdanju TNM klasifikacije tumora bubrega po AJCC (engl. American Joint Committee on Cancer), iz 2018., (Tabela 3.) (20).



Slika 1. Makroskopske i histološke karakteristike ccRCC. A. Klasični ccRCC su na preseku žute boje, sa poljima krvarenja i nekroze; dok su B. ccRCC gradusa IV, sa sarkomatoidnom diferencijacijom, na preseku bele boje; C-F. Različiti nuklearni gradusi ccRCC. C. ccRCC NG I, sa odsutnim ili nejasnim nukleolusima, D. NG II, nukleolusi su jasno uočljivi; E. NG III, nukleolusi su prominentni, dok je F. ccRCC sa NG IV izraženog nuklearnog pleomorfizma (po WHO/ISUP,2016.); uveličanje 200x.

Tabela 2. Kriterijumi za gradiranje ccRCC i pRCC, po WHO/ISUP, 2016.

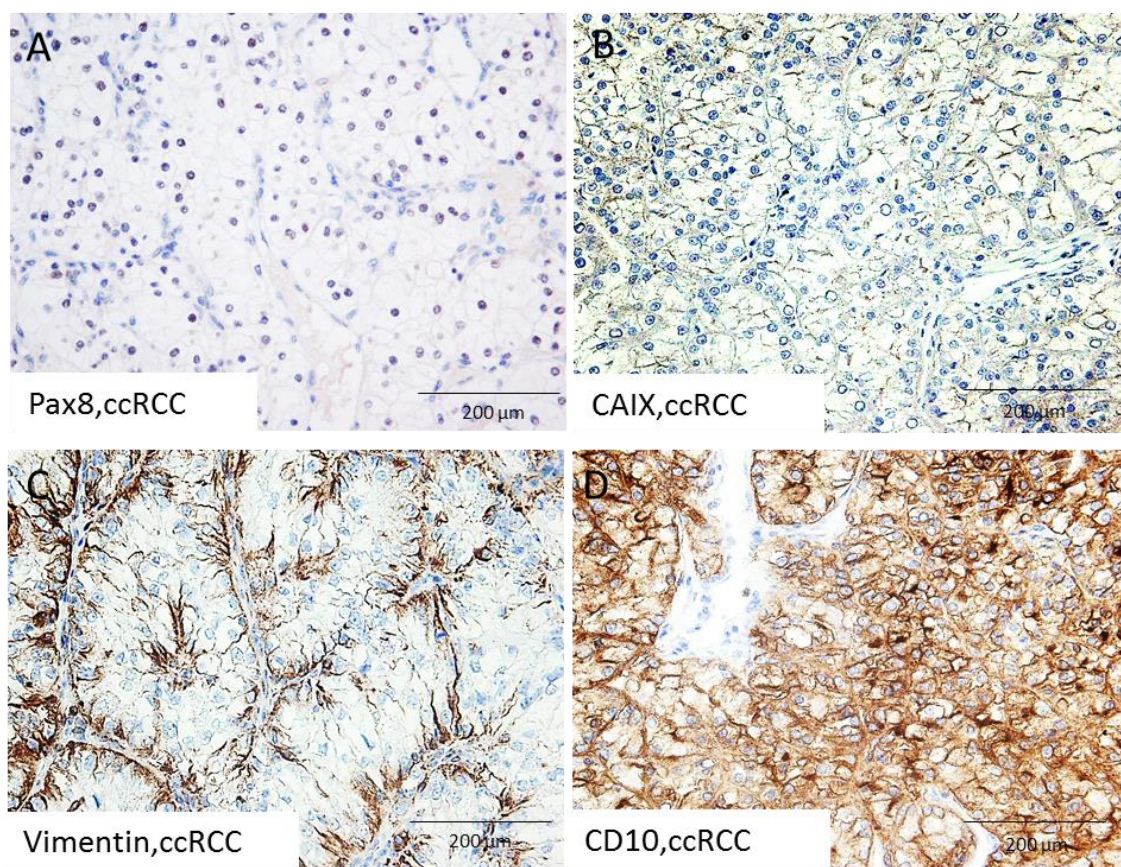
NG (po WHO/ISUP)	Kriterijumi
I	Nukleolusi su odsutni ili nejasno uočljivi i bazofilni na uveličanju x400.
II	Nukleolusi su jasno uočljivi i eozinofilni na uveličanju x400, ali ne prominentni na uveličanju x100.
III	Nukleolusi su jasno uočljivi i eozinofilni na uveličanju x100.
IV	Prisutan je ekstremni nuklearni pleomorfizam, multinuklearne džinovske ćelije i/ili rabdoidna i/ili sarkomatoidna diferencijacija.

Skraćenice: NG- nuklearni gradus; WHO/ISUP, Svetska zdravstvena organizacija i Internacionalno udruženje za urološku patologiju (engl. World Health Organisation/ International Society for Urologic Pathology).

Tabela 3. TNM klasifikacija tumora bubrega po AJCC (engl. American Joint Committee on Cancer), 8. Izdanje, 2018.

T – Primarni tumor
TX Primarnom tumoru se ne može pristupiti
T0 Nema dokaza primarnog tumora
T1 Tumor ≤ 7 cm u najvećoj dimenziji, ograničen na bubreg
T1a Tumor ≤ 4 cm
T1b Tumor > 4 cm ali < 7 cm
T2 Tumor > 7 cm u najvećoj dimenziji, ograničen na bubreg
T2a Tumor > 7 cm ali < 10 cm
T2b Tumor > 10 cm, ograničen na bubreg
T3 Tumor se širi u velike vene ili u perirenalno tkivo, ali ne u istostranu nadbubrežnu žlezdu i ne izvan Gerota fascije
T3a Tumor se širi u bubrežnu venu ili njene segmentalne grane ili tumor vrši invaziju pelvikaliksnog sistema, perirealnog masnog tkiva i/ili renalnog sinusa, ali ne izvan Gerota fascije
T3b Tumor se širi u šuplju venu ispod dijafragme
T3c Tumor se širi u šuplju venu iznad dijafragme ili invadira zid šuplje vene
T4 Tumor vrši invaziju izvan Gerota fascije (uljučujući kontinuirano širenje u istostranu nadbubrežnu žlezdu)
N – Regionalni limfni Nodusi
NX Regionalnim limfnim nodusima se ne može pristupiti
N0 Bez metastaza u regionalnim limfnim nodusima
N1 Metastaze u regionalnom limfnom nodusu (-ima)
M –Udaljene metastaze
M0 Bez udaljenih metastaza
M1 Sa udaljenim metastazama
Grupe stadijuma
Stadijum I T1 N0 M0
Stadijum II T2 N0 M0
Stadijum III T3 N0 M0
T1, T2, T3 N1 M0
Stadijum IV T4 bilo koji N M0
Bilo koji T

Imunohistohemijski, tumorske ćelije su pozitivne na Pax8, Pax2 (difuzno nuklearno), CAIX (difuzno membranski, sa mogućim gubitkom imunopozitivnosti u visokim gradusima), CD10, CK (AE1/AE3), EMA, vimentin (intenzivnije u sarkomatoidnim poljima), RCC marker pokazuje membransku i citoplazmatsku pozitivnost, međutim nije dovoljno specifičan. Tumorske ćelije su negativne na CK7 (moguća je fokalna pozitivnost pojedinačnih ćelija) (Slika 2) (1,21).



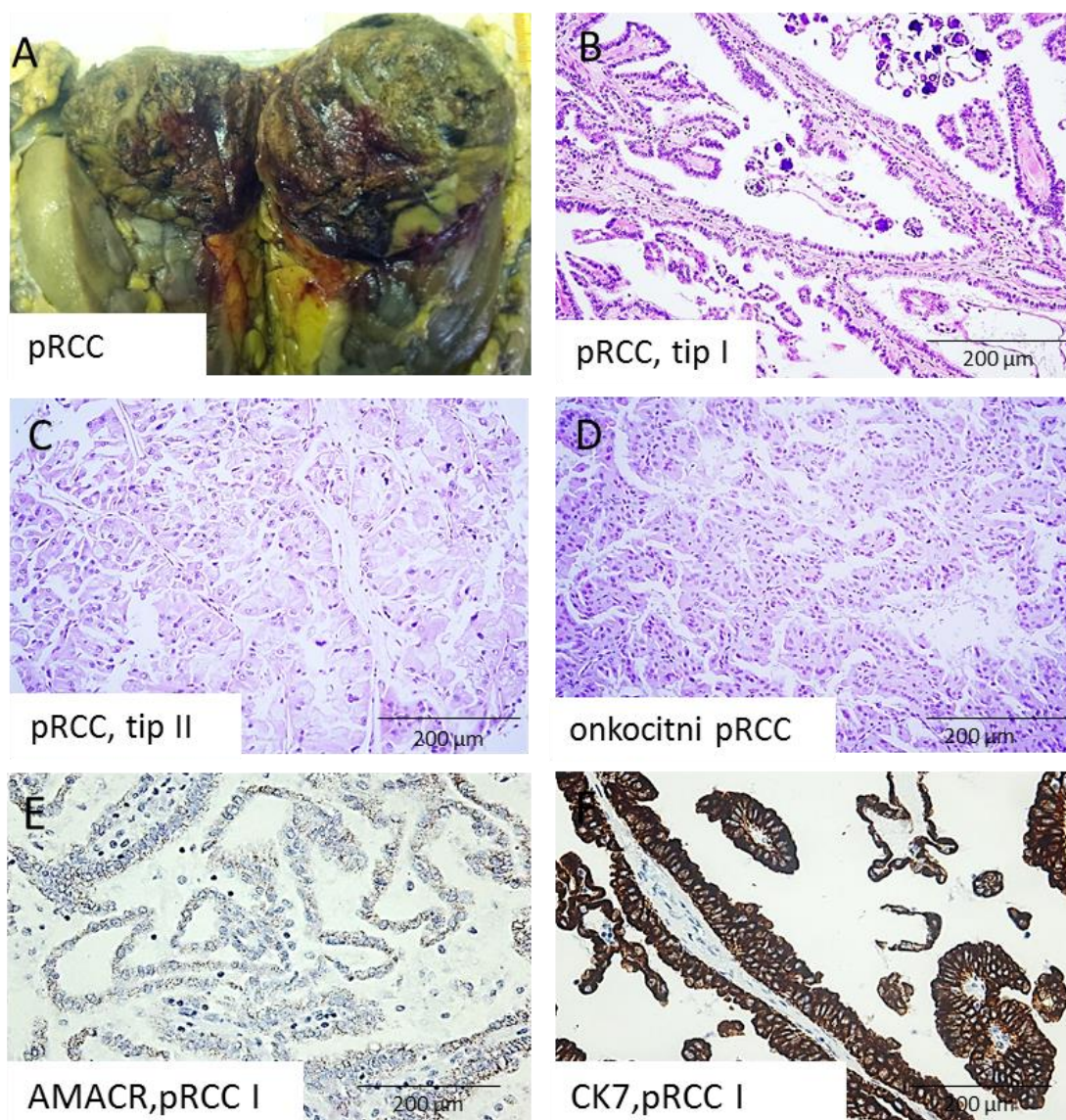
Slika 2. Ekspresija različitih imunohistohemijskih markera u rutinskoj dijagnostici ccRCC. A. Difuzna nuklearna ekspresija Pax8; B-D. Membranska imunopozitivnost na CAIX, vimentina i CD10; uveličanje 200x.

U sporadičnim i hereditarnim ccRCC prisutni su različiti tipovi somatskih mutacija *VHL* tumor supresor gena koji kodira VHL protein. U oko 20% slučajeva prisutna je inaktivacija *VHL* gena epigenetskom promenom u vidu metilacije promotora (1). Inaktivacija *VHL* gena dovodi do gubitka funkcije VHLp, što uzrokuje inicijaciju, progresiju i metastaziranje ccRCC. Ostali genetski poremećaji obuhvataju gubitak 3p hromozoma, gubitak alela na hromozomima 14q, 4p i gubitak 9p, a u oko 70% tumora prisutne su polizomije 5q. Značajno je napomenuti da se ccRCC gotovo uvek javlja u sklopu VHL sindroma, a može biti udruženi i sa drugim familijarnim renalnim karcinomskim sindromima, kao što su Cowden sindrom, Birt-Hogg-Dube sindrom (BHD), tuberozna skleroza i sindrom udružen sa sukcinat dehidrogenaza-deficijentnim RCC (1). Među najučestalijim tumorima bubrega, ccRCC je najagresivniji tip. Prosečno 5-ogodišnje preživljavanje je 75%, a 10-ogodišnje 62%, u zavisnosti od stadijuma, gradusa, prisustva koagulacione nekroze, sarkomatoidne i rabdoidne diferencijacije (1).

1.1.2. Papilarni karcinom bubrežnih ćelija

Papilarni RCC je drugi po učestalosti karcinom bubrežnih ćelija koji potiče iz tubulskih epitelnih ćelija, ima papilarnu i tubulopapilarnu građu, a čini oko 18,5% svih RCC. Najčešće javlja sporadično, međutim njegova učestalost je velika i u familijarnim sindromima, kao i kod pacijenata sa završnim stadijumom bubrežne bolesti (engl. end stage kidney disease) ili sa ACKD (1). Makroskopski, tumor je jasno ograničen, sa prominentnom pseudokapsulom, braon do sivo-žute boje, sa varijabilnim područjima papilarnih formacija, krvarenja, nekroze, fibroze ili cistične degeneracije (Slika 3A) (1). U ACKD može biti prepoznat u vidu solidnih ili lako papilarnih područja unutar brojnih cističnih struktura. Danas je taj tip karcinoma svrstan u poseban podtip RCC: Karcinom bubrežnih ćelija udružen sa stečenom cističnom bolešću bubrega (1,22). PRCC tumor može biti multifokalan i/ili bilateralnost, i to u okviru hereditarnih PRCC-udruženih sindroma (1). Osnovna morfološka karakteristika ovog tumora su papilarne fomacije, obložene ćelijama različitog pleomorfizma, u zavisnosti od tipa. U tipu pRCC tip I, obložene su jednim redom relativno uniformnih ili lako polimorfnih kubičnih ćelija, oskudne svetle citoplazme (Slika 3B). U pRCC tip II, papile su obložene sa više redova

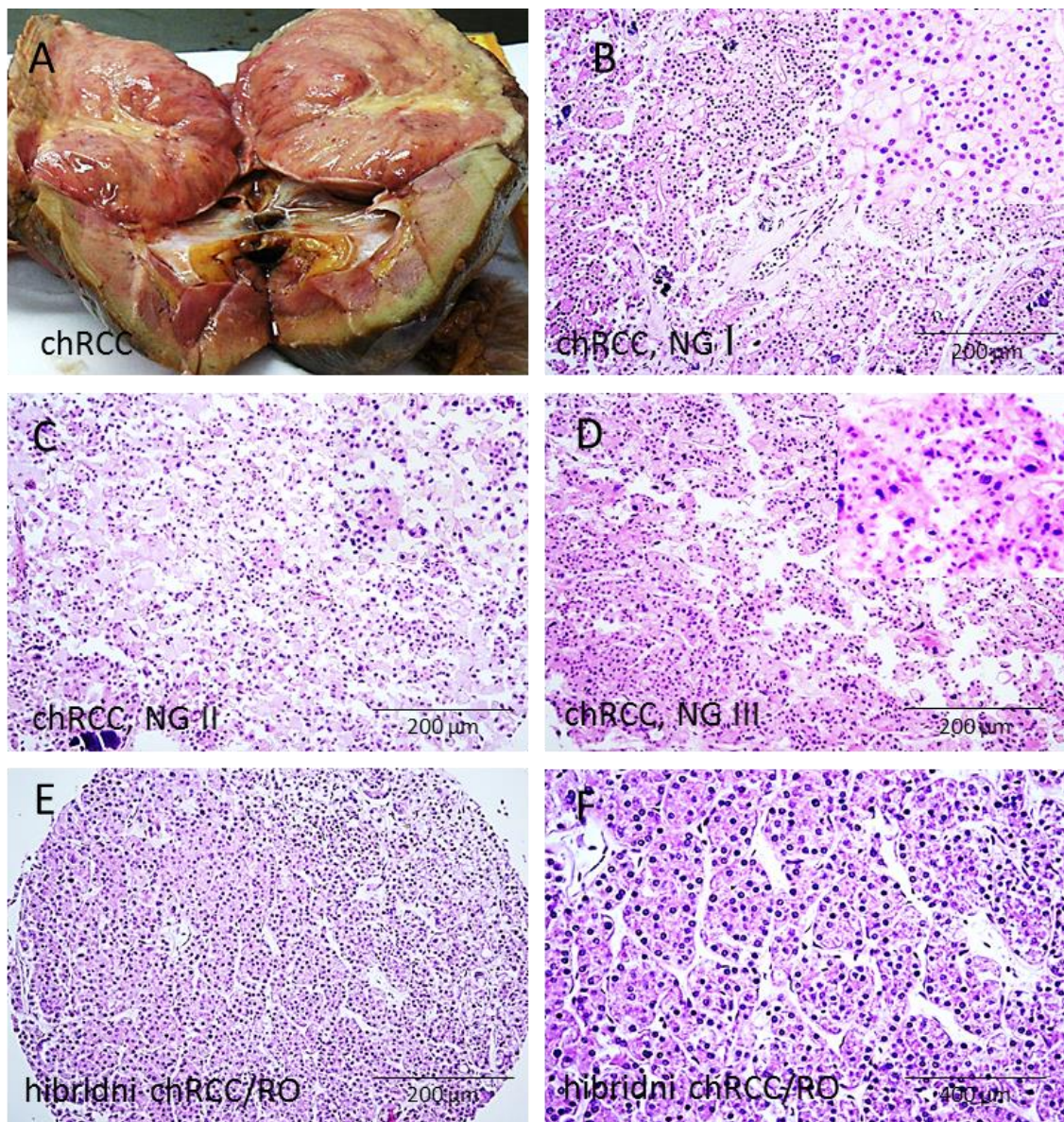
ćelija ili pseudostratifikovanim ćelijama sa izraženim pleomorfizmom i eozinofilnom citoplazmom (Slika 3C). Nuklearni gradus se, kao i kod ccRCC, određuje prema preporukama WHO/ISUP (Tabela 2) (1). Poslednjih godina, sve je veći broj onkocitomalik PRCC, koji se karakterišu papilarnim formacijama obloženim krupnim ćelijama, lakog stepena polimorfizma, bazalno postavljenih jedara i obilne eozinofilne citoplazme (Slika 3D). Karakteristično, u vezivnovaskularnim papilama PRCC nalaze se penušavo transformisani makrofazi ili psamomatozna telašca. PRCC takođe može imati obimna polja nekroze i krvarenja, kao fokuse sarkomatoidne diferencijacije, što značajno pogoršava prognozu (1). Tumorske ćelije su uglavnom pozitivne na sledeće imunohistohemijske markere: AMACR, CD10, HMW-CK, EMA, RCCM, vimentin, CK7 (češće eksprimiran u PRCC tipu I, nego u PRCC tipu II), a negativne na CAIX (Slika 3 E-F) (21,25). Trizomija i tetrazomija hromozoma 7, trizomija hromozoma 17 i gubitak Y hromozoma su karakteristični za PRCC. Opisan je gubitak *VHL* heterozigotnosti. Takođe, opisane su i razlike u genetskim mutacijama između tipa I i tipa II. Tip I tipično pokazuje polizomije 7p i 17p, dok tip II pokazuje gubitak heterozigotnosti hromozoma 1p, 3p, 5q, 6, 8, 9p, 10, 11, 15, 18 i 22. Rezultati molekularnih analiza onkocitnog PRCC su još su na početku i nedovoljno ispitani (1).



Slika 3. Makroskopske, histološke i imunohistohemijske karakteristike pRCC. A. pRCC je na preseku braon boje, fokalno papilarne građe, sa poljima krvarenja; B. pRCC tip I odlikuju papile obložene jednim redom tumorskih ćelija lakog pleomorfizma; C. pRCC tip II je sa papilama obloženim višerednim ili pseudostratifikovanim tumorskim ćelijama, jačeg pleomorfizma; D. Onkocitni pRCC je papilarne građe sa tumorskim ćelijama izraženo eozinofilne citoplazme i bazalno postavljenim nukleusima, umerenog pleomorfizma. E. Karakteristična je imunohistohemijska citoplazmatska pozitivnost na AMACR i F. membranska imunopozitivnost na CK7 u pRCC, tip I; uveličanje 200x.

1.1.3. Hromofobni karcinom bubrežnih ćelija

Hromofobni RCC čini oko 5-7% svih tumora bubrežnih ćelija kod odraslih. Uglavnom se javlja sporadično, a ređe u hereditarnim slučajevima (u okviru BHD sindroma, kao hibridni onkocitno/hromofobni tumor) (1). Makroskopski, chRCC su uglavnom jasno ograničeni tumori, ali neinkapsulirani tumori, tamno bele do braon boje, nekada sa izraženim centralnim ožiljavanjem (Slika 4 A)(22). Patohistološki, tumor se sastoji iz solidnih plaža tumorskih ćelija, nepotpuno razdvojenih fibrovaskularnim septama ili tubularnih, mikrocističnih i trabekularnih formacija tumorskih ćelija (Slika 4 B-E) (22). Za određivanje nuklearnog gradusa se ne preporučuje sistem gradiranja po WHO/ISUP koji se koristi za ccRCC i pRCC. Za tu svrhu, opisan je sistem određivanja gradusa po Paneru (Tabela 4.) (26). Klasične tumorske ćelije su poligonalne, krupne, sa obilnom granuliranom/retikularnom citoplazmom i naglašenim ćelijskim membranama, sa perinuklearnim haloom i čestom binukleacijom. Drugi tip ćelija je karakterističan za eozinofilni tip chRCC. Ćelije su manje po veličini, oskudne citoplazme oksifilne granuliranosti, takođe sa perinuklearnim haloom, a nekada i regularnih nukleusa. U najvećem broju slučajeva se radi o kombinaciji ova dva tipa ćelija (Slika 4 B-D). I ovaj tip tumora može imati u oko 5% slučajeva sarkomatidnu transformaciju, što pogoršava prognozu (22). Zbog patohistoloških sličnosti, u praksi je sve veći broj tumora sa karakteristikama onkocitoma i chRCC, tzv. hibridni onkocitno/hromofobni karcinomi (Slika 4 E-F) (27).



Slika 4. Makroskopske i histološke karakteristike chRCC. A. Na poprečnom preseku tumor je braon boje, često sa centralnim ožiljavanjem; B-E. chRCC može biti različitih nuklearnih gradusa (I-III) po Paneru; E. Hibridni chRCC/RO ima morfološke karakteristike onkocitoma (plaže tumorskih ćelija eozinofilne citoplazme, bez pleomorfizma u rastresitoj i miksoidnoj stromi); i F. Morfološke karakteristike chRCC (perinuklearni halo i fokalno naglašene membrane), uveličanja 200x i 400x .

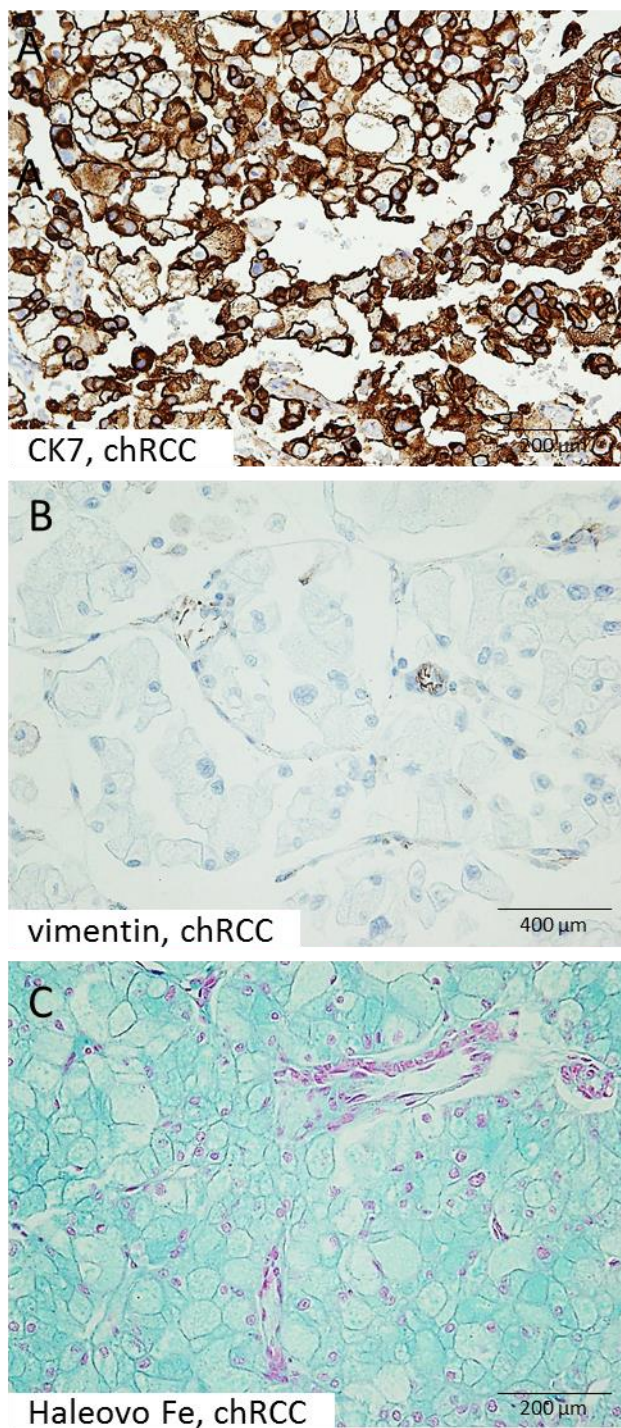
Tabela 4. Kriterijumi za određivanje tumorskog gradusa chRCC po Paneru.

Nuklearni gradus	Kriterijumi
1	Jasan nuklearni pleomorfizam, ali bez anaplazije ili stvaranja nuklearnih klastera.
2*	Stvaranje nuklearnih klastera, sa hiperchromazijom, vidljivom na x10 uveličanju. Pojedini nukleusi u direktnom kontaktu, vidljivi na x40 uveličanju. Nuklearni pleomorfizam (varijacija u veličini na ≥ 3 -polja i jasne iregularnosti nuklearnog hromatina (bez degenerativnih promena).
3	Jasna anaplazija ćelija (nuklearna polilobulacija, džinovske ćelije) ili sarkomatoidna promena.

* Zahteva sva tri kriterijuma (modifikovano prema Banach BS i Paner GP. Chromophobe Renal Cell Carcinoma with High-Grade Features: Can We Disregard the Grade? AJSP: Reviews & Reports 2017;22: 282-285)

Tumorske ćelije su pozitivne na sledeće imunohistoheмиjske markere: CD117, parvalbumin, bubreg specifični kadherin, CK7, a negativne na vimentin. Specifična je citoplazmatska pozitivnost tumorskih ćelija na histoheмиjsko bojenje- Haleovo koloidno gvožđe (Slika 5) (1).

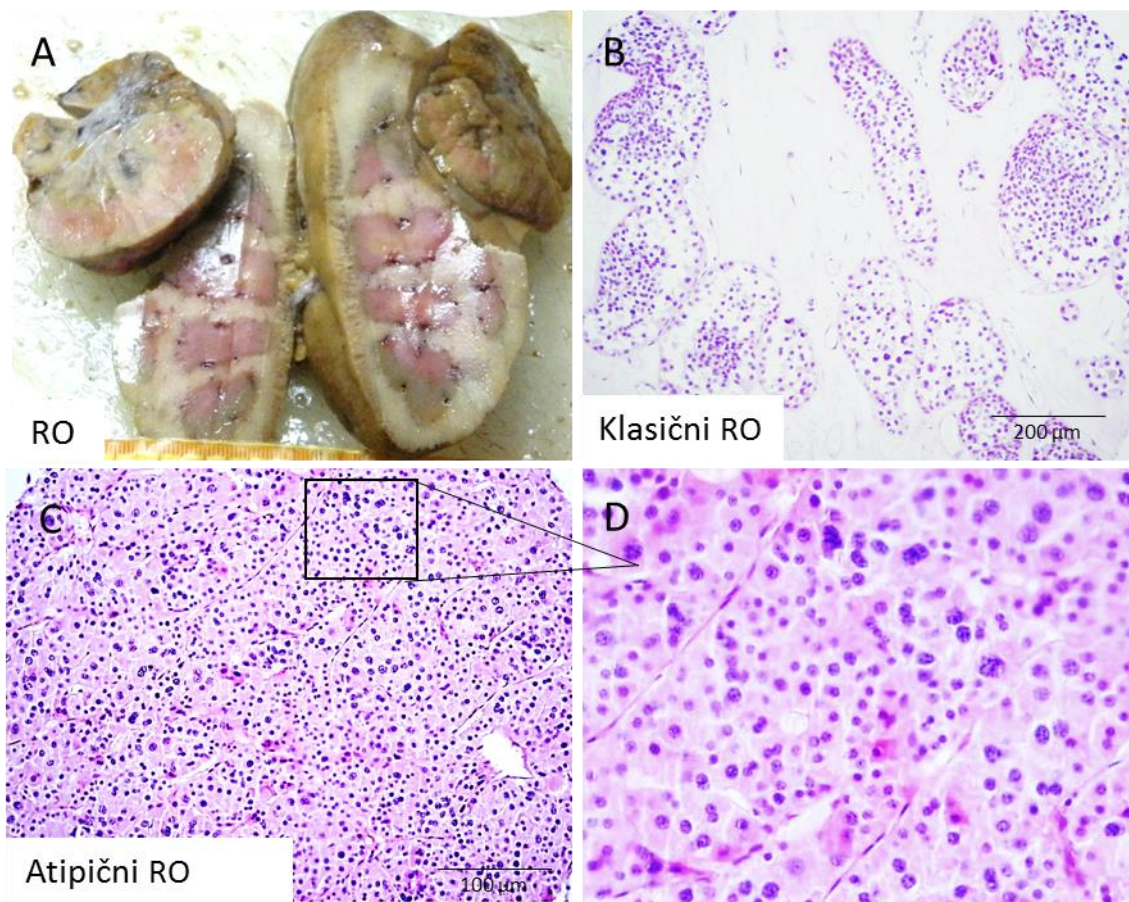
Klasični tip chRCC pokazuje gubitak hromozoma: Y, 1, 2, 6, 10, 13, 17 i 21, dok eozinofilna varijanta može biti i bez genetskih promena. Česte su somatske mutacije u mitohondrijalnoj DNA. Primećena je i mutacija TP53 i PTEN, kao i rearanžman u promotoru TERT regiona (1).



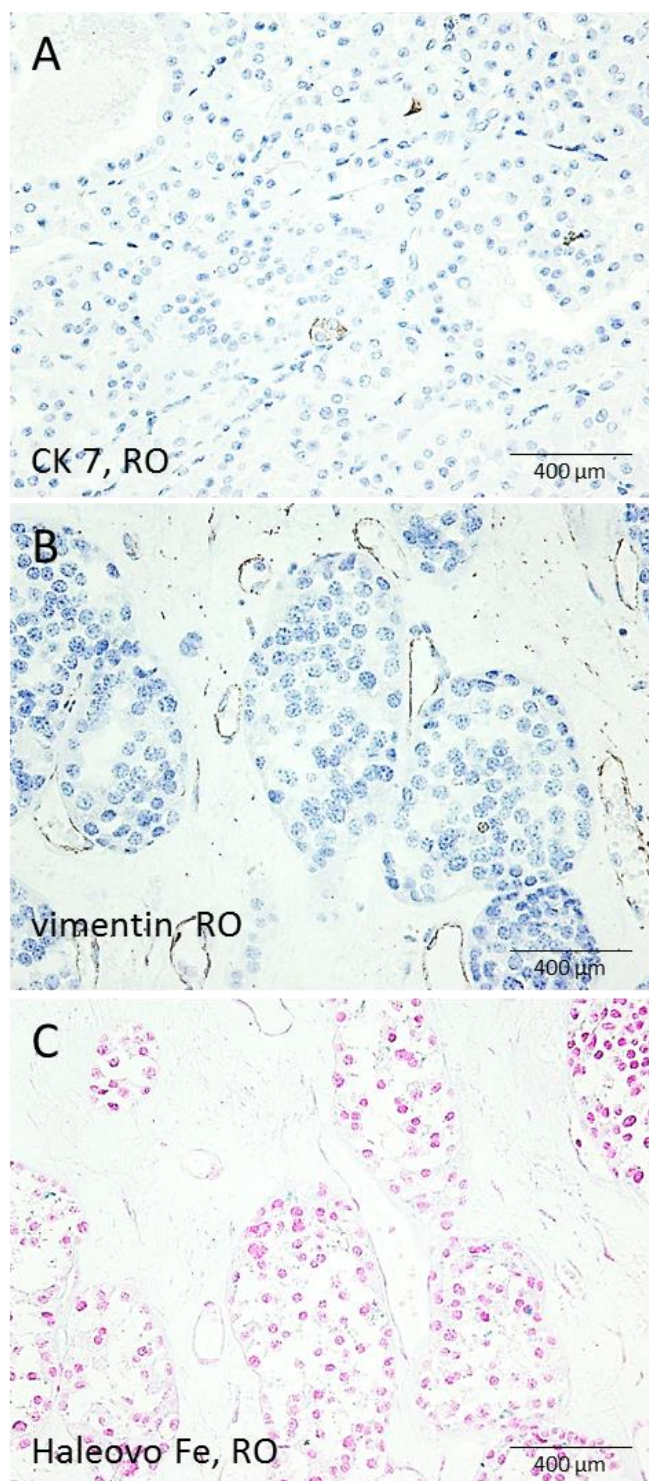
Slika 5. Imunohistohemijske i histohemijske karakteristike chRCC. A. Prisutna je difuzna membranska imunopozitivnost na CK7 uz B. negativno bojenje na vimentin; i C. difuzna citoplazmatska pozitivnost na Haleovo koloidno gvožđe, uvećanja 200x i 400x.

1.1.4. Onkocitom bubrega

Onkocitomi su benigni tumori bubrega i čine oko 5-9% bubrežnih neoplazmi (1). Obično su lokalizovani u korteksu, a opisani su i slučajevi sa širenjem u perinefritično masno tkivo, sa vaskularnom invazijom i metastazama (28). Onkocitomi su uglavnom jasno ograničeni tumori, solidne ili solidno cistične građe, na preseku braon boje, sa centralnim ožiljavanjem, mogućim zonama krvarenja, ali retkom nekrozom (1). Morfologija onkocitoma može biti varijabilna. U klasičnim slučajevima, onkocitomi se sastoje iz solidnih plaža i malih ostrvaca onkocitnih ćelija u rastresitoj hipocelularnoj stromi. Onkocitne ćelije su relativno uniformnog izgleda, srednje veličine, okruglog oblika, sa eozinofilnom citoplazmom, relativno uniformnih jedara, sa malim, ali vidljivim nukleolusima i mogućom binukleacijom (Slika 6A-B). Osim onkocita, u tumoru su prisutni i onkoblasti i to uglavnom oko mesta makroskopski uočljivog centralnog ožiljka. Onkoblasti su ćelije manje od onkocita, sa oskudnom eozinofilnom citoplazmom (1). Nekada je moguće prisustvo atipičnih, bizarnih, pleomorfnih tumorskih ćelija sa hiperhromatičnim nukleusima i mitozama, ali bez koagulacione nekroze, što je karakteristično za tzv. atipične onkocitome (aRO) (Slika 6C-D). Smatra se da su atipične ćelije deo morfološkog spektruma onkocitoma i da nemaju prognostički značaj (29). Budući da su benigni tumori, onkocitomi se ne gradiraju i ne određuju im se stadijumi. Imunohistohemijski profil onkocitoma je varijabilan. Najveći broj je pozitivan na CD117, E-kadherin, S100A i CK, a negativni na CK7 (uz moguću pozitivnost pojedinačnih ćelija). Negativni su na Haleovo koloidno gvožđe (Slika 7) (1,21). Najčešća genetska aberacija kod onkocitoma je gubitak hromozoma 1 (dela ili u celini), u kombinaciji sa gubitkom Y hromozoma. Moguć je rearanžman 11q13, translokacija t(5;11)(q35;q13) i delecija hromozoma 14. Takođe, prisutni su slučajevi sa normalnim kariotipom (1).



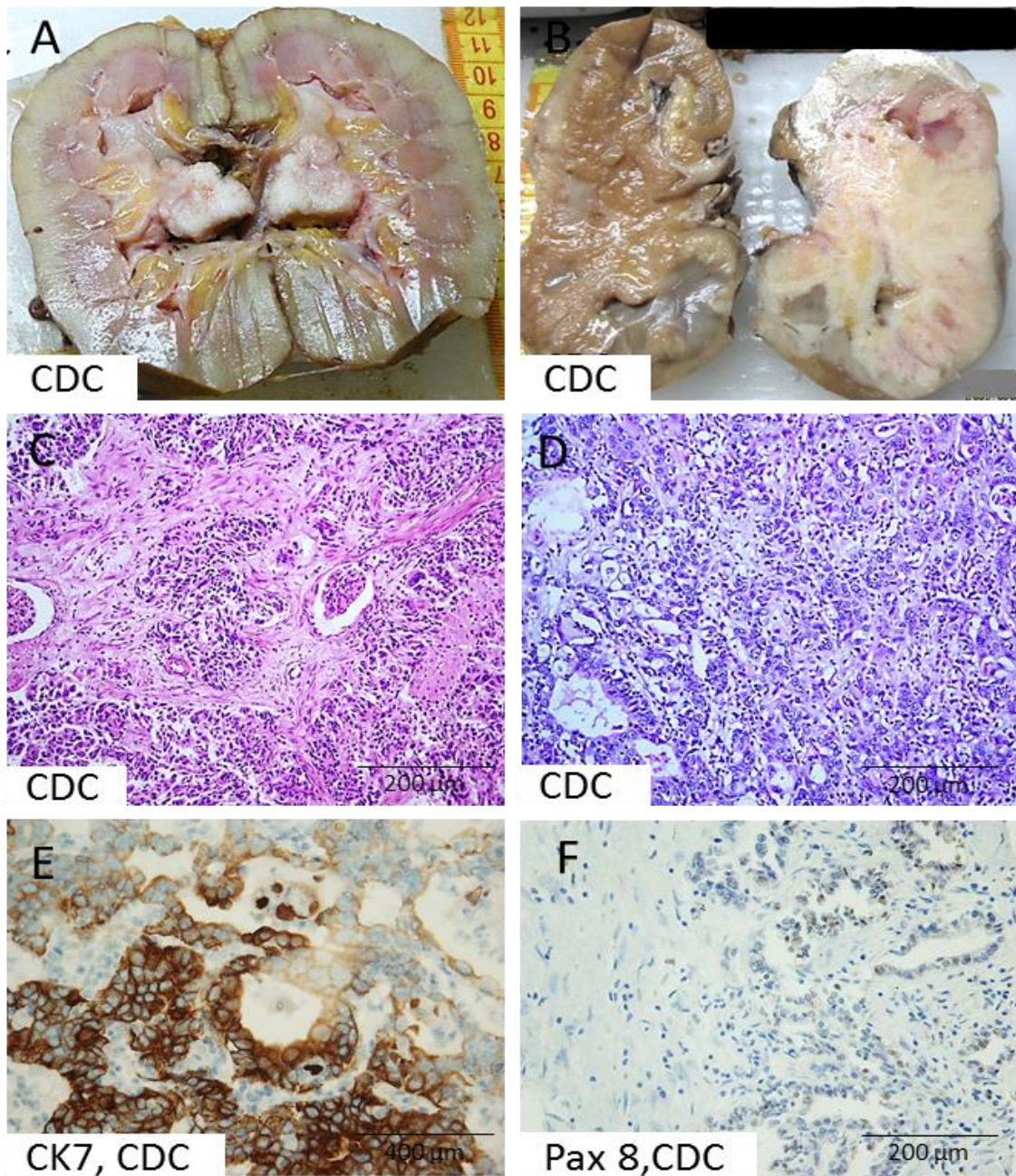
Slika 6. Makroskopske i histološke karakteristike RO. A. Na poprečnom preseku tumor je braon boje, često sa centralnim oživljavanjem; B. Klasični tip čine plaže eozinofilnih ćelija u hipocelularnoj stromi; C. U atipičnoj varijanti onkocitoma prisutne su tumorske ćelije sa različitim stepenom ćelijske atipije, uveličanje 200x; D. Atipične tumorske ćelije su sa različitim stepenom pleomorfizma, obilne eozinofilne citoplazme, hiperhromatičnih nukleusa i prominentnih nukleolusa, uveličanje 400x .



Slika 7. Imunohistohemijske i histohemijske osobine RO. A-C. Difuzna negativnost tumorskih ćelija na imunohistohemijske markere CK7 i vimentin i histohemijsko Haleovo kolidno gvožđe.

1.1.5. Karcinom sabirnih kanalića-Bellini

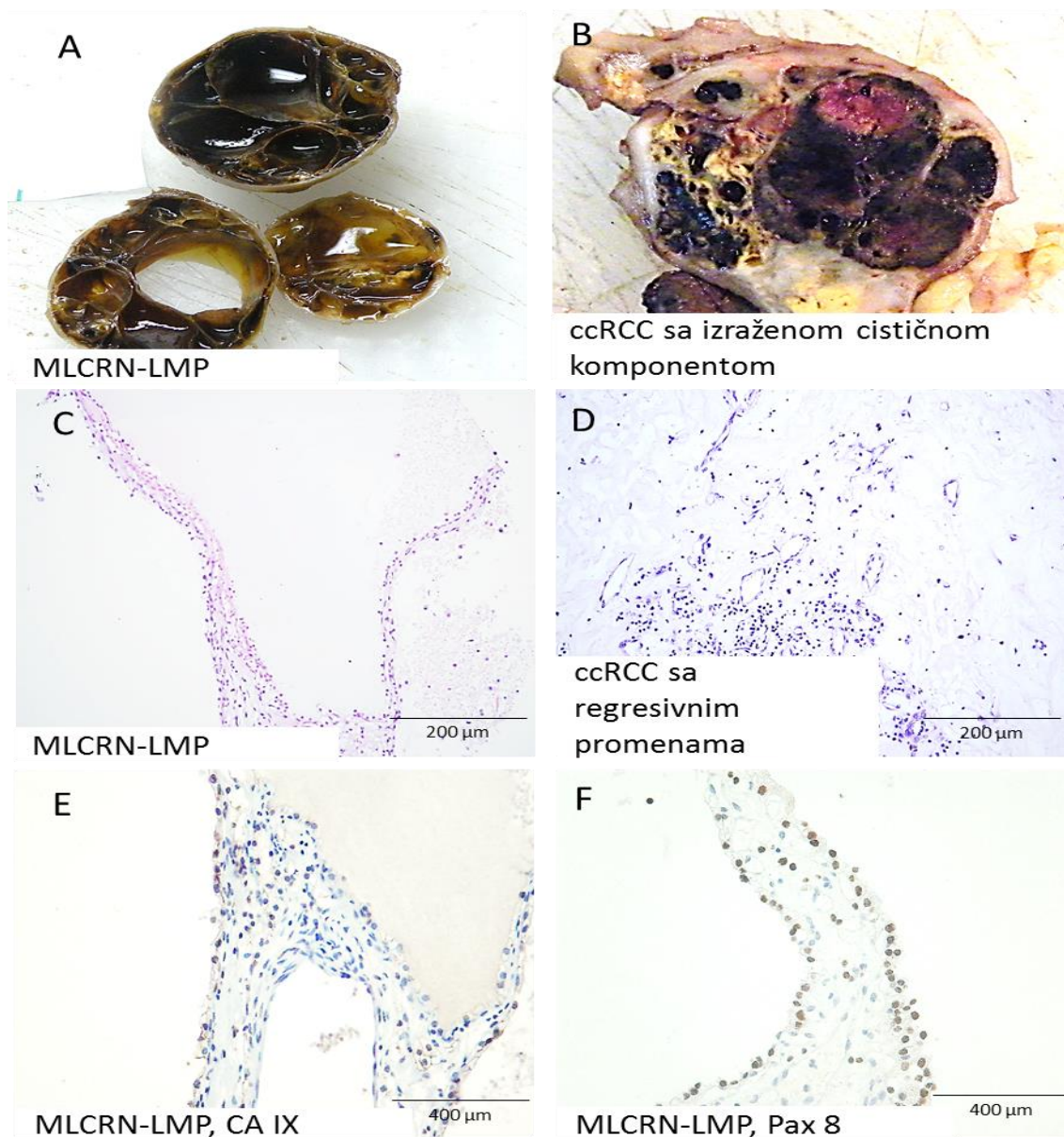
Karcinom sabirnih kanalića bubrega je maligni i veoma agresivan tumor bubrega, koji potiče iz glavnih ćelija bubrežnih sabirnih- Belinijevih kanalića i čini oko 1-2% svih tumora bubrega (1). Karakteristično je lokalizovan u meduli, bele je boje, solidne konzistencije, nejasno ograničen, infiltrativnog rasta, sa čestim širenjem u korteks i izvan bubrega (Slika 8 A-B) (23). Tumor pokazuje tubularni, tubulopapilarni ili tubulocistični rast, sa širenjem između sabirnih kanalića, tubula, glomerula i dezmodoplastičnom reakcijom strome. Tumorske ćelije su pleomorfne, kubične ili kolumnarne, svetle, eozinofilne ili granulirane citoplazme, nekada sa prisutnim mucinom u okolini (Slika 8 C-D). Nukleusi su prominentni, sa vidljivim nukleolusom (23). Ne postoje zvanične preporuke za gradiranje CDC. Ovaj tumor je veoma agresivan, budući da više od 70% pacijenata u momentu dijagnoze bude u visokom stadijumu tumorsle bolesti, a česte su i limfogene i hematogene metastaze (1). Tumorske ćelije su imunohistohemijski pozitivne na CK7, CK19, Pax8, a negativne na CK5/6, CK17, CD10, RCC marker, CD117, p63, thrombomodulin i uroplakin III (Slika 8 E-F) (21). Budući da je incidenca CDC u populaciji veoma niska, detaljne genetske promene nisu dovoljno ispitane. Opisani su gubici heterozigotnosti na različitim hromozomima: 8p, 6p,9p,13q, 21q, monozomije hromozoma 1,6,14,15 i 22, gubici hromozoma 4,14,18,22, kao i trizomije hromozoma 4,7,8,17,20. CDC retko mogu biti udruženi sa genetskim oštećenjima SMARCB1 gena (INI1) (1).



Slika 8. Makroskopske, histološke i imunohistoheimske karakteristike CDC. A. Na preseku tumor je bele boje, lokalizovan u meduli; B. Tumor često infiltriše čitav bubreg; C. Tumorske ćelije infiltrišu stromu između glomerula, sa propratnom dezmozoplazijom i D. Mogu formirati tubulopapilarne i pseuglandularne sutrukture ispunjene mucinom, uveličanje 200x; E. Membranska imunopozitivnost tumorskih ćelija na CK7 i F. Nuklearna imunopozitivnost tumorskih ćelija na Pax 8, uveličanje 200x.

1.1.6. Multilokularna cistična renalna neoplazma niskog malignog potencijala

MLCRN-LMP su neoplazme cističnog izgleda, koje čine manje od 1% svih renalnih tumora. Tumor se sastoji isključivo iz brojnih cisti različitih veličina, ispunjenih svetlim, seroznim, želatinoznim ili hemoragičnim sadržajem, razdvojenim tankim septama (Slika 9A.)(1). Kriterijumi za dijagnozu su veoma precizni zbog mogućih morfoloških sličnosti sa ccRCC, naročito onih slučajeva ccRCC sa izraženim cističnim i regresivnim promenama (Slika 9B). Ciste u MLCRN-LMP su obložene jednim redom tumorskih ćelija sa obilnom svetlom citoplazmom i malim nukleusima, bez nukleolusa, a veoma retko su obložene sa više redova ovakvih ćelija, mikropapilarnim formacijama, eventualno sa manjim grupama tumorskih ćelija u septama, međutim bez ekspanzivnih tumorskih nodusa (Slika 9C-D). Prisustvo nekroze, vaskularne invazije ili sarkomatoidne transformacije je inkompatibilno sa dijagnozom. Tumor se ne gradira i ne određuje mu se stadijum, ima odličnu prognozu, bez do sada opisanih recidiva ili metastaza (1). Imunohistohemijski profil tumorskih ćelija je gotovo identičan onom u ccRCC: ćelije su pozitivne na Pax8 i CAIX, kao i u ccRCC (Slika 9E-F) (1). Smatra se da je MLCRN-LMP genetski identičan ccRCC, budući da je u 25% tumora prisutna mutacija *VHL* gena, kao i 3p delecija u 74% slučajeva (1).



Slika 9. Morfološke i IHH karakteristike MLCRN-LMP i ccRCC sa cističnim i regresivnim promenama; A. Na preseku MLCRN-LMP je u potpunosti cističan, ispunjen hemoragičnim i mucinoznim sadržajem; B. Diferencijalno dijagnostički sličan je ccRCC sa izraženom cističnom promenom, međutim, ovde se uočavaju solidna područja tumora, žute boje; C. Ciste su u MLCRN-LMP obožene jednim redom ćelija svetle citoplazme. D. ccRCC sa izraženim regresivnim promenama u vidu hijalinizacije ili fibroze; E. Membranska imunopozitivnost na CAIX; F. Nuklearna imunopozitivnost na PAX 8, uveličanja 200x i 400x.

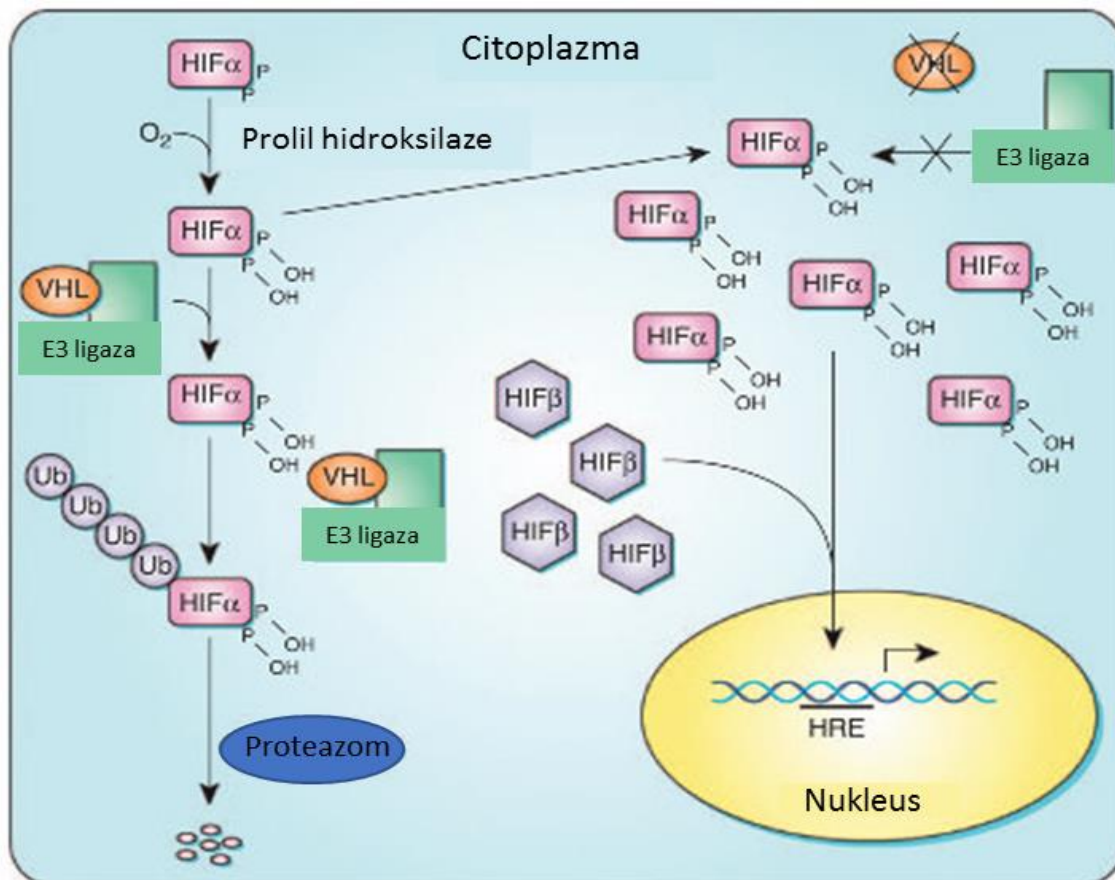
1.2. Diferencijalno dijagnostičke i prognostičke dileme u praksi

U svakodnevnoj kliničko-patološkoj praksi česte su diferencijalno-dijagnostičke dileme među različitim tipovima tumora bubrega. Primer za to je diferencijalna dijagnoza RO i chRCC, kao i ccRCC niskog gradusa, onih sa izraženim cističnim i regresivnim promenama i MLCRN-LMP (31–33). Kada je reč o diferencijalnoj dijagnozi između RO i chRCC, radi se o dva tipa tumora koja mogu imati veoma slične makroskopske i histomorfološke osobine, a biološko ponašanje i prognoza su značajno različiti. RO je benigni tumor sa odličnom prognozom, a chRCC je maligni tumor varijabilne prognoze, sa mogućim širenjem izvan granica bubrežnog parenhima i nastankom metastaza (34). Pored klasičnih onkocitoma, neretko su prisutne različite morfološke varijante RO (37–41). Takođe, opisana je i varijanta aRO, sa atipičnim morfološkim karakteristikama, koja diferencijalno dijagnostički može podsećati na chRCC ili druge maligne tumore bubrežnih ćelija. Međutim, kao i klasični RO, aRO ima dobru prognozu (28). Osim u morfološkim karakteristikama, RO i chRCC mogu se preklapati i u imunohistohemijskoj pozitivnosti na brojne markere, kao što su CD117, vimentin, RCCM i CD10. Dva markera koja se najviše koriste u diferencijalnoj dijagnozi RO i chRCC su imunohistohemijsko bojenje na CK7 i histohemijsko bojenje na Haleovo kolidno gvožđe, čija pozitivna reakcija ukazuje na chRCC (34,40). Međutim, nekada interpretacija Haleovog koloidnog gvožđa može biti otežana i nepouzdana (34). ccRCC niskog gradusa i MLCRN-LMP mogu imati slične morfološke osobine, naročito ukoliko se radi o ccRCC sa izraženom cističnom komponentom i regresivnim promenama u vidu fibroze i hijalinizacije (41–43). Oba tipa tumora, ccRCC i MLCRN-LMP pokazuju gotovo identičnu ekspresiju imunohistohemijskih markera. Čak se smatra da imaju zajedničku genetsku osnovu (1). Međutim, za razliku od ccRCC, koji se može metastazirati, do sada nisu zabeleženi agresivni slučajevi MLCRN-LMP (44). Budući da se radi o neoplazmama različitog malignog potencijala, neophodno je ispitati nove imunohistohemijske i prognostičke markere koji bi eventualno mogli pomoći u diferencijalnoj dijagnozi između ovih tipova bubrežnih neoplazmi.

1.3. Genetske karakteristike tumora koje su bitne za patogenezu

Tumori bubrežnih ćelija mogu nastati kao posledica uticaja različitih genetskih faktora, kao i poremećaja epigenetske regulacije (3). U najvećem broju slučajeva, RCT nastaju sporadično, međutim, manji broj se javlja u sklopu različitih sindroma kao što su VHL, BHD, hereditarna leiomiomatoza ili nastaju u okviru poremećaja subjediniče sukcinat dehidrogenaze B i D (SDHB, SDHD). Prethodne studije su pokazale da osobe sa pozitivnom porodičnom anamnezom imaju dva puta veći rizik za nastanak karcinoma bubrega (1).

Uticaj genetskih i epigenetskih faktora najviše je analiziran u karcinogenezi ccRCC. U osnovi 85% sporadičnih ccRCC nalazi se inaktivacija *VHL* gena lociranom na hromozomu 3p25. Inaktivacija *VHL* može nastati usled njegove tačkaste mutacije ili hipermetilacije njegovog promotora. VHL protein reguliše ćelijski odgovor na promene koncentracije kiseonika. Lokalizovan je u citoplazmi, u kompleksu sa elonginom B i C, cullinom 2 i Rbx, kao deo E3 ligaznog kompleksa. Ovaj kompleks ubikvitinizira različite proteine i dalje ih usmerava na proteazomalnu degradaciju (45). (Slika 10)

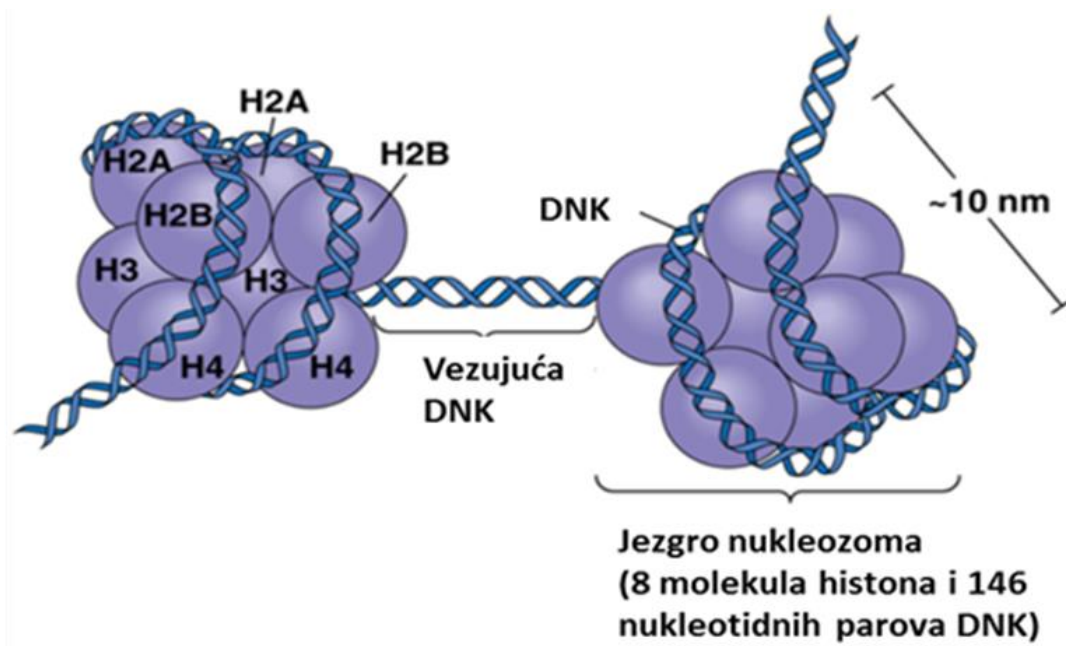


Slika 10. VHL i HIF α . U uslovima odgovarajuće koncentracije kiseonika, regulatorni molekul hipoksija inducibilni faktor- α (HIF α) je hidroksiliran serijom prolil hidroksilaze (leva strana slike). Hidroksilirani HIF α se vezuje za VHLp/E3 ligazni enzimski kompleks, HIF α se ubikvitinizira i dalje usmerava na proteazomalnu degradaciju, te je njegova koncentraciju u uslovima normalne koncentracije kiseonika niska. Na desnoj strani slike prikazan je poremećaj normalnog regulatornog procesa u slučaju aberantne funkcije VHL. U odsuvu funkcionalnog VHL, E3 ligazni kompleks ne može vezati HIF α , bez obzira na njegovu hidroksilaciju. Ovo dovodi do nakupljanja HIF α u citoplazmi, dovodeći do dimerizacije sa stalno eksprimiranim HIF β . Ovaj kompleks se potom translocira u jedro i vezuje za promotore gena koji kontrolišu sintezu proteina ćelijskog odgovora na hipoksiju (HRE): prekusora vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. vascular endothelial growth factor, VEGF), faktora rasta porekla trombocita (engl. platelet disease growth factor, PDGF), transformišućeg faktora rasta α (engl. trombocyte growth factor- α , TGF- α), karbonske hidraze IX (engl. carbonic anhidrase, CA-IX), eritropoetina, glukoznog

transportera-1 (engl. glucose transporter-1, GLUT-1) i drugih. U slučaju mutacije ili hipermetilacije promotora VHLp, bez obzira na koncentraciju kiseonika, HIF α se ne razgrađuje i konstantno se eksprimira u visokom nivou u ćeliji, što uzrokuje kontinuiranu sintezu VEGF, PDGF, and TGF i dovodi do nastanka ccRCC. HIF α , hipoksija-inducibilni faktor alfa; HIF β , hipoksija inducibilni faktor beta; HRE, hipoksija responzivni elementi; Ub, ubikvitin; VHL, von Hippel–Lindau. Modifikovano prema Peter E. Kidney Int 2009.

1.4. Epigenetska regulacija u patogenezi tumora bubrežnih ćelija

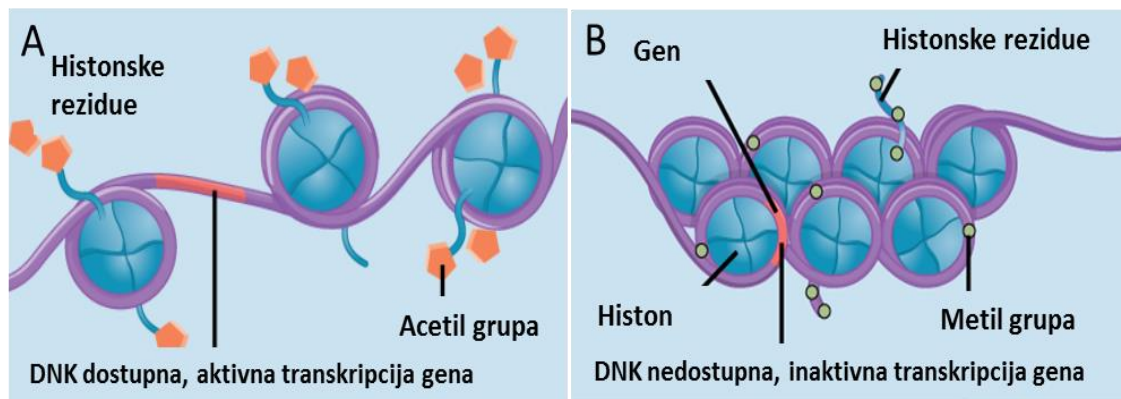
Epigenetska regulacija genske ekspresije se postiže bez promene u primarnoj nukleotidnoj sekvenci DNK (4). Ove promene podrazumevaju metilaciju genskih promotora, konformacione promene hromatina nastale usled modifikacije histonskih proteina i regulaciju mikro RNK. Prisutne su tokom normalnog razvoja i diferencijacije tkiva, a njihov poremećaj može uticati na nastanak karcinoma bubrega (3,4,46). Metilacija genskih promotora podrazumeva dodavanje -CH₃ grupe na citozin na 5' kraj unutar 5'—C—fosfat—G—3' (CpG) ostrvaca DNK, pomoću enzima DNK metiltransferaza (DNMTs) (3). Smatra se da je aberantna hipermetilacija genskih promotora jedan od osnovnih epigenetskih mehanizama u kancerogenezi (4). Posttranslaciona modifikacija (PTM) histonskih proteina je promena koja dovodi do promena u izgledu hromatina, čime se kontroliše dostupnost gena transkripcionim faktorima. DNK je organizovana u nukleozome, koji se sastoje iz jezgra histonskih oktamera H2A, H2B, H3 i H4, oko kog se obmotavaju po dva navoja DNK (Slika 11) (47).



Slika 11. Histonski proteini. Adaptirano prema:

<https://columbiasciencereview.com/2015/04/11/an-incomplete-inheritance-new-research-demonstrates-that-histone-proteins-can-carry-genetic-information/>

Histonski proteini su sastavni delovi nukleozoma. Terminalni krajevi histonskih proteina podložni su kovalentnim modifikacijama, kao što su acetilacija i metilacija. Ove modifikacije su kritične za regulaciju strukture hromatina. Kondenzovani hromatin (heterohromatin) čini visokokondenzovana, gusto obavijena DNK, koja onemogućava pristup transkripcionim faktorima, za razliku od relaksiranog, otvorenog hromatina (euhromatin) koji otkriva genske sekvence i čini ih dostupnim za transkripciju (Slika 12.) (3). Acetilacija podrazumeva dodavanje acetil grupe na histonske proteine pomoću enzima histon acetiltransferaza, što dovodi do otvaranja kondenzovanog hromatina i olakšavanja transkripcije gena (Slika 12A) (3). Efekti metilacije histona zavise od substrata i stepena metilacije (mono-, di- ili trimetilacija), te mogu indukovati ili sprečavati transkripciju gena (48) (Slika 12B).



Slika 12. Acetilacija i metilacija histona.

Modifikovano prema www.differencebetween.com.

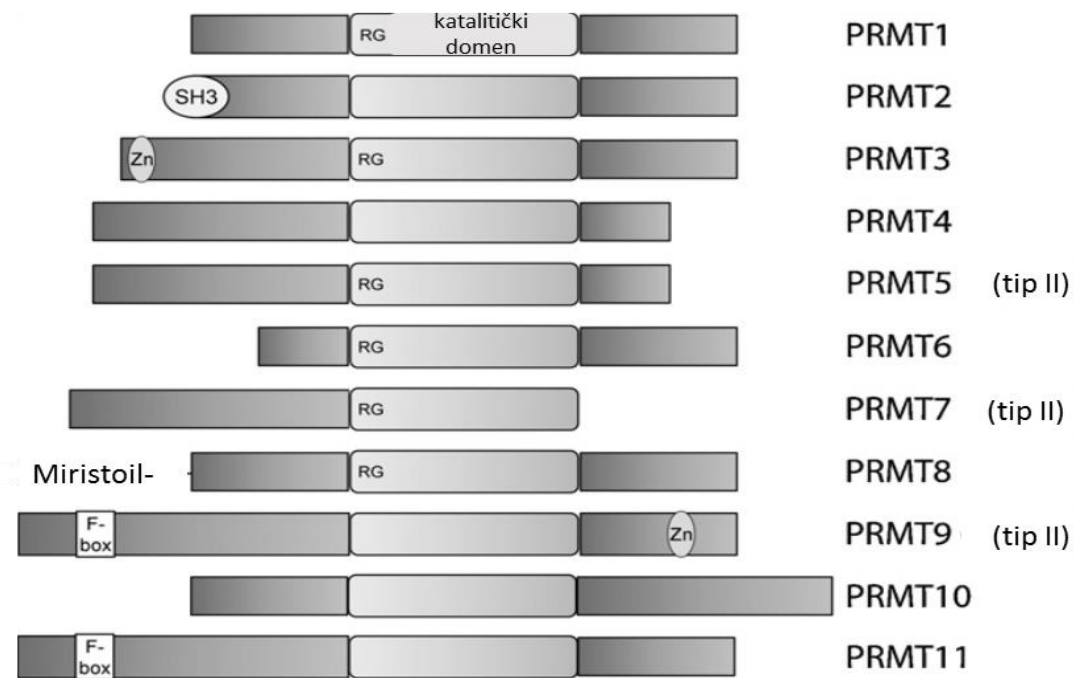
Metilacija se vrši histon metiltransferazama (HMT), a demetilacija histon demetilazama (HDMT). Svojom aktivnošću HMT i HDMT vrše važnu ulogu u kontroli ćelijskog ciklusa i ćelijske proliferacije, angiogeneze i ćelijskog odgovora na hipoksiju. Studije su pokazale da je kontrolom ovih enzima i reverzijom epigenetskih modifikacija moguće reaktivirati tumor supresor gene ili suprimirati onkogene u ccRCC (48). Različiti podtipovi RCT se razlikuju u odnosu na stepen metilacije. Tako je metilacija H3K27 (H3K27me1/-me2/-me3) zastupljenija u pRCC, nego u ccRCC, dok je viši nivo tri-metilacije H3K27 (H3K27me3) primećen kod onkocitoma. Takođe, nivo metilacije korelirao je sa tumorskim gradusom, stadijumom i preživljavanjem (49).

Imajući u vidu da su procesi epigenetske regulacije reverzibilni, kao i da su različiti tipovi metilacija u korelaciji sa tipovima RCT, progresijom i preživljavanjem, neophodno je dalje ispitivanje metilacionih enzima i njihovog značaja kao mogućih dijagnostičkih i prognostičkih markera. Na ovakav način uticalo bi se na razvoj potencijalne personalizovane terapije kod pacijenata sa različitim tipovima tumora bubrežnih ćelija.

1.5. Familija protein arginin metil-transferaza

Protein arginin metil-transferaze (PRMT) vrše proces PTM, katališući prenos -CH₃ grupe sa S-Adenozilmetionina (Ado-Met), na argininske rezidue ciljnih proteina (5). Metilacija arginina se vrši na terminalnoj guanidino grupi nitrogena aminokiseline arginina i to u vidu monometilacije (N^G-monometilarginin), simetrične dimetilacije (N^G, N^G dimetilarginin-simetrično metilovani dimetil arginin) i asimetrične dimetilacije (N^G, N^G dimetilarginin-asimetrično metilovani dimetil arginin) (5). Metilacija histona na funkcionalnim proteinima ima važnu ulogu u regulaciji transkripcije gena, popravke DNK i regulaciji signalnih puteva (50). Poremećaji u funkciji PRMT udružen sa nastankom nekoliko tipova tumora, kao što su karcinomi pluća, dojke, prostate, debelog creva, mokraćne bešike i leukemija (51).

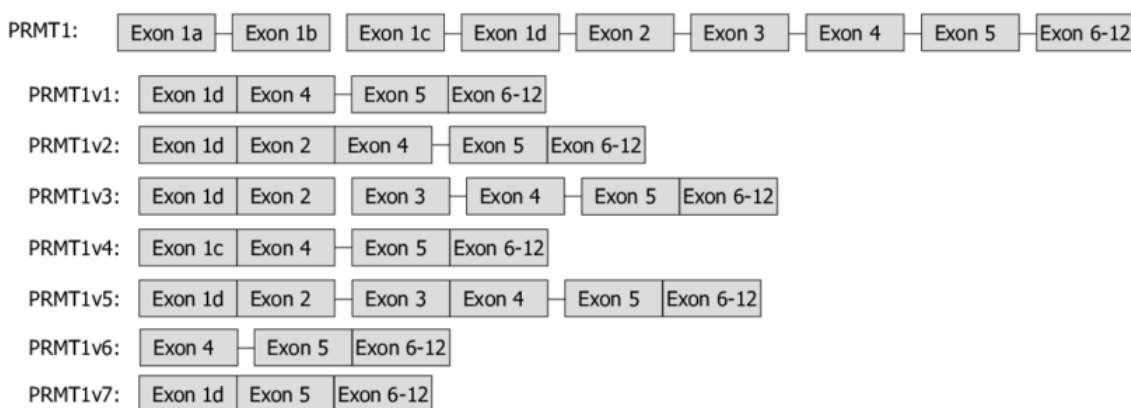
Porodica PRMT enzima se sastoji iz 11 članova (PRMT 1-11). PRMT enzimi se mogu podeliti na tip I i tip II. Tip I PRMT čine PRMT 1-2, PRMT 4, PRMT 6 i PRMT 8 koji katalizuju dodavanje dve metil grupe na istu terminalnu nitrogen grupu arginina, stvarajući asimetrični dimetil arginin (ADMA). Tip II PRMT čine PRMT 5, PRMT 7, PRMT 9 i PRMT 11, koji dodaju metil grupu na drugi terminalni nitrogen stvarajući simetrični dimetil arginin (SDMA) (52) (Slika 13). Eksperimenti na miševima su pokazali da inaktivacija pojedinih tipova PRMT proteina dovodi do različitih posledica u njihovom razvoju, od zastoja u rastu (inaktivacija PRMT 3 i PRMT 4), pa do smrti embriona (inaktivacija PRMT1)(52).



Slika 13. Šematski prikaz familije PRMT. Grafički prikaz 11 članova PRMT familije sa osnovnim funkcionalnim karakteristikama svakog proteina. Svaki PRMT sadrži konzervativni katalitički domen. PRMT2 sadrži SH3 domen, dok PRMT3 i PRMT9 sadrži cink prstaste domene (Zn). PRMT9 takođe sadrži F-kutiju (engl. F-box), dok PRMT8 je modifikovan miristoilacijom na njegovom N-kraju (modifikovano prema Nicholson TB, Chen T and Richard S. Pharmacol Res. 2009).

1.6. PRMT1

Iako je metilacija proteina prvi put opisana 1968. godine, veća pažnja je posvećena posttranslacionim modifikacijama tek nakon 1996. godine, kada je klonirana PRMT1 (14). Smatra se da je PRMT1 odgovorna za oko 85% ćelijske metiltransferazne aktivnosti (52). PRMT1 gen se sastoji iz 12 kodirajućih egzona i postoji u 7 različitih izoformi. Ove izoforme variraju u N-terminalnoj sekvenci, molekularnoj težini, u substratima, enzimskoj aktivnosti, ćelijskoj i tkivnoj lokalizaciji (Slika 14) (8,51,53,54).

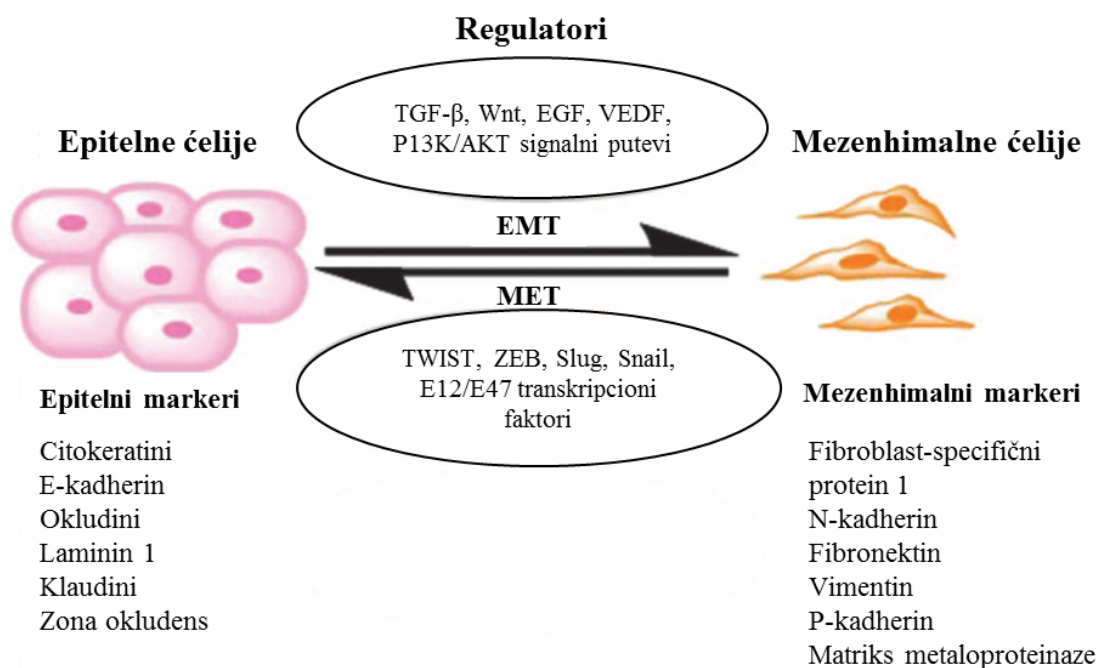


Slika 14. Različite izoforme PRMT1. Prema Baldwin i sar. World J Biol Chem 2014.

PRMT1 ekspresija je uočena u mnogim organima: bubregu, koži, duodenumu, pankreasu, plućima, dojci, placenti, testisu, prostati (55). Poremećaj u ekspresiji PRMT1 uočeni su u različitim malignim tumorima, kao što su karcinomi želuca, pluća, mokraćne bešike, debelog creva, dojke, akutnoj limfoblastnoj leukemiji i gliomima (9,10,13–15,53,56). Povećana ekspresija PRMT1 korelirala je sa progresijom karcinoma debelog creva i nesitnoćelijskih karcinoma pluća (53,57). Sa druge strane, preživljavanje pacijenata sa karcinomom želuca i niskom PRMT1 ekspresijom je bilo lošije u poređenju sa grupom pacijenata koji su imali visoku PRMT1 ekspresiju (9). Ovakve studije ukazuju da PRMT1 može imati različitu funkciju u zavisnosti od organa. Ekspresija PRMT1 nije ispitivana u tumorima bubrega.

1.6.1. EMT i PRMT1

Smatra se da je EMT reverzibilan proces, precizno regulisan brojnim transkripcionim faktorima i signalnim putevima, kao što su Wnt/ β -katenin EMT, TGF- β i HIF1 signalni put (58). Takođe, pokazano je da sva tri mehanizma epigenetske regulacije: DNK metilacija, modifikacija histona i regulacija miRNK, utiču na proces EMT (59). EMT se odlikuje smanjenom ekspresijom E-kadherina, aberantnom ekspresijom N- kadherina i koaktivacijom različitih transkripcionih faktora, kao što ZEB, Twist, Snail, i Slug (Slika 15) (58).

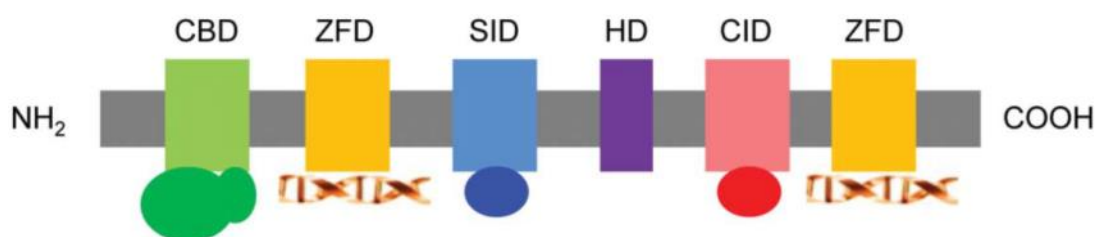


Slika 15. Pojednostavljeni prikaz EMT. Modifikovano prema Q Xu i sar. Cell Death Dis 2016.

E-kadherin je transmembranski glikoprotein koji posreduje u kalcijum zavisnoj međućelijskoj adheziji kroz homofilnu interakciju preko NH₂ terminalnog ektodomena. Intracelularni domen E-cadherina je COOH- terminalni domen kojim se vezuje za β -katenin, a potom se oba vezuju za α -catenin i aktinski citoskelet, što omogućava stabilnu međućelijsku adheziju (60). β -katenin ima centralnu ulogu u WNT/ β -EMT signalnom putu, neophodnom za pravilan embrionalni razvoj. Aberantna aktivacija WNT/ β -EMT signalnog puta pokazana je u mnogim karcinomima (61). PRMT1 je novi regulator WNT/ β katenin-EMT signalnog puta (62). Pokazano je da svoju ulogu regulatora procesa EMT PRMT1 obavlja kroz metilaciju ZEB1 i TWIST1 transkripcionih faktora (15). Međutim njihova interakcija nije ispitivana u tumorima bubrega.

1.6.2. ZEB1 i PRMT1

ZEB1 je transkripcioni faktor prisutan u tkivu pankreasa, jetre, ovarijuma, mokraćne bešike i uterusa, ali je njegova funkcija još nedovoljno ispitana. Aberantna ekspresija ZEB1 može indukovati tumorsku invaziju i nastanak tumorskih metastaza kroz proces EMT (63). Sa svoja dva NH₂- i COOH- kraja vezuje se za sekvence (CAACCTG) na ciljnom genu DNK. Između ova dva kraja nalaze se homeodomeni koji se aktiviraju u međuproteinskim interakcijama (Slika 16.) (64).

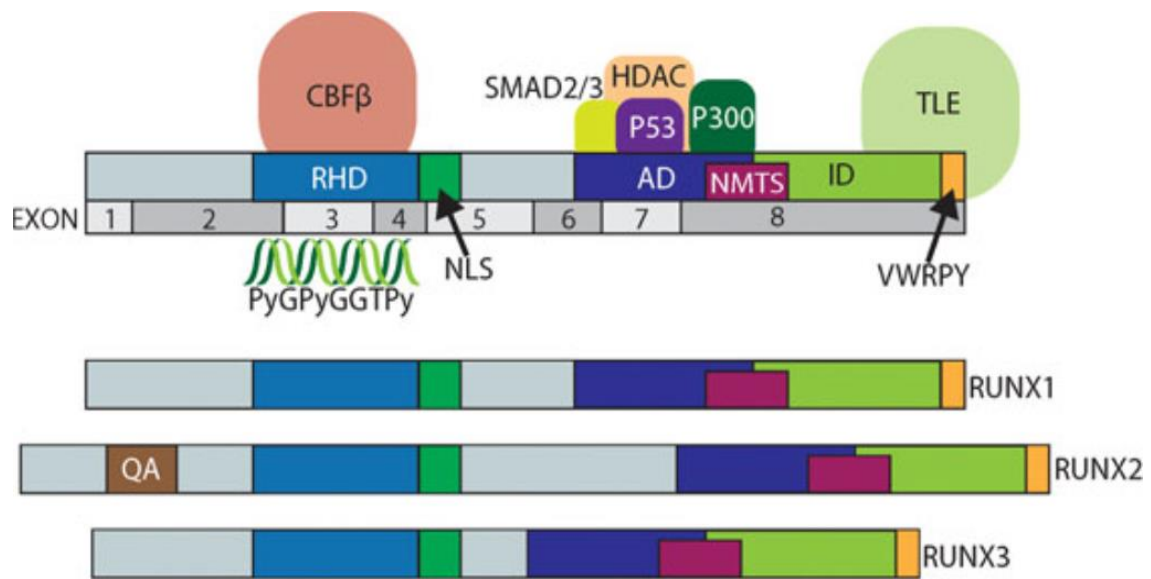


Slika 16. Modifikovani šematski prikaz ZEB1 proteina sa homeodomenima i krajevima za DNK vezivanje. Zhang P i sar. Cell Cycle 2015.

ZEB1 se smatra glavnim supresorom E-kadherina i jednim od ključnih regulatora EMT u karcinomima pluća (65). Pokazano je da aberantna ekspresija ZEB1 u karcinomima endometrijuma i cerviksa utiče na njihovu progresiju (64,66,67). U karcinomima dojke PRMT1 vrši metilaciju H4R3me2as na promotoru ZEB1 gena, što indukuje transkripciju ZEB1 proteina i utiče na smanjenu ekspresiju E-kadherina i povećanu ekspresiju mezenhimalnih markera. Na taj način ZEB1 utiče na EMT i dovodi proliferacije ćelija karcinoma dojke. Takođe, potvrđeno je da utišavanjem gena za ZEB1, dolazi do smanjene ekspresije mezenhimalnih markera, kao i smanjenih migratornih i invazivnih sposobnosti tumorskih ćelija, indukovanih preko PRMT1(15). Poređenje ekspresije ZEB1 i PRMT1 u tumorima bubrega još nije ispitivana.

1.6.3. RUNX1 i PRMT1

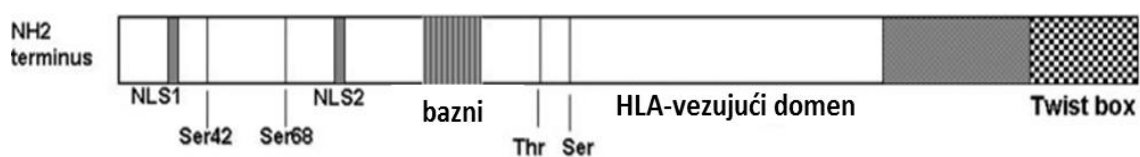
RUNX1 pripada RUNX familiji transkripcionih faktora, koju čine još RUNX2 i RUNX3 (Slika 17). RUNX1 se eksprimira tokom hematopoeze, razvoja kostiju, hrskavice, nervnog sistema, mlečne žlezde, mišića i folikula dlake (68). Poremećaj RUNX1 ekspresije je uočen u leukemijama i mnogim solidnim tumorima. U zavisnosti od tipa solidnog tumora, RUNX1 može funkcionisati kao tumor supresor ili onkogen (68–71). Tako u karcinomima dojke, ezofagusa i tumorima gastrointestinalnog trakta RUNX1 može funkcionisati kao tumor supresor, a u invazivnom karcinomu endometrijuma, kože, glave i vrata, prostate, debelog creva i rektuma kao onkogen (69,71). Nedavno istraživanje je pokazalo udruženost povećane RUNX1 ekspresije i pola, visokog gradusa i stadijuma tumorske bolesti kod pacijenata sa ccRCC (72). Pokazano je da se tokom smanjenja RUNX1 ekspresije u kulturama epitelnih ćelija dojke aktivira TGF β EMT signalni put, te dolazi do smanjene E-kadherin i povećane N-kadherin i vimentin ekspresije, što RUNX1 čini odgovornim za očuvanje ćelijskog epitelnog fenotipa (73). Funkcija RUNX1 može biti regulisana PTM i međuproteinskim interakcijama. Pokazano je da PRMT1 vršiti metilaciju RUNX1 i funkcioniše kao njegov transkripcioni koaktivator (18). Analiza ekspresije PRMT1 i RUNX1 još nije ispitivana u tumorima bubrega.



Slika 17. Proteinski domeni unutar RUNX faktora i njihova struktura. RHD (Runt homologni domen, DNA i CBF - β vezujući domeni), nuklearni lokalizujući signal (NLS), NMTS (nukleus matriks target signal), aktivacioni domen (AD), inhibitorni domen (ID), QA domen (poliglutamat-alanin bogat domen). Adaptirano prema Hong D i sar J Cell Physiol. 2018.

1.6.4. TWIST1 I PRMT1

TWIST1 je transkripcioni faktor, koji pripada porodici baznih heliks-loop-heliks proteina (bHLH) (Slika 18). TWIST1 ima višestruku ulogu regulatora embriogeneze, organogeneze, angiogeneze, apoptoze, senescencije i karcinogeneze (74). Uloga TWIST1 u karcinogenezi je do sada najviše opisana kroz proces EMT. Pokazano je da TWIST1 indukuje N-kadherin ekspresiju i direktnim vezivanjem za promotor *E-kadherin* gena smanjuje njegovu ekspresiju (74). Povećana ekspresija TWIST1 je primećena u invazivnim karcinomima dojke, mokraćne bešike, pluća, bubrega, debelog creva, ovarijuma, želuca, jetre, pankreasa, prostate, glave i vrata, skvamocelularnim karcinomom jednjaka i udružena je sa lošom prognozom (75). Pokazano je da su povećana ekspresija TWIST1 i njegova citoplazmatska lokalizacija udruženi sa višim nuklearnim gradusom, stadijumom i lošijim preživljavanjem pacijenata sa različitim tipovima RCC (76,77). PRMT1 aktivira TWIST1 metilacijom arginina 34, usled čega dolazi do E-kadherin supresije u nesitnoćelijskim karcinomima pluća. Utišavanjem gena za PRMT1 u istom tipu ćelija, inhibira se EMT (14). Poređenje ekspresije PRMT1 i TWIST1 do sada nije ispitivano u tumorima bubrega.



Slika 18. Šematski prikaz TWIST1 gena. Modifikovano po Dobrian AD. Front Endocrinol, 2012.

2. Ciljevi

1. Ispitivanje ekspresije PRMT1 i njenih ko-efektora ZEB1, RUNX1 i TWIST1 u različitim histološkim tipovima tumora bubrežnih ćelija (ccRCC, pRCC, chRCC, onkocitomima, CDC i MLCRN-LMP).
2. Poređenje ekspresije PRMT1, ZEB1, RUNX1 i TWIST1 sa demografskim i epidemiološkim karakteristikama pacijenata - pol, starost i preživljavanje, kao i prognostičkim parametrima tumora bubrega - nuklearnim gradusom, stadijumom tumorske bolesti i dimenzijama tumora.
3. Ispitivanje dijagnostičkog i prognostičkog značaja imunohistohemijske ekspresije PRMT1 i ZEB1 u ccRCC niskog nuklearnog gradusa (nuklearni gradus I i II po WHO/ISUP) i MLCRN-LMP, kao i između chRCC, klasičnih RO i aRO.
4. Korelacija ekspresije PRMT1, ZEB1, RUNX1 i TWIST1 sa ekspresijom markera WNT/ β - EMT signalnog puta: N-kadherinom, E-kaderinom i β -kateninom u različitim histološkim tipovima tumora bubrega.
5. Ispitivanje iRNA PRMT1 ekspresije u najčešćim karcinomima bubrežnih ćelija: ccRCC, pRCC i chRCC i okolnom netumorskom bubrežnom parenhimu, kao i poređenje sa prognostičkim parametrima tumora bubrega - nuklearnim gradusom, stadijumom tumorske bolesti i dimenzijama tumora.
6. Analiza hromozomskih aberacija aRO FISH metodom i poređenje sa PRMT1 i ZEB1 IHH ekspresijom.

3. Materijal i metode

3.1. Uzorci tumora i karakteristike pacijenata

U prvom delu istraživanja, korišćen je arhivski materijal (parafinske kalupe) Klinike za urologiju, Kliničkog Centra Srbije (KCS) i Medicinskog fakulteta u Beogradu. Uzorak su činili reprezentativni slučajevi dijagnostikovani od 1. januara 2010. - 31. decembra 2016. godine. Studija je obuhvatila 120 slučajeva ccRCC, 28 pRCC (7 tip I i 21 tip II), 28 chRCC, 25 onkocitoma, 7 CDC i 5 MLCRN-LMP pacijenata Klinike za urologiju. Parafinski kalupi u ovom delu istraživanja korišćeni su za formiranje tkivnog mikroniza (TMN). U cilju validiranja metodologije korišćene u ovoj sudiji i potvrde dobijenih rezultata na TMN, korišćeni su odgovarajući konvencionalni, celi preseci 45 slučajeva korišćenih u TMA. Ova grupa je uključivala 15 ccRCC, 3 pRCC I, 7 pRCC II, 10 chRCC i 10 RO. S obzirom na rezultate dobijene analizom TMN, detaljna distribucija imunohistohemijske ekspresije PRMT1 i ZEB1 bila je analizirana na celim presecima kalupa. Uzorke je činio arhivski materijal Odeljenja za patologiju, Univerzitetske bolnice u Plzenu, Češka, kao i Klinike za urologiju, KCS. Korišćeni su reprezentativni slučajevi dijagnostikovani od 1996-2017. godine. U ovom delu studije, bili su analizirani celi preseci 19 niskogradusnih ccRCC, 17 MLCRN-LMP, 27 chRCC, 25 klasičnih i 15 atipičnih onkocitoma (aRO), od kojih su svi slučajevi niskogradusnih ccRCC, 5 MLCRN-LMP, 12 chRCC i 10 klasičnih onkocitoma dijagnostikovani na Klinici za urologiju, KCS, dok je 12 MLCRN-LMP, 15 chRCC, 15 klasičnih onkocitoma i 15 aRO, bilo dijagnostikovano na Odeljenju za patologiju, Univerzitetske bolnice u Plzenu, Češka. Celi preseci su bili korišćeni kako bi se preciznije i tačnije analizirala distribucija PRMT1 i ZEB1 imunohistohemijskih markera u diferencijalnoj dijagnozi RO i chRCC, kao i niskogradusnih ccRCC i MLCRN-LMP. Deskriptivne karakteristike svih pacijenata i histopatološke karakteristike tumora korišćenih u studiji predstavljene su u Tabelama 5. i 6.

Tabela 5. Deskriptivne karakteristike pacijenata i histopatološke karakteristike tumora, TMN.

	Histopatološki tipovi, N (%)							Ukupno
	ccRCC	pRCC I	pRCC II	chRCC	RO	CDC	MLCRN-LMP	
N (%)	120 (57.7)	7 (3.4)	16 (7.7)	28 (13.5)	25 (12.0)	7 (3.4)	5 (2.3)	208 (100)
Starost, sv ±SD (g)	61.6±9.05	70.4 ±11.01	62.6±10.8	58.3±13.2	58.5±12.5	52.7±10.7	51.8±15.9	60.7±10.7
Pol N (%)								
Muškarci	79 (65.8)	6 (85.7)	10 (62.5)	15 (53.6)	12 (48.0)	6 (85.7)	4 (80.0)	132 (100)
Žene	41 (34.2)	1 (14.3)	6 (37.5)	13 (46.4)	10 (40.0)	1 (14.3)	1 (20.0)	73 (100)
Veličina tumora, sv±SD (mm)	69.9±43.8	78.3±46.3	74.8±22.7	65.4±28.8	54.2±29.5	66.4±29.7	49.2±12.1	68±38.2
Gradus N (%)								
I	21 (17.5)	2 (28.6)	0 (0.0)					23 (100)
II	68 (56.7)	5 (71.4)	8 (50.0)					81 (100)
III	18 (15.0)	0 (0)	4 (25.0)	N/D	N/D	N/D	N/D	22 (100)
IV	13 (10.8)	0 (0)	4 (25.0)					17 (100)
Stadijum N (%)								
pT1	58 (48.3)	4 (57.1)	5 (31.3)	13 (46.4)				80 (100)
pT2	13 (10.8)	1 (14.3)	3 (18.8)	3 (10.7)				20 (100)
pT3	38 (31.7)	2 (28.6)	7 (43.8)	10 (35.7)	N/D	N/D	N/D	57 (100)
pT4	11 (9.2)	0 (0)	1 (6.3)	2 (7.1)				14 (100)
Praćenje, prosek (meseci)	41.7	50.3	41.9	49.3	54.4	36.1	74.8	44.2
Smrt udružena sa bolešću N (%)	39 (81.2)	0 (0.0)	5 (10.4)	2 (4.1)	0 (0)	2 (4.1)	0 (0)	48 (100)

Skraćenice: ccRCC-svetloćelijski karcinomi bubrežnih ćelija; pRCC I- papilarni karcinom bubrežnih ćelija, tip I; pRCC II- papilarni karcinom bubrežnih ćelija, tip II; chRC- hromofobni karcinom bubrežnih ćelija; RO- renalni onkocitom; CDC- karcinom sabirnih kanalića; MLCRN-LMP- multilokularna renalna cistična neoplazma niskog malignog potencijala; sv- srednja vrednost; N-broj; N/D- nije dostupno.

Tabela 6. Deskriptivne karakteristike pacijenata i histopatološke karakteristike ccRCC, MLCRN-LMP, chRCC, RO i aRO na celim presecima.

	Histopatološki tipovi, N (%)					Ukupno
	ccRCC	MLCRN-LMP	chRCC	RO	aRO	
N (%)	19 (18.4)	17 (16.5)	27 (26.2)	25 (24.3)	15 (14.6)	103 (100)
Starost, sv±SD	58.6±10.2	57.5±18.5	67.5±10.3	65.0±9.8	65.0±18.1	62.3±15.2
Pol						
Muškarci	9 (16.1)	13 (23.2)	15 (26.8)	12(21.4)	7 (12.5)	56 (100)
Žene	10 (4.7)	4 (8.5)	12 (25.5)	13 27.6	8 (17.0)	47 (100)
Veličina tumora, sv±SD	53.5±25.7	44.8±19.3	59.0±43.3	42.3±17.4	56.8±30.3	51.2±30.1
Gradus N (%)						
Niski	19 (70.4)	N/D	8 (29.6)	N/D	N/D	27 (100)
Visoki	0 (0.0)		9 (100)			9 (100)
Nepoznato	0 (0.0)		10 (100)			10 (100)
Stadijum N (%)						
Niski	14 (51.7)	N/D	13 (48.3)	N/D	N/D	27(100)
Visoki	15 (68.2)		7 (31.8)			22 (100)
Nepoznato	0 (0.0)		7 (100)			7 (100)

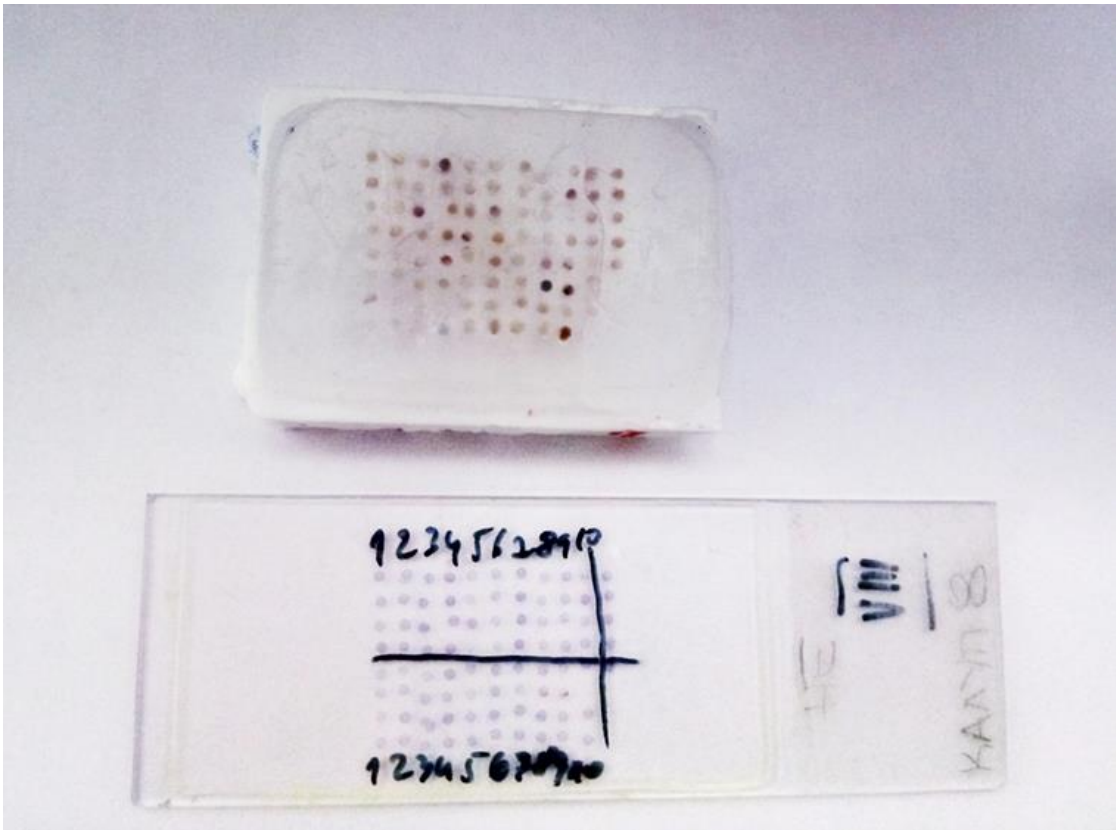
Skraćenice: ccRCC- svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija; MLCRN-LMP- multilokularna cistična renalna neoplazma niskog malignog potencijala; chRCC- hromofobni karcinom bubrežnih ćelija; RO- renalni onkocitom; a-atipični; sv- srednja vrednost, SD, standardna devijacija; N- broj; N/D, nije dostupno

3.2. Patološki evaluacioni kriterijumi

Potvrda patohistološke dijagnoze različitih tipova RCT učinjena je na osnovu Klasifikacije tumora urinarnog sistema i muških genitalnih organa Svetske zdravstvene organizacije, 2016. (engl. World Health Organisation-WHO Classification of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs, 2016). TMN su činili sledeći podtipovi RCT: 120 (57.7%) ccRCC, 7 (3.4%) pRCC I, 16 (7.7%) pRCC II, 28 (13.5%) chRCC, 25 (12.0%) RO, 7 (3.4%) CDC i 5 (2.3%) MLCRN-LMP. U cilju validiranja metodologije i potvrde dobijenih rezultata na TMN, korišćeni su odgovarajući konvencionalni, celi preseci 45 slučajeva korišćenih u TMN. Ova grupa je uključivala 15 (33.3%) ccRCC, 3 (6.7%) pRCC I, 7 (15.6%), 10 (22.2%) chRCC i 10 (22.2%) RO. ccRCC i pRCC su izdvojeni prema različitom nuklearnom gradusu. Sedam ccRCC je bilo niskog gradusa, osam slučajeva je bilo visokog gradusa, uključujući jedan sa sarkomatoidnim karakteristikama. Takođe, analizirano je po pet slučajeva niskog i visokog gradusa pRCC. chRCC i RO su nasumično odabrani. Grupa uzoraka kod kojih su korišćeni isključivo celi preseci obuhvatila je 19 (18.4%) slučajeva niskogradusnih ccRCC, 27 (26.2 %) chRCC, 17 (16.5%) MLCRN-LMP, 25 (24.3%) klasičnih RO i 15 (14.6%) aRO. U zavisnosti od tipa, slučajevi su evaluirani u odnosu na nuklearni gradus, stadijum i veličinu tumora. Nuklearni gradus za ccRCC i pRCC je određivan na osnovu WHO/ISUP, 2016 (1). Tumorski stadijum je određivan prema osmom izdanju TNM (engl. tumour node metastasis) klasifikacije AJCC (engl. American Joint Commission on Cancer, 8th edition) (20). Nuklearni gradus nije određivan za chRCC, budući da ne postoje zvanične WHO/ISUP preporuke. Nuklearni gradus i tumorski stadijum nisu određivani za RO i MLCRN-LMP, budući da je RO benigni tumor, a MLCRN-LMP je prema preporukama WHO, 2016. granična lezija, niskog malignog potencijala (1). Podaci o kliničko patološkim parametrima: godine, pol i veličina tumora (maksimalni dijametar tumora) uzeti su iz finalnih patohistoloških izveštaja. Podaci o praćenju pacijenta, uključujući vreme između operacije i ishoda, ili datuma zadnje posete, bili su preuzeti iz istorije bolesti.

3.3. Konstrukcija tkivnog mikroniza

TMN je konstruisan ručno. Od svakog dijagnostikovanog slučaja izdvojena je po jedna reprezentativna hematoksilin-eozin (H&E) bojena pločica. Budući da TMN cilindri sadrže mali uzorak tkiva, postojala je mogućnost variranja rezultata u odnosu na ceo presek usled intratumorske heterogenosti imunohistohemijskog bojenja. Za što verniju aproksimaciju dobijenih rezultata na TMN u odnosu na konvencionalni presek, uzorkovano je po 3 cilindra iz različitih regija svakog tumora, prema važećoj preporuci (78). Na svakoj H&E pločici su flomasterom označena tri tipična mesta u tumoru sa najvećim gradusom (sredina tumora, deo prema zdravom tkivu i deo između njih), sa kojih su se iz odgovarajućeg parafinskog kalupa (kalup davalac), iglom unutrašnjeg promera 1,2 mm uzela po tri tkivna cilindra za formiranje tkivnog mikroniza. Cilindri su bili raspoređeni u donorske parafinske kalupe, u 8 redova i 10 kolona, uz dodatna 3 cilindra (uzorci zdravog bubrežnog parenhima), koji su bili postavljeni kao pozitivne kontrole za imunohistohemijsko bojenje i orijentaciju uzorka. Takođe, za svaki slučaj bio je uzet po jedan cilindar netumorskog tkiva korteksa i tkiva medule. Po formiranju pojedinačnog TMN, u metalni kalup se izlio tečni parafin iz kojeg se, posle hlađenja, na mikrotomu najpre načinio presek za H&E bojenje, kojim se kontrolisalo da li uzorak odgovara planiranom (Slika 19). Potom su se preseći debljine 5 mikrometara stavljali na mikroadhezivne pločice i dalje bili korišćeni za imunohistohemijsko bojenje.



Slika 19. TMN i kontrolna H&E pločica.

3.4. Imunohistohemijska analiza

Preseci TMN i celi preseci parafinskih kalupa su deparafinizirani na 60°C, u trajanju od 20 minuta i rehidrirani u alkoholima sa opadajućom koncentracijom (100%, 96%, 70%) u trajanju od 2x4 min, nakon čega su ostavljeni u destilovanoj vodi tokom 5 min. Demaskiranje antigena je učinjeno u vodenom kupatilu na 37°C, kuvanjem tkivnih preseka u citratnom puferu (pH=6.0), u trajanju od 20 minuta. Endogena peroksidaza i nespecifično bojenje je bilo blokirano sa 3% H₂O₂, u trajanju od 20 minuta na sobnoj temperaturi. Tkivni preseci su 1 sat inkubirani na sobnoj temperaturi sa primarnim antitelima (Tabela 7). Pločice su 30 minuta inkubirane sa Envision^{im} FLEX/HRP (K4063, Dako, Denmark) kitom. Za vizuelizaciju bojenja korišćen je 3, 3'-diaminobenzidine (DAB), a kontrastiranje je učinjeno Majerovim hematoksilinom. Na kraju, slajdovi su bili dehidrirani u etanolu, očišćeni u ksilolu i prekriveni medijumom za pokrivanje. Zdravo tkivo bubrega je korišćeno kao pozitivna kontrola bojenja, a zamena primarnog antitela fosfatnim puferom korišćena je kao negativna kontrola.

Tabela 7. Imunohistohemijska antitela korišćena u analizi.

Primarno antitelo (klon)	Poreklo	Razblaženje	Proizvođač
1. PRMT1 (ab92299)	zečje-monoklonalno	1:200	Abcam
2. ZEB1 (HPA027524)	zečije-poliklonalno	1:500	Sigma Aldrich
3. RUNX1 (sc-365644)	mišije-monoklonalno	1:50	Santa Cruze
4. TWIST1 (ABD29)	zečije-poliklonalno	1:100	Merck Millipore
5. E-kadherin (spm471)	mišije-monoklonalno	1:100	Santa Cruze
6. N-kadherin (6D11)	zečije-poliklonalno	1:100	Dako
7. β-katenin (β-katenin I)	mišije-monoklonalno	1:100	Dako

3.4.1. Analiza imunohistohemijškog bojenja na TMN presecima

Imunohistohemijški obojene pločice TMN bile su analizirane svetlosnim mikroskopom na prisustvo PRMT1, ZEB1, RUNX1, TWIST1, E-kadherin, N-kadherin i β -katenin imunohistohemijških markera u tumorskom tkivu. PRMT1, ZEB1, RUNX1 i TWIST1 ekspresija evaluirana je i u okolnom netumorskom renalnom parenhimu. Sledeća bojenja su smatrana validnim:

- nuklearno bojenje za PRMT1, ZEB1 i RUNX1 citoplazmatsko i/ili nuklearno bojenje za TWIST1
- membransko za N- i E-kadherin
- β -katenin membransko bojenje smatrano kao očekivano, a nuklearno i/ili citoplazmatsko je smatrano kao aberantno

Intenzitet imunohistohemijškog bojenja PRMT1, ZEB1, RUNX1 i TWIST1 određivan je kao:

- 1+, slabo;
- 2+, umereno;
- 3+, jako.

Na TMN, slučaj se smatrao pozitivnim ukoliko je više od 5% tumorskih ćelija ekspimiralo imunohistohemijški marker (fokalno ili difuzno), najmanje slabog intenziteta i u jednom cilindru. Ukoliko je manje od 5% tumorskih ćelija bilo pozitivno, slučaj je smatran negativnim. Slučajevi sa uniformnom difuznom IHH ekspresijom na svim cilindrima bili su klasifikovani kao homogeno pozitivni, dok su slučajevi sa manje od 5% tumorskih ćelija na svakom od tri cilindra bili homogeno negativni. Slučajevi sa različitom imunopozitivnošću među cilindrima su klasifikovani kao heterogena imunopozitivnost. Na slučajevima celih preseka pozitivnost manja od < 50% tumorskih ćelija se smatrala fokalnom, a slučajevi sa \geq 50% pozitivnih ćelija su smatrali difuzno pozitivnim.

Rezultati imunohistohemijskog bojenja PRMT1, RUNX1, ZEB1 i TWIST1 na TMN bili su analizirani u odnosu na:

- histološki tip tumora
- histopatološke prognostičke parametre ispitivanih tumora (nuklearni gradus, stadijum tumorske bolesti i dimenzije)
- epidemiološke karakteristike (pol, starost i preživljavanje),
- u odnosu na ekspresiju markera EMT/WNT- β katenin signalnog puta: E-kadherin, N-kadherin, β -katenin.

3.4.2. Analiza imunohistohemijskog bojenja na celim presecima

- U cilju potvrde dobijenih rezultata na TMN, korišćeni su odgovarajući konvencionalni, celi preseci slučajeva korišćenih u TMN. Analizirano je da li homogeno negativno ili pozitivno PRMT1 i ZEB1 bojenje na TMN odgovara istom obrascu ekspresije u subkapsularnom, centralnom ili perifernom delu celih preseka.
- Nezavisno od slučajeva korišćenih u TMN, na celim presecima ccRCC niskog gradusa i MLCRCN-LMP ispitivana je ekspresija PRMT1.
- Nezavisno od slučajeva korišćenih u TMN, na celim isečcima klasičnih RO, aRO i chRCC ispitivana je ekspresija PRMT1 i ZEB1.

Imunohistohemijsko bojenje svih markera je evaluirano bez prethodnog znanja o ishodu pacijenta ili drugim kliničko-patološkim podacima. Obojene pločice su bile analizirane korišćenjem svetlosnih mikroskopa BX50 i BX53, a reprezentativna bojenja fotografisana su DP70-CCD i DP12-CCD kamerama (Olympus, Nemačka).

3.5. Izolacija iRNK i qRT-PCR analiza iRNK PRMT1 ekspresije

Sveži uzorci tumorskog tkiva i okolnog netumorskog bubrežnog parenhima uzorkovani su tokom operacije, trenutno smrjavani u tečnom azotu, a potom čuvani na -80°C. U analizi su korišćeni uzorci 5 ccRCC, 2 pRCC i 1 chRCC, sa okolnim netumorskim bubrežnim parenhimom, koji su analizirani u triplikatima. Za tkivnu lizu korišćen je lizni puffer u tkivnom lizeru – engl. Lyser LT Adapter-u (Qiagen, Velika Britanija) u trajanju od 5 minuta. Za ekstrakciju RNK, a prema protokolu proizvođača, korišćeni su sledeći reagensi: TRIzol Reagens (Takara, Šiga, Japan) i Minipipet angio Kit (Isto, Takara). Za merenje količine izolovane RNK korišćen je NanoDrop 2000 spektrofotometar (Thermo Scientific, Germany). 100 ng od totalne količine RNK digestirano je sa DNaza I reagensom (Sigma Aldrich, Velika Britanija) i korišćeno za sintezu komplementarne DNK (engl. Complementary, cDNK) uz korišćenje Super Script II Reverzne Trankriptaze (Life Technologies, Germany). Za qRT-PCR, razblažena cDNK (1/10) je bila korišćena kao matrica za Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies, Germany). Amplifikacija i umnožavanje urađeno je na Run on Step One Plus Real-Time PCR Sistemu (Applied Biosystems, Sjedinjene Američke Države) u totalnoj reaktivnoj smeši od 20 µL. Prajmeri za PRMT1 gen (forward, 5'-ATCTCGCACACACCTTCTA-3'; reverse, 5'-CGGTATAGATGTCCACCTCCTTTATG -3'), bili su poručeni od Primer Design (Termo Fisher Scientific, Sjedinjene Američke Države).

3.6. TCGA i GTEx kohorta

Nivoi iRNA PRMT1 izraženi u FPKM (engl. Fragment Per Kilo Base Million) vrednostima 877 uzoraka u TCGA (engl. The Cancer Genome Atlas) kohorte i 32 uzorka normalnog tkiva iz GTEx (engl. Genotype-Tissue Expression) kohorte preuzeti su sa Human Protein Atlas portala (<https://www.proteinatlas.org/>) u Aprilu 2019. Kliničko patološki podaci pacijenata su preuzeti sa TCGA (79). Spojeni podaci su dostupni u Excel verziji u prilogu doktorata. Tabela 8 sadrži deskriptivne karakteristike pacijenata iz grupe

TCGA. Kod 528 (60.1 %) pacijenata dijagnostikovano je ccRCC; pRCC je dijagnostikovano kod 285 (23.5%) i 64 (7.3%) je imalo chRCC. iRNA PRMT1 nivo ekspresije je bio analiziran u tumorskom i netumorskom renalnom parenhimu. Takođe, iRNA PRMT1 nivo ekspresije u ccRCC, pRCC i chRCC bio je poređen sa tumorskim stadijumom, dok je gradus tumora bio dostupan samo za ccRCC.

Tabela 8. Karakteristike pacijenata analiziranih u TCGA kohorti

Histopatološki tipovi RCC u TCGA kohorti, N (%)				
	ccRCC	pRCC	chRCC	Ukupno
N (%)	528 (60.2)	285 (32.5)	64 (7.3)	877 (100)
Godine, sv ±SD (godine)	60.1± 12.1	61.7 ±11.9	51.6 ± 13.9	60.2±12.4
Pol, N (%)				
Muškarci	344 (58.2)	209 (35.4)	38 (6.4)	591 (100)
Žene	184 (64.3)	76 (26.6)	26 (9.1)	286 (100)
Gradus, N (%)				
I	11 (2.1)			11 (100)
II	209 (39.6)	N/D	N/D	209 (100)
III	198 (37.5)			198 (100)
IV	71 (13.4)			71 (100)
N/A	39 (7.4)			39 (100)
Stadijum, N (%)				
I	249 (55.7)	179 (40.0)	19 (4.3)	447 (100)
II	64 (53.8)	30 (25.2)	25 (21.0)	119 (100)
III	173 (70.3)	55 (22.3)	18 (7.4)	246 (100)
IV	9 (34.6)	15 (57.7)	2 (7.7)	26 (100)
N/D	33 (94.3)	2 (5.7)	0 (0.0)	35 (100)

Skraćenice: TCGA, engl. The Cancer Genome Atlas; ccRCC, svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija; pRCC, papilarni karcinom bubrežnih ćelija; chRCC, hromofobni karcinom bubrežnih ćelija; N, broj; sv-srednja vrednost; SD, standardna devijacija; N/D, nije dostupno;

3.7. Fluorescentna in situ hibridizacija

Inicijalno je za FISH analizu izdvojeno 15 slučajeva aRO. Od svakog tumora je bio određen po jedan reprezentativni kalup i H&E pločica. Dva područja od interesa, jedno sa ćelijskom atipijom i jedno sa klasičnim ćelijama onkocitoma bila su obeležene flomasterom, kako bi se kasnije ova polja preciznije mogla analizirati FISH metodom na aneuploidije hromozoma. Sa parafinskih kalupa od interesa načinili su se preseki koji su stavljeni na adhezivne pločice, na kojima se izvodila FISH metoda. Tabela 9. prikazuje centromerne i lokus specifične probe koje su bile korišćene za analizu broja svih hromozoma (1-22, XY)

Pouzdana i tehnički odgovarajuća interpretacija rezultata FISH analize bila je moguća na 11 slučajeva atipičnih onkocitoma. Analiza broja hromozoma je vršena brojanjem fluorescentnih signala na najmanje 100 nasumično selektovanih nepreklapajućih jedara na prethodnom odabranim područjima od interesa. Hromozomske aberacije su klasifikovane kao:

- Monozomije, definisane kao prisustvo jednog signala po jedru/ćeliji u > 45 % jedara
- Polizomije, definisane kao 3 ili više signala u > 10 % jedara.

U zavisnosti od rezultata dobijenih FISH analizom, formirale su se sledeće grupe atipičnih onkocitoma:

- Sa aneuploidijom,
- Bez aneuploidije,
- Sa aneuploidijama pojedinačnih hromozoma.

Rezultati FISH analize na slučajevima atipičnih onkocitoma su se na kraju poredili sa imunohistohemijskom ekspresijom PRMT1 i ZEB1.

Tabela 9. Centromerne i lokus specifične probe korišćene za analizu broja svih hromozoma u atipičnim onkocitomima.

Hromozom	Proba
1	Vysis LSI 1p36 / LSI 1q25
2	Vysis CEP 2 (D2Z1)
3	Vysis CEP 3 (D3Z1)
4	Vysis CEP 4
5	Vysis EGR1 FISH Probe Kit
6	Vysis CEP 6 (D6Z1)
7	Vysis CEP 7 (D7Z1)
8	Vysis CEP 8
9	Vysis CEP 9
10	Vysis CEP 10
11	Vysis CEP 11 (D11Z1)
12	Vysis CEP 12 (D12Z3)
13	AneuVysion – Vysis LSI 13
14	Vysis LSI IGH Break Apart
15	Vysis CEP 15 (D15Z1)
16	Vysis CEP 16 (D16Z3)
17	Vysis CEP 17 (D17Z1)
18	AneuVysion - CEP 18
19	Vysis LSI 19q13/19p13
20	Vysis CEP 20 (D20Z1)
21	AneuVysion - Vysis LSI 21
22	Vysis LSI 22 (BCR)
X	AneuVysion - Vysis CEP X
Y	AneuVysion - Vysis CEP Y

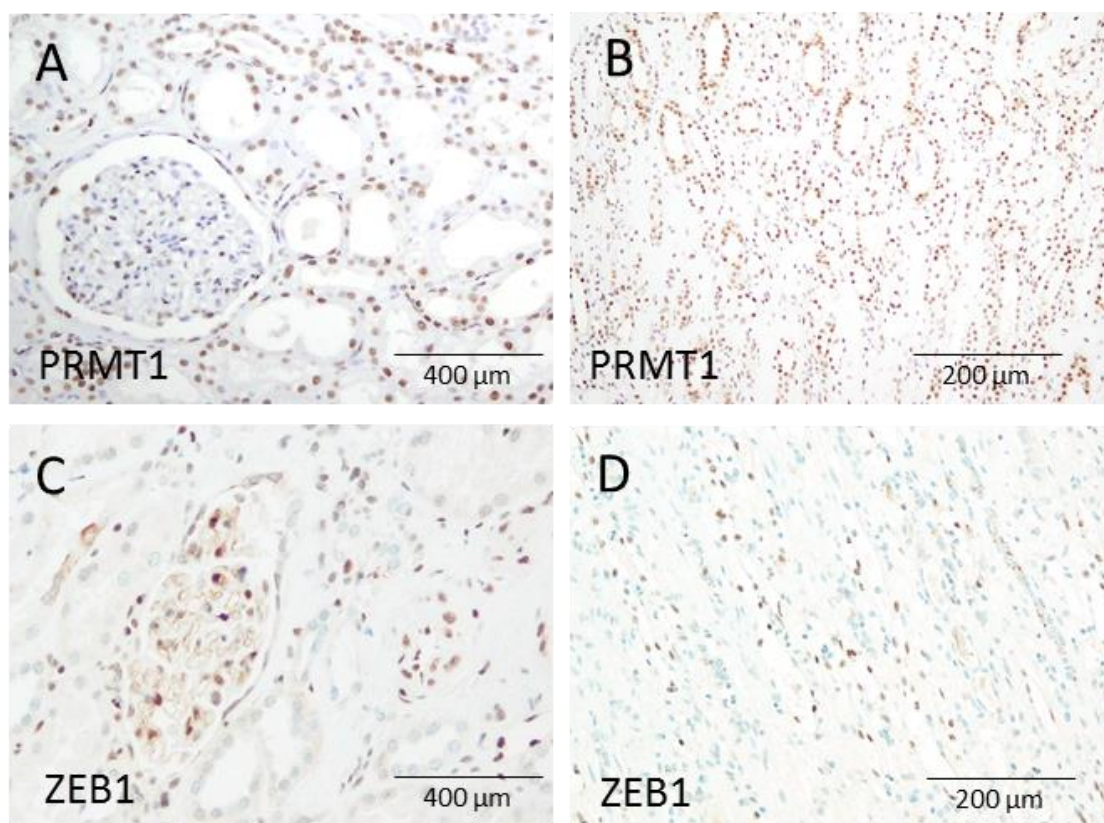
3.8. Statistička analiza

Rezultati su predstavljeni kao ukupan broj (procenat) ili srednja vrednost \pm standardna devijacija. T test, ANOVA, Mann-Whitney U test, Pirson hi kvadrat test, Fišerov test tačne verovatnoće i Kruskal Wallis test su korišćeni za grupne komparacije. Kaplan Majerove krive i Cox regresija su korišćene za analizu preživljavanja. P-vrednosti manje od 0.05 smatrane su značajne. Za statističku analizu korišćen je SPSS 20.0 (IBM corp.) statistički softver.

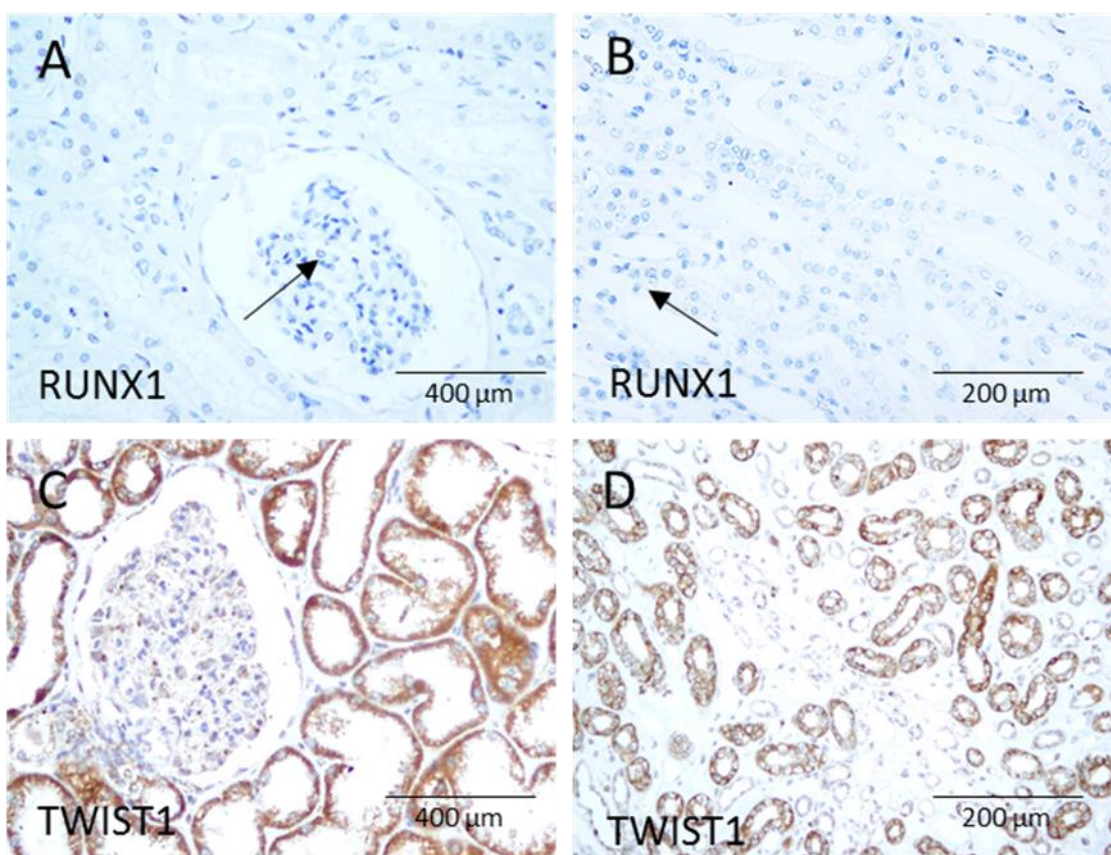
4. Rezultati

4.1. Imunohistohemijska ekspresija markera u netumorskom parenhimu

Nuklearno PRMT1 bojenje bilo je prisutno u svakom uzorku bubrežnog parenhima korišćenom kao pozitivna kontrola, nezavisno od tipa tumora. PRMT1 je bio eksprimiran u različitim strukturama korteksa i medule. U korteksu bubrežnog parenhima PRMT1 je pokazivao difuznu i jaku imunopozitivnost u epitelnim ćelijama proksimalnih i distalnih tubula, mezangijumskim ćelijama glomerula i parijetalnim ćelijama Bowmanove kapsule. PRMT1 je u meduli bio eksprimiran u epitelnim ćelijama sabirnih kanalića (Slika 20A-B). ZEB 1 je bio eksprimiran u umerenom do jakom intenzitetu u endotelnim ćelijama kapilara glomerulobazalne membrane, kao i krvnih sudova u korteksu i meduli, bez ekspresije u tubulskim epitelnim ćelijama ili epitelnim ćelijama sabirnih kanalića (Slika 20C-D). RUNX1 je imao veoma slabu imunopozitivnost u pojedinačnim ćelijama glomerula, kao i u pojedinačnim ćelijama proksimalnih, distalnih tubula i sabirnih kanalića (Slika 21A-B). TWIST1 je pokazao difuznu i jaku imunopozitivnost u citoplazmi tubulskih epitelnih ćelija i u ćelijama glomerula. U meduli se TWIST1 eksprimirao na membrani sabirnih kanalića (Slika 21C-D).



Slika 20. IHH ekspresija PRMT1 i ZEB1 u bubrežnom parenhimu. Difuzna i jaka nuklearna imunopozitivnost PRMT1 u A. epitelnim ćelijama proksimalnih i distalnih tubula, mezangijumskim ćelijama glomerula, parijetalnim ćelijama Bowmanove kapsule i B. u epitelnim ćelijama sabirnih kanalića; C-D. ZEB 1 ekspresija u endotelnim ćelijama kapilara glomerulobazalne membrane i krvnih sudova u korteksu i meduli; Originalna uveličanja 200x i 400x.



Slika 21. IHH ekspresija RUNX1 i TWIST1 u bubrežnom parenhimu. A-B. RUNX1 diskretna imunopozitivnost u pojedinačnim ćelijama glomerula, proksimalnih, distalnih tubula i sabirnih kanalića; C-D. TWIST1 difuzna i jaka imunopozitivnost u citoplazmi tubulskih epitelnih ćelija i u ćelijama glomerula, kao i na membrani sabirnih kanalića u meduli, uveličanja 200x i 400x.

4.2. Ekspresija markera u tumorskom tkivu i korelacija sa kliničko-patološkim parametrima i preživljavanjem

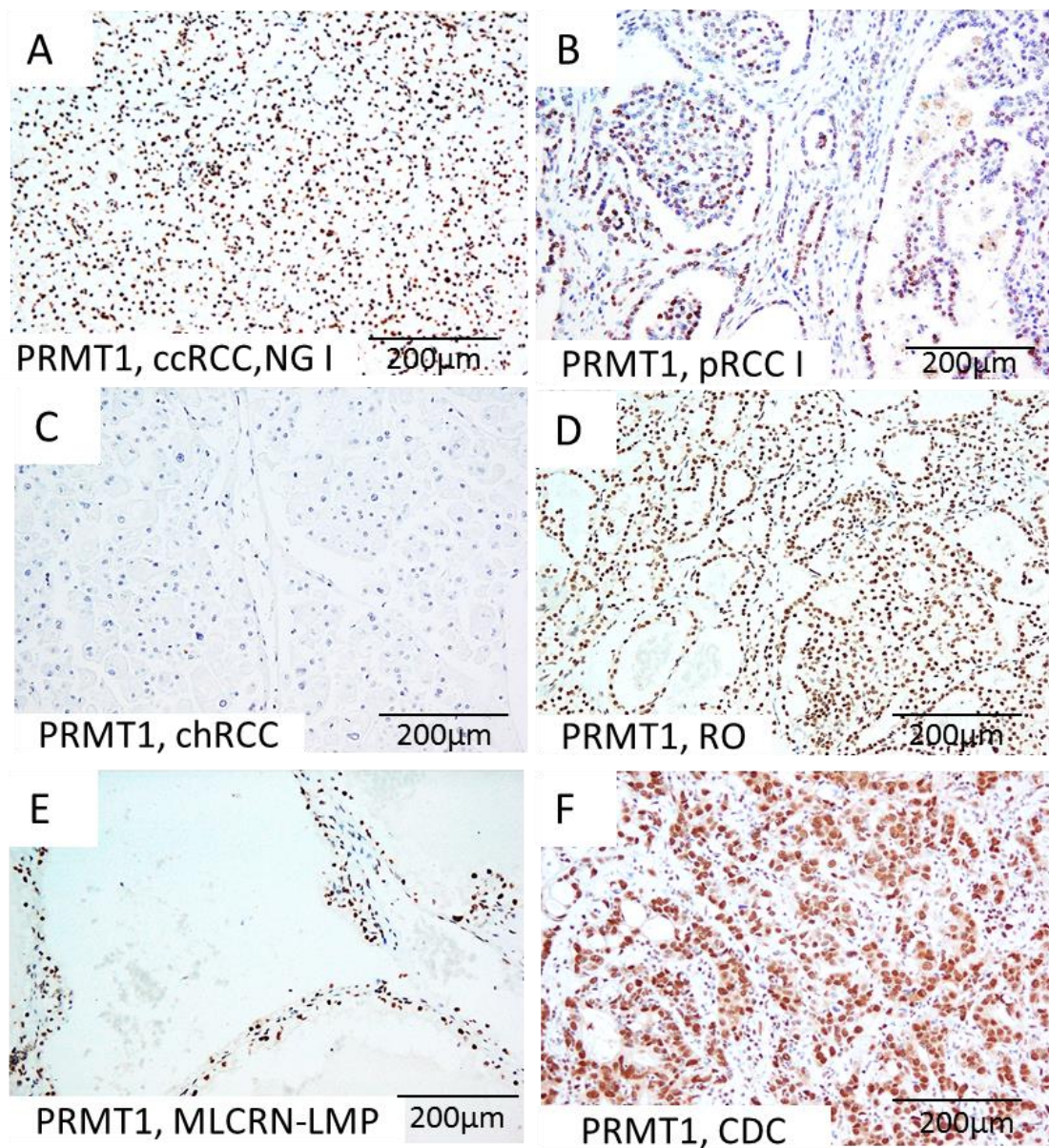
4.2.1. PRMT 1

PRMT1 ekspresija je uočena u svim analiziranim tipovima tumora, sa statističkom razlikom u učestalosti i intenzitetu ($p=0.044$; $p=0.010$, respektivno) (Tabela 10.). PRMT1 je bio ekspimiran u većini ccRCC, u manjem broju chRCC, skoro svim RO i svim MLCRN-LMP. Jak intenzitet IHH bojenja PRMT1 je imao u većini RO, MLCRN-LMP i CDC, dok je slabu imunopozitivnost imao u pRCC II i chRCC (Slika 22) (Tabela 10.) PRMT1 se u različitim tipovima tumora bubrežnih ćelija ekspimirao heterogeno ($p<0.001$) (Tabela 11.). PRMT1 ekspresija je među ccRCC bila uglavnom heterogena, u većem broju slučajeva chRCC homogeno negativna, dok je veći broj RO homogeno ekspimirao PRMT1 (Slika 23). Homogeno pozitivna ili homogeno negativna PRMT1 ekspresija na TMN, odgovarala je istom obrascu ekspresije na celim presecima istih slučajeva, bez obzira na tip tumora i nuklearni gradus. Heterogena PRMT1 ekspresija na TMN, odgovarala je istom subkapsularnom i retkom perifernom području i/ili centralnim zonama na analiziranim konvencionalnim presecima istih slučajeva (Tabela 11).

Tabela 10. Imunohistochemijska ekspresija PRMT1 u različitim tipovima tumora bubrežnih ćelija

PRMT1 EKSPRESIJA NA TMN					
PH TIP	OBIM, N (%)		INTEZITET, N (%)		
	pozitivno	negativno	slab	umeren	jak
CCRCC	73 (60.8)	47 (39.2)	22 (30.2)	28 (38.3)	23 (31.5)
PRCC I	4 (57.1)	3 (42.9)	0 (0.0)	2 (50.0)	2 (50.0)
PRCC II	12 (75.0)	4 (25.0)	2 (16.7)	7 (58.3)	3 (25.0)
CHRCC	12 (42.8)	16 (57.2)	3 (25.0)	2 (16.7)	7 (58.3)
RO	24 (96.0)	1 (4.0)	0 (0.0)	4 (16.7)	20 (83.3)
CDC	5 (71.4)	2 (28.6)	0 (0.0)	2 (40.0)	3 (60.0)
MLCRNLMP	5 (100)	0 (0.0)	1 (20.0)	1 (20.0)	3 (60.0)
p	0.044*		0.010*		

Skraćenice: PRMT1- protein arginin metil transferaza 1; PH-patohistološki; ccRCC- svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija; pRCC I- papilarni karcinom bubrežnih ćelija tip I; pRCC II- papilarni karcinom bubrežnih ćelija tip II; chRCC- hromofobni karcinom bubrežnih ćelija; RO- onkocitom; CDC- karcinom sabirnih kanalića; MLCRN-LMP- multilokularna renalna cistična neoplazma niskog malignog potencijala; TMN- tkivni mikroniz; N-broj; P-vrednosti verovatnoća; *- statistički značajna p vrednost.

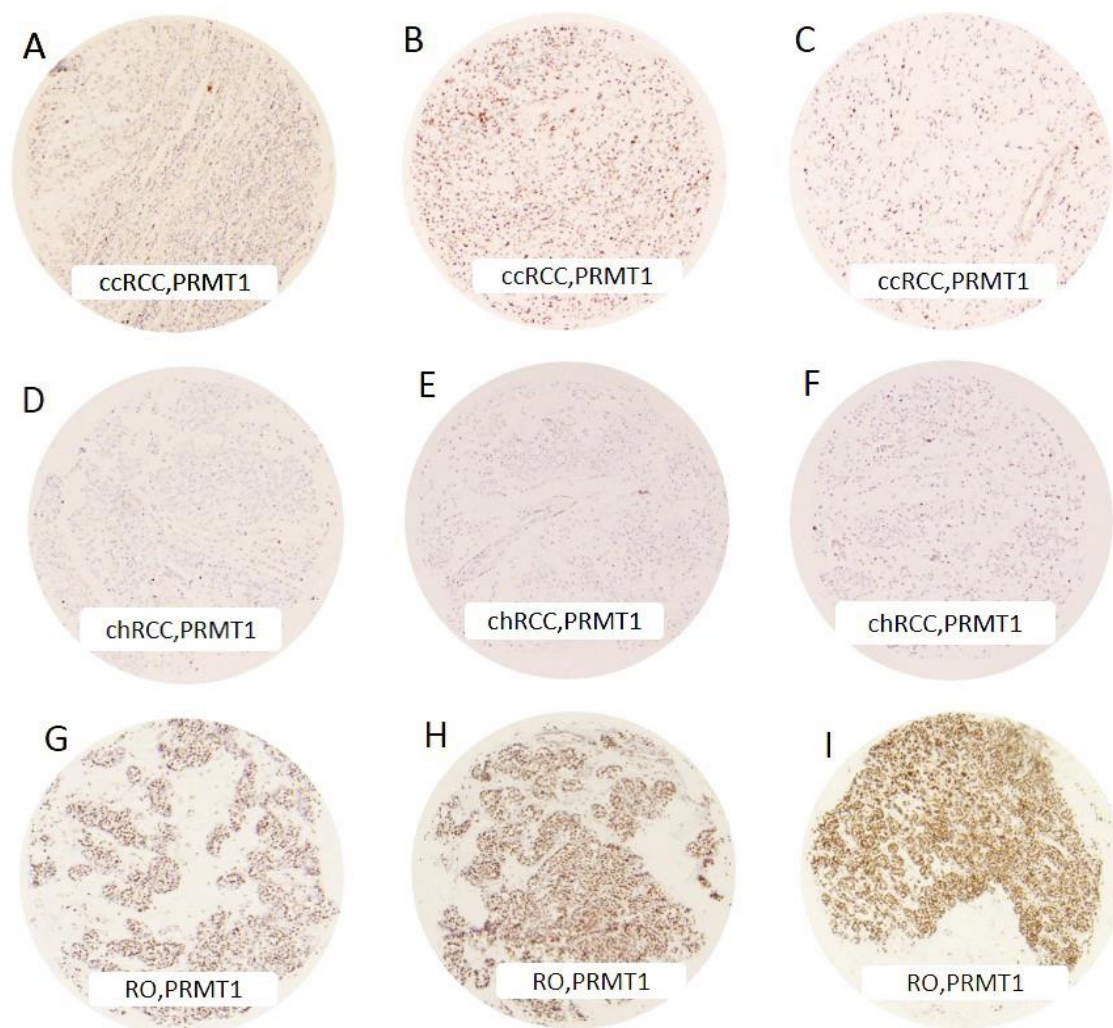


Slika 22. Ekspresija PRMT1 u različitim tipovima tumora bubrega. A-B Difuzna nuklearna PRMT1 ekspresija u ccRCC i pRCC; C. Odsustvo PRMT1 u većem broju slučajeva chRCC, za razliku od D. difuzne i jake nuklearne PRMT1 ekspresije u RO; E-F. Jaka i difuzna nuklearna PRMT1 ekspresija u CDC i MLCRN-LMP, uveličanje 200x.

Tabela 11. Heterogenost PRMT1 imunohistohemijske ekspresije među različitim tipovima tumora bubrežnih ćelija.

PRMT1 EKSPRESIJA NA TMN, N (%)				
PH tip	Homogeno pozitivni	Heterogeni	Homogeno negativni	Ukupno
ccRCC	24 (20.0)	49 (40.8)	47 (39.2)	120 (100)
pRCC I	2 (28.6)	2 (28.6)	3 (42.8)	7 (100)
pRCC II	3 (18.7)	9 (56.3)	4 (25.0)	16 (100)
chRCC	7 (25.0)	5 (17.8)	16 (57.2)	28 (100)
RO	18 (72.0)	6 (24.0)	1 (4.0)	25 (100)
CDC	3 (43.0)	2 (28.5)	2 (28.5)	7 (100)
MLCRN-LMP	3 (60.0)	2 (40.0)	0 (0.0)	5 (100)
p		<0.001*		

Skraćenice: PRMT1- protein arginin metil transferaza 1; PH-patohistološki; ccRCC- svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija; pRCC I- papilarni karcinom bubrežnih ćelija tip I; pRCC II- papilarni karcinom bubrežnih ćelija tip II; chRCC- hromofobni karcinom bubrežnih ćelija; RO- renalni onkocitom; CDC- karcinom sabirnih kanalića; MLCRN-LMP- multilokularna renalna cistična neoplazma niskog malignog potencijala; TMN- tkivni mikroniz; N-broj; P-vrednosti verovatnoća; *- statistički značajna p vrednost.



Slika 23. Reprezentativne mikrofotografije PRMT1 ekspresije u ccRCC, chRCC i RO tkivnog mikroniza. (A-C) Heterogena nuklearna ekspresija PRMT1 jakog intenziteta bila je uočena u većini ccRCC; (D-F) Homogeno odsustvo PRMT1 ekspresije bilo je uočeno u chRCC, (G-I). dok je homogeno pozitivna nuklearna ekspresija PRMT1 jakog intenziteta bila prisutna u RO; Originalno uvećanje, x40.

Tabela 12. PRMT1 imunohistohemijska ekspresija na tkivnom mikronizu i odgovarajućim konvencionalnim presecima.

PH TIP	PRMT1 EKSPRESIJA NA TMN i CELIM PRESECIMA, N (%)			
	Homogeno pozitivno	Heterogeno	Homogeno negativno	Ukupno
ccRCC ng.	2 (28.6)	4 (57.1)	1 (14.3)	7 (100)
ccRCC vg.	0 (0.0)	3(37.5)	5 (62.5)	8 (100)
pRCC I	2 (66.7)	1 (33.3)	0 (0.0)	3 (100)
pRCC II ng.	1 (50.0)	0 (0.0)	1 (50.0)	2 (100)
pRCC II vg.	0 (0.0)	2 (40.0)	3 (60.0)	5 (100)
chRCC	1 (10.0)	3 (30.0)	6 (60.0)	10 (100)
RO	8 (80.0)	2 (20.0)	0 (0.0)	10 (100)

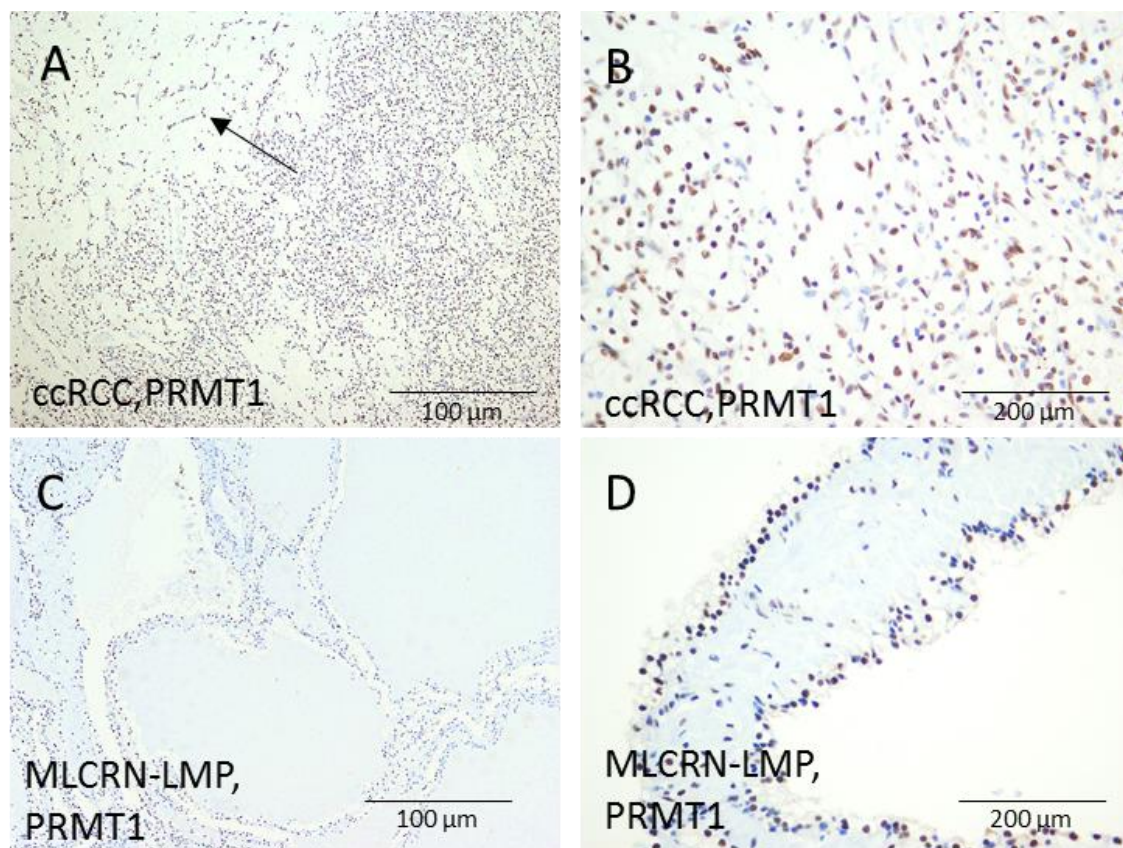
Skraćenice: PRMT1- protein arginin metiltransferaza 1; PH-patohistološki; TMN- tkivni mikroniz; ccRCC- svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija; pRCC I- papilarni karcinom bubrežnih ćelija, tip I; pRCC II- papilarni karcinom bubrežnih ćelija, tip II; ng-niski gradus; vg- visoki gradus; chRCC- hromofobni karcinom bubrežnih ćelija; RO-onkocitom; N-broj.

U grupi uzoraka u kojoj su korišćeni samo celi preseci ccRCC niskog gradusa, MLCRN-LMP, RO i aRO, najveći broj slučajeva je difuzno ekspresirao PRMT1 jakog intenziteta, za razliku od slučajeva chRCC u kojima je uočena fokalna PRMT1 ekspresija, slabog intenziteta ($p < 0.001$) (Tabela 13.) (Slika 24 i Slika 25). Iz tehničkih razloga, jedan slučaj MLCRN-LMP i RO nije bilo moguće analizirati.

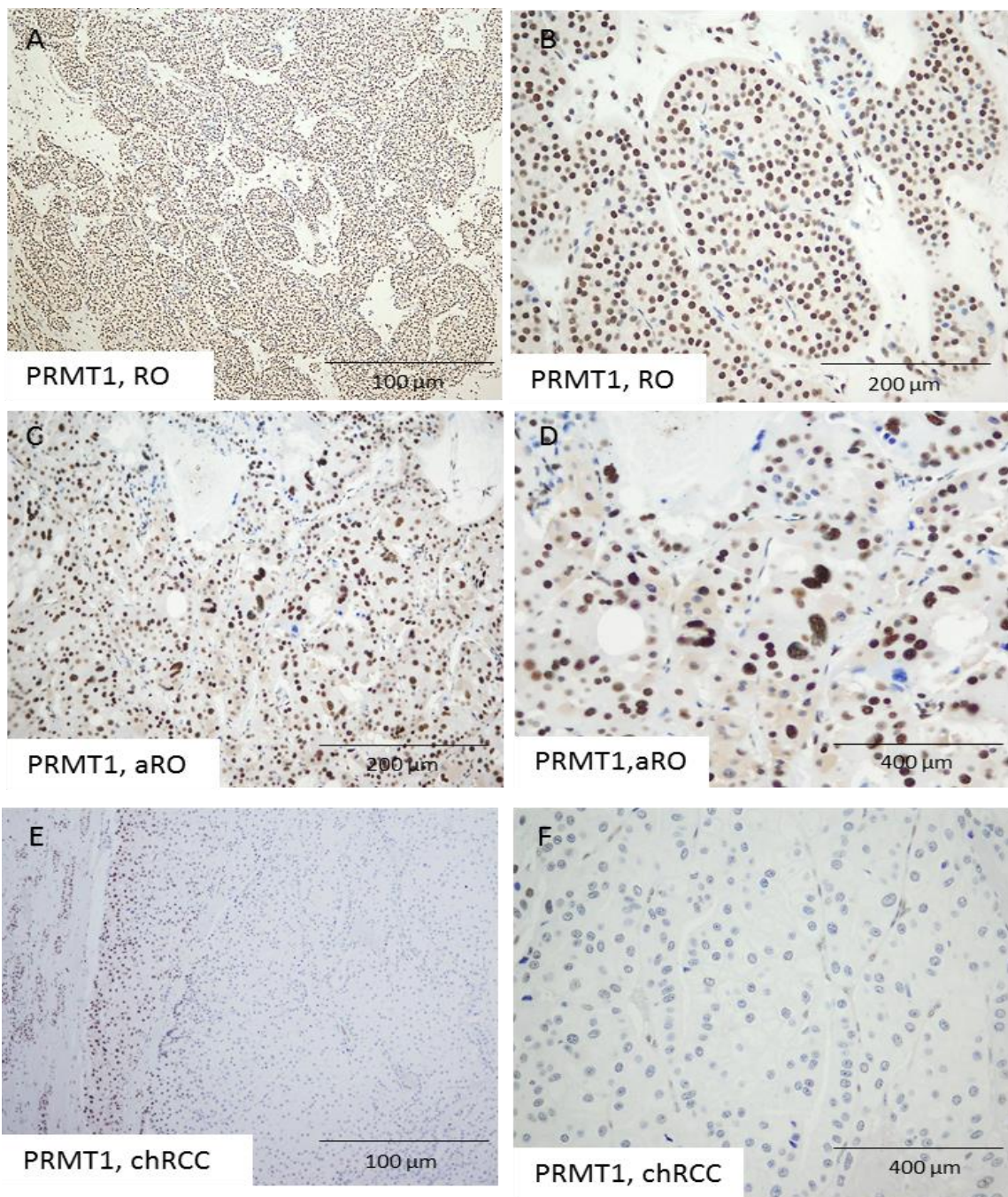
Tabela 13. Imunohistohemijaska ekspresija PRMT1 na celim presecima ccRCC niskog gradusa, MLCRN-LMP, chRCC, RO i aRO.

PRMT1	PRMT1 EKSPRESIJA na CELIM PRESECIMA, N (%)						
	OBIM	ccRCC	MLCNLMP	chRCC	RO	aRO	p
Difuzno		19 (100)	15 (93.7)	3 (11.1)	23 (95.9)	15 (100)	
Fokalno		0 (0.0)	1 (6.3)	23 (85.2)	1 (4.1)	0 (0.0)	<0.001*
Negativno		0 (0.0)	0 (0.0)	1 (3.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Ukupno		19 (100)	16 (100)	27 (100)	24 (100)	15 (100)	
INTENZITET							
Jako		13 (68.4)	13 (81.2)	5 (19.2)	22 (91.6)	14 (93.4)	
Umereno		6 (31.6)	3 (18.7)	10 (2.6)	1 (4.2)	1 (6.6)	<0.001*
Slabo		0 (0.0)	0 (0.0)	11 (42.3)	1 (4.2)	0 (0.0)	

Skraćenice: PRMT1- protein arginin metiltransferaza 1; PH-patohistološki; ccRCC- svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija; MLCRN-LMP- multilokularna cistična renalna neoplazma niskog malignog potencijala; chRCC- hromofobni karcinom bubrežnih ćelija; RO- renalni onkocitom; a-atipični; N-broj; p-vrednosti verovatnoća; * statistički značajne p vrednosti.



Slika 24. PRMT1 ekspresija u ccRCC niskog gradusa i MLCRN-LMP. Difuzna nuklearna ekspresija PRMT1 jakog intenziteta, bila je uočena u A-D. ccRCC gradusa I, sa izraženim regresivnim promenama u vidu hijalinizacije i fibroze i sa propratnim gubitkom tumorskih ćelija (strelica) i MLCRN-LMP; originalna uveličanja 100x i 200x.



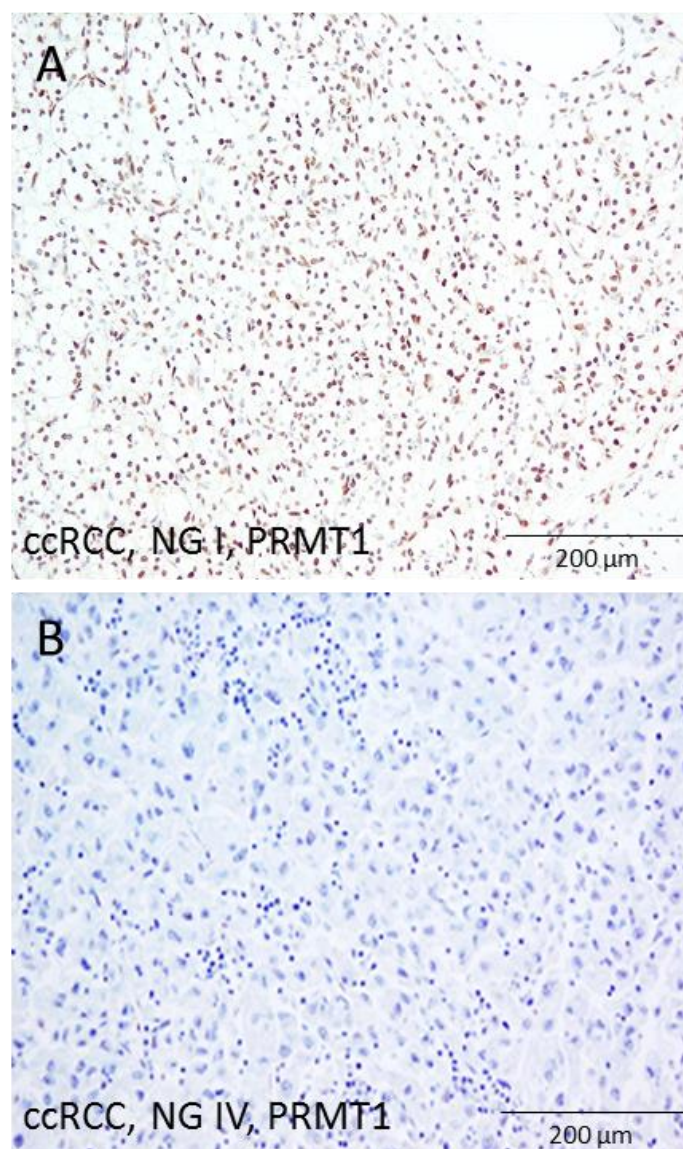
Slika 25. PRMT1 ekspresija u RO, aRO i chRCC. A.-D. Difuzna nuklearna ekspresija jakog intenziteta uočena je u RO i aRO, dok je E-F. U chRCC ekspresija bila fokalna, slabog intenziteta i uglavnom lokalizovana na periferiji; originalna uveličanja 100x, 200x i 400x.

Statistička analiza je pokazala udruženost PRMT1 ekspresije sa kliničko-patološkim parametrima samo u ccRCC. PRMT1 ekspresija je bila udružena sa ccRCC niskog gradusa i niskog stadijuma ($p=0.009$; $p=0.046$, respektivno) (Tabela 14; Slika 26). Pol, godine i veličina tumora nisu bili udruženi sa PRMT1 ekspresijom. Statistički značajno bolje preživljavanje bilo je uočeno kod pacijenata sa ccRCC, ekspresijom PRMT1, visokim nuklearnim gradusom tumora i visokim stadijumom tumorske bolesti (Grafikon 1). Univarijantna analiza je pokazala da je PRMT1 jedan od značajnih prediktora tumor specifičnog preživljavanja kod pacijenata sa ccRCC (Tabela 15).

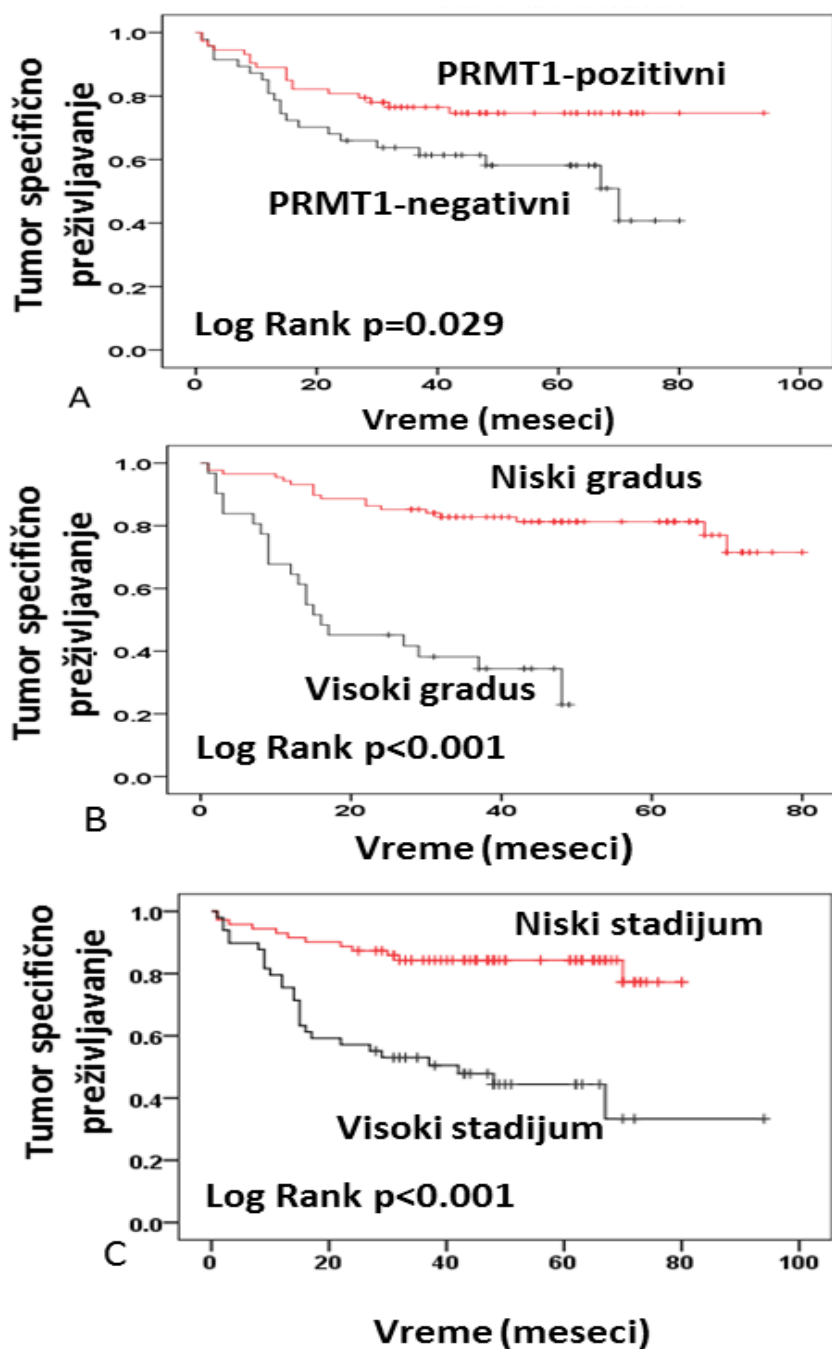
Tabela 14. PRMT1 ekspresija u ccRCC i korelacija sa kliničko-patološkim parametrima

PRMT1 EKSPRESIJA			
Varijabla	Pozitivno, N (%)	Negativno, N (%)	p
Gradus			
I/II	61 (68.5)	28 (31.5)	0.009*
III/IV	13 (41.9)	18 (58.1)	
Stadijum			
pT1/pT2	49 (69.0)	22 (31.0)	0.046*
pT3/pT4	25 (51.0)	24 (49.0)	
Pol			
Muškarci	44 (55.7)	35 (44.3)	0.110
Žene	29 (70.7)	12 (29.3)	
Starost,	61±9.45	62.6±8.38	0.346
srednja vrednost±SD (godine)			
Veličina tumora,	67±48.75	74.5±32.3	0.362
srednja vrednost ±SD (mm)			

Skraćenice: PRMT1-protein arginin metiltransferaza 1; SD- standardna devijacija; N- broj; mm-milimetri; p-vrednosti verovatnoća; *-statistički značajne p vrednosti.



Slika 26. Ekspresija PRMT1 u ccRCC različitog gradusa. A. PRMT1 je bio eksprimiran u većem broju ccRCC niskog gradusa; B. dok je odsustvo PRMT1 ekspresije bilo učestalije kod ccRCC visokog gradusa, uveličanje 200x.



Grafikon 1. Kaplan-Majer krive tumor specifičnog preživljavanja pacijenata sa ccRCC, u odnosu na PRMT1 ekspresiju, nuklearni gradus i stadijum tumorske bolesti (n=120). A. Pacijenti sa PRMT1 ekspresijom su imali bolje preživljavanje, u poređenju sa pacijentima bez PRMT1 ekspresije; B. Pacijenti sa nižim gradusom su imali bolje preživljavanje od pacijenata sa visokim gradusom; C. Pacijenti u nižem stadijumu tumorske bolesti su imali bolje preživljavanje od pacijenata u višem stadijumu bolesti.

Tabela 15. Univarijantna i multivarijantna analiza tumor-specifičnog preživljavanja kod pacijenta sa ccRCC.

Prognostički faktor	Tumor-specifično preživljavanje (meseći)				Univarijantna analiza		Multivarijantna analiza	
	Svi tipovi sv (95% IP)	p	ccRCC sv (95% CI)	p	HR (95% IP)	p	HR (95% IP)	p
	PRMT1							
pozitivno	78 (73-84)		74 (66-82)		0.504 (0.269-0.947)			
negativno	56 (48-63)	0.009*	51 (42-61)	0.029*	Ref.	0.033*	0.622 (0.326-1.188)	0.150
ZEB1								
pozitivno	83 (76-91)		80 (70-90)		0.344 (0.140-0.801)			
negativno	68 (61-74)	0.011*	52 (45-60)	0.009*		0.014*	0.367 (0.152-0.889)	0.026*
RUNX1								
pozitivno	75 (68-82)		67 (60-74)		0.872 (0.463-1.644)		N/D	
negativno	69 (61-78)	0.937	57 (48-66)	0.506		0.673		
TWIST1								
pozitivno	73 (68-78)		67 (60-74)		1.168 (0.159-8.553)		N/D	
negativno	54 (34-75)	0.886	54 (34-75)	0.878		0.879		
Gradus								
Nizak	N/D		67 (62-72)		5.802 (3.000-11.222)		6.284 (3.175-12.438)	
Visok			25 (18-32)	<0.001*		<0.001*		<0.001*
Stadijum								
Nizak	N/D		69 (63-75)		1.062 (0.849-1.330)		1.187 (0.912-1.547)	
Visok			48 (36-60)	<0.001*		0.597		0.203
Pol								
Muškarci	75 (66-83)		58 (51-65)		1.123 (0.569-2.218)		N/D	
Žene	72 (66-78)	0.686	70 (58-81)	0.736		0.737		

Skraćenice: PRMT1, protein arginin metiltransferaza 1; ZEB1, engl. Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1; RUNX1, engl. Runt-related transcription factor 1; TWIST1, engl. Twist Family BHLH Transcription Factor 1; sv-srednja vrednost; IP-interval poverenja; ref, referentna vrednost; N/D-nije dostupno; p-vrednosti verovatnoća; *statistički značajna p vrednost.

Homogeni gubitak PRMT1 ekspresije je bio uočen kod većeg broja slučajeva ccRCC visokog gradusa, visokog stadijuma i pacijenata sa smrtnim ishodom (p=0.015, p=0.040, p=0.044, respektivno) (Tabela 16).

Homogena imunopozitivnost bila udružena sa najmanjom prosečnom dimenzijom tumora, naročito u poređenju sa grupom homogeno negativnih slučajeva (p=0.005, p=0.001, respektivno).

PRMT1 EKSPRESIJA, N (%)				
Varijabla	Homogeno pozitivni	Heterogeni	Homogeno negativni	p
Gradus				
I/II	22 (24.7)	39 (43.8)	28 (31.5)	0.015*
III/IV	2 (6.5)	11 (35.5)	18 (58.0)	
Veličina tumora sv±SD (mm)	50.6±35.8	73.7±52.0	75.4±32.1	0.005* 0.001*
Stadijum				
pT1/pT2	19 (26.8)	30 (42.2)	22 (31.0)	0.040*
pT3/pT4	5 (10.2)	20 (40.8)	24 (49.0)	
Ishod				
Umrlji	4 (10.2)	14 (36.0)	21 (53.8)	0.044*

Tabela 16. Korelacija heterogenosti imunohistohemijske PRMT1 ekspresije u ccRCC različitog gradusa, veličine tumora, stadijuma i ishoda tumorske bolesti.

Skraćenice: PRMT1- protein arginin metiltransferaza 1; SD- standardna devijacija; N- broj; p-vrednosti verovatnoća; *-statistički značajne p vrednosti; mm- milimetri.

4.2.2. ZEB 1

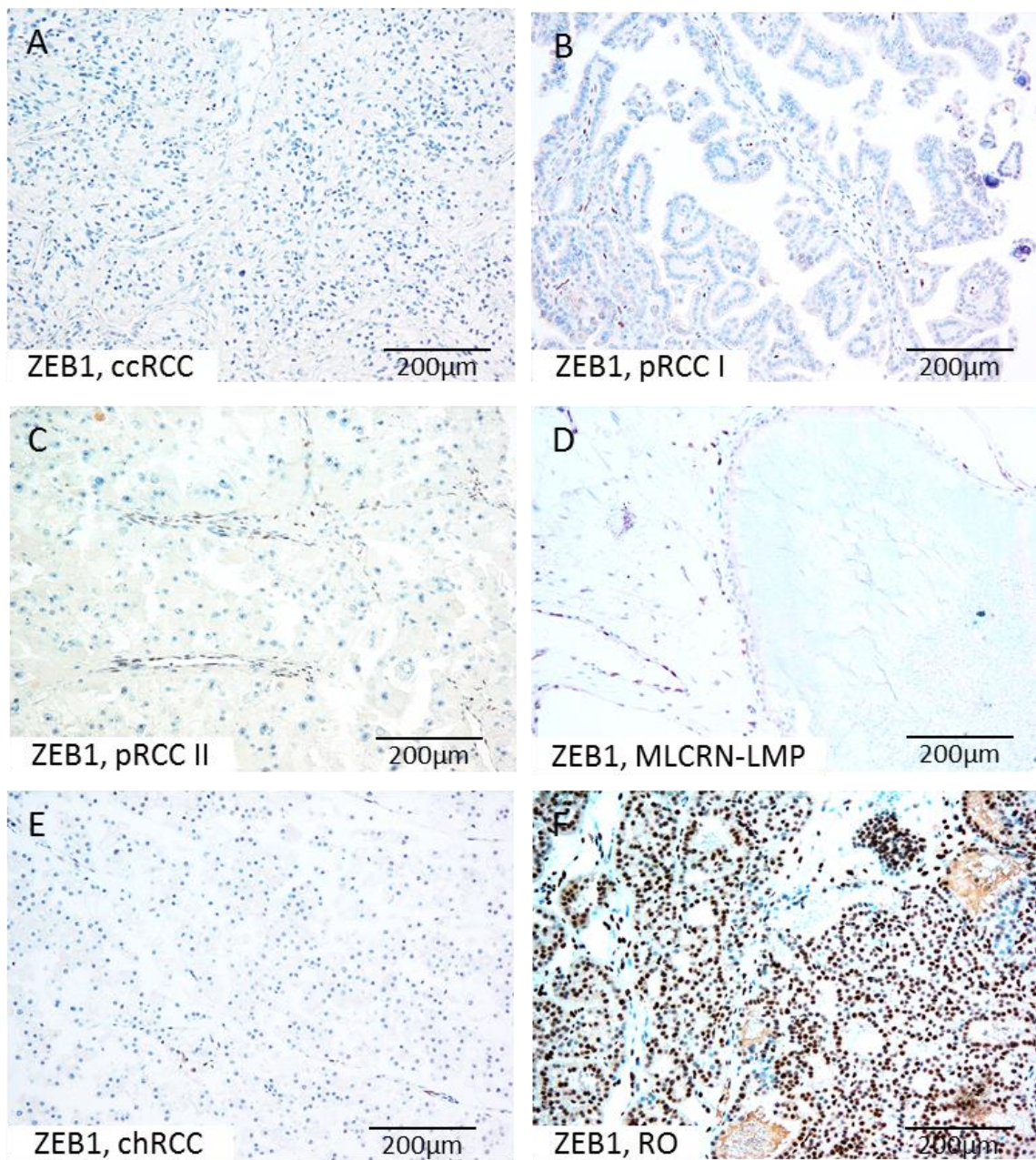
Imunohistohemijaska ekspresija ZEB1 uočena je u većini analiziranih tipova tumora bubrega u različitoj učestalosti i u različitom intenzitetu ($p < 0.001$)

ZEB1 imunopozitivnost je bila prisutna u manjem broju slučajeva ccRCC, pRCC, chRCC i CDC, uglavnom slabog intenziteta i ni u jednom od MLCRN-LMP. Skoro svi slučajevi RO su ekspresirali ZEB1, u različitom intenzitetu (Tabela 17; Slika 27).

Tabela 17. Imunohistohemijaska ekspresija ZEB1 u različitim tipovima tumora bubrežnih ćelija.

ZEB1 EKSPRESIJA NA TMN					
PH TIP	OBIM, N (%)		INTEZITET, N (%)		
	pozitivno	negativno	slab	umeren	jak
CCRCC	36 (31.3)	79 (68.7)	22 (61.1)	10 (27.8)	4 (11.1)
PRCC I	0 (0.0)	7 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
PRCC II	1 (6.3)	15 (93.7)	1 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)
CHRCC	2 (7.4)	25 (92.6)	2 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)
RO	24 (96.0)	1 (4.0)	9 (37.5)	11 (45.8)	4 (16.7)
CDC	2 (28.6)	5 (71.4)	1 (50.0)	1 (50.0)	0 (0.0)
MLCRN-LMP	0 (0.0)	5 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
p	<0.001*		<0.001*		

Skraćenice: ccRCC- svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija; pRCC I- papilarni karcinom bubrežnih ćelija tip I; pRCC II- papilarni karcinom bubrežnih ćelija tip II; chRCC- hromofobni karcinom bubrežnih ćelija; RO- onkocitom; CDC- karcinom sabirnih kanalića; MLCRN-LMP- multilokularna renalna cistična neoplazma niskog malignog potencijala; TMN- tkivni mikroniz; N-broj; p-vrednosti verovatnoća; * -statistički značajna p vrednost; PH-patohistološki.



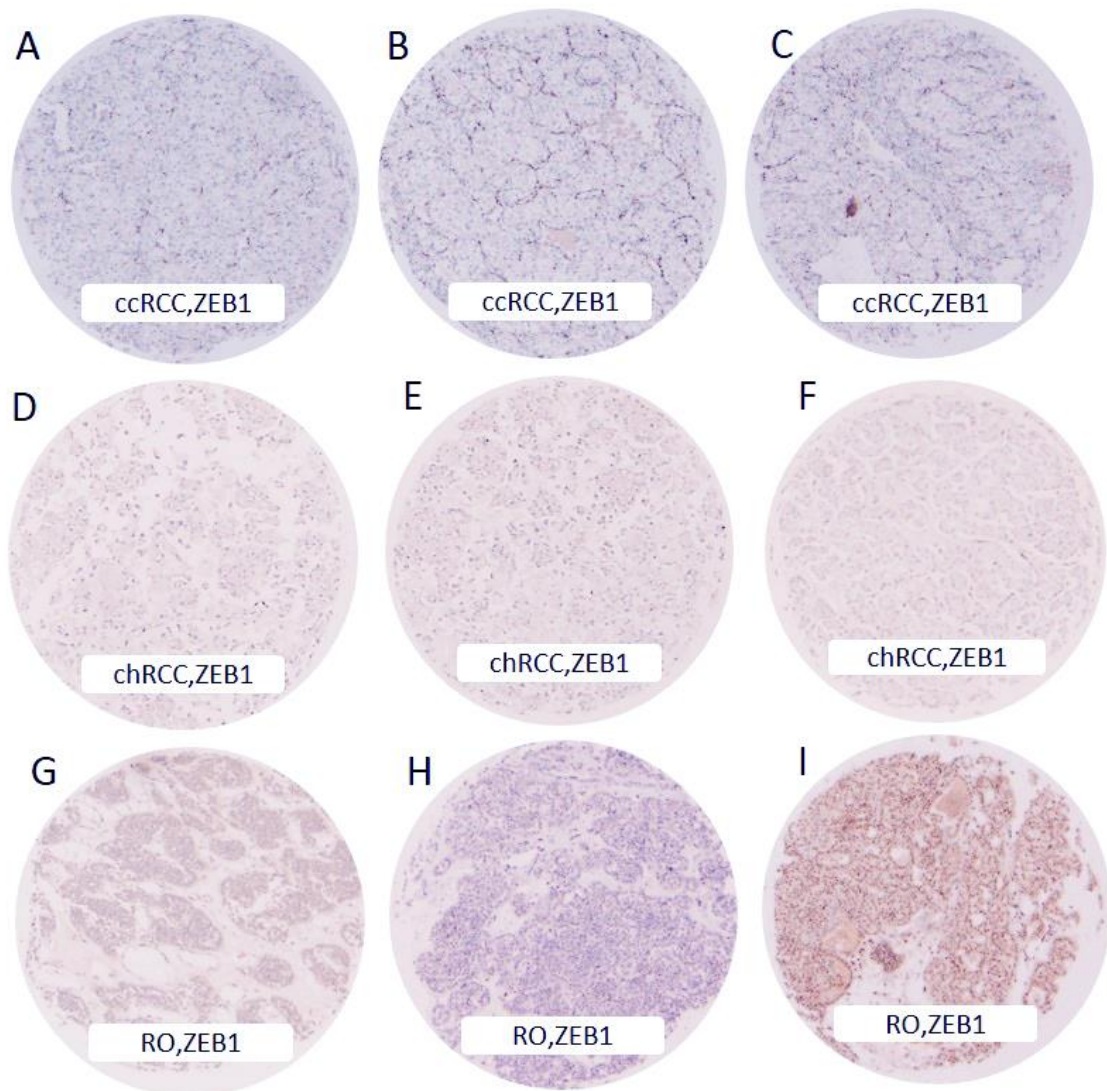
Slika 27. Nuklearna ekspresija ZEB1 u različitim tipovima tumora bubrega. A-E. ZEB1 je bio negativan u većini ccRCC, pRCC, MLCRN-LMP i chRCC, za razliku od F. difuzne i jake imunopozitivnosti u RO, uvećanje 200x.

Statistički značajna heterogenost uočena je i u ZEB1 ekspresiji ($p < 0.001$) (Tabela 18). U većini ccRCC i chRCC bilo je uočeno homogeno odsustvo ZEB1 ekspresije, dok je u većem broju RO bila prisutna heterogena ZEB1 ekspresija (Slika 28).

Tabela 18. Heterogenost ZEB1 imunohistohemijske ekspresije među različitim tipovima tumora bubrega.

ZEB1 EKSPRESIJA NA TMN, N (%)				
PH TIP	Homogeno pozitivno	Heterogeno	Homogeno negativno	Ukupno
ccRCC				115
	4 (3.5)	32 (27.8)	79 (68.7)	(100)
pRCC I	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (100)	7(100)
pRCC II	0 (0.0)	1 (6.6)	15 (93.4)	16 (100)
chRCC	0 (0.0)	2 (7.4)	25 (92.6)	27 (100)
RO	6 (24.0)	18 (72.0)	1 (4.0)	25 (100)
CDC	0 (0.0)	2 (28.6)	5 (71.4)	7 (100)
MLCRNLM				5 (100)
P	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (100)	
p		<0.001*		

Skraćenice: ZEB1- engl. Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1; PH-patohistološki; ccRCC- svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija; pRCC I- papilarni karcinom bubrežnih ćelija tip I; pRCC II- papilarni karcinom bubrežnih ćelija tip II; chRCC- hromofobni karcinom bubrežnih ćelija; RO- onkocitom; CDC- karcinom sabirnih kanalića; MLCRN-LMP- multilokularna renalna cistična neoplazma niskog malignog potencijala; N-broj; p- vrednost verovatnoća; *-statistički značajna p vrednost.



Slika 28. Reprezentativne mikrofotografije ZEB1 nuklearne ekspresije u ccRCC, chRCC i RO tkivnog mikroniza. A-F. Homogeno odsustvo ZEB1 ekspresije u ccRCC i u chRCC, za razliku od G-I heterogene nuklearne ekspresije jakog intenziteta u RO. Originalno uvećanje, x400.

Homogeno pozitivna ili homogeno negativna ZEB1 ekspresija na TMN, odgovarala je istom obrascu ekspresije na celim presecima istih slučajeva, bez obzira na tip tumora i nuklearni gradus. Heterogena ZEB1 ekspresija na TMN, odgovarala je istom subkapsularnom, retkim perifernim i/ili centralnim zonama na analiziranim konvencionalnim presecima (Tabela 19).

Tabela 19. ZEB1 imunohistohemijska ekspresija na tkivnom mikronizu i odgovarajućim konvencionalnim presecima.

PH TIP	ZEB1 EKSPRESIJA na TMN i CELIM PRESECIMA, N (%)			
	Homogeno pozitivno	Heterogeno	Homogeno negativno	Ukupno
ccRCC ng.	3 (42.8)	3 (42.9)	1 (14.3)	7 (100)
ccRCC vg.	0 (0.0)	2 (25.0)	6 (75.0)	8 (100)
pRCC I	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (100)	3 (100)
pRCC II ng.	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (100)	2 (100)
pRCC II vg.	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (100)	5 (100)
chRCC	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (100)	10 (100)
RO	2 (20.0)	7 (70.0)	1 (10.0)	10 (100)

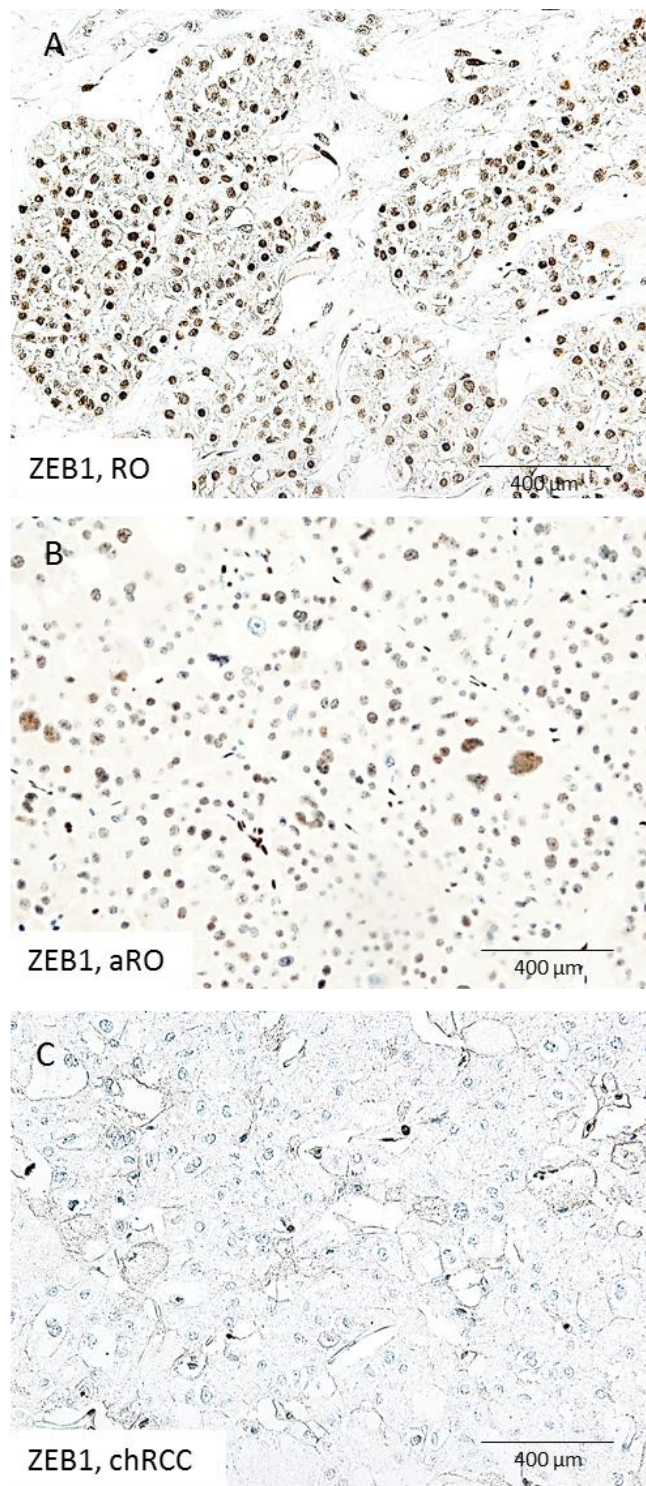
Skraćenice: ZEB1- engl. Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1; TMN- tkivni mikroniz; ccRCC- svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija; pRCC I- papilarni karcinom bubrežnih ćelija tip I; pRCC II- papilarni karcinom bubrežnih ćelija tip II; chRCC- hromofobni karcinom bubrežnih ćelija; RO- onkocitom; ng-niski gradus; vg-visoki gradus; N-broj; PH-patohistološki.

U grupi uzoraka celih preseka, difuzna ekspresija ZEB1, umerenog do jakog intenziteta bila je uočena u većini klasičnih RO i svim aRO, dok je u većini chRCC ZEB1 ekspresija bila odsutna (<0.001) (Tabela 20) (Slika 29). Jedan slučaj RO usled tehničkih razloga nije bilo moguće interpretirati.

Tabela 20. ZEB1 imunopozitivnost na celim presecima klasičnih RO, atipičnih RO i chRCC.

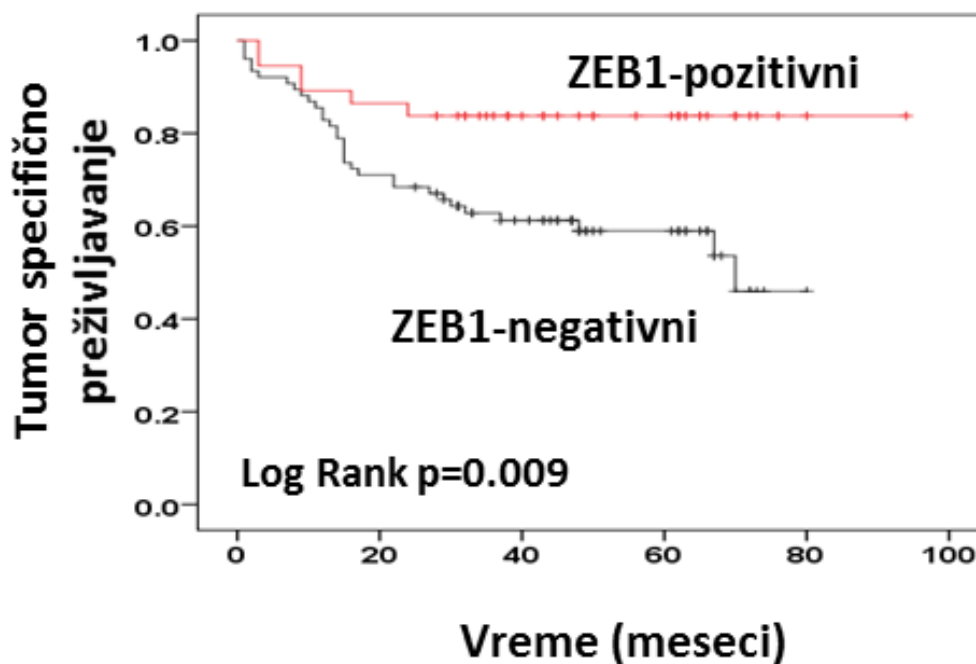
ZEB1 EKSPRESIJA na CELIM PRESECIMA, N (%)				
OBIM	RO (klasični)	aRO	chRCC	p
difuzno	21/24 (87.5)	15/15 (100)	1/27 (3.7)	<0.001*
fokalno	3/24 (12.5)	0/0 (0.0)	3/27 (11.1)	
negativno	0/24 (0)	0/0 (0.0)	23/27 (85.2)	
INTENZITET				
Slabo	3/24 (12.5)	1/15 (6.7)	4/4 (100)	<0.001*
Umereno	11/24 (45.8)	11/15 (73.3)	0/4 (0.0)	
Jako	10/24 (41.7)	3/15 (20.0)	0/4 (0.0)	

Skraćenice: RO-onkocitomi; a- atipični; chRCC-hromofobni karcinomi bubrežnih ćelija; N-broj; p-vrednosti verovatnoća; *-statistički značajna p-vrednost.



Slika 29. Nuklearna ekspresija ZEB1 na celim presecima klasičnih RO, aRO i chRCC. (A-C). Difuzna ekspresija ZEB1 jakog intenziteta uočena je u klasičnim RO i aRO, za razliku od (E-F). odsustva ZEB1 ekspresije u većini chRCC. Originalno uvećanje 400x.

ZEB1 ekspresija nije bila u kliničko-patološkoj korelaciji sa ni sa jednim od analiziranih tipova RCT. Međutim, statistički značajno bolje preživljavanje bilo je uočeno kod pacijenata sa ccRCC koji su ekspimirali ZEB1 (Grafikon 2).



Grafikon 2. Kaplan-Meier krive tumor specifičnog preživljavanja pacijenata sa ccRCC u odnosu na ZEB1 ekspresiju (n=120). Pacijenti sa ekspresijom ZEB1 imali su statistički značajno bolje preživljavanje u poređenju sa pacijentima sa odsustvom ZEB1 ekspresije.

Osim toga, multivarijantna analiza pokazala je da je ekspresija ZEB1, bila nezavisni pokazatelj tumor specifičnog preživljavanja kod pacijenata sa ccRCC (Tabela 15). Takođe, većina pacijenata sa smrtnim ishodom imala je homogeno odsustvo ZEB1 ekspresije ($p=0.009$) (Tabela 21).

Tabela 21. Poređenje heterogenosti ZEB1 ekspresije i ishoda pacijenata sa ccRCC.

ZEB1	Umrli	p
Homogeno pozitivni	0/38 (0.0)	
Heterogeni	5/38 (13.1)	0.009*
Homogeno negativni	33/38 (86.9)	

Skraćenice: ZEB1- engl. Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1; p-vrednosti verovatnoća; *-statistički značajna p vrednost.

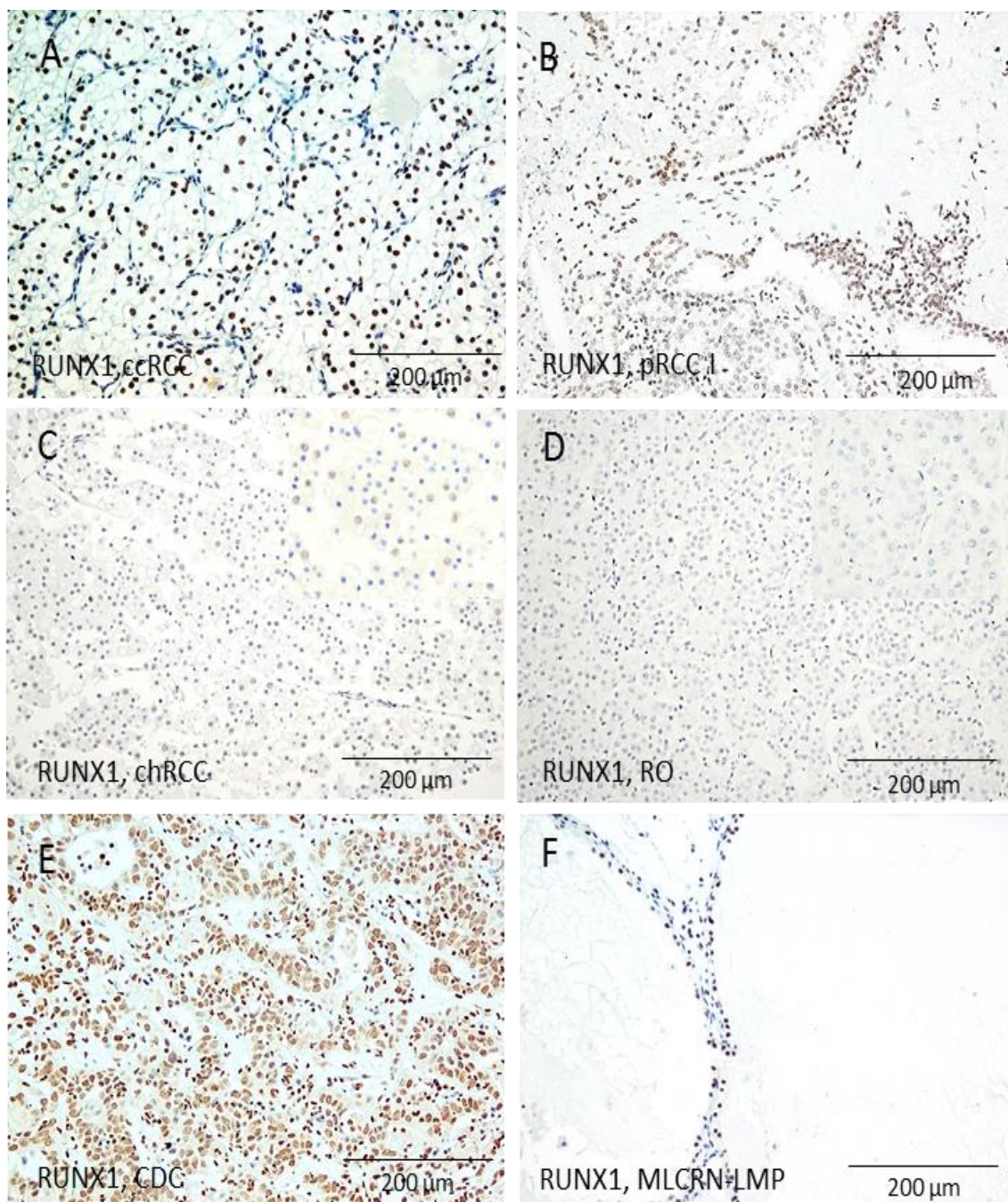
4.2.3. RUNX 1

Ekspresija RUNX1 je bila prisutna u svim analiziranim tipovima tumora bubrega, ali bez statističke značajnosti u učestalosti i intenzitetu (Tabela 22; Slika 30). Statistički značajna razlika u heterogenosti RUNX1 ekspresije nije uočena (Tabela 23.).

Tabela 22. Imunohistohemijska ekspresija RUNX1 različitim tipovima RCT

RUNX1 EKSPRESIJA					
PH TIP	OBIM, N (%)		INTEZITET, N (%)		
	pozitivno	negativno	slab	umeren	jak
CCRCC	70 (59.8)	47 (40.2)	35 (50.0)	23 (32.9)	12 (17.1)
PRCC I	2 (28.6)	5 (71.4)	1 (50.0)	1 (50.0)	0 (0.0)
PRCC II	7 (43.7)	9 (56.3)	5 (71.4)	2 (28.6)	0 (0.0)
CHRCC	13 (46.4)	15 (53.6)	8 (61.5)	5 (38.5)	0 (0.0)
RO	9 (36.0)	16 (64.0)	8 (88.9)	1 (1.1)	0 (0.0)
CDC	3 (42.9)	4 (57.1)	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.4)
MLCRNLMP	5 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (60.0)	2 (40.0)
P	0.149		0.086		

Skraćenice: RUNX1, engl. Runt-related transcription factor 1; PH- patohistološki ccRCC-svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija; pRCC I- papilarni karcinom bubrežnih ćelija tip I; pRCC II- papilarni karcinom bubrežnih ćelija tip II; chRCC- hromofobni karcinom bubrežnih ćelija; RO- onkocitom; CDC- karcinom sabirnih kanalića; MLCRN-LMP- multilokularna renalna cistična neoplazma niskog malignog potencijala; N-broj; p- vrednosti verovatnoća.



Slika 30. Ekspresija RUNX1 u različitim tipovima tumora bubrega. A-B Difuzna RUNX1 ekspresija jakog intenziteta u ccRCC i umerenog ili slabog intenziteta u pRCC i chRCC. E-F Difuzna jaka imunopozitivnost bila je prisutna u CDC i MLCRN-LMP; originalno uveličanje 200x.

Tabela 23. Heterogenost RUNX1 imunohistohemijske ekspresije među različitim tipovima tumora bubrega.

RUNX1 EKSPRESIJA na TMN, N (%)				
PH TIP	Homogeno pozitivno	Heterogeno	Homogeno negativno	Ukupno
ccRCC				117
	12 (10.3)	58 (49.6)	47 (40.1)	(100)
pRCC I	0 (0.0)	2 (28.6)	5 (71.4)	7 (100)
pRCC II	0 (0.0)	7 (43.7)	9 (56.3)	16 (100)
chRCC	0 (0.0)	13 (46.4)	15 (53.6)	28 (100)
RO	0 (0.0)	9 (36.0)	16 (64.0)	25 (100)
CDC	0 (0.0)	3 (42.9)	4 (57.1)	7 (100)
MLCRNLM				5 (100)
P	2 (40.0)	3 (60.0)	0 (0.0)	
p		0.183		

Skraćenice: RUNX1, engl. Runt-related transcription factor 1; N-broj; PH-patohistološki; p-vrednosti verovatnoća.

RUNX1 imunopozitivnost nije bila udružena ni sa jednim od kliničko-patoloških parametara niti sa preživljavanjem.

4.2.4. TWIST1

TWIST1 ekspresija je bila uočena u skoro svim slučajevima analiziranih tipova tumora bubrega, uglavnom umerenog do jakog intenziteta (Tabela 24). Takođe, TWIST1 ekspresija je bila statistički značajno heterogena među analiziranim patohistološkim tipovima (Tabela 25).

Tabela 24. Imunohistohemijska ekspresija TWIST1 različitim tipovima RCT

TWIST1 EKSPRESIJA NA TMN					
PH TIP	OBIM, N (%)		INTEZITET, N (%)		
	pozitivno	negativno	slab	umeren	jak
CCRCC	115 (97.5)	3 (2.5)	12 (10.4)	52 (45.2)	51 (44.4)
PRCC I	7 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (42.9)	4 (57.1)
PRCC II	16 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (31.2)	11 (68.8)
CHRCC	27 (100)	0 (0.0)	1 (3.7)	7 (26.0)	19 (70.3)
RO	25 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	25 (100)
CDC	6 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (100)
MLCRNLMP	5 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (3.0)	3 (2.5)
p	0.934		0.030*		

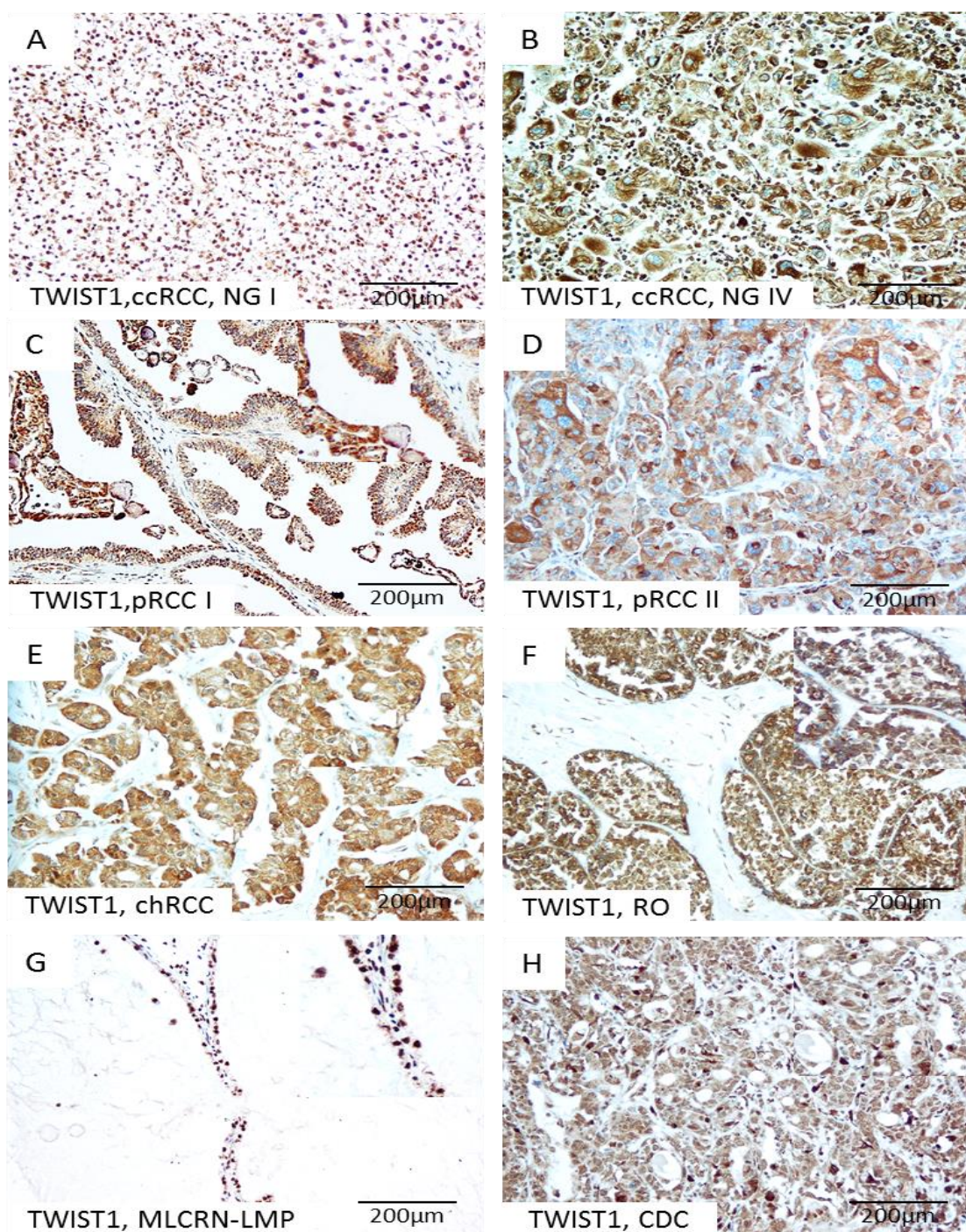
Skraćenice: TWIST1, engl. Twist Family BHLH Transcription Factor 1; ccRCC- svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija; pRCC I- papilarni karcinom bubrežnih ćelija tip I; pRCC II- papilarni karcinom bubrežnih ćelija tip II; chRCC- hromofobni karcinom bubrežnih ćelija; RO- onkocitom; CDC- karcinom sabirnih kanalića; MLCRN-LMP- multilokularna renalna cistična neoplazma niskog malignog potencijala; N- broj; PH- patohistološki; p-vrednosti verovatnoća; *-statistički značajna p vrednost.

Tabela 25. Heterogenost TWIST1 imunohistochemijske ekspresije među različitim tipovima tumora bubrega.

TWIST1 EKSPRESIJA na TMN, N (%)				
PH TIP	Homogeno pozitivno	Heterogen	Homogeno negativno	Ukupno
CCRCC	51 (43.2)	64 (54.3)	3 (2.5)	118 (100)
PRCC I	4 (57.1)	3 (42.9)	0 (0.0)	7 (100)
PRCC II	11 (68.8)	5 (31.2)	0 (0.0)	16 (100)
CHRCC	20 (74.1)	7 (25.9)	0 (0.0)	27 (100)
RO	25 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	25 (100)
CDC	5 (83.3)	1 (16.7)	0 (0.0)	6 (100)
MLCRNLMP	3 (60.0)	2 (40.0)	0 (0.0)	5 (100)
p		<0.001*		

Skraćenice: TWIST1, engl. Twist Family BHLH Transcription Factor 1; ccRCC- svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija; pRCC I- papilarni karcinom bubrežnih ćelija tip I; pRCC II- papilarni karcinom bubrežnih ćelija tip II; chRCC- hromofobni karcinom bubrežnih ćelija; RO- onkocitom; CDC- karcinom sabirnih kanalića; MLCRN-LMP- multilokularna renalna cistična neoplazma niskog malignog potencijala; N-broj; p-rednosti verovatnoća; *-statistički značajna p vrednost.

TWIST1 ekspresija je bila prisutna uglavnom u citoplazmi različitih tipova tumora, uključujući i dva slučaja ccRCC sa sarkomatoidnom komponentom, dok je nuklearna ekspresija bila prisutna u MLCRN-LMP i CDC (Slika 31). TWIST1 ekspresija nije bila u korelaciji ni sa jednim od kliničko-patoloških parametara ni u jednom ispitivanom tipu tumora.



Slika 31. Ekspresija TWIST1 u različitim tipovima RCT. A. Difuzna i jaka TWIST1 nuklearna imunopozitivnost bila je uočena u ccRCC nižeg gradusa, dok je (B-F). Difuzna i jaka citoplazmatska TWIST1 imunopozitivnost bila prisutna u ccRCC visokog gradusa sa sarkomatoidnom komponentom, pRCC, chRCC i RO; G-H. Difuzna i jaka TWIST1 nuklearna ekspresija bila je prisutna u MLCRC-LMP i CDC; Originalno uvećanje 200x.

4.3. Ko-ekspresija PRMT1 sa ZEB1, RUNX1 i TWIST1

Statistički značajna razlika u ko-ekspresiji PRMT1 sa ZEB1, RUNX1 i sa različitom TWIST1 lokalizacijom bila je uočena samo u ccRCC (Tabela 26). Većina ccRCC bez PRMT1 ekspresije bila je negativna na ZEB1 ($p=0.028$), dok je većina PRMT1 pozitivnih slučajeva ekspresirala RUNX1 ($p=0.019$). Većina PRMT1 negativnih ccRCC imala je citoplazmatsku ekspresiju TWIST1, bez nuklearne pozitivnosti ($p<0.001$).

Tabela 26. Ko-ekspresija PRMT1 i ostalih transkripcionih faktora ZEB1, RUNX1 i TWIST1 u ccRCC.

IHH marker (svi slučajevi)	PRMT1		p
	Pozitivan, N (%)	Negativan, N (%)	
ZEB1 (113)			
pozitivni	27 (40.9)	10 (21.3)	0.028*
negativni	39 (59.1)	37 (78.7)	
RUNX1 (117)			
pozitivni	48 (68.6)	22 (46.8)	0.019*
negativni	22 (31.4)	25 (53.2)	
TWIST1 (115)			
nuklearno±citoplazmatsko	37 (53.6)	10 (21.7)	<0.001*
citoplazmatsko	32 (46.4)	36 (78.3)	

Skraćenice: IHH-imunohistohemijski; PRMT1, protein arginin metiltransferaza 1; ZEB1, engl. Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1; RUNX1, engl. Runt-related transcription factor 1; TWIST1, engl. Twist Family BHLH Transcription Factor 1; ccRCC, svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija; p-vrednosti verovatnoća; N-broj; *-statistička značajnost.

4.4. Ekspresija PRMT1, RUNX1, ZEB1 i TWIST 1 i markera EMT

Među analiziranim tipovima tumora, aberantna β -katenin citoplazmatska imunoreaktivnost je uočena kod 133 (71.1%) slučajeva, bez nuklearne imunopozitivnosti. N-kadherin ekspresija je bila prisutna u 124 (66.9%) slučajeva, a gubitak E-kadherina u 42 (23.1%) slučajeva. PRMT1 ekspresija nije bila udružena ni sa aberantnom β -katenin ekspresijom, ni sa učestalijom N- kadherin ekspresijom ili gubitkom E-kadherina u analiziranim tipovima tumora. Udruženost između RUNX1, N-i E-kadherin ekspresije je bila značajna samo u ccRCC. Većina ccRCC sa ekspresijom RUNX1, ekspimirala je i N-kadherin ($p=0.003$). Međutim, gubitak E-kadherina bio je učestaliji u ccRCC bez RUNX1 ekspresije ($p=0.019$) (Tabela 27).

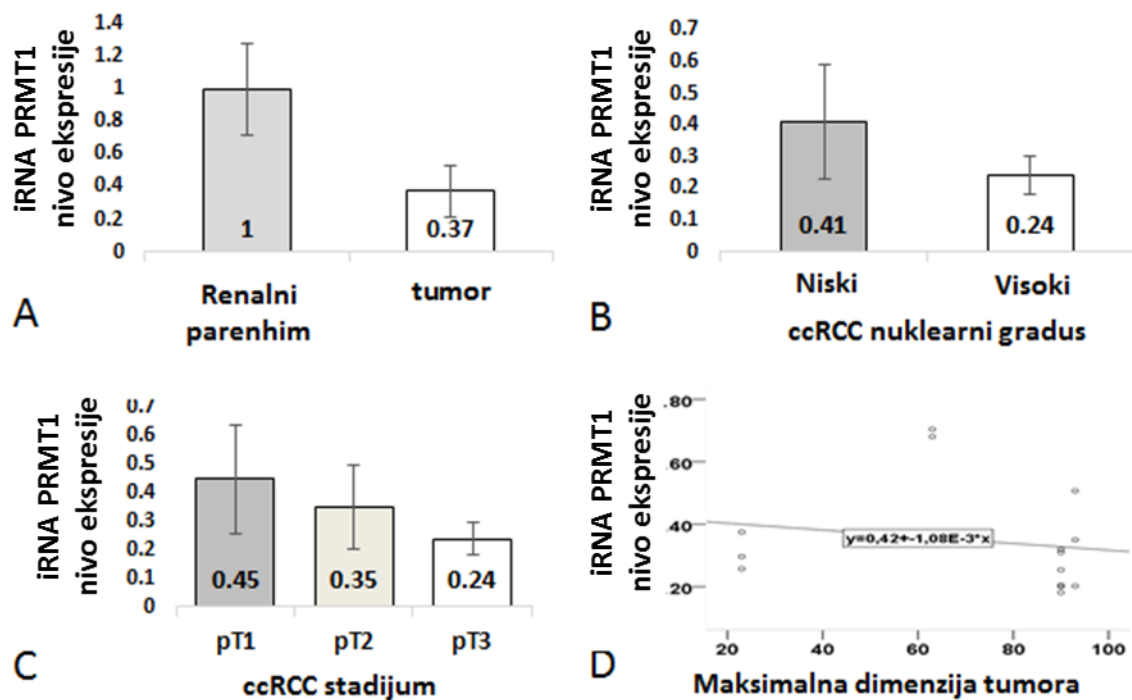
Tabela 27. Ekspresija PRMT1, ZEB1, RUNX1 i TWIST1 sa WNT- β -katenin/EMT markerima (β -katenin, N- i E-kadherinom) u ccRCC.

Transkripcijski faktor	Wnt- β -katenin/EMT markeri					
	β -katenin	P	N-kadherin+	P	E-kadherin-	P
PRMT1						
pozitivni	37/37 (100)	0.493	58/69 (84.1)	0.878	20/66 (30.3)	0.468
negativni	36/36 (100)		40/47 (85.1)		11/46 (24.0)	
ZEB1						
pozitivni	21/21 (100)	0.080	33/37 (89.2)	0.380	12/36 (33.3)	0.280
negativni	52/52 (100)		63/76 (83.0)		17/73 (23.6)	
RUNX1						
pozitivni	46/46 (100)	0.532	65/70 (92.8)	0.003*	14/70 (20.0)	0.019*
negativni	26/26 (100)		32/45 (71.1)		17/42 (40.5)	
TWIST1						
nuklearno±citoplazatsko	20/20 (100)	1	38/46 (82.6)	0.563	14/46 (30.4)	0.528
citoplazmatsko	52/52 (100)		58/67 (86.6)		16/64 (25.0)	

Skraćenice: PRMT1, protein arginin metiltransferaza 1; ZEB1, engl. Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1; RUNX1, engl. Runt-related transcription factor 1; TWIST1, engl. Twist Family BHLH Transcription Factor 1; EMT-epitelno-mezenhimna transformacija; ccRCC, svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija; p-vrednosti verovatnoća; N-broj; *-statistička značajnost.

4.5. qRT-PCR PRMT1 ekspresija u cRCC, chRCC i pRCC

Nivo iRNA PRMT1 ekspresije je bio značajno niži u tumorskom tkivu, u poređenju sa okolnim netumorskim parenhimom ($p < 0.001$). Relativni nivo iRNK PRMT1 ekspresije je bio najniži u ccRCC ($p = 0.35$), potom nešto viši u chRCC ($p = 0.40$), a najviši nivo je bio u pRCC ($p = 0.43$). Međutim, statistička značajnost među različitim analiziranim tipovima tumora nije uočena. ccRCC sa nuklearnim gradusom II i nižim stadijumom (I i II), imao je viši nivo iRNA PRMT1 ekspresije ($p = 0.043$, $p = 0.028$, respektivno). Takođe, primećeno je smanjenje nivoa ekspresije iRNA PRMT1 uporedno sa porastom veličine tumora, iako statistička značajnost nije uočena (Grafikon 3). U uzorcima korišćenim za analizu iRNA PRMT1 ekspresije, IHH ekspresija PRMT1 je bila uočena u sva tri analizirana RCC tipa. U dva slučaja ccRCC sa najvišim gradusom, stadijumom i najvećom dimenzijom, relativna iRNA PRMT1 ekspresija je bila najniža i IHH PRMT1 ekspresija je bila homogeno negativna i heterogena. Oba slučaja pRCC tip I homogeno su esprimirali PRMT1, iako je nivo relativne iRNA PRMT1 ekspresije bio različit (Tabela 28).



Grafikon 3. qRT-PCR analiza nivoa iRNA PRMT1 ekspresije u ccRCC. A. Nivo relativne iRNK PRMT1 je bio niži u tumorskom, nego u okolnom bubrežnom parenhimu; B. Relativni nivo iRNK PRMT1 ekspresije bio je niži u ccRCC višeg gradusa i C. višeg stadijuma; D. Uporedo sa porastom maksimalne dimenzije tumora ccRCC, relativni nivo iRNK PRMT1 se snižavao.

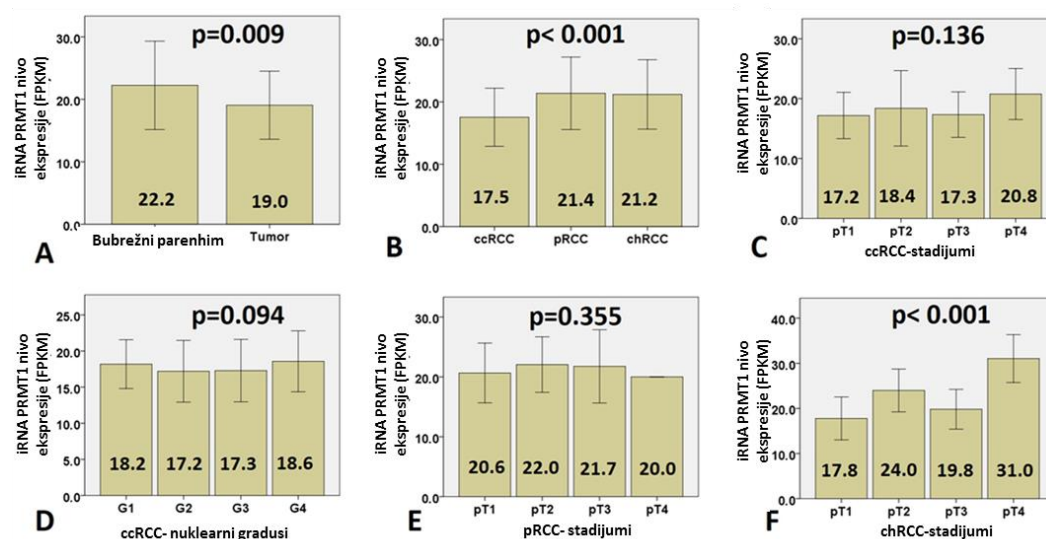
Tabela 28. iRNK PRMT i IHH PRMT1 ekspresija u analiziranim tipovima RCC.

Pacijent	Tip tumora	Stadijum	Gradus	Pol	Dimenzija tumora	iRNA PRMT1 nivo ekspresije*	PRMT1 IHH bojenje
1.	ccRCC	1	2	M	23	0.31	Homogeno pozitivno
2.	ccRCC	1	2	F	63	0.58	Heterogeno
3.	ccRCC	2	2	M	93	0.35	Homogeno pozitivno
4.	ccRCC	3	3	F	90	0.20	Heterogeno
5.	ccRCC	3	3	M	90	0.29	Homogeno negativno
6.	pRCC, tip I	3	2	F	70	0.31	Homogeno pozitivno
7.	pRCC, tip I	3	2	F	70	0.56	Homogeno pozitivno
8.	chRCC	3	4	F	112	0.39	Heterogeno

Skraćenice : PRMT1- protein arginin metiltransferaza 1; ccRCC- svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija; pRCC- papilarni karcinom bubrežnih ćelija; chRCC- hromofobni karcinom bubrežnih ćelija *Predstavljene su srednje vrednosti iRNK PRMT1; uzorci su korišćeni u triplikatima, a nivoi iRNK ekspresije su kvantitativno analizirani i normalizovani u odnosu na nivo referentnog gena gliceraldehid 3-fosfata (engl. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-GAPDH).

4.6. iRNA PRMT1 ekspresija u TCGA i GTEx kohorti

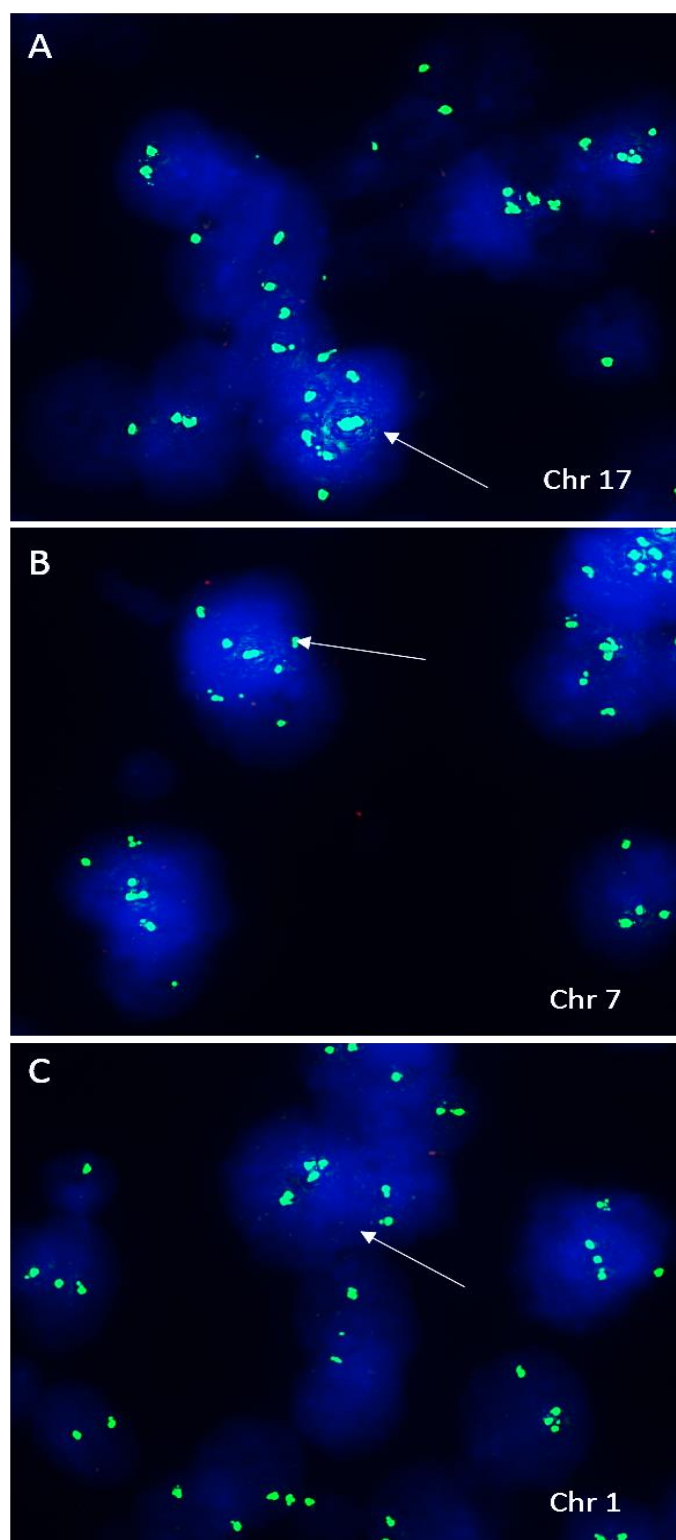
Grafikon 4. predstavlja rezultate iRNA PRMT1 ekspresije u TCGA kohorti. iRNA PRMT1 nivo ekspresije u tumorskom tkivu je bio značajno niži nego u netumorskom parenhimu ($p=0.009$). U tumorskom tkivu, iRNA PRMT1 nivo ekspresije je bio značajno niži u ccRCC, u poređenju sa pRCC i chRCC ($p<0.001$). Međutim, iRNA PRMT1 nivo ekspresije u ccRCC nije bio udružen sa tumorskim stadijumom i gradusom, kao ni sa stadijumom pRCC ($p=0.136$; $p=0.094$; $p=0.355$, respektivno. Sa druge strane, iRNA PRMT1 nivo ekspresije u chRCC je bio značajno viši u stadijumu IV ($p<0.001$)(Grafikon 4).



Grafikon 4. iRNA PRMT1 transkripcioni podaci (FPKM vrednosti) u TCGA kohorti u odnosu na tumorsko tkivo i stadijum tumora. (A) iRNA PRMT1 nivo ekspresije je bio snižen u tumorskom tkivu u odnosu na netumorski parenhim; (B) U tumorskom tkivu, mRNA PRMT1 nivo ekspresije je bio značajno niži u ccRCC, u poređenju sa pRCC i chRCC; (C-E) Međutim, mRNA PRMT1 nivo ekspresije nije bio udružen sa stadijumom tumora, i nuklearnim gradusom ccRCC, ni sa stadijumom pRCC; (F) Sa druge strane, porast mRNA PRMT1 ekspresije bio je primećen u stadijumu IV chRCC; iRNA nivo ekspresije je predstavljen prema FPKM (engl. Fragments Per Kilobase Million) vrednostima (+/- 1 SD), sa statističkom značajnošću $p<0.05$.

4.7. FISH analiza aRO

Od 15 slučajeva aRO selektovanih za FISH analizu, 4 slučaja su bila tehnički neodgovarajućeg kvaliteta. Ostalih 10 (90%) slučajeva je imalo poliploidiju svakog hromozoma. U tumorskim ćelijama svih 10 slučajeva bila je prisutna poliploidija hromozoma (chr) 17. U tumorskim ćelijama bilo je uočeno od 3-6 centromernih signala chr 17 po nukleusu (Slika 32 A). Takođe, uočeno je 4-6 centromernih signala chr 7 u tumorskim ćelijama (Slika 32 B). U tumorskim ćelijama su bila prisutna 3-4 centromerna signala chr 1 (Slika 32 C). Jedan (9%) slučaj je imao gubitak hromozoma X, a 1 (9%) slučaj nije imao hromozomske aberacije. Svi analizirani slučajevi aRO su difuzno ekspimirali PRMT1 i ZEB1, nezavisno od tipa hromozomskih aberacija (Tabela 29).



Slika 32. FISH nalaz na tumorskim ćelijama atipičnog onkocitoma. Zeleni signali označeni strelicama, predstavljaju centromerni region hromozoma 17 (A), 7 (B) i 1(C), što ukazuje na poliploidiju.

Tabela 29. Analiza ekspresije hromozomskih aberacija FISH metodom i poređenje sa IHH ekspresijom PRMT1 i ZEB1 u aRO.

Slučaj	Pol	Hromozomske aberacije																						IHH ekspresija					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y	PRMT1	ZEB1		
1	M	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Dif.	Dif.	
2	Ž	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	ND	Dif.	Dif.	
3	Ž	TN	TN	TN	TN	TN	TN	ND	TN	TN	TN	TN	ND	NA	TN	TN	TN	ND	TN	TN	TN	TN	TN	TN	TN	TN	Dif.	Dif.	
4	Ž	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	ND	Dif.	Dif.	
5	M	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Dif.	Dif.	
6	M	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Dif.	Dif.	
7	Ž	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	ND	Dif.	Dif.	
8	Ž	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gubitak	ND	Dif.	Dif.	
9	M	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Dif.	Dif.	
10	Ž	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	ND	Dif.	Dif.	
11	M	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Dif.	Dif.	
12	M	TN	TN	TN	TN	TN	TN	ND	TN	TN	TN	TN	ND	NA	TN	TN	TN	ND	TN	TN	TN	TN	TN	TN	TN	TN	Dif.	Dif.	
13	Ž	TN	TN	TN	TN	TN	TN	ND	TN	TN	TN	TN	ND	ND	TN	TN	TN	ND	TN	TN	TN	TN	TN	TN	TN	TN	Dif.	Dif.	
14	M	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	Gain	ND	Dif.	Dif.
15	Ž	TN	TN	TN	TN	TN	TN	ND	TN	TN	TN	TN	ND	ND	TN	TN	TN	ND	TN	TN	TN	TN	TN	TN	TN	TN	Dif.	Dif.	

Skraćenice: FISH- fluorescentna in situ hibridizacija, IHH- imunohistohemijska, gain- engl. dodatak (polizomija hromozoma), PRMT1- Protein arginin metil transferaza 1, ZEB1- Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1, TN-tehnički neadekvatno, ND-nije dostupno, neg- negativno, dif- difuzna imunopozitivnost.

5. Diskusija

Karcinomi bubrega su heterogena grupa tumora različitog biološkog ponašanja i prognoze (1). Stalni naponi naučnika u pronalaženju preciznih dijagnostičkih i pouzdanih prognostičkih parametara, motivišu istraživače na kontinuirano ispitivanje novih bioloških markera. Poznato je da genetski faktori predstavljaju značajanu osnovu za nastanak većine tumora bubrežnih ćelija. Međutim, poslednjih godina pokazano je i da epigenetska regulacija genske ekspresije utiče na njihov nastanak (3).

PRMT1 je epigenetski regulator koji se eksprimira u različitim strukturama mnogih tkiva i organa tokom njihovog razvoja (55). U ovoj studiji, PRMT1 je bio ekspimiran u korteksu i meduli svih slučajeva korišćenih kao pozitivna kontrola. U korteksu bubrežnog parenhima, PRMT1 imunopozitivnost je bila uočena u parijetalnim ćelijama Boumanove kapsule i ćelijama mezangijuma, kao i u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula. U meduli, PRMT1 je bio ekspimiran u epitelnim ćelijama sabirnih kanalića. Ovakav nalaz ukazuje da je PRMT1 ubikvitarno ekspimiran marker u strukturama bubrežnog parenhima. Prema podacima iz literature, samo jedna studija je pokazala ekspresiju PRMT1 u epitelnim ćelijama renalnih tubula, ali bez ekspresije PRMT1 u glomerulima ili sabirnim kanalićima, što bi se moglo objasniti korišćenjem različitog klona antitela u ovoj studiji (55).

Uloga PRMT1 u tumorogenezi je još uvek kontraverzna i naizgled zavisna od tipa tumora i substrata koji metiluje. U većem broju slučajeva, PRMT1 se eksprimira u agresivnim tumorima, sa lošom prognozom (7,8). Takođe, pokazano je da inaktivacija PRMT1 malom interferirajućom RNK u nesitnoćelijskom karcinomu pluća sprečava rast tumorskih ćelija (6). Druga studija je pokazala da PRMT1 indukuje invazivnost ćelija karcinomima dojke u *in vitro* uslovima, a da inaktivacijom PRMT1 ćelija ulazi u senescenciju (15). Međutim, pojedini autori su pokazali pozitivan uticaj ekspresije PRMT1 na ishod pacijenata sa karcinomom. Tako su pacijenti sa karcinomom zeluca i nižim vrednostima PRMT1 ekspresije, nakon korišćenja adjuvantne hemioterapije imali lošije preživljavanje, u poređenju sa pacijentima koji su imali više vrednosti PRMT1 ekspresije (9). Prema ostalim podacima iz literature, samo je u jednoj studiji indirektno analizirana funkcija PRMT1 u RCC. Autori su ispitivali uticaj interakcije B-ćelijskog translokacionog gena 1

(BTG1) i PRMT1 na tkivnim uzorcima i ćelijskim linijama RCC. Iako je ekspresija BTG1 na proteinskom i molekularnom nivou na uzorcima RCC bila mala, pokazano je da BTG1 u interakciji sa PRMT1 može inhibirati ćelijski rast i indukovati ćelijsku apoptozu u RCC, a da su takođe pojedine funkcije BTG1 bile suprimirane inhibicijom PRMT1 (80). Međutim, detaljna ekspresija PRMT1 u različitim tumorima bubrežnih ćelija još uvek nije ispitivana.

Rezultati ove studije su pokazali ekspresiju PRMT1 u svim analiziranim tipovima tumora bubrežnih ćelija, koja je u većini slučajeva bila heterogena. Učestalija heterogena PRMT1 ekspresija je primećena u ccRCC nižeg gradusa (I i II) i nižeg stadijuma tumorske bolesti (pT1 i pT2), dok je homogeni gubitak PRMT1 ekspresije bio karakterističan za slučajeve ccRCC visokog gradusa (III i IV), visokog stadijuma (pT3 i pT4) i kod umrlih pacijenata. Heterogena ekspresija PRMT1 na TMN bila je potvrđena na odgovarajućim konvencionalnim isečcima istih slučajeva. Intratumorska heterogenost (ITH) predstavlja varijaciju u morfologiji, gradusu, agresivnosti, odgovoru istih tumora na terapiju i varijaciju u ekspresiji različitih IHH markera kod tumora uniformne morfologije (81). Prisutna je u skoro svim solidnim tumorima i može biti posledica genetskih, epigenetskih faktora, faktora spoljašnje sredine ili njihove kombinacije (82,83). Prema dosadašnjim podacima iz literature, ITH je od naročitog značaja za ccRCC i može biti uzrok njegovog nepredvidivog ponašanja kod različitih slučajeva naizgled iste morfologije (81,84). Značaj ITH je još uvek nedovoljno jasan. U literaturi je opisana učestala ITH kod ccRCC visokog gradusa i većih dimenzija. Međutim, ITH se javlja i u ranim fazama karcinogeneze, kada ne mora biti direktno odgovorna za tumorsku progresiju (81,84,85). S obzirom na ovakve podatke, heterogena ekspresija PRMT1 na ccRCC nižeg gradusa i stadijuma, može predstavljati rano stečenu epigenetsku promenu koja bi mogla voditi ka progresiji povezanoj sa potpunim gubitkom PRMT1.

Osim u ccRCC, PRMT1 je bio eksprimiran i u svim MLCRN-LMP. MLCRN-LMP i ccRCC imaju zajedničku mutaciju *VHL* gena, na 3p25 hromozomskom regionu, ali su potpuno različitog biološkog ponašanja (1). Moguće je da je za agresivnu prirodu ccRCC, neophodan raranžman ostalih regiona hromozoma 3 ili delecije hromozoma 14q, 9p, 8p i 6q, koji bi mogli biti odgovorni za kodiranje različitih tumor supresornih gena (41). MLCRN-LMP i ccRCC eksprimiraju i zajedničke imunohistohemijske markere, kao što

su: CA-IX i PAX-2 (1). U svakodnevnoj praksi su poznati slučajevi ccRCC sa izraženom cističnom komponentom koji se morfološki teško mogu razlikovati od MLCRN-LMP, a smatra se da imaju bolju prognozu od klasičnog ccRCC (86). S obzirom na benignu prirodu MLCRN-LMP i povoljniju prognozu ccRCC niskog gradusa, učinjena je dodatna analiza PRMT1 ekspresije na celim presecima novih slučajeva. Nalaz na celim presecima je bio konzistentan sa nalazom na TMA. Skoro svi slučajevi MLCRN-LMP i ccRCC niskog gradusa su difuzno ekspimirali PRMT1.

Dobijeni rezultati bi mogli značiti da je PRMT1 jedan od ubikvitarno ekspimiranih gena koji vrši epigenetsku kontrolu normalnog bubrežnog razvoja, te da bilo koja promena u PRMT1 ekspresiji može voditi ka nastanku tumora i/ili voditi ka nepovoljnoj prognozi po pacijenata. Moguće je spekulirati da bi MLCRN-LMP zapravo mogla biti početni deo spektruma diferencijacije u ccRCC sa izraženom cističnom komponentom, a potom i u ccRCC klasične građe. Difuzna ekspresija PRMT1 u niskogradusnim ccRCC i MLCRN-LMP bi mogla odgovarati njihovom zajedničkom poreklu, a mogla bi služiti i kao potvrda ekspresije u tumorima bubrega povoljnijeg biološkog ponašanja.

Osim u ccRCC i MLCRN-LMP, PRMT1 se ekspimirao u skoro svim RO i manjem broju chRCC. Smatra se da chRCC i RO pripadaju jednom morfološkom spektrumu, a imaju potpuno različito biološko ponašanje (34). U većini slučajeva, dijagnoza RO i chRCC se postavlja pažljivim pregledom H&E preparata. Međutim, u svakodnevnoj praksi sreću se različite varijante RO, koje se po morfološkim osobinama nekada teško mogu razlikovati od chRCC (87). Pored klasičnog tipa RO, opisane su i različite varijante, kao što je sitnoćelijska varijanta sa pseudorozetama, sa intracitoplazmatskim lumenima, sa atipičnim, bizarnim ćelijama i telengiektatični RO (29,37,38,88,89). aRO se odlikuje fokalnom ili difuznom ćelijskom atipijom (90). Ćelijska atipija u aRO podrazumeva naglašeni nuklearnim pleomorfizmom, hiperhromaziju i prisustvo multinuklearnih tumorskih ćelija, bez mitozu (28). Pored citološke atipije, opisana je i ekstenzija aRO u perirenalno masno tkivo, hemoragija, minimalna mikroskopska nekroza, pa čak i vaskularna invazija. Smatra se da je atipija u RO samo deo morfološkog spektruma i da ne utiče nepovoljno na prognozu (29). Međutim, nekada se aRO morfološki teško može razlikovati od chRCC. Takođe, osim klasične varijante chRCC, opisane su još i eozinofilna, mikrocistična, adenomatoidna pigmentna, tubulocistična, pa čak i onkocitna

varijanta chRCC (34,91,92). Na primer, eozinofilna i onkocitna varijanta chRCC se teško može morfološki razlikovati od RO (31). Iz navedenih razloga, ekspresija različitih markera u diferencijalnoj dijagnozi ova dva tumora može biti od velikog značaja. U tom smislu, difuzna ekspresija CK7 imunohistohemijskog markera i pozitivno histohemijsko bojenje na Haleovo koloidno gvožđe, smatra se karakterističnim nalazom u patohistološkoj dijagnozi chRCC i koristi se u diferencijalnoj dijagnozi sa RO. Međutim, važno je napomenuti da nekada iz tehničkih razloga ovo histohemijsko bojenje može biti neadekvatno i teško za interpretaciju. Drugi markeri, kao što su S100A1, CD117 (KIT), CD10 i RCC marker se nisu pokazali kao odgovarajući za diferencijalnu dijagnozu chRCC i RO (34). S obzirom na česta morfološka preklapanja ova dva tumora različite prognoze, te na važnost postavljanja pravilne patohistološke dijagnoze, PRMT1 ekspresija je analizirana u zasebnoj kohorti celih preseka dodatnih slučajeva chRCC, RO i aRO. U skoro svim slučajevima chRCC PRMT1 ekspresija je bila fokalna i lokalizovana na periferiji isečka, u blizini granice sa okolnim bubrežnim parenhimom. U skoro svim RO i svim aRO PRMT1 ekspresija je bila difuzna i jakog intenziteta. Rezultati istraživanja mogu ukazivati da difuzna PRMT1 ekspresija, jakog intenziteta može biti značajna u patogenezi RO i može služiti kao pomoćni IHH marker u patohistološkoj dijagnozi RO.

ZEB1 je bio eksprimiran u endotelnim ćelijama kapilara glomerula i krvnih sudova bubrežnog parenhima, uz odsustvo ekspresije u epitelnim ćelijama tubula i sabirnih kanalića. U literaturi je ekspresija ZEB1 pokazana u karcinomima cerviksa, uterusa, dojke, debelog creva, pluća i pankreasa, u slučajevima višeg stadijuma ili sa već prisutnim metastazama (63,64,66,67). U karcinomima bubrežnih ćelija, ZEB1 je uglavnom ispitivan kao jedan od osnovnih regulatora EMT posredovane progresije tumora (17,93). Iako je ZEB1 ekspresija bila uočena u skoro svim analiziranim tipovima tumora, najveći broj slučajeva je bio homogeno negativan. Heterogena imunopozitivnost je uglavnom uočena u ccRCC i RO, ukazujući na potencijalnu ulogu ZEB1 u njihovoj patogenezi. Ekspresija ZEB1 nije bila udružena sa kliničko-patološkim parametrima. Međutim, analiza preživljavanja je pokazala da je ZEB1 nezavisni prognostički parametar boljeg preživljavanja pacijenata sa ccRCC, a da je veći broj umrlih pacijenata imao homogeni gubitak ZEB1 ekspresije. U literaturi je za ccRCC visokog gradusa opisana heterogenost, kao i potpuni gubitak ZEB1 ekspresije (81,94). Međutim, korelacija ITH ekspresije ZEB1 i preživljavanja nije analizirana. Učestalost ZEB1 u ovoj studiji se većinom razlikuje u

odnosu na rezultate dobijene u literaturi. Moguće je da ZEB1 na različite načine učestvuje u tumor specifičnim mehanizmima nastanka i progresije RCT, koji su za sada još uvek nedovoljno proučeni.

S obzirom na rezultate dobijene analizom TMN, dodatna analiza ZEB1 je urađena na konvencionalnim presecima novih uzoraka chRCC, RO i aRO. ZEB1 je bio homogeno negativan u skoro svim chRCC, dok je većina RO i svi aRO difuzno ekspimirala ZEB1. Ovakvi rezultati mogu ukazivati da ZEB1 ekspresija može biti značajna za patogenezu RO i može služiti kao pomoćni IHH marker u njihovoj dijagnozi.

RUNX1 se ekspimirao u pojedinačnim ćelijama glomerula, proksimalnih, distalnih tubula i sabirnih kanalića u veoma slabom intenzitetu. U ovoj studiji RUNX1 je bio ekspimiran u različitoj učestalosti kod svih analiziranih tipova i u svim slučajevima MLCRN-LMP. Međutim, ekspresija RUNX1 nije bila udružena sa kliničko-patološkim parametrima. Najnovija studija je pokazala da je povećana ekspresija RUNX1 u ccRCC udružena sa polom, visokim nuklearnim gradusom i kliničkim stadijumom, kao i lošijim preživljavanjem (72). Ovakvi rezultati se mogu objasniti različitom metodologijom u ovoj studiji, tj. korićenjem IHH analize, za razliku od druge studije, gde su korišćene vrednosti iRNK RUNX1 ekspresije preuzete iz TCGA javne baze podataka. Rezultati studije ukazuju da bi RUNX1 mogao biti značajan u patogenezi različitih tipova tumora bubrežnih ćelija. Ovakve rezultate je potrebno upotpuniti analizom iRNK RUNX1 ekspresije.

TWIST1 je jedan od ključnih regulatora embriogeneze i organogeneze, čiji je nivo ekspresije nizak u adultnim tkivima (74,75). Na uzorcima bubrežnog parenhima, difuzna ekspresija jakog intenziteta bila je prisutna u citoplazmi tubulskih epitelnih ćelija i u ćelijama glomerula, dok se u meduli TWIST1 ekspimirao na membrani sabirnih kanalića. Ekspresija TWIST1 u karcinomima dojke, mokraćne bešike, prostate, kao i njegoa citoplazmatska lokalizacija u ćelijama ccRCC, bili su udruženi sa visokim gradusom, agresivnim tumorskim ponašanjem i lošom prognozom (75,76). Citoplazmatska ekspresija je bila primećena u ccRCC visokog gradusa, sa sarkomatoidnom komponentom. Primećena je i učestala heterogena ekspresija TWIST1, ali bez udruženosti sa kliničko-patološkim faktorima. U literaturi je heterogenost TWIST ekspresije već opisana, a gubitak Twist ekspresije bio je udružen sa ccRCC niskog gradusa (94).

Međutim, moguće je da su ovakve razlike u rezultatima posledica različitog klona korišćenog u studijama.

Ko-ekspresija PRMT1, ZEB1, RUNX1 i TWIST1 imunohistochemijskih markera je bila značajna u ccRCC. Najveći broj slučajeva ccRCC sa odsustvom PRMT1 ekspresije, imao je i nedostatak ZEB1 ekspresije. Ovo bi moglo značiti da gubitak ZEB1 ekspresije može biti zavistan od gubitka PRMT1. Takođe, većina ccRCC i svi MLCRN-LMP sa RUNX1 ekspresijom imali su ko-ekspresiju sa PRMT1, te je moguće spekulirati da RUNX1/PRMT1 ko-ekspresija može biti značajna za povoljnije ponašanje bubrežnih neoplazmi. Gubitak PRMT1 ekspresije u ccRCC, bio je udružen sa učestalom citoplazmatskom lokalizacijom TWIST1. Ovo bi mogao da bude jedan od mehanizama kojim gubitak PRMT1 utiče na agresivnije ponašanje tumora.

Wnt/ β -katenin EMT signalni put se odlikuje gubitkom E-kadherin ekspresije, povećanom N-kadherin ekspresijom, disocijacijom β -katenina sa membrane i njegovom translokacijom u citoplazmu ili jedro (59). Wnt/ β -katenin signalni put je važan za proces embriogeneze, ali njegova aberantna aktivacija kod odraslih može dovesti do nastanka tumora. Na ćelijskim kulturama karcinoma pluća pokazano je da PRMT1 vrši metilaciju aksina, povećava njegovu stabilnost i sprečava aktivaciju Wnt/ β -katenin signalnog puta. Inaktivacijom PRMT1 dolazi do aberantne aktivacije Wnt/ β -katenin EMT signalnog puta (62). ZEB1, RUNX1 i TWIST1 su važni regulatori EMT (67,68,76). U karcinomima dojke, PRMT1 metiluje promotor ZEB1, aktivira njegovu transkripciju, što potom indukuje EMT (15). ZEB1 se direktno vezuje za promotor gena za E-kadherin, sprečava njegovu transkripciju i tako dovodi do EMT (63). Takođe, povećana ekspresija ZEB1 i N-kadherina, smanjena ekspresija E-kadherina i gubitak membranske β -katenin imunopozitivnosti povezani su sa povećanom invazivnošću cervikalnog karcinoma (67). Sa druge strane, u ćelijama karcinoma dojke RUNX1 se vezuje za promotor gena za E-kadherin, indukuje njegovu povećanu ekspresiju i sprečava EMT (73). Pokazano je da PRMT1 vrši metilaciju RUNX1 i indukuje njegovu transkripciju (18). U nesitnoćelijskim karcinomima pluća, PRMT1 vrši metilaciju TWIST1, koji potom dovodi do smanjene ekspresije E-kadherina i na taj način indukuje EMT (14). S obzirom na ovakve podatke iz literature, očekivana je učestala ZEB1 i TWIST1 ekspresija, njihova ko-ekspresija sa PRMT1, smanjena ekspresija E-kadherina, učestalija ekspresija N-kadherina i

citoplazmatska ili nuklearna lokalizacija β -katenina u RCC visokog gradusa i/ili stadijuma. Očekivana je bila i RUNX1/PRMT1 ko-ekspresiju u tumorima sa boljom prognozom, praćena učestalijom E-kadherin ekspresijom, gubitkom N-kadherin ekspresije i očuvanom membranskom lokalizacijom β -katenina. Međutim, rezultati studije su pokazali da markeri EMT Wnt/ β -katenin signalnog puta nisu udruženi sa PRMT1, ZEB1 ili TWIST1 ekspresijom. Samo je u ccRCC ekspresija RUNX1 bila udružena sa učestalom ekspresijom N-kadherina, ali bez smanjene ekspresije E-kadherina. Naprotiv, gubitak E-kadherina je bio udružen sa smanjenom ekspresijom RUNX1.

U studiji je ispitivana i relativna iRNK PRMT1 ekspresija u tri najučestalija tipa tumora bubrežnih ćelija, ccRCC, pRCC, chRCC i okolnom netumorskom parenhimu. Nivo relativne iRNK PRMT1 ekspresije u tumorskom tkivu bio je niži nego u tkivu okolnog parenhima bubrega. Najniži nivo relativne iRNA-PRMT1 ekspresije zabeležen je kod ccRCC. Nešto viši nivo iRNA-PRMT1 je bio u pRCC, a najviši nivo relativne ekspresije iRNA-PRMT1 primećen je kod chRCC. Značajno sniženje relativne iRNA-PRMT1 ekspresije bilo je uočeno u uzorcima ccRCC visokog gradusa i stadijuma. Ovakav rezultat je važan, budući da je ccRCC, u poređenju sa pRCC i chRCC, agresivniji tip tumora, sa lošijom prognozom (1). Za razliku od rezultata dobijenih u ovoj studiji, drugi autori su pokazali značajno povećanje relativne iRNK PRMT1 ekspresije u tumorskom tkivu drugih tipova karcinoma (mokraćne bešike, dojke, pluća) i gliomima, u odnosu na okolni netumorski parenhim (6,7,10,56). Međutim, relativna iRNA-PRMT1 ekspresija u tkivu tumora bubrega i netumorskom bubrežnom parenhimu do sada nije analizirana. S obzirom na ovakve podatke iz literature, analizirani su nivoi iRNK PRMT1 ekspresije preuzete iz javne TCGA/GTEX baze, a potom su upoređivani sa rezultatima dobijenim na malom uzorku korišćenom u ovoj studiji. U obe grupe uzoraka, iRNA PRMT1 nivo ekspresije je bio snižen u tumorskom tkivu u poređenju sa netumorskim parenhimom, a najniži nivo je bio uočen u cRCC. Za razliku od rezultata dobijenih u ovoj studiji, nivo iRNA PRMT1 ekspresije u ccRCC TCGA grupi nije bio udružen sa gradusom i stadijumom tumora. Takođe, povišen nivo iRNA PRMT1 ekspresije je bio udružen samo sa visokim gradusom chRCC u TCGA grupi. Uočene razlike u iRNK PRMT1 ekspresiji mogu biti posledica malog broja uzoraka kohorte u ovoj studiji. Dalje, razlike u rezultatima IHH analize u kohorti ove studije i analize iRNK PRMT1 ekspresije u TCGA grupi mogu biti posledica varijacije u post-trankripcionim mehanizmima uključenim u translaciju iRNK PRMT1 u

protein, kao što je već opisano u literaturi (95,96). Takođe, potrebno je uzeti u obzir varijacije u ekspresiji gena u svakom individualnom slučaju unutar istog tipa tumora (97).

Metodom FISH analize dokazana je poliploidija svakog hromozoma u slučajevima aRO, što je neuobičajen nalaz među tumorima (98). Čelija je poliploidna ukoliko ima tri ili više kopija haploidnog genoma i može biti mononuklearna i multinuklearna džinovska (98). Poliploidija se sreće tokom embriogeneze ili postnatalno u odgovoru na stres, čime se prilagođava na novonastale nepovoljne uslove (98). Smatra se da je u humanoj populaciji poliploidija prisutna u oko 37% tumora (99). Pokazano je da poliploidna multinuklearna džinovska ćelija sprečava rast tumora i indukuje ćelijsku senescenciju (99). Eksperimenti na ćelijskim kulturama RCC su pokazali izraženu osetljivost poliploidnih tumorskih ćelija na anti-tumorske agense ili gama zračenje (100). Poliploidija hromozoma u aRO nije do sada opisana, niti je njen značaj objašnjen. U analiziranim uzorcima, zone sa ćelijskom atipijom i multinuklearnim džinovskim ćelijama su odgovarale nalazu poliploidije hromozoma svakog uzorka na FISH analizi. Pretpostavka je da poliploidija u aRO može biti posledica ćelijskog stresa tokom nastanka tumora, njenog reprogramiranja i prilagodjavanja, te održavanja benigne prirode RO.

Glavni rezultati ovog istraživanja pokazuju da ekspresija PRMT1 može biti značajna karakteristika ccRCC sa niskim nuklearnim gradusom i niskim stadijumom tumorske bolesti, kao i tumora povoljnog biološkog ponašanja kao što su MLCRN-LMP i RO. Heterogena ekspresija PRMT1, može biti marker ITH i nepredvidivog biološkog ponašanja tumora, dok homogeni gubitak PRMT1 može biti specifičan za ccRCC visokog gradusa i stadijuma. Gubitak PRMT1 i/ili ZEB1 ekspresije može biti znak lošijeg preživljavanja pacijenata sa ccRCC. Difuzna PRMT1 i ZEB1 imunohistohemijska ekspresija jakog intenziteta u onkocitomima može biti od značaja u diferencijalnoj dijagnozi sa hromofobnim karcinomima bubrežnih ćelija.

Rezultati ove studije nisu pokazali udruženost PRMT1, kao epigenetskog regulatora sa WNT/ β -katenin-EMT signalnim putem u patogenezi tumora bubrežnih ćelija, budući da ni jedan od analiziranih transkripcionih faktora nije korelirao sa gubitkom ekspresije E-kadherina, povećanom ekspresijom N-kadherina ili citoplazmatskom i/ili nuklearnom ekspresijom β -katenina.

Rezultati PRMT1 ekspresije dobijeni u ovom istraživanju, značajan su pokazatelj uticaja epigenetske regulacije u patogenezi različitih tipova tumora bubrežnih ćelija odrasle dobi. Međutim, jasan mehanizam njegovog delovanja ostaje nejasan. U tumorima bubrega, PRMT1 može uticati na druge EMT signalne puteve, ćelijski ciklus ili apoptozu. Za dalja i detaljnija ispitivanja, neophodni su eksperimenti na ćelijskim kulturama. Ova studija predstavlja prvi korak budućeg istraživanja koje će pokazati precizan mehanizam dejstva PRMT1 i njegov značaj u dijagnostičkim, prognostičkim, kao i novim terapijskim smernicama tumora bubrežnih ćelija.

6. Zaključci

1. PRMT1 ekspresija uočena je u svim ispitivanim patohistološkim tipovima tumora bubrega na TMN, ali je njegova ekspresija bila najučestalija u ccRCC, RO i MLRCN-LMP.
2. Učestala difuzna PRMT1 ekspresija na celim presecima uzoraka, bila je karakteristična za ccRCC niskog gradusa, MLCRN-LMP, klasične RO i aRO, dok je u većini chRCC PRMT1 eksprimiran fokalno.
3. Većini ispitivanih patohistoloških tipova tumora na TMN je eksprimirala ZEB1, ali je njegova ekspresija bila najučestalija u RO.
4. Difuzna ZEB1 ekspresija bila je prisutna na celim presecima većine klasičnih RO, svih aRO, dok je u većini slučajeva chRCC ZEB1 ekspresija bila odsutna.
5. Najveći broj slučajeva ccRCC sa odsustvom PRMT1 ekspresije, imao je i nedostatak ZEB1 ekspresije. Većina ccRCC i svi MLCRN-LMP sa RUNX1 ekspresijom imali su ko-ekspresiju sa PRMT1. Gubitak PRMT1 ekspresije u ccRCC, bio je udružen sa učestalom citoplazmatskom lokalizacijom TWIST1.
6. Ekspresija PRMT1, ZEB1 i TWIST1 nije bila udružena sa promenama u ekspresiji kadherina i β -katenina.
7. Većina ccRCC sa RUNX1 ekspresijom, eksprimirala je N-kadherin, ali bez gubitka E-kadherin ekspresije. Gubitak E-kadherina je bio uočen u većini ccRCC bez ekspresije RUNX1.
8. PRMT1 ekspresija je bila heterogena u većini ccRCC niskog nuklearnog gradusa i niskog stadijuma tumorske bolesti. Homogeni gubitak PRMT1 ekspresije bio je primećen u većini ccRCC visokog gradusa, visokog stadijuma, većih dimenzija i u slučajevima smrtnog ishoda.
9. ZEB1 ekspresija u ccRCC je bila učestalija kod pacijenata sa boljim preživljavanjem i bila je nezavistan faktor preživljavanja, dok je homogeni gubitak ZEB1 ekspresije bio značajno češći u slučajevima smrtnog ishoda.

10. Relativni iRNA-PRMT1 nivo ekspresije je bio viši u netumorskom parenhimu nego u tumorskom tkivu.
11. Najniži nivo relativne iRNA-PRMT1 ekspresije primećen je u ccRCC, a najviši u chRCC.
12. Sniženje relativnog iRNA-PRMT1 nivoa ekspresije je bilo uočeno u ccRCC višeg nuklearnog gradusa, višeg stadijuma tumorske bolesti i sa porastom dimenzije tumora.
13. Hromozomi skoro svih slučajeva su imali poliploidiju. Jedan slučaj je imao gubitak hromozoma X, a jedan je bio bez hromozomskih aberacija.
14. Ekspresija PRMT1 i ZEB1 je bila nezavisna od hromozomskih aberacija i bila je prisutna u svim analiziranim slučajevima aRO.
15. Opšti zaključak: Ekspresija PRMT1 je značajna karakteristika ccRCC sa niskim nuklearnim gradusom, niskim stadijumom tumorske bolesti i tumora sa povoljnim biološkim ponašanjem, kao što su MLCRN-LMP i RO. Homogeni gubitak PRMT1 ekspresije je značajan za ccRCC visokog gradusa, visokog stadijuma i većih dimenzija. Gubitak PRMT1 i/ili ZEB1 ekspresije može biti znak lošijeg preživljavanja pacijenata sa ccRCC. Učestalija difuzna PRMT1 i ZEB1 imunohistohemijska ekspresija jakog intenziteta u onkocitomima može biti od značaja u diferencijalnoj dijagnozi sa hromofobnim karcinomima bubrežnih ćelija.

7. Literatura

1. Moch H, Amin MB, Argani P, Cheville J, Delahunt B M et al. Renal cell tumors. In: Moch HA, Peter AH, Ulbright TM E, editor. WHO Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2016. p. 11–43.
2. Liao L, Testa JR YY. The Roles of Chromatin-Remodelers and Epigenetic Modifiers in Kidney Cancer Lili. *Cancer Genet.* 2015;208:2016–214.
3. Morris MR, Latif F. The epigenetic landscape of renal cancer. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13:47–60.
4. Miremadi A, Oestergaard MZ, Pharoah PDP, Caldas C. Cancer genetics of epigenetic genes. *Hum Mol Genet.* 2007;16(1):28–49.
5. Wolf SS. The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans. 2009;66:2109–21.
6. Elakoum R, Gauchotte G, Oussalah A, Wissler MP, Clément-Duchêne C, Vignaud JM, et al. CARM1 and PRMT1 are dysregulated in lung cancer without hierarchical features. *Biochimie.* 2014;97:210–8.
7. Mathioudaki K, Scorilas A, Ardavanis A, Lymberi P, Tsiambas E, Devetzi M, et al. Clinical evaluation of PRMT1 gene expression in breast cancer. *Tumor Biol.* 2011;32:575–82.
8. Mathioudaki K, Papadokostopoulou A, Scorilas A, Xynopoulos D, Agnanti N, Talieri M. The PRMT1 gene expression pattern in colon cancer. *Br J Cancer.* 2008;99:2094–9.
9. Altan B, Yokobori T, Ide M, Mochiki E, Toyomasu Y, Kogure N, et al. Nuclear PRMT1 expression is associated with poor prognosis and chemosensitivity in gastric cancer patients. *Gastric Cancer.* 2016;19:789–97.
10. Wang S, Tan X, Yang B, Yin B, Yuan J, Qiang B, et al. The role of protein arginine-methyltransferase 1 in gliomagenesis. *BMB Rep.* 2012;45:470–5.

11. Madreiter-Sokolowski CT, Gyorffy B, Klec C, Sokolowski AA, Rost R, Waldeck-Weiermair M, et al. UCP2 and PRMT1 are key prognostic markers for lung carcinoma patients. *Oncotarget*. 2017;8(46):80278–85.
12. Yang Y, Bedford MT. Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(1):37–50.
13. Zou L, Zhang H, Du C, Liu X, Zhu S, Zhang W, et al. Correlation of SRSF1 and PRMT1 expression with clinical status of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol*. 2012;5:42.
14. Avasarala S, Van Scoyk M, Rathinam MKK, Zerayesus S, Zhao X, Zhang W, et al. PRMT1 is a novel regulator of epithelial-mesenchymal-transition in non-small cell lung cancer. *J Biol Chem*. 2015;290(21):13479–89.
15. Gao Y, Zhao Y, Zhang J, Lu Y, Liu X, Geng P, et al. The dual function of PRMT1 in modulating epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence in breast cancer cells through regulation of ZEB1. *Sci Rep*. 2016;6:19874.
16. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119:1420–8.
17. He H, Magi-galluzzi C. Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Renal Neoplasms. *Adv Anat Pathol*. 2014;21:174–80.
18. Zhao X, Jankovic V, Gural A, Huang G, Pardanani A, Menendez S, et al. Methylation of RUNX1 by PRMT1 abrogates SIN3A binding and potentiates its transcriptional activity. *Genes Dev*. 2008;22:640–53.
19. Ondrej Hes, Ximing J. Yang. Renal Cell Carcinoma, Clear Cell Type. In: Jang XJ, editor. *Atlas of Practical Genitourinary Pathology*. 1st ed. Chicago: Mc Graw Hill Education; 2015. p. 512.
20. Amin MB, Edge SG, Brookland DR, Washington RK, Gershenwald MK JE. *AJCC Cancer Staging Form Supplement*. 8th ed. *AJCC Cancer Staging Manual*. American Joint Committee on Cancer; 2018.
21. Kuroda N, Tanaka A, Ohe C, Nagashima Y. Recent advances of

- immunohistochemistry for diagnosis of renal tumors. *Pathol Int*. 2013;63(8):381–90.
22. Tickoo, Satish K, Victor RE. Kidney tumors and tumor like conditions. In: Amin, Mahul B. Satish TK, editor. *Genitourinary Diagnostic Pathology*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier; 2016. p. 4–178.
 23. Bostwick, David G LC. *Urologic Surgical Pathology*. 3rd ed. Gregory T. MacLennan and Liang Cheng, editor. Philadelphia: Eesvier Saunders; 2013. 76–155 p.
 24. Magi-Galluzzi C PC. *Genitourinary Pathology*. 1st ed. Magi-Galluzzi C PC, editor. New York: Springer International Publishing; 2015. 271–429 p.
 25. Ozcan A. Immunoprofiles of Adult Renal Epithelial Tumors: Immunohistochemistry Is Still Essential for Diagnosis of Renal Tumors (A Comprehensive Update). *J Interdiscip Histopathol*. 2015;3(3):81–101.
 26. Paner GP, Amin MB, Alvarado-Cabrero I, Young AN, Sticker HJ, Moch H, et al. A Novel Tumor Grading Scheme for Chromophobe Renal Cell Carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2010;34:1233–40.
 27. Hes O, Petersson F, Kuroda N, Hora M, Michal M. Renal hybrid oncocytic/chromophobe tumors - A review. *Histol Histopathol*. 2013;28:1257–64.
 28. Perez-Ordenez B, Hamed G, Campbell S, Erlandson RA, Russo P, Gaudin PB, et al. Renal oncocytoma: a clinicopathologic study of 70 cases. *Am J Surg Pathol*. 1997;21:871–83.
 29. Trpkov K, Yilmaz A, Uzer D, Dishongh KM, Quick CM, Bismar TA, et al. Renal oncocytoma revisited: A clinicopathological study of 109 cases with emphasis on problematic diagnostic features. *Histopathology*. 2010;57:893–906.
 30. Delahunt B, Srigley JR, Judge MJ, Amin MB, Billis A CP et al. Dataset for the reporting of carcinoma of renal tubular origin: recommendations from the International Collaboration on Cancer Reporting (ICCR). *Histopathology*. 2019;74:377–90.
 31. Abrahams NA, Tamboli P. Oncocytic renal neoplasms: Diagnostic considerations. *Clin Lab Med*. 2005;25:317–39.
 32. Williamson SR, Halat S EJ. Multilocular Cystic Renal Cell Carcinoma:

Similarities and Differences in Immunoprofile Compared With Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2012;36:1425–33.

33. Williamson SR, Cheng L. Clear cell renal cell tumors: Not all that is “clear” is cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2016;34:292.e17-292.e22.

34. Ng KL, Rajandram R, Morais C, Yap NY, Samaratunga H, Gobe GC, et al. Differentiation of oncocytoma from chromophobe renal cell carcinoma (RCC): can novel molecular biomarkers help solve an old problem? *J Clin Pathol*. 2014;67:97–104.

35. Petersson F, Šíma R, Grossmann P, Michal M, Kuroda N, Hora M, et al. Renal small cell oncocytoma with pseudorosettes: A histomorphologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 10 cases. *Hum Pathol*. 2011;42:1751–60.

36. Xiao GQ, Ko HBM, Unger P. Telangiectatic oncocytoma: A previously undescribed variant of renal oncocytoma. *Am J Clin Pathol*. 2013;140:103–8.

37. Shimazaki H, Kiyoko T, Aida S, Tamai S. Renal Oncocytoma with Intracytoplasmic Lumina: A Case Report with Ultrastructural Findings of “Oncoblasts.” *Ultrastruct Pathol*. 2001;25:153–8.

38. Hes O, Michal M, Boudova L, Mukensnabl P, Kinkor Z, Miculka P. Small cell variant of renal oncocytoma—a rare and misleading type of benign renal tumor. *Int J Surg Pathol*. 2001;9:215–22.

39. Skenderi F, Ulamec M, Vranić S, Bilalović N, Pečkova K, Rotterova P, et al. Cystic renal oncocytoma and tubulocystic renal cell carcinoma: morphologic and immunohistochemical comparative study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2016;24:112–9.

40. Liu L, Qian J, Singh H, Meiers I, Zhou X, Bostwick DG. Immunohistochemical analysis of chromophobe renal cell carcinoma, renal oncocytoma, and clear cell carcinoma: An optimal and practical panel for differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131:1290–7.

41. Halat S, Eble JN, Grignon DJ, Lopez-Beltran A, Montironi R, Tan P-H, et al. Multilocular cystic renal cell carcinoma is a subtype of clear cell renal cell carcinoma. *Mod Pathol*. 2010;23:931–6.

42. Wahal SP, Mardi K. Multilocular cystic renal cell carcinoma: a rare entity with review of literature. *J Lab Physicians*. 2014.
43. Williamson SR, Maclennan GT, Lopez-Beltran A, Montironi R, Tan PH, Martignoni G, et al. Cystic partially regressed clear cell renal cell carcinoma: A potential mimic of multilocular cystic renal cell carcinoma. *Histopathology*. 2013;63:767–79.
44. Williamson SR, Cheng L. Clear cell renal cell tumors: Not all that is “clear” is cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2016;34(7):292.e17-22.
45. Clark PE. The role of VHL in clear-cell renal cell carcinoma and its relation to targeted therapy. *Kidney Int*. 2010;76(9):939–45.
46. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Essay Epigenetics : A Landscape Takes Shape. *Cell*. 2007;128(4):635–8.
47. Luger K, Dechassa ML, Tremethick DJ. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13:436–47.
48. Xing T, He H. Epigenomics of clear cell renal cell carcinoma: Mechanisms and potential use in molecular pathology. *Chinese J Cancer Res*. 2016;28(1):80–91.
49. Rogenhofer S, Kahl P, Mertens C, Hauser S, Hartmann W, Büttner R, et al. Global histone H3 lysine 27 (H3K27) methylation levels and their prognostic relevance in renal cell carcinoma. *BJU Int*. 2012;109(3):459–65.
50. Zhang R, Li X, Liang Z, Zhu K, Lu J, Kong X, et al. Theoretical Insights into Catalytic Mechanism of Protein Arginine Methyltransferase 1. *PLoS One*. 2013;8:1–11.
51. Baldwin RM, Morettin A, Côté J. Role of PRMTs in cancer: Could minor isoforms be leaving a mark? *World J Biol Chem*. 2014;5(2):115–29.
52. Nicholson TB, Chen T, Richard S. The physiological and pathophysiological role of PRMT1-mediated protein arginine methylation. *Pharmacol Res*. 2009;60(6):466–74.
53. Papadokostopoulou A, Mathioudaki K, Scorilas A, Xynopoulos D, Ardavanis A, Kouroumalis E TM. Colon cancer and protein arginine methyltransferase 1 gene expression. *Anticancer Res*. 2009;29:1361–6.

54. Baldwin RM, Morettin A, Paris G, Goulet I, Cote J. Alternatively spliced protein arginine methyltransferase 1 isoform PRMT1v2 promotes the survival and invasiveness of breast cancer cells. *Cell Cycle*. 2012;11:4597–612.
55. Vezzalini M, Aletta JM, Beghelli S, Moratti E, Della Peruta M, Mafficini A, et al. Immunohistochemical detection of arginine methylated proteins (MeRP) in archival tissues. *Histopathology*. 2010;57:725–33.
56. Yoshimatsu M, Toyokawa G, Hayami S, Unoki M, Tsunoda T, Field HI, et al. Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers. *Int J Cancer*. 2011;128(3):562–73.
57. Zhang T, Cui G, Yao YL, Guo Y, Wang QC, Li XN, et al. Inhibition of Nonsmall Cell Lung Cancer Cell Migration by Protein Arginine Methyltransferase 1 - small Hairpin RNA Through Inhibiting Epithelial -mesenchymal Transition, Extracellular Matrix Degradation, and Src Phosphorylation In Vitro. *Chin*. 2015;128(9):1202–8.
58. Xu Q, Deng F, Qin Y, Zhao Z, Wu Z, Xing Z, et al. Long non-coding RNA regulation of epithelial – mesenchymal transition in cancer metastasis. *Cell Death Dis*. 2016;7:e2254.
59. Skrypek N, Goossens S, Smedt E De, Vandamme N, Berx G. Epithelial-to-Mesenchymal Transition : Epigenetic Reprogramming Driving Cellular Plasticity. *Trends Genet*. 2017;33:943–59.
60. Stockinger A, Eger A, Wolf J, Beug H, Foisner R. E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent β -catenin transcriptional activity. *J Cell Biol*. 2001;154:1185–96.
61. Ying Y, Tao Q, Ying Y, Tao Q. Epigenetic disruption of the WNT / β -catenin signaling pathway in human cancers Epigenetic disruption of the WNT / β -catenin signaling pathway in human cancers. *Epigenetics*. 2009;4:307–12.
62. Cha B, Kim W, Kim YK, Hwang BN, Park SY, Yoon JW, et al. Methylation by protein arginine methyltransferase 1 increases stability of Axin, a negative regulator of Wnt signaling. *Oncogene*. 2011;30:2379–89.

63. Zhang P, Sun Y. ZEB1: At the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle*. 2015;14(481–487).
64. Singh M, Spoelstra NS, Jean A, Howe E, Torkko KC, Clark HR, et al. ZEB1 expression in type I vs type II endometrial cancers: A marker of aggressive disease. *Mod Pathol*. 2008;21(7):912–23.
65. Matsubara D, Kishaba Y, Yoshimoto T, Sakuma Y, Sakatani T, Tamura T, et al. Immunohistochemical analysis of the expression of E-cadherin and ZEB1 in non-small cell lung cancer. *Pathol Int*. 2014;64:560–8.
66. Spoelstra NS, Manning NG, Higashi Y, Darling D, Singh M, Shroyer KR, et al. The Transcription Factor ZEB1 Is Aberrantly Expressed in Aggressive Uterine Cancers. *Cancer Res*. 2006;1:3893–902.
67. Ma Y, Zheng X, Zhou J, Zhang Y, Chen K. ZEB1 promotes the progression and metastasis of cervical squamous cell carcinoma via the promotion of epithelial-mesenchymal transition. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):11258–67.
68. Hong D, Fritz AJ, Gordon JA, Tye CE, Boyd JR, Tracy KM, et al. RUNX1-dependent mechanisms in biological control and dysregulation in cancer. *J Cell Physiol*. 2019;234(6):8597–609.
69. Keita M, Bachvarova M, Morin C, Plante M, Gregoire J, Renaud MC, et al. The RUNX1 transcription factor is expressed in serous epithelial ovarian carcinoma and contributes to cell proliferation, migration and invasion. *Cell Cycle*. 2013;12:972–86.
70. Chimge NO, Little GH, Baniwal SK, Adisetiyo H, Xie Y, Zhang T, et al. RUNX1 prevents oestrogen-mediated AXIN1 suppression and β -catenin activation in ER-positive breast cancer. *Nat Commun*. 2016;7:10751.
71. Fijneman RJA, Anderson RA, Richards E, Liu J, Tijssen M, Meijer GA, et al. Runx1 is a tumor suppressor gene in the mouse gastrointestinal tract. *Cancer Sci*. 2012;103:593–9.
72. Fu Y, Sun S, Man X, Kong C. Increased expression of RUNX1 in clear cell renal cell carcinoma predicts poor prognosis. *PeerJ*. 2019;2019(10):1–12.

73. Hong D, Messier TL, Tye CE, Dobson JR, Fritz AJ, Sikora KR, et al. Runx1 stabilizes the mammary epithelial cell phenotype and prevents epithelial to mesenchymal transition. 2017;8(11):17610–27.
74. Zhao Z, Rahman MA, Chen ZG, Dong M. Multiple biological functions of Twist1 in various cancers. 2017;8(12):20380–93.
75. Bastid J, Ciancia C, Puisieux A, Ansieau S. Role of TWIST proteins in cancer progression. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2011;14:898–907.
76. Rasti A, Madjd Z, Abolhasani M, Mehrazma M, Janani L, Saeednejad Zanjani L, et al. Cytoplasmic expression of Twist1, an EMT - related transcription factor, is associated with higher grades renal cell carcinomas and worse progression - free survival in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Exp Med*. 2018;18:177-190.
77. Ohba K, Miyata Y, Matsuo T, Asai A, Mitsunari K, Shida Y. High expression of Twist is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in patients with renal cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(6):3158–65.
78. Kampf C, Olsson I, Ryberg U, Sjöstedt E, Pontén F. Production of Tissue Microarrays, Immunohistochemistry Staining and Digitalization Within the Human Protein Atlas. *J Vis Exp*. 2012;(63):e3620.
79. Ricketts CJ, Cubas AA De, Fan H, Spellman PT, Rathmell WK, Linehan WM, et al. Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma The Cancer Genome Atlas Comprehensive Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma. *Cell Rep*. 2018;23:313–26.
80. Liu C, Tao TAO, Xu BIN, Lu KAI, Zhang LEI, Jiang L, et al. BTG1 potentiates apoptosis and suppresses proliferation in renal cell carcinoma by interacting with PRMT1. *Oncol Lett*. 2015;10:619–24.
81. Guarch R, Lawrie CH, Larrinaga G, Angulo JC, Pulido R. High levels of intratumor heterogeneity characterize the expression of epithelial-mesenchymal transition markers in high-grade clear cell renal cell carcinoma. *Ann Diagn Pathol*. 2018;34:27–30.
82. Nassar A, Radhakrishnan A, Cabrero IA, Cotsonis GA CC. Intratumoral

Heterogeneity of Immunohistochemical Marker Expression in Breast Carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010;18:433–41.

83. Renovanz M, Kim EL. Molecular and Cellular Oncology Intratumoral heterogeneity, its contribution to therapy resistance and methodological caveats to assessment. *Front Oncol*. 2014;4:142.

84. Zaldumbide L, Erramuzpe A, Guarch R. Large (> 3 . 8 cm) clear cell renal cell carcinomas are morphologically and immunohistochemically heterogeneous. *Virchows Arch*. 2015;466:61–6.

85. Cortés MJ, De Petris G LJ. Detection of intratumor Heterogeneity in Modern Pathology: A Multisite tumor sampling Perspective. *Front Med*. 2017;4:25.

86. Williamson SR, Maclennan GT, Lopez-Beltran A, Montironi R, Tan PH, Martignoni G, et al. Cystic partially regressed clear cell renal cell carcinoma: A potential mimic of multilocular cystic renal cell carcinoma. *Histopathology*. 2013;63(6):767–79.

87. Alamara C, Karapanagiotou EM, Tourkantonis I, Xyla V, Maurer CC, Lykourinas M, et al. Renal oncocytoma: A case report and short review of the literature. *Eur J Intern Med*. 2008;19:e67–9.

88. Petersson F, Šíma R, Grossmann P, Michal M, Kuroda N, Hora M, et al. Renal small cell oncocytoma with pseudorosettes: A histomorphologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 10 cases. *Hum Pathol*. 2011;42(11):1751–60.

89. Xiao GQ, Ko HBM, Unger P. Telangiectatic oncocytoma: A previously undescribed variant of renal oncocytoma. *Am J Clin Pathol*. 2013;140(1):103–8.

90. Williamson SR, Gadde R, Trpkov K, Hirsch MS, Srigley JR, Reuter VE, et al. Diagnostic criteria for oncocytic renal neoplasms: a survey of urologic pathologists. *Hum Pathol*. 2017;63:149–56.

91. Din NU, Fatima S, Ahmad Z. Chromophobe renal cell carcinoma: A morphologic and immunohistochemical study of 45 cases. *Ann Diagn Pathol*. 2013;17:508–13.

92. Hes O, Vanecek T, Perez-Montiel DM, Alvarado Cabrero I, Hora M, Suster S, Lamovec J, Curik R, Mandys V MM. Chromophobe renal cell carcinoma with microcystic

and adenomatous arrangement and pigmentation-a diagnostic pitfall. Morphological, immunohistochemical, ultrastructural and molecular genetic report of 20 cases. *Virchows Arch.* 2005;446:383–93.

93. Harada KI, Miyake H, Kusuda Y, Fujisawa M. Expression of epithelial-mesenchymal transition markers in renal cell carcinoma: Impact on prognostic outcomes in patients undergoing radical nephrectomy. *BJU Int.* 2012;110:e1131-e1137.

94. Zaldumbide L, Erramuzpe A, Guarch R, Pulido R, Cortés JM, López JI. Snail heterogeneity in clear cell renal cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2016;16:194.

95. Lichtinghagen R, Musholt PB, Lein M, Römer A, Rudolph B, Kristiansen G, et al. Different mRNA and protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in benign and malignant prostate tissue. *Eur Urol.* 2002;42(4):398–406.

96. Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol.* 2003;4(9).

97. Uhlen M, Zhang C, Sunjae Lee S, Sjöstedt E, Fagerberg L, Bidkhori G BR et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science.* 2017;357:eaan2507.

98. Øvrebø JI, Edgar BA. Polyploidy in tissue homeostasis and regeneration. *Development.* 2018;145:1-16.

99. Liu J. The dualistic origin of human tumors. *Semin Cancer Biol.* 2018;53:1–16.

100. Cheng L, Shen C, Lin J. Reversine, a substituted purine, exerts an inhibitive effect on human renal carcinoma cells via induction of cell apoptosis and polyploidy. *Oncotargets Ther.* 2018;11:1025–35.

Biografija

Jelena (Milorad) Filipović, rođena je 27.08.1985. u Zrenjaninu, Republika Srbija. Osnovnu i Srednju medicinsku školu završila je u Zrenjaninu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2004. godine i diplomirala 2010. godine sa prosečnom ocenom na studijama 8.63. Završila je Specijalističke akademske studije, smer Citologija, histohemija, elektronska mikroskopija i embriologija na Medicinskom fakultetu u Beogradu 2011. godine. Doktorske akademske studije upisala je oktobra 2011. godine, smer Molekularna medicina, a izrada doktorske disertacije pod nazivom „*Ekspresija protein arginin metil transferaze 1 (PRMT1) i njenih ko-efektora u tumorima bubrežnih ćelija kod odraslih*“ odobrena je na sednici Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu 27.02.2018. godine. Za mentora doktorske disertacije imenovana je prof. dr Jasmina Marković-Lipkovski, redovan profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Od 01. jula 2011. zaposlena je kao istraživač na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod nazivom „*Karakterizacija bubrežnih stem/progenitor ćelija kod čoveka: identifikacija novih površinskih markera multipotentnih bubrežnih ćelija koje mogu imati regenerativnu ulogu kod oštećenja bubrega*“, broj OI 175047. Bila je i član PPP-DAAD bilateralnog projekta između Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i DAAD fondacije SR Nemačke, pod nazivom „*Characterization of Progenitor Cells for Kidney Regeneration (“ProKiReg”): Identity of NCAM positive Progenitors in fetal and adult Kidney*“ u toku 2014/2015 godine. Od 02. novembra 2011. zaposlena je kao saradnik u nastavi na Katedri Patologije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a potom od 2014. kao asistent na istoj Katedri. Specijalistički ispit iz patološke anatomije dr Filipović je položila u januaru 2017.godine. Uže oblasti interesovanja dr Filipović su uropatologija, nefropatologija i molekularna patologija, a usavršavala se u SR Nemačkoj i Češkoj Republici. Dr Filipović je dobitnik „Giordani stipendije“ Evropskog udruženja patologa, za 2017.godinu, iz oblasti urološke patologije. Dr Filipović je rezultate svojih istraživanja prikazivala na brojnim domaćim i naučnim skupovima, a u saradnji sa drugim autorima publikovala je u celini 9 radova.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Jelena Filipović

Broj indeksa MM 20/11

Izjavljujem

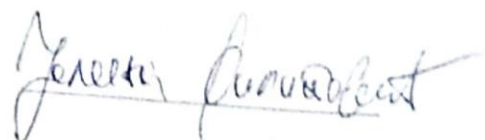
Da je doktorska disertacija pod naslovom

„Ekspresija protein arginin metil transferaze 1 (PRMT1) i njenih ko-efektora u tumorima bubrežnih ćelija kod odraslih“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, 19.06.2020.




Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora **Jelena Filipović**
Broj indeksa MM 20/11
Studijski program Molekularna medicina

Naslov rada „Ekspresija protein arginin metil transferaze 1 (PRMT1) i njenih ko-efektora u tumorima bubrežnih ćelija kod odraslih“

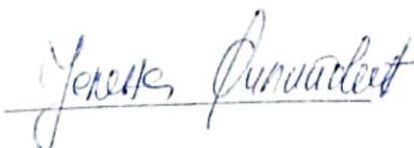
Mentor prof. dr Jasmina Marković-Lipkovski

Potpisani 

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora 

U Beogradu, 19.06.2020.

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Ekspresija protein arginin metil transferaze 1 (PRMT1) i njenih ko-efektora u tumorima bubrežnih ćelija kod odraslih“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

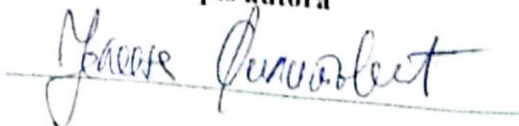
1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerada
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.

Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

U Beogradu, 19.06.2020.

Potpis autora



1. Autorstvo. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.