

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Bojana M. Uzelac

PROGNOSTIČKI ZNAČAJ EKSPRESIJE GENA
ZA HISTON-DEACETILAZE KOD
PACIJENTKINJA SA TROSTRUKO-
NEGATIVNIM I HORMON RECEPTOR-
POZITIVNIM KARCINOMOM DOJKE

Doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Bojana M. Uzelac

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF HISTONE-
DEACETILASE GENES EXPRESSION IN
PATIENTS WITH TRIPLE-NEGATIVE AND
HORMONE-RECEPTOR POSITIVE BREAST
CANCER

Doctoral dissertation

Belgrade, 2021

MENTORI

dr Gordana Šupić, vanredni profesor

Univerzitet odbrane, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije

dr Katarina Zeljić, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

KOMISIJA ZA OCENU I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

dr Gordana Šupić, vanredni profesor

Univerzitet odbrane, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije

dr Katarina Zeljić, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Ana Krivokuća, viši naučni saradnik

Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Datum odbrane _____

Zahvalnica

Najsrdajnije se zahvaljujem prof. dr Gordani Šupić, mentoru, na ukazanom poverenju za realizaciju ove ideje, vođenju i nesebičnom deljenju znanja i iskustva tokom svih faza izrade ovog rada. Zahvalna sam na prilici da učim od nje, na strpljenju i posvećenosti koju je pokazala podržavajući me i motivišući me na ovom putu.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Katarini Zeljić, mentoru, na upoznavanju sa osnovnim principima dobre laboratorijske prakse i etikom naučnoistraživačkog rada, vremenu izdvojenom za brojne konsultacije, pomoći i podršci prilikom realizacije ove doktorske disertacije.

Veliko hvala višem naučnom saradniku dr Ani Krivokući, članu komisije, na više nego korisnim sugestijama i stalnoj dostupnosti za svaki vid pomoći prilikom izrade ove disertacije.

Želim da se zahvalim prof. dr Marini Stamenković-Radak i prof. dr Biljani Božić Nedeljković na podršci i savetima tokom trajanja doktorskih akademskih studija.

Zahvaljujem se svim kolegama Instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije. Velika mi je čast i zadovoljstvo biti deo tog kolektiva. Naročito se zahvaljujem profesoru Vojvodiću, Ivanu, Stevi, Saški, Gorici, Ivani, Debori i Nemanji na svakodnevnoj podršci, savetima, pričama i druženju.

Zahvaljujem se svojim prijateljima, porodici i kumovima na podršci i razumevanju.

Najveću zahvalnost dugujem mami, tati, Nikoli i Stevanu na bezgraničnoj ljubavi koju mi pružaju svakog dana, koja me vuče napred i čini da mogu nemoguće. Vi ste moj oslonac, snaga i smisao.

Rad posvećujem svojim roditeljima

Ova doktorska disertacija je realizovana u laboratoriji za Molekulsku genetiku Instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije. Biološki uzorci korišćeni za izradu ove doktorske disertacije su obezbeđeni u saradnji sa Institutom za onkologiju i radiologiju Srbije.

PROGNOSTIČKI ZNAČAJ EKSPRESIJE GENA ZA HISTON-DEACETILAZE KOD PACIJENTKINJA SA TROSTRUKO-NEGATIVNIM I HORMON RECEPTOR-POZITIVNIM KARCINOMOM DOJKE

SAŽETAK

U osnovi kancerogeneze nalazi se akumulacija različitih genetičkih i epigenetičkih promena. Epigenetički mehanizmi (metilacija DNK, modifikacija histona i nekodirajuće RNK) regulišu ćelijski ciklus, metabolizam, DNK reparaciju i apoptozu. Trostruko-negativni karcinom dojke (TNBC) se odlikuje odsustvom receptora za estrogen, progesteron i humani epidermalni faktor rasta-2, HER2. Karakteriše se agresivnom kliničkom slikom i lošom prognozom, za razliku od hormon receptor-pozitivnog, HER2-negativog (ER+PR+HER2-) koji se odlikuje manjom agresivnošću, boljom kliničkom slikom i većom stopom preživljavanja. Narušena genska ekspresija histon-deacetilaza predstavlja potencijalni biomarker toka i ishoda bolesti. Cilj studije je ispitati povezanost ekspresije gena za histon-deacetilaze sa kliničko-patološkim karakteristikama i preživljavanjem ispitivanih pacijenata sa karcinomom dojke.

Studijsku grupu je činila 61 pacijentkinja sa trostruko-negativnim, i 74 sa hormon receptor-pozitivnim, HER2-negativnim karcinomom dojke. Analiza ekspresije *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT6*, *SIRT7* i *HDAC7* gena je urađena metodom kvantitativnog PCR-a.

Rezultati su pokazali različite nivoe ekspresije *SIRT1*, *SIRT3* i *HDAC7* gena kod dve grupe pacijenata. Utvrđena je povezanost snižene ekspresije *SIRT1* i *SIRT6* i lošeg preživljavanja pacijenata sa ER+PR+HER2-, i povećane *SIRT3* ekspresije i lošeg preživljavanja pacijenata sa TNBC. Kod obe grupe je utvrđena povezanost povećane *SIRT7* ekspresije i lošeg preživljavanja. *HDAC7* predstavlja negativan prediktivan parametar lošeg preživljavanja pacijentkinja sa TNBC.

Na osnovu dobijenih rezultata, zaključeno je da ekspresija ispitivanih gena zavisi od tipa karcinoma dojke i ukazano je na potencijal daljih ispitivanja prognostičkog i prediktivnog značaja ovih gena u TNBC i ER+PR+HER2- tipu karcinoma dojke.

Ključne reči: karcinom dojke, TNBC, ER+PR+HER2-, epigenetika, ekspresija gena, histon-deacetilaze, sirtuini

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genetika

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF HISTONE-DEACETYLASE GENES EXPRESSION IN PATIENTS WITH TRIPLE-NEGATIVE AND HORMONE-RECEPTOR POSITIVE BREAST CANCER

ABSTRACT

Accumulation of different genetic and epigenetic alterations is underlying the process of cancerogenesis. Epigenetic modifications (DNA methylation, histone modification and ncRNAs) regulate cell cycle, metabolism, DNA repair and apoptosis. Triple-negative breast cancer (TNBC) is defined by absence of estrogen and progesterone receptors, and also receptor for human epidermal growth factor-2, HER2. It is characterized by aggressive phenotype and poor prognosis, as opposed to hormone receptor-positive, HER2-negative, less aggressive, with higher survival rates and better prognosis breast cancer type. Aberrant expression of histone-deacetylase genes could be potential biomarker for predicting outcomes and prognosis of breast cancer patients. The aim of this study was to investigate association of histone-deacetylase genes expression with clinicopathological characteristics and survival rates of breast cancer patients.

The study included 61 patients with triple-negative, and 74 with hormone receptor-positive, HER2-negative breast cancer. Analysis of *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT6*, *SIRT7* and *HDAC7* genes expression was evaluated by quantitative PCR method.

Results revealed different *SIRT1*, *SIRT3* and *HDAC7* genes expression levels in two groups of patients. It was shown association of low *SIRT1* and *SIRT6* expression and poor survival of ER+PR+HER2- patients, and also *SIRT3* overexpression and poor survival of TNBC patients. *SIRT7* overexpression was associated with poor survival in both examined groups of breast cancer patients. *HDAC7* persisted as a negative predictive factor of poor survival of TNBC patients.

It has been concluded that expression levels of investigated genes depend on the molecular subtype of breast cancer. It has been implicated that further research of potential significance of these genes in TNBC and in ER+PR+HER2- breast cancer should be carried on.

Keywords: breast cancer, TNBC, ER+PR+HER2-, epigenetics, gene expression, histone-deacetylases, sirtuins

Scientific field: Biology

Narrower scientific field: Genetics

Lista skraćénica

TNBC	Trostruko-negativan karcinom dojke (eng. <i>Triple-negative breast cancer</i>)
HER2	Receptor za humani epidermalni faktor rasta 2 (eng. <i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>)
ER+	Estrogen receptor pozitivan
PR+	Progesteron receptor pozitivan
EGFR	Receptor za epidermalni faktor rasta (eng. <i>Epidermal growth factor receptor</i>)
CNAs	Promene u broju ponovaka (eng. <i>Copy-number alterations</i>)
TGF β	Transformišući faktor rasta beta (eng. <i>Transforming growth factor beta</i>)
RNK	Ribonukleinska kiselina
ADP	Adenzin-difosfat (eng. <i>Adenosine diphosphate</i>)
PARP	Poli-ADP-ribozna polimeraza (eng. <i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>)
CDK4	Ciklin-zavisna kinaza 4 (eng. <i>Cyclin-dependent kinase 4</i>)
PI3K	Fosfatidil-inozitol 3 kinaza (eng. <i>Phosphoinositide 3-kinase</i>)
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
DNMT1	DNK-metiltransferaza 1 (eng. <i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1</i>)
DNMT3A	DNK-metiltransferaza 3A (eng. <i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A</i>)
DNMT3B	DNK-metiltransferaza 3B (eng. <i>DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta</i>)
HMT	Histon-metiltransferaza
HDM	Histon-demetilaza
HAT	Histone-acetiltransferaza
HDAC	Histon-deacetilaza
SIRT	Tihi regulator informacija 2 (eng. <i>Silent mating type information regulation 2 homolog</i>)
BER	Bazni isecajući mehanizam popravke (eng. <i>Base excision repair</i>)
NER	Nukelotidni isecajući mehanizam popravke (eng. <i>Nucleotide excision repair</i>)
HR	Homologa rekombinacija

NHEJ	Hehomologa rekombinacija spojenih krajeva (eng. <i>Non-homologous end joining</i>)
NF- κ B	Nukleusni faktor κ B (eng. <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NAD ⁺	Nikotinamid dinukleotid
NADH	Nikotinamid dinukleotid vodonik
ER α	Receptor za estrogen alfa
HIF-1 α	Inducibilni faktor hipoksije 1-alfa (eng. <i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>)
ATP	Adenozin-trifosfat
EMT	Epitelno-mezenhimska tranzicija (eng. <i>Epithelial-mesenchymal transition</i>)
MMP	Matriksna metaloproteinaza (eng. <i>Matrix metalloproteinases</i>)
MnSOD	Mangan-superoksid dismutaza
SOD2	Superoksid dismutaza 2
OGG1	8-oksoguanin glikozilaza
IDH2	Izocitrat dehidrogenaza
GLUT1	Glukoзни transporter 1
TERT	Reverzna transkriptaza telomeraze (eng. <i>Telomerase reverse transcriptase</i>)
RPS	Ribozomski protein S
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
BLCB	Karcinom dojke sličan bazalnom tipu (eng. <i>Basal-like breast cancer</i>)
rDNK	Ribozomalna dezoksiribonukleinska kiselina

Sadržaj

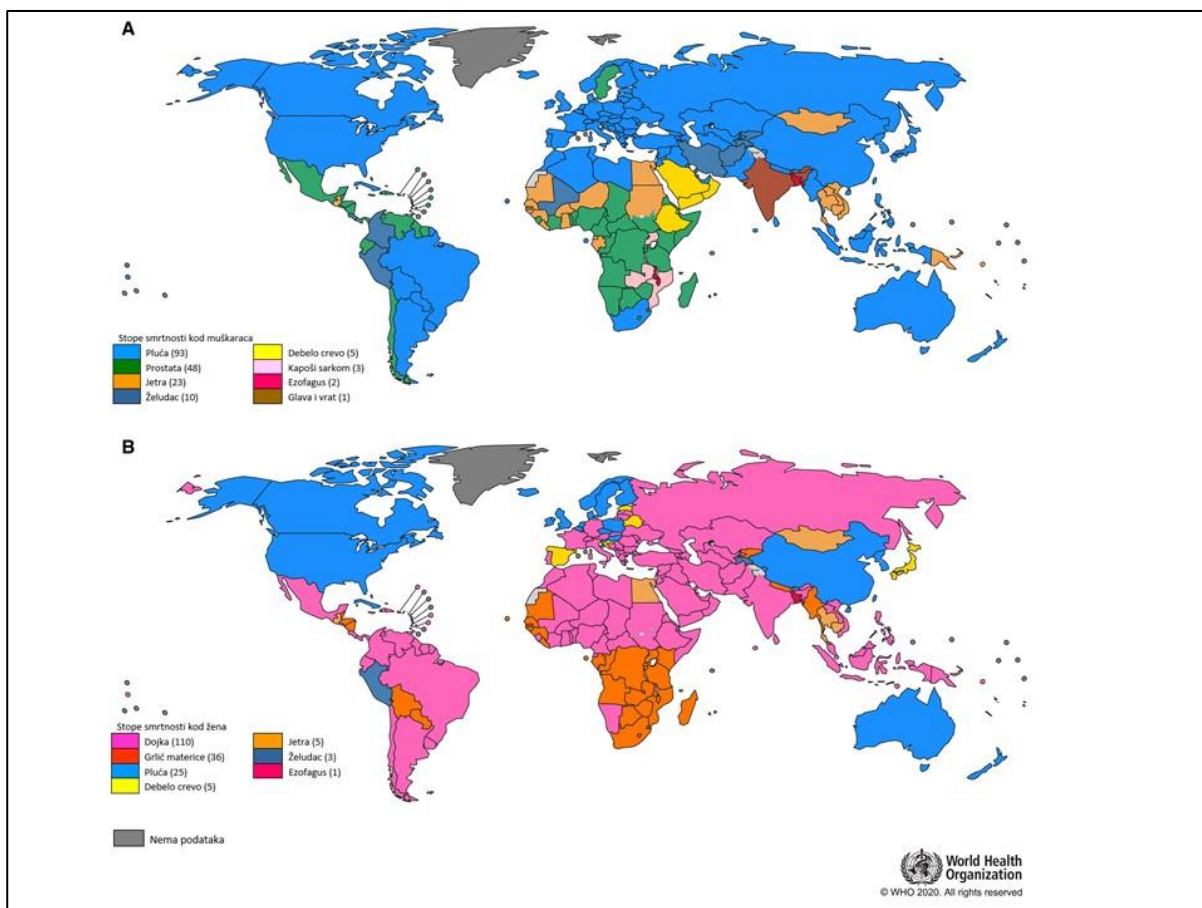
1. Uvod	1
1.1. Karcinom dojke	1
1.1.1. Klasifikacija karcinoma dojke	2
1.1.2. TNM klasifikacija karcinoma dojke	3
1.1.3. Trostruko-negativni karcinom dojke	3
1.1.4. Hormon receptor-pozitivan karcinom dojke	5
1.2. Epigenetika kancera	6
1.2.1. DNK metilacija	7
1.2.2. Modifikacija histona	8
1.2.3. Nekodirajuće RNK	10
1.3. Histon-deacetilaze	10
1.3.1. HDAC7 i kancer	12
1.4. Sirtuini i kancer	13
1.4.1. SIRT1	15
1.4.2. SIRT3	17
1.4.3. SIRT6	18
1.4.4. SIRT7	21
2. Ciljevi rada	24
3. Materijal i metode	24
3.1. Materijal	24
3.1.1. Studijska grupa	24
3.2. Metode	25
3.2.1. Izolacija ukupne RNK	25
3.2.2. Određivanje koncentracije RNK u uzorku	26
3.2.3. Reverzna transkripcija	27
3.2.4. Lančana reakcija polimeraze	27
3.2.5. Elektroforeza na agaroznom gelu	28
3.2.6. Kvantitativni PCR	29
3.2.7. Statistička analiza podataka	31
4. Rezultati	33
4.1. Ekspresija <i>SIRT1</i> gena kod pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke	33
4.2. Ekspresija <i>SIRT3</i> gena kod pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke	34
4.3. Ekspresija <i>SIRT6</i> gena kod pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke	36

4.4.	Ekspresija <i>SIRT7</i> gena kod pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke.....	37
4.5.	Ekspresija <i>HDAC7</i> gena kod pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke.....	38
4.6.	Analiza povezanosti ekspresije <i>SIRT1</i> gena sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke.....	40
4.7.	Analiza povezanosti ekspresije <i>SIRT3</i> gena sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke.....	42
4.8.	Analiza povezanosti ekspresije <i>SIRT6</i> gena sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke.....	44
4.9.	Analiza povezanosti ekspresije <i>SIRT7</i> gena sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke.....	46
4.10.	Analiza povezanosti ekspresije <i>HDAC7</i> gena sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke.....	48
4.11.	Analiza ukupnog preživljavanja pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke u odnosu na ekspresiju <i>SIRT1</i> gena	50
4.12.	Analiza ukupnog preživljavanja pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke u odnosu na ekspresiju <i>SIRT3</i> gena	51
4.13.	Analiza ukupnog preživljavanja pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke u odnosu na ekspresiju <i>SIRT6</i> gena	52
4.14.	Analiza ukupnog preživljavanja pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke u odnosu na ekspresiju <i>SIRT7</i> gena	53
4.15.	Analiza ukupnog preživljavanja pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke u odnosu na ekspresiju <i>HDAC7</i> gena.....	54
4.16.	Ispitivanje prognostičkih faktora za preživljavanje pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke univarijantnom analizom.....	55
4.17.	Ispitivanje nezavisnih prediktivnih faktora preživljavanja pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke multivarijantnom Cox regresionom analizom	56
5.	Diskusija.....	57
5.1.	Povezanost <i>SIRT1</i> genske ekspresije sa kliničko-patološkim karakteristikama i prognostičkim značajem pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim tipom karcinoma dojke..	57
5.2.	Povezanost <i>SIRT3</i> genske ekspresije sa kliničko-patološkim karakteristikama i prognostičkim značajem pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim tipom karcinoma dojke..	60
5.3.	Povezanost <i>SIRT6</i> genske ekspresije sa kliničko-patološkim karakteristikama i prognostičkim značajem pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim tipom karcinoma dojke..	62
5.4.	Povezanost <i>SIRT7</i> genske ekspresije sa kliničko-patološkim karakteristikama i prognostičkim značajem pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim tipom karcinoma dojke..	64
5.5.	Povezanost <i>HDAC7</i> genske ekspresije sa kliničko-patološkim karakteristikama i prognostičkim značajem pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim tipom karcinoma dojke..	66
6.	Zaključci	68
7.	Literatura	69

1. Uvod

1.1. Karcinom dojke

Karcinom dojke kod žena predstavlja najčešće maligno oboljenje i vodeći je uzrok smrtnosti žena obolelih od karcinoma (1). Prema podacima iz 2020. godine, procenjeno je da je u svetu od karcinoma dojke novoobolelo 2,3 miliona žena, što je 11,7% svih novootkrivenih pacijenta sa nekom vrstom maligne bolesti. Stope incidencije karcinoma dojke su značajno veće u razvijenim zemljama u odnosu na zemlje u razvoju, međutim stope smrtnosti žena sa karcinomom dojke su značajno veće u zemljama u razvoju (17%) u odnosu na razvijene zemlje, Slika 1 (2). Visoka učestalost karcinoma dojke u razvijenim zemljama javlja se kao posledica visoke prevalencije hormonskih i reproduktivnih faktora rizika, ali i faktora rizika koji se odnose na životni stil žena iz razvijenih područja, u odnosu na žene iz zemalja u razvoju (2). Takođe, veća učestalost karcinoma dojke u razvijenim zemljama se može objasniti i boljom dostupnošću dijagnostičkih metoda i metoda skrininga za rano otkrivanje karcinoma dojke u odnosu na dostupnost istih u zemljama u razvoju.



Slika 1. Raspodela stope mortaliteta usled pojave kancera po zemljama među A) muškarcima i B) ženama. Preuzeto i modifikovano: Sung i saradnici (2)

Faktori rizika za nastanak karcinoma dojke se mogu podeliti u tri kategorije: faktori spoljašnje sredine, endokrini i genetički faktori. Faktori spoljašnje sredine kao što su povećana telesna masa, kalorična ishrana, smanjena fizička aktivnost, pušenje, ali i reproduktivni faktori poput rane menarhe, odlaganja planiranja potomstva, izostanak laktacije i kasnija menopauza, u značajnoj meri

povećavaju rizik za nastanak karcinoma dojke (2). Izloženost jonizujućem zračenju, kancerogenim materijama, povećana konzumacija alkohola i virusne infekcije predstavljaju poseban vid faktora rizika spoljašnje sredine za razvoj karcinoma dojke (3).

Endokrini faktori rizika, odnosno endogeni i egzogeni hormoni, u velikoj meri utiču na pojavu i razvoj karcinoma dojke. Brojne studije ukazuju na kumulativni efekat estrogena, a naročito estradiola na epitelno tkivo dojke kao faktor rizika za nastanak neoplastične transformacije. Rana menarha i kasna menopauza povećavaju broj ovulatornih ciklusa i time povećavaju nivo estrogena u cirkulaciji. Kod žena u postmenopauzi, glavni izvor estrogena predstavlja konverzija androstendiona u estrogen u adipoznom tkivu, te gojaznost u ovoj starosnoj dobi povećava produkciju estrogena i time značajno doprinosi povećanju rizika za nastanak karcinoma dojke (3). Sve više studija upućuje na to da upotreba steroidnih hormona utiče na ćelijsku proliferaciju povećavajući rizik za nastanak karcinoma dojke. Hormonske terapije, kao i oralni kontraceptivi su dve najrasprostranjenije forme egzogenih hormona. Upotreba oralnih kontraceptivih sredstava i hormonske terapije povećavaju rizik za nastanak karcinoma dojke kod žena koje su trenutno na terapiji ili su nedavno prekinule terapiju. Potvrđeno je da je rizik za razvoj karcinoma dojke proporcionalan dužini vremena uzimanja hormonske terapije (3).

U osnovi kancerogeneze dojke, kao i ostalih tipova kancera, nalazi se akumulacija različitih genetičkih promena, među kojima su ključni aktivacija protoonkogena i inaktivacija tumorsupresorskih gena. Nasledna predispozicija za nastanak karcinoma dojke u velikoj meri povećava rizik. Međutim, kod žena koje imaju pojavu karcinoma dojke u porodici, manje od 30% slučajeva ima identifikovanu genetičku mutaciju kao glavnog uzročnika patogeneze (4). U 25% slučajeva naslednog karcinoma dojke, detektovana je mutacija u nekom od visoko penetrabilnih gena kao što su *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *PTEN*, *TP53*, *CDH1* i *STK11* (4, 5). Mutacije u ovim genima povećavaju rizik do 80% za nastanak karcinoma dojke tokom života. Dodatni rizik od 2-3% za nastanak karcinoma dojke predstavljaju mutacije u genima umerene penetrabilnosti kao što su *CHEK2*, *BRIP1* i *ATM* (4).

1.1.1. Klasifikacija karcinoma dojke

Klasifikacija karcinoma dojke može biti bazirana na histološkom i na molekularnom nivou, a u odnosu na bazalnu laminu dele se na invazivne i neinvazivne, odnosno *in situ*. Neinvazivni karcinom dojke podrazumeva pojavu atipičnih ćelija na mestu nastanka neoplastične transformacije koje ne prelaze bazalnu laminu. Po mestu nastanka mogu biti duktalni karcinom *in situ* i lobularni karcinom *in situ*. I jedan i drugi tip kancera dojke pokazuju tendenciju da vremenom pređu u invazivne tipove. Kod invazivnih tipova karcinoma dojke, atipične ćelije prolaze bazalnu laminu, prožimaju okolno tkivo i imaju mogućnost migracije u druge delove tela. U invazivne karcinome dojke spadaju invazivni duktalni karcinom, invazivni lobularni, medularni, mucinozni, tubularni, a mogući su i mešoviti tipovi karcinoma dojke (6).

Pored velike histološke heterogenosti, karcinom dojke se odlikuje i molekularnom heterogenošću. Na osnovu St. Galen molekularne stratifikacije, odnosno na osnovu imunohistohemijske ekspresije estrogenskih i progesteronskih receptora, kao i receptora za humani epidermalni faktor rasta - HER2, karcinom dojke se može podeliti na pet različitih podtipova: luminalni A, luminalni B (HER2-), luminalni B (HER2+), HER2+, i trostruko-negativni karcinom dojke (eng. *Triple Negative Breast Cancer - TNBC*) (7). Na osnovu genskih ekspresionih profila, moguće je izvršiti molekularnu klasifikaciju na luminalni A, luminalni B, HER2-bogati tip, i bazalnom tipu sličan karcinom dojke (eng. *Basal-Like Breast Cancer- BLBC*) (8). TNBC i bazalnom tipu sličan karcinom dojke se u izvesnoj meri preklapaju kako fenotipski, tako i na osnovu ekspresionih profila. Neki autori smatraju da je TNBC zapravo najučestaliji podtip BLBC

(9), dok po drugim autorima oko 70% TNBC pokazuje fenotip sličan bazalnom tipu, a 30% TNBC tipa se fenotipski potpuno razlikuje od BLBC (10). Značaj molekularne klasifikacije je u personalizovanom pristupu lečenja pacijenata, odnosno u odabiru specifične terapije na osnovu molekularnih obrazaca tumora.

Patogeneza karcinoma dojke je kompleksan, multifaktorijsan proces, regulisan različitim mehanizmima u različitim stadijumima kancerogeneze. Heterogenost u histološkoj i molekularnoj klasifikaciji karcinoma dojke utiče na veliku varijabilnost kliničke slike, kao i na varijabilnost toka bolesti i preživljavanja pacijenata sa različitim tipovima karcinoma dojke. Mnogobrojne studije koje su se bavile ispitivanjima karcinoma dojke u poslednjih dvadesetak godina su doprinele velikom napretku u razumevanju patogeneze, kao i napretku razvoja različitih terapijskih strategija za lečenje pacijenata obolelih od ovog maligniteta.

1.1.2. TNM klasifikacija karcinoma dojke

U cilju postavljanja adekvatne dijagnoze kao i odabira optimalne strategije lečenja pacijenata sa karcinomom dojke, pored histološke i molekularne klasifikacije, neophodno je tumore stratifikovati i na osnovu tzv. TNM klasifikacije. Ovaj vid klasifikacije se koristi još od 40-ih godina prošlog veka i njome se opisuje anatomska proširenost i stadijum tumora. TNM klasifikacija tumora se određuje na osnovu veličine tumora (T), zahvaćenosti limfnih čvorova (N) i prisutstva metastaza (M). Ova klasifikacija se upostavlja fizikalnim pregledom i radiološkim ispitivanjima (11).

Na osnovu veličine tumora, tumori se mogu razvrstati u tri kategorije. T1 kategoriju obuhvataju tumori veličine manje od 2cm, T2 tumori veličine između 2 i 5cm, dok T3 kategoriju čine tumori veličine veće od 5cm. Posebnu T4 kategoriju čine tumori bilo koje veličine, ali kod kojih je došlo do invazije na zid grudnog koša ili kožu, odnosno inflamatorni tip karcinoma (11).

U odnosu na to da li su se metastaze proširile na regionalne limfne čvorove, nodalni status tumora se može definisati kao N0, kada nisu detektovane metastaze u okolnim limfnim čvorovima, ili N1, ukoliko postoje metastaze u okolnim limfnim čvorovima. U zavisnosti od broja zahvaćenih limfnih čvorova kao i veličine metastaza, tumori mogu biti kategorisani kao N1, N2 i N3 (12).

Uzimajući u obzir postojanje distalnih metastaza, tumori se mogu klasifikovati kao M0 ili M1. M0 tumori su oni kod kojih nisu klinički i radiološki detektovane metastaze, dok su M1 tumori oni kod kojih je detektovano prisustvo udaljenih metastaza (13).

Pored TNM klasifikacije, bitan parametar pri determinisanju dijagnoze i prognoze onkoloških pacijenata je i određivanje histološkog gradusa tumora. Histološki gradus tumora se određuje na osnovu stepena diferenciranosti tumora i razlikuju se tri gradusa tumora. G1 histološki gradus se odnosi na najdiferenciraniji tip tumora i odlikuje se najboljom prognozom. G2 histološki tip se odlikuje manjim stepenom diferencijacije i lošijom prognozom, dok se G3 gradus odlikuje najmanjim stepenom diferencijacije i najnepovoljnijom prognozom (14).

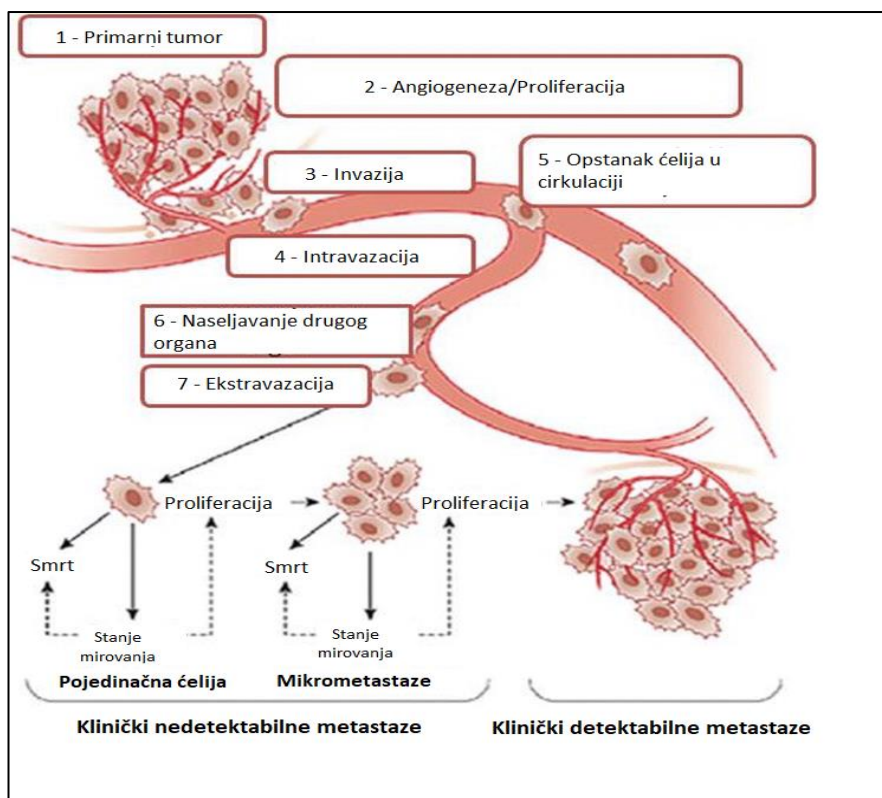
1.1.3. Trostruko-negativni karcinom dojke

Trostruko-negativni karcinom dojke je molekularni tip karcinoma dojke definisan odsustvom receptora za estrogen, progesteron i receptora za humani epidermalni faktor rasta-2, HER2 (ER-PR-HER2-). Njegova zastupljenost među svim molekularnim tipovima karcinoma dojke je 12-17%.

Naročito je zastupljen među ženama španskog i afričkog porekla, a incidenca pojave bolesti je karakteristična za žene u pre-menopauzi (15). Prema histološkoj klasifikaciji, većina TNBC tumora je po tipu invazivnog duktalnog karcinoma (15). Karakteriše se ranim početkom bolesti, visokim rizikom za pojavu metastaza i lošim petogodišnjim preživljavanjem (16).

Iako zaseban molekularni tip karcinoma dojke, TNBC se odlikuje velikim diverzitetom u pogledu genetičkih obeležja, transkriptoma, histologije, ali i kliničke manifestacije (17). Genetička heterogenost TNBC se opisuje velikom nestabilnošću genoma, visokom mutacionom stopom, strukturnim rearanžmanima i kompleksnim obrascima promena u broju ponovaka (eng. *Copy Number Alterations* - CNAs) (18). Najčešće se somatske mutacije u TNBC tumorima dešavaju u genima *TP53* i *PIK3CA*, a nešto ređe u genima *PTEN*, *RBI*, *NF1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *ERBB4* i *ALK* (18). Skoro 30% TNBC tumora ima prisutnu germinativnu mutaciju u *BRCA1* genu (19). Fenotipska sličnost TNBC tipa karcinoma dojke i karcinoma dojke povezanih sa mutacijama u *BRCA1* genu odražava se u lošoj prognozi ovih pacijenata. Međutim, i pored velike fenotipske sličnosti, veliki broj TNBC tumora ipak nema mutaciju u *BRCA1*, te se pretpostavlja da kod određenog broja TNBC dolazi do epigenetičkog utišavanja *BRCA1* gena (20).

Razvoj metastaza kod TNBC tipa je kompleksan proces koji u svojoj osnovi ima višestruke genetičke i epigenetičke promene, procese proliferacije, angiogeneze, invazije, intravazacije, lokalizacije u udaljenim organima, ekstravazacije i preživljavanje u cirkulaciji, Slika 2 (21).



Slika 2. Koraci u procesu formiranja metastaza. Preuzeto i modifikovano: Al-Mahmud i saradnici, 2018 (22)

Diseminovane ćelije koje u cirkulaciji ili distalnim organima prežive proapoptotske signale, mogu ostati u dormantnom stanju ili formirati mikrometastaze koje su obično teške za detekciju i mogu pokazivati rezistentnost na hemioterapiju (23). Iako je primetan veliki napredak u razumevanju procesa inicijacije karcinoma dojke, molekularni mehanizmi i signalni putevi koji se nalaze u osnovi metastatske diseminacije su još uvek nerazjašnjeni. Pretpostavlja se da će nova

saznanja o ovim procesima dati značajan doprinos razvoju efikasnog tretmana u lečenju TNBC pacijenata.

S obzirom da pacijenti sa TNBC tipom ne mogu biti tretirani konvencionalnom endokrinom terapijom, niti terapijom koja targetuje HER2 receptor, klinički ishod ovih pacijenata je veoma loš. Takođe, karakteristična je i povećana ekspresija receptora za epidermalni faktora rasta (eng. *Epidermal Growth Factor Receptor* - EGFR), koja doprinosi pojavi rezistencije na konvencionalu hemioterapiju (22). Inovativni pristup lečenju TNBC pacijenata predstavlja upotrebu malih interferišućih RNK (siRNAs) metodama nanotehnologije, kao supresora EGFR u kombinaciji sa monoklonskim antitelima (22). Brojne kliničke studije su trenutno usmerene ka pronalaženju adekvatnog terapijskog pristupa za lečenje TNBC pacijenata. Neki od signalnih puteva koji su targetovani inovativnim potencijalnim terapijama kod TNBC tipa kancera su:

- Notch signalni put, povezan sa ćelijskom proliferacijom i diferencijacijom;
- Hedgehog signalni put, povezan sa invazijom ćelija kancera, metastazama i rezistencijom na terapiju;
- TGF β signalni put, povezan sa stimulacijom formiranja metastaza;
- Wnt/ β -katenin signalni put, povezan sa stimulacijom epitelno-mezenhimske tranzicije (24).

Pored navedenih, rastući je broj ispitivanja inhibitora poli (ADP-riboza) polimeraze (PARP), mTOR i EGFR inhibitora. Dodatno, ispituju se i epigenetički lekovi, koji se prevashodno zasnivaju na inhibitorima histon-deacetilaza, i malih nekodirajućih RNK (24, 20).

1.1.4. Hormon receptor-pozitivan karcinom dojke

Za razliku od TNBC-a, hormon receptor-pozitivan, HER2 negativan tip karcinoma dojke (ER+PR+HER2-) se odlikuje manjom agresivnošću, boljom kliničkom slikom i većom stopom preživljavanja (15). Karakteristična je velika učestalost kod žena u post-menopauznom statusu (15). Ovaj tip karcinoma dojke je najčešće zastupljen u poređenju sa ostalim molekularnim tipovima. Oko 80% svih tipova karcinoma dojke imaju eksprimirane hormonske receptore za estrogen i progesteron i na molekularnom nivou su klasifikovani kao luminalni A ili luminalni B tip. Luminalni A tip nema eksprimiran HER2 i odlikuje se niskim nivoom proliferacije (Ki-67<14%), dok luminalni B tip može biti i HER2-negativan i HER2-pozitivan i odlikuje se nešto višim nivoom proliferacije (Ki-67 \geq 14%). Prisustvo hormonskih receptora i HER2 predstavlja prognostičke i prediktivne biomarkere, sa ulogom u determinaciji terapijskog pristupa.

Ekspresija estrogenskog receptora je najvažnije obeležje hormon receptor-pozitivnog karcinoma dojke. Estradiol, kao važan mitogen kod ER+ karcinoma dojke, vezujući se za svoj estrogenski receptor formira transkripcioni kompleks koji inicira signalne puteve koji stimulišu ćelijski rast i preživljavanje (25). Transkripcioni target estrogenskog receptora je ciklin D1, koji se vezuje za ciklin-zavisne kinaze CDK4 i CDK6, koje fosforilišući retinoblastoma protein učestvuju u inicijaciji S faze ćelijskog ciklusa. Takođe, indukcijom c-Myc ekspresije stimuliše se CDK4 aktivnost i inicijacija S faze ćelijskog ciklusa (25). Iako pacijenti sa ER+ tipom kancera dojke pokazuju dobru prognozu, kod oko 30% pacijenata će doći do pojave relapsa uprkos adjuvantnoj endokrinom terapiji (26).

Progesteronski receptor je eksprimiran kod više od 50% ER+ kancera i moduliše aktivnost estrogenskog receptora. Naime, u prisustvu liganada, progesteronski receptor interaguje sa

estrogenskim receptorom pospešujući transkripciju gena povezanih sa dobrim kliničkim parametrima (27), stoga predstavlja biomarker boljeg preživljavanja pacijenata sa ovim tipom karcinoma dojke. Progesteron takođe inhibira rast tumora indukovanih ER-ekspresijom (27).

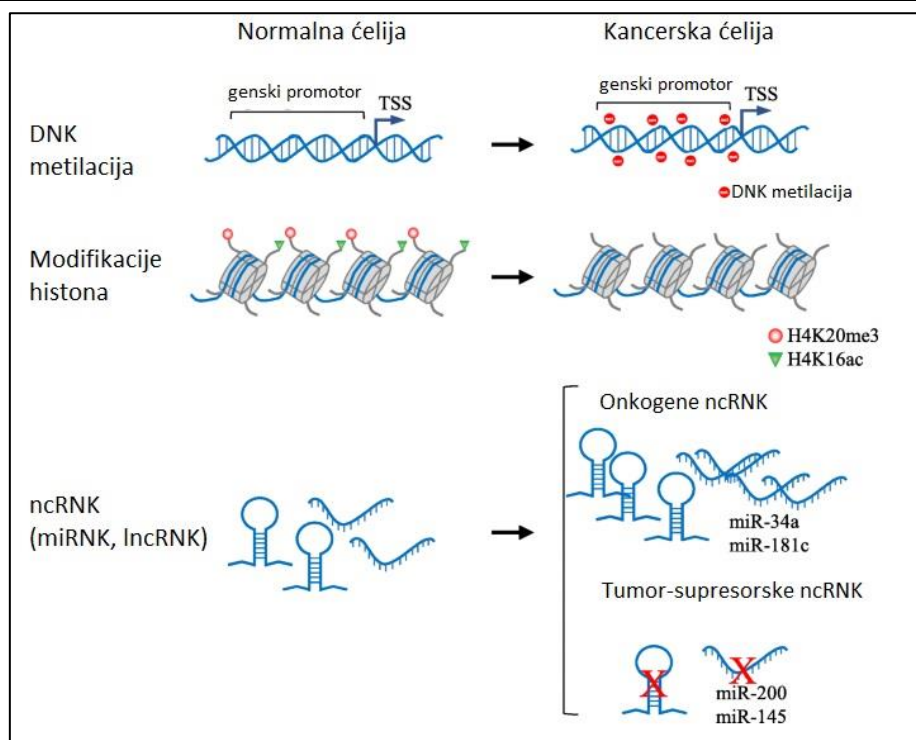
Humani epidermalni receptor 2 (HER2), važan molekularni marker za klasifikaciju karcinoma dojke, dimerizacijom inicira RAS/MAPK, PI3K/Akt i STAT signalne puteve, stimulišući ćelijsku proliferaciju, migraciju, adheziju i preživljavanje (28). Upravo nedostatak HER2 ekspresije kod ER+PR+HER2- tipa karcinoma dojke, značajno doprinosi boljoj kliničkoj manifestaciji i ishodu pacijenata sa ovim tipom karcinoma dojke.

1.2. Epigenetika kancera

Kancer je oboljenje heterogene etiologije, u čijoj osnovi patogeneze se nalazi akumulacija genetičkih i epigenetičkih promena. Jedna od glavnih molekularnih karakteristika kancera je svakako promena genske ekspresije, koja za posledicu ima narušavanje signalnih puteva homeostaze. Kancerogeneza se odlikuje pojavom više različitih kancer-specifičnih događaja: stalna signalizacija za proliferaciju, izbegavanje ćelijske smrti, izbegavanje supresije rasta, replikativna besmrtnost, inflamatorni odgovor, deregulacija energetskeg metabolizma, genomska nestabilnost, indukcija angiogeneze (29). Pokretanje ovih kancer-specifičnih odlika može biti indukovano kako mutacijama i hromozomskim aberacijama, tako i epigenetičkom regulacijom, što za posledicu ima promenu ekspresije gena koji se nalaze u osnovi ovih fenotipskih karakteristika.

Epigenetičke modifikacije predstavljaju stabilne i nasledne promene genske ekspresije koje ne uključuju promenu primarne DNK sekvence (30). Epigenetički mehanizmi su prisutni i neophodni za normalan razvoj i održavanje ćelijske homeostaze i funkcije organizama. U fiziološkim uslovima epigenetičke modifikacije se nalaze u osnovi inaktivacije X hromozoma, genomske imprintinga, utišavanja ponavljajućih DNK sekvenci, regulaciji održavanja genomske strukture i pravilnoj ekspresiji gena (31). Kao i genetičke promene, različite epigenetičke promene u malignoj ćeliji doprinose razvoju ćelijske sposobnosti nekontrolisanog rasta, jednom od glavnih fenotipskih obeležja maligne ćelije.

Efekat epigenetičkih modifikacija u procesu kancerogeneze, ogleda se u regulaciji transkripcije onkogena i tumor-supresorskih gena, čiji produkti imaju ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa, metabolizmu, popravci DNK oštećenja, imunskom odgovoru, ćelijskom preživljavanju i programiranoj ćelijskoj smrti. Za ćelije kancera karakteristična je aktivacija protoonkogena, kao i utišavanje tumor-supresorskih gena epigenetičkim mehanizmima, kao što su DNK metilacija, modifikacija histona i RNK interferencija, Slika 3.



Slika 3. Epigenetičke modifikacije u kancerskoj ćeliji: hipermetilacija promotora tumor-supresorskih gena, demetilacija i deacetilacija histona i posttranskripciona regulacija onkogenih i tumor-supresorskih gena od strane nekodirajućih RNK. Preuzeto i modifikovano: Roberti i saradnici, 2019 (32)

1.2.1. DNK metilacija

DNK metilacija se smatra ključnim regulatornim mehanizmom tokom procesa razvića, ćelijske diferencijacije i održavanja tkivne homeostaze. Povezana je sa brojnim fiziološkim procesima kao što su inaktivacija X hromozoma, genomski imprinting, tkivno specifična genska ekspresija, hromozomska stabilnost, represija transpozona, starenje, ali i sa patološkim stanjima kao što je kancer. DNK metilacija se definiše kao reakcija dodavanja metil grupe na C-5 poziciju citozina, čime nastaje 5-metilcitozin (5mC) i katalizovana je pomoću enzima DNK metiltransferaza (eng. *DNA Methyltransferases* - DNMTs).

Tri enzima su uključena u proces DNK metilacije: DNMT1 sa snažnim afinitetom za hemimetilovanu DNK, metiluje CpG dinukleotide u nosivim lancima DNK na osnovu prisustva metilacije na komplementarnim DNK lancima. DNMT3a i DNMT3b su odgovorne za *de novo* DNK metilaciju. Kod sisara, DNK metilacija se gotovo isključivo dešava u okviru CpG dinukleotida koji se inače nalaze po celom genomu, ali manje od 10% se nalazi u okviru tzv. CpG ostrvaca lociranih u 5' regionu većine sisarskih gena. Proces *de novo* metilacije nije karakteristika samo germinativnih ćelija i ranog embrionskog razvića, već se dešava i u adultnim somatskim ćelijama. Tokom procesa starenja, ali i kod neoplastično transformisanih ćelija, veliki broj humanih CpG dinukleotida biva progresivno metilovan. Kada se dešava u okviru promotora, DNK metilacija obično dovodi do transkripcionog utišavanja. Metilovani citozin može dovesti do regrutovanja regulatornih proteina i kroz interakciju sa histon-deacetilazama ili onemogućavanjem vezivanja transkripcionih faktora i drugih transkripcionih regulatornih proteina, posredovati u transkripcionoj represiji (32).

Do sada su poznate promene u tri različita tipa metilacionih događaja povezanih za onkogenim fenotipom ćelije. To su tzv. globalna hipometilacija kancerskog genoma, hipermetilacija promotora tumor-supresorskih gena i direktna mutageneza 5mC usled deaminacije, UV radijacije ili uticaja drugih kancerogena (33). Ove promene se generalno dešavaju simultano u ćeliji, doprinoseći kancerogenezi, što sugeriše da je izmenjena homeostaza epigenetičke regulacije bitna za evoluciju kancera.

U malignim ćelijama, verovatno najraniji proces je tzv. globalna hipometilacija genoma ćelija kancera. U normalnim ćelijama procenat metilovanih CpG dinukleotida van regiona promotora iznosi 80%, dok kod malignih ćelija taj procenat iznosi 40-60% (33). Iako posledice ovog fenomena još uvek nisu potpuno razjašnjene, globalna demetilacija potencijalno doprinosi genomskoj nestabilnosti i povećava hromozomsku fragilnost, učestalost hromozomskih aneuploidija i mutacionu stopu, što sve doprinosi inicijaciji kancerogeneze (33). Smanjenje DNK metilacije može biti praćeno aktivacijom transkripcije kako protoonkogeni, tako i ponavljajućih sekvenci i transpozona. Aktivacija transkripcije ponavljajućih sekvenci i transpozona povećava mogućnost rekombinacije kako u nivou tzv. „*hot spot*“ mesta, tako i u blizini protoonkogeni utičući na njihovu aktivaciju (34). Aktivacija transpozona značajno povećava mutacionu stopu.

Hipermetilacija CpG ostrvaca u nivou promotora tumor-supresorskih gena je povezana sa transkripcionim utišavanjem ovih gena, odnosno predstavlja alternativni mehanizam mutacionoj inaktivaciji ovih gena. Najčešće metilovani promotori su kod tumor-supresorskih gena *RB*, *p16*, *MLH1* i *BRCA1* (35). Kod familijarnih kancera, za koje su karakteristične mutacije u germinativnim linijama, hipermetilacija promotora obično predstavlja drugi događaj Knudsonove „*two-hit*“ hipoteze, kojim se inaktivira druga kopija ovih gena (36).

5mC modifikacija povećava učestalost spontane mutageneze, ali takođe utiče i na indukovanu mutagenezu usled delovanja UV radijacije i različitih kancerogena. Primer spontane mutageneze 5mC je mutacija prisutna u *TP53* genu, kod kojeg je u čak više od 50% od svih mutacija upravo mutacija u nivou metilacije citozina (37). Metilacija C5-citozina povećava mogućnost hidrolitičke deaminacije, čime nastaje timin. Mehanizmi popravke DNK su manje efikasni za popravku pogrešno sparenih baza u slučaju kad je uzrok takve mutacije deaminacija.

Tačan mehanizam kojim se DNMT transferaze regrutuju kako bi katalizovale proces metilacije DNK još uvek nije potpuno rasvetljen. Kao jedan od mogućih načina je kooperacija sa drugim epigenetičkim mehanizmima, a naročito sa histon-deacetilazama koje predstavljaju senzore metaboličkog, ali i genotoksičnog stanja ćelija. Svakako, aberantni metilacioni obrasci predstavljaju potencijalne biomarkere za detekciju i praćenje progresije kancera.

1.2.2. Modifikacija histona

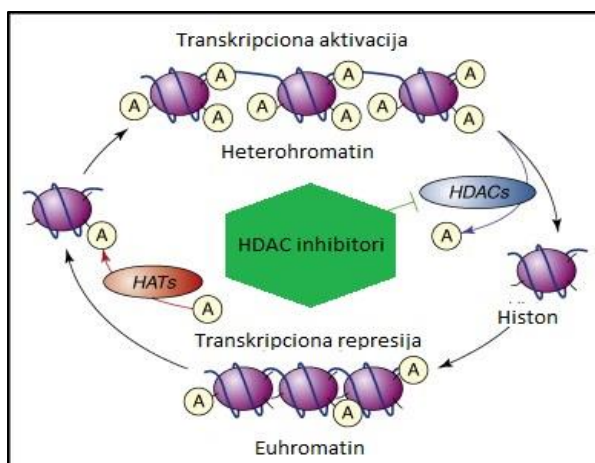
U eukariotskim ćelijama, hromatin je organizovan na nivou nukleozomskih jedinica. Svaki nukleozom se sastoji od pozitivno naelektrisanih histonskih oktamera kojeg čine histoni H2A, H2B, H3 i H4 i negativno naelektrisane DNK dužine 147bp koja 1,7 puta okružuje histonski oktamer. Histon H1 predstavlja „*linker*“ DNK veličine 10-80bp koja razdvaja susedne nukleozome. Nukleozomi formiraju hromatinska vlakna koja formiraju hromosome. N-terminalni region histonskih proteina u okviru nukleozoma, na tačno određenim aminokiselinskim ostacima može imati različite posttranslacione kovalentne modifikacije, kao što su: metilacija, acetilacija, ubikvitinacija, sumoilacija i fosforilacija. Ove posttranslacione kovalentne modifikacije histona utiču na strukturu hromatina i posledično na transkripciju gena, i time predstavljaju važne epigenetičke markere (38).

Za razliku od DNK metilacije, modifikacije histona mogu rezultovati bilo aktivacijom bilo represijom transkripcije, a sve u zavisnosti od tipa histonske modifikacije, ali i od aminokiselinskog ostatka u okviru histona na kojoj se vrši kovalentna modifikacija. Metilacija histona se može odigrati na aminokiselinskim ostacima arginina ili lizina. Arginin može biti mono- i dimetilovan, dok lizin može biti mono-, di- i trimetilovan. Proces transfera metil grupe sa S-adenozilmetionina katalizuju enzimi histon-metiltransferaze (HMT). Metilacija histona je reverzibilan proces, a mehanizam uklanjanja metil grupe sa histona katalizuju enzimi histon-demetilaze (HDM) (39). Različiti metilacioni obrasci histona imaju različiti efekat na gensku regulaciju. Na primer, trimetilacija lizina na histonu H3 (H3K4me3) i dimetilacija arginina na histonu H4 (H4R3me2) povezane su sa transkripcionom aktivacijom gena, dok je metilacija H3K9me2, H3K9me3 i H3K27me3, povezana sa transkripcionim utišavanjem gena (40). Osim pomenutih lokacija, metilacija histona se još može naći na pozicijama H3K36, H3K79, i H4K20 (41).

Acetilacija histona je najčešći vid modifikacije histona koja se odvija na aminokiselinskim ostacima lizina. Reakciju dodavanja acetilne grupe sa acetyl-CoA na N-terminalni rep lizina katalizuju enzimi histon-acetiltransferaze (HAT). Acetilacija smanjuje pozitivno naelektrisanje histona, smanjujući interakciju histona i negativno naelektrisanog molekula DNK, što za posledicu ima stvaranje relaksirane strukture hromatina. Formiranje relaksiranog hromatina, odnosno euhromatina omogućava pristup proteinima transkripcione mašinerije i aktivacijom transkripcije povećava ekspresiju gena.

Odnos acetilacije i deacetilacije je ključan za održavanje stabilnosti i integriteta hromatina (38). Uklanjanje acetilnih grupa sa lizina katalizuju enzimi histon-deacetilaze (HDAC). Deacetilacija lizina dovodi do povećanja pozitivnog naelektrisanja histona, i čvršće interakcije između pozitivno naelektrisanih histona i negativno naelektrisanog molekula DNK, odnosno utiče na kompaktnost hromatina. Usled povećanja kompaktnosti hromatina, smanjuje se dostupnost DNK molekula enzimima i transkripcionim faktorima koji učestvuju u procesima transkripcije, tako da histon-deacetilaze indukuju transkripcionu represiju, Slika 4.

Acetilacija se najčešće odvija na N-terminalnim domenima lizina u okviru pozicija H3K9, H3K14, H3K18, H3K23 i H4K5, H4K8, H4K12, i H4K16 (31). Generalno, acetilacija histona je karakteristična za transkripciono aktivne regione hromatina. Acetilacije H3K9ac, H3K4ac i H4K16ac imaju definisane uloge u regulaciji hromatinske strukture i naročito su zastupljene u transkripciono aktivnim genima. Deacetilacija histona na ovim pozicijama predstavlja važno epigenetičko obeležje humanih kancera. Smanjen nivo H3K9ac povezan je sa progresijom tumora i lošim kliničkim ishodom pacijenata sa karcinomom dojke, dok je gubitak H4K16ac pronađen u čak 78,9% slučajeva karcinoma dojke i pretpostavlja se da bi ova alteracija mogla da predstavlja rani znak kancerogeneze karcinoma dojke (42, 40).



Slika 4. Uticaj acetilacije histona na strukturu hromatina. Preuzeto i modifikovano: Chuang i saradnici, 2009 (43)

Fosforilacija histona se dešava na H3S10, dok se ubikvitinacija dešava na histonima H2A i H2B i imaju ulogu u popravci DNK oštećenja, mitozu i održanju genomske integriteta (39). Greške u regulaciji histon-metiltransferaza i histon-demetilaza su povezane sa brojnim kancerima, uključujući i karcinom dojke, prostate, pluća i mozga (44).

Specifični obrasci histonskih modifikacija su karakteristični za različite tipove kancera i mogu se potencijalno koristiti kao prediktivni markeri kliničkog ishoda. Određivanje kancer-specifičnog obrasca histonskih modifikacija moglo bi da doprine razvoju ciljane epigenetičke terapije. Kada je u pitanju lečenje humanih maligniteta, poseban fokus kliničkih studija je usmeren na ispitivanje inhibitora DNK-metiltransferaza i histon-deacetilaza, sa velikim potencijalom za uspostavljanje personalizovanih terapijskih strategija u lečenju ovih oboljenja.

1.2.3. Nekodirajuće RNK

Nekodirajuće RNK predstavljaju važne modulatore genske ekspresije kako na posttranskripcionom, tako i na posttranslacionom nivou (32). One se ne mogu translirati u funkcionalne proteine, te je njihova uloga regulatorna. U nekodirajuće RNK spadaju transportne RNK (tRNK), ribozomalne RNK (rRNK), male nukleolarne RNK (snoRNKs), duge nekodirajuće RNK (lncRNK) i mikro RNK (miRNK).

Od navedenih tipova nekodirajućih RNK molekula, do sada su najbolje proučene mikro RNK. miRNK su mali nekodirajući RNK molekuli veličine oko 18-22 nukleotida, koji predstavljaju važne regulatore brojnih bioloških procesa (proliferacije, diferencijacije i apoptoze) (35). Ovi molekuli regulišu ekspresiju ciljnih gena na posttranskripcionom nivou. miRNK specifično prepoznaju sekvence u okviru 3' netranslatirajućeg regiona ciljne iRNK, dovodeći do njene degradacije ili do inhibicije translacije. Broj identifikovanih miRNK kao i njihovih iRNK targeta se svakodnevno povećava.

Brojne studije pokazuju promene u ekspresionim obrascima različitih miRNK tokom procesa kancerogeneze. U zavisnosti od ciljnih iRNK, miRNK mogu imati regulatornu ulogu i kao onkogeni i kao tumor-supresori. Povećane ekspresije miR-10b, miR-26a, miR-146a i miR-153 povezane su sa transkripcionim utišavanjem *BRCA1* gena kako kod TNBC tipa karcinoma dojke, tako i kod ER+PR+HER2- tipa (45), dok miR-200a, miR-200b i miR-200c regulišu proces epitelnomezehimalne tranzicije, važnog koraka za inicijaciju metastaza (20).

1.3. Histon-deacetilaze

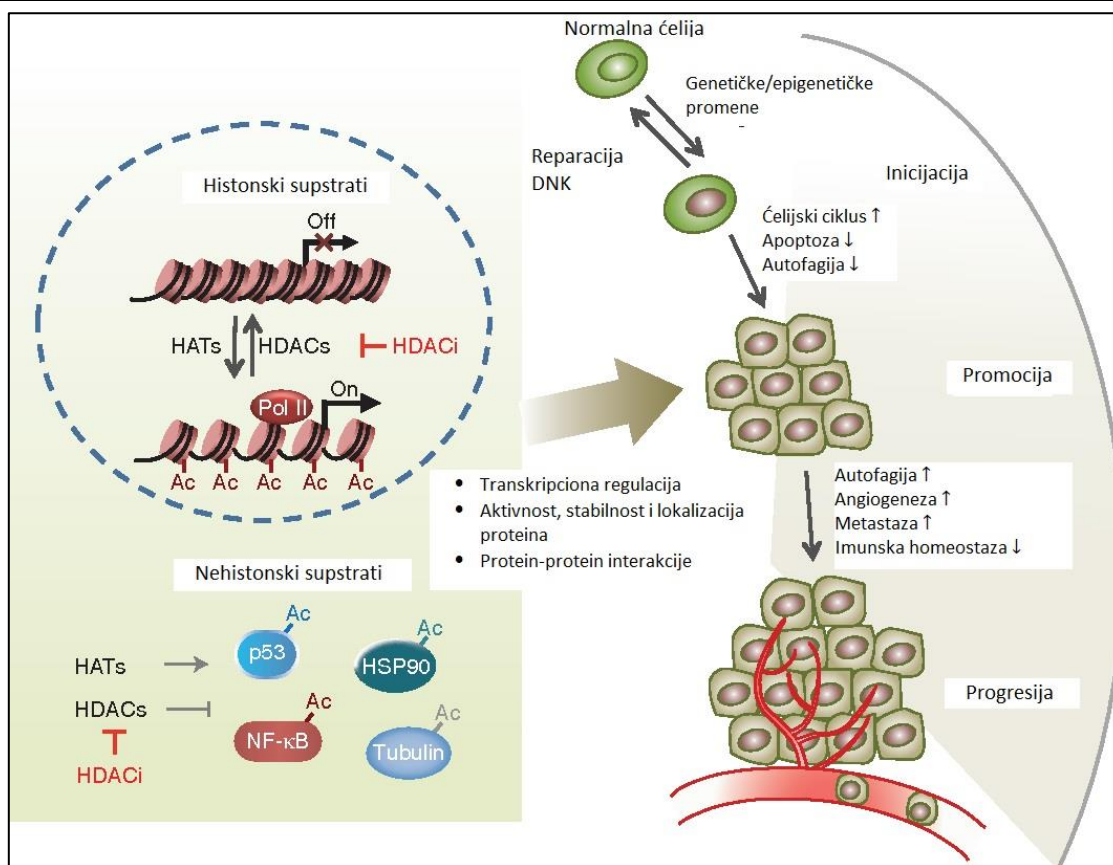
Na osnovu homologije sa histon-deacetilazama kvasca, do sada je identifikovano 18 humanih histon-deacetilaza, koje su na osnovu filogenetičkih analiza, ćelijske lokalizacije i biološke funkcije podeljene u četiri klase. Prva klasa HDAC deli homologiju sa transkripcionim regulatorom kvasca Rpd3, lokalizovana je u jedru i nju čine HDAC1, 2, 3 i 8 (46). Histon-deacetilaze ove klase najčešće svoju aktivnost ispoljavaju u okviru kompleksa sa drugim proteinima koji modulišu njihovu aktivnost i olakšavaju regrutaciju i vezivanje za molekul DNK (46). Klasa II HDAC pokazuje homologiju sa Hda1 i obuhvata HDAC4, 5, 6, 7, 9 i 10. Može biti lokalizovana i u citoplazmi i u jedru, odnosno pored deacetilacije histona, ima ulogu u deacetilaciji nehistskih proteina. Klasu III HDAC predstavljaju NAD⁺ (nikotinamid adenin dinukleotid) zavisne histone-deacetilaze koje pokazuju homologiju sa proteinom kvasca Sir2, te se nazivaju sirtuini i mogu biti lokalizovani

kako u jedru tako i u citoplazmi. Klasa sirtuina sadrži sedam članova i to su SIRT1, 2, 3, 4, 5, 6 i 7. Poslednju IV klasu HDAC čini HDAC11 (46).

Kako je već rečeno, primarna uloga histon-deacetilaza je uklanjanje acetilne grupe sa N-terminalnih regiona lizina u okviru specifičnih pozicija na histonskim proteinima čime se povećava jačina jonskih interakcija između pozitivno naelektrisanih histona i negativno naelektrisanog molekula DNK. Stvaranje kompaktne hromatinske strukture onemogućava pristup RNK polimerazi, kao i transkripcionim faktorima čime dolazi do inhibicije ekspresije gena. Regulacija genske ekspresije na nivou acetilacije/deacetilacije histona je jedan od najbitnijih načina regulacije genske ekspresije kod eukariota. Nedostatak ravnoteže u delovanju histon-acetilaza i histon-deacetilaza može dovesti do aberantne ekspresije određenih gena što za posledicu može imati nestabilnost genoma, ali i poremećaje u regulaciji ćelijskog ciklusa, apoptoze i održavanja homeostaze.

Aberantna ekspresija histon-deacetilaza je povezana sa brojnim malignitetima, kako hematološkim tako i kod solidnih tumora. Tačan mehanizam kojim HDAC regulišu proces kancerogeneze je veoma heterogen. Iako je u većini slučajeva povećana ekspresija histon-deacetilaza povezana sa lošijom prognozom onkoloških pacijenata, u nekim slučajevima je pokazano da histon-deacetilaze mogu imati i ulogu u supresiji kancerogeneze (47). Osim deacetilacije histona, i regulacije ekspresije na transkripcionom nivou, HDAC mogu deacetilovati i nehistonske proteine regulišući njihovu aktivnost na posttranslacionom nivou. Poznato je da deacetilacijom kako histona, tako i nehistonskih supstrata u ćelijama kancera, histon-deacetilaze su uključene u regulaciju ćelijskog ciklusa, metabolizma, popravke DNK oštećenja, apoptoze, autofagije, angiogeneze, metastaza i drugih ćelijskih procesa (47), Slika 5.

Upotreba inhibitora histon-deacetilaza za sada pokazuje pozitivne efekte samo u slučaju hematoloških maligniteta, dok su rezultati primene u lečenju solidnih tumora još uvek prilično skromni. Najveća mana primene inhibitora histon-deacetilaza (HDACi) je njihova velika toksičnost, ali i nespecifičnost, jer pored toga što mogu reaktivirati tumor-supresore, takođe mogu dovesti i do aktivacije protoonkogeno. Iako je druga generacija HDAC inhibitora pokazala bolje farmakodinamičke i farmakokinetičke karaktersitike, trenutno najveći potencijal se nazire u upotrebi specifičnih HDAC inhibitora.



Slika 5. Uloga histon-deacetilaza u regulaciji različitih stadijuma kancerogeneze. Preuzeto i modifikovano: Li i Seto, 2016 (47)

1.3.1. HDAC7 i kancer

Histon-deacetilaza 7 (HDAC7) pripada II klasi histon-deacetilaza. Gen za HDAC7 mapiran je na hromozomu 12q13.11 i kodira protein veličine 102kDa sa ćelijskom lokalizacijom kako u jedru, tako i u citoplazmi. Svojim N-terminalnim domenom, HDAC7 se vezuje za transkripcione faktore regulišući njihovu aktivnost. U odgovoru na specifične signale u ćeliji, dolazi do fosforilacije HDAC7, čime se prekida njegova interakcija sa transkripcionim faktorima, a enzim se translocira u citoplazmu. Karakteristična je manja katalitička aktivnost HDAC7 u poređenju sa drugim histon-deacetilazama (48).

Ekspresija *HDAC7* je tkivno i vremenski-specifično regulisana. Povećan nivo *HDAC7* ekspresije je potvrđen u tkivu srčanog mišića, plućima i CD4/CD8 timocitima, kao i CD4/CD8 T-ćelijama (49).

Sve više dokaza sugerise njegovu ulogu u procesima inicijacije i progresije kancera. HDAC7 je uključen u epigenetičku regulaciju bioloških procesa, kao što su rast ćelija, diferencijacija i apoptoza (50). Iako je utvrđena njegova povezanost sa različitim malignitetima, njegova precizna uloga u procesu kancerogeneze još uvek nije razjašnjena. Pretpostavljena je važna uloga HDAC7 u procesu proliferacije ćelija kancera. Smanjenje regulacije HDAC7 inhibira napredovanje ćelijskog ciklusa represijom ekspresije *c-Myc* i indukcijom ekspresije *p21* i *p27* (50-51). Naime, HDAC7 se direktno vezuju za *c-Myc* gen i deacilacijom H3 i H4 histona olakšava vezivanje RNK polimeraze II i transkripciju *c-Myc* gena (50). Poremećena regulacija *c-Myc* gena je povezana sa agresivnim fenotipom malignih ćelija.

HDAC7 takođe ima ulogu u regulaciji metabolizma u hipoksičnim uslovima. Naime, u normalnim uslovima oksigenacije, HDAC7 se nalazi u citoplazmi, međutim, u uslovima hipoksije, HDAC7 iz citoplazme prelazi u jedro gde se vezuje za HIF1 α (eng. *Hypoxia-Inducible Factor 1-Alpha*) i aktivira ga regulišući transkripciju seta glikolitičkih gena (52).

HDAC7 takođe modulise migraciju i angiogenezu endotelnih ćelija (50, 53), procese neophodne za progresiju tumora i metastaze. Pokazana je asocijacija HDAC7 i različitih faktora transkripcije, uključujući STAT3 (54), ER α , FOXP3 (55) i FOXA1 (56). Jedan od gena čija transkripcija je regulisana aktivnošću HIF1 α je gen za endotelijalni vaskularni faktor rasta (eng. *Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF*) (52). Tokom embriogeneze, HDAC7 je eksprimiran u vaskularnom endotelijumu i ima ulogu u održavanju vaskularnog integriteta (57). Represijom transkripcije matriksne metaloproteinaze 10 (MMP), HDAC7 regulise proces angiogeneze (57). Međutim, HDAC7 regulise i ćelijsku lokalizaciju β -katenina, a samim tim i ekspresiju njegovih targetnih gena, kao i gena koji učestvuju u regulaciji ćelijskog ciklusa. VEGF indukuje fosforilaciju i degradaciju HDAC7, čime se omogućava translokacija β -katenina u jedro i njegovom ekspresijom stimuliše proliferaciju endotelijalnih ćelija (58).

U ćelijama karcinoma pluća, HDAC7 deacetilacijom H3 i H4 u nivou promotora inhibira ekspresiju plakoglobina i pospešuje ćelijski rast i formiranje metastaza malignih ćelija (59). Plakoglobin je tumor-supresorski protein čija molekularna uloga u procesu kancerogeneze još uvek nije objašnjena, ali je utvrđeno da supresija plakoglobina od strane HDAC7, indukuje proliferaciju, migraciju i invaziju ćelija kancera. (59)

Imajući u vidu da HDAC7 u ćelijama kancera ispoljava kako onkogeni, tako i tumor-supresorski potencijal, novije studije ukazuju da bi HDAC7 mogao biti potencijalna meta novih terapijskih strategija primenom specifičnih HDAC inhibitora (60).

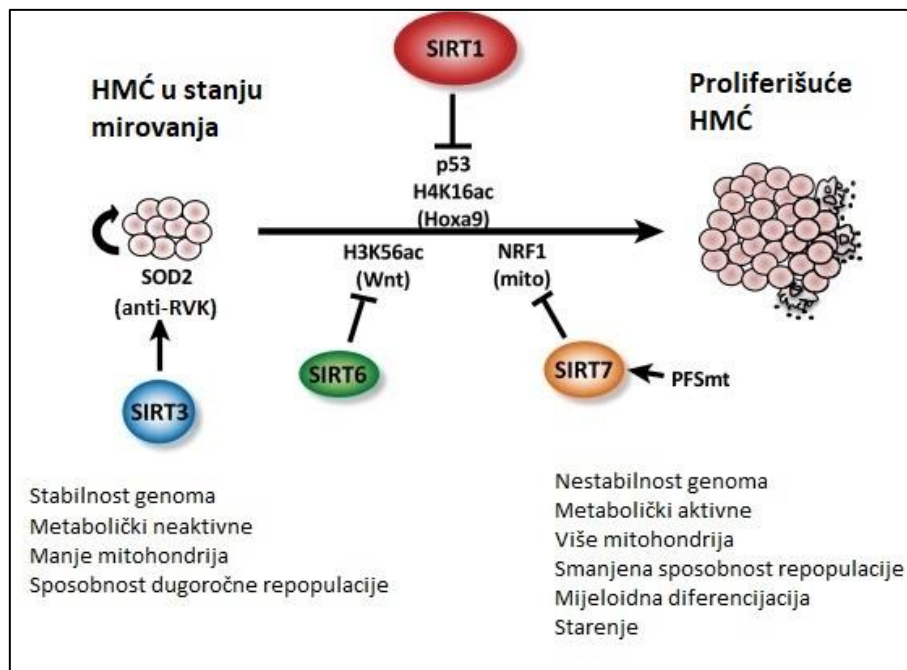
1.4. Sirtuini i kancer

Sirtuini, evoluciono očuvana familija enzima, pripadaju III klasi NAD⁺-zavisnih histon-deacetilaza, koji deacetilacijom kako histonskih tako i nehistonskih proteina učestvuju u regulaciji ekspresije različitih gena i svojom aktivnošću se nalaze u osnovi različitih ćelijskih procesa. Prvi otkriveni sirtuin je SIRT1, sisarski homolog tihog regulatora informacija 2 kod kvasca Sir2 (eng. *Silent mating type information regulation 2 homolog*). Kod sisara postoji 7 različitih sirtuina SIRT1-SIRT7, čiji se katalitički domen veličine oko 250 aminokiselina, karakteriše specifičnim NAD⁺-vezujućim domenom i strukturnim Zn-vezujućim domenom. Sirtuini se međusobno razlikuju po svojim N- i C-terminalnim sekvencama, koje determinišu njihovu intracelularnu lokaciju, enzimatске aktivnosti, protein-protein interakcije i biološke funkcije koje imaju kako u normalnim, tako i u maligno transformisanim ćelijama (61). Sirtuini mogu katalizovati dva tipa reakcija: deacetilaciju i ADP-ribozilaciju. S obzirom da za svoju aktivnost zahtevaju prisustvo kofaktora NAD⁺, njihova uloga zavisi od odnosa NAD⁺/NADH u ćeliji, što implicira direktnu povezanost aktivnosti sirtuina sa metaboličkim stanjem ćelije (62).

Izmenjeni metabolizam maligne ćelije se odlikuje povećanom aerobnom glikolizom i intenzivnom glutaminolizom, lipidnim metabolizmom, mitohondrijskom biogenezom, i sintezom različitih molekula kako bi se obezbedio povoljan energetska status ćelije za procese proliferacije i kancerogeneze (63). Jedna od glavnih karakteristika izmenjenog metabolizma maligne ćelije je Warburgov efekat, po kom maligna ćelija za svoje energetske potrebe u aerobnim uslovima prioritetno koristi glikolizu (64). Pokazano je da sirtuini imaju različite uloge u procesima glukoznog metabolizma, odnosno u procesima glukoneogeneze, glikolize, sekrecije i osetljivosti insulina i time između ostalog pokazuju i određeni terapijski potencijal za lečenje različitih metaboličkih poremećaja (65). Pored metaboličkog reprogramiranja, deregulacija mehanizama

sistema za popravku oštećenja na molekulu DNK kao i posledična genomska nestabilnost omogućavaju akumulaciju tumorigenih mutacija doprinoseći rastu tumora i progresiji kancera (65). Sirtuni regulišu različite mehanizme za popravku DNK, kao što su mehanizmi isecanja baza i nukleotida (eng. *Base Excision Repair - BER*; *Nucleotide Excision Repair - NER*), homologa i nehomologa rekombinacija spajanja krajeva (eng. *Homologous Recombination-HR*; *Nonhomologous End Joining - NHEJ*) (65).

Poslednjih godina, sve više studija ukazuje na značaj sirtuina u biologiji matičnih ćelija. Uloga sirtuina u regulaciji stanja mirovanja i regenerativnog potencijala matičnih ćelija, ogleda se u regulaciji homeostaze mitohondrija i održavanju genomske stabilnosti. Poremećaji u regulaciji ovih procesa prevode metabolički neaktivne ćelije u metabolički aktivne, povećava se nestabilnost genoma i dolazi do nekontrolisane proliferacije ćelija, Slika 6 (66).



Slika 6. Sinergističko delovanje SIRT1, SIRT3, SIRT6 i SIRT7 na proliferaciju hematopoetskih matičnih ćelija (HMC). Preuzeto i modifikovano: Fang i saradnici, 2019 (66)

Dosadašnja saznanja ukazuju na potencijalno dvojaku ulogu sirtuina, onkogenu i tumor-supresorku, u procesima formiranja i progresije kancera. Upravo ta odlika čini sirtuine zanimljivim za ispitivanja i rasvetljavanje kako njihovih bioloških uloga u procesima kancerogeneze, tako i njihovog prognostičkog, ali i potencijalno terapijskog značaja za lečenje humanih maligniteta.

1.4.1. SIRT1

SIRT1, histon-deacetilaza sa ulogama u regulaciji genomske stabilnosti, utišavanju gena, metabolizmu i opstanku ćelija, je u poslednjoj deceniji u fokusu brojnih istraživanja. Njegova sposobnost deacetilacije histona i nehistskih proteina, i regulacije ekspresije i aktivnosti različitih tumor-supresora i onkogenih, kao što su p53, p73, Rb i NF- κ B ukazuje na njegovu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa, urođenog i stečenog imunskog odgovora i kancerogenezi (67). SIRT1 je dominantno lokalizovan u jedru, ali se može naći i u citoplazmi u zavisnosti od tipa tkiva, stadijuma razvoja i energetske potrebe.

Intracelularni odnos nivoa NAD⁺ i NADH je regulisan uskraćivanjem nutritivnih sastojaka, energetske potrošnjom i hipoksijom. Kod sisara, usled smanjenja koncentracije glukoze, kao glavni izvor sinteze ATP-a se koristi proces β -oksidacije masnih kiselina, što za posledicu ima povećanje odnosa NAD⁺/NADH (68). SIRT1 predstavlja jednog od regulatora glukoznog metabolizma. U procesu glukoneogeneze uloga SIRT1 je dvostruka. U ranim fazama glukoneogeneze SIRT1 indukuje smanjenje produkcije glukoze tako što suprimira CRT2 (eng. *CREB Regulated Transcription Coactivator 2*), kao i PGC1 α (eng. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha*) dok u kasnijim fazama deacetiluje i aktivira transkripcioni faktor FOXO1 (eng. *Forkhead Box Protein O1*) i stimuliše transkripciju gena uključenih u proces sinteze glukoze (65). Hipoksija takođe smanjuje nivo NAD⁺/NADH (68). Tokom hipoksije, metabolizam ćelije se menja i dolazi do indukcije HIF1 α , koji povećava glikolizu preko laktat dehidrogenaze i povećane aktivnosti glukoznog transportera (68). SIRT1 moduliše ćelijsku adaptaciju na hipoksiju tako što deacetiluje i inaktivira HIF1 α smanjujući transkripciju glikolitičkih gena (68). Međutim, u slučaju produžene hipoksije, smanjuje se koncentracija NAD⁺, što vodi smanjenju aktivnosti SIRT1, povećanju acetilacije i aktivnosti HIF1 α i povećanju glikolize (68). SIRT1 je uključen u metabolizam glukoze i transkripcionom represijom UCP2 proteina (eng. *Uncoupling protein 2*), kojim se pozitivno moduliše sekrecija insulina (69).

SIRT1 ima ulogu u regulaciji mehanizama popravke DNK, održavanju telomera i čuvanju genomske stabilnosti (65). Usled genotoksičnog stresa, SIRT1 migrira iz regiona promotora na mesto dvolančanog prekida DNK, deacetiluje histone H1 i H4 i učestvuje u regrutaciji proteina Rad51, NBS1 i BRCA1 na mesto oštećenja (70). SIRT1 deacetilacijom WRN (eng. *Werner syndrome ATP-dependent helicase*) proteinom iz familije DNK helikaza RecQ koji ima ulogu u održavanju genomske stabilnosti, inicira homologu rekombinaciju DNK. S druge strane, SIRT1 učestvuje u NHEJ popravkama tako što deacetiluje Ku70 i inhibira mitohondrijalnu apoptozu (71), dok preko deacetilacije KAP1 pozitivno reguliše NHEJ (72). SIRT1 takođe reguliše i NER, tako što deacetiluje i aktivira proteine XPA i XPC (Xeroderma pigmentosum protein A i C) koji dalje regrutuju ostale proteine NER mehanizma na mesto prekida uzrokovano UV oštećenjem (70). Ove uloge SIRT1 u očuvanju genomske stabilnosti impliciraju njegovu tumor-supresorsku ulogu. Osim uloge u regulaciji DNK reparacije, SIRT1 učestvuje i u očuvanju integriteta genoma u nivou telomera. SIRT1 pozitivno reguliše dužinu telomera tako što inhibira degradaciju c-Myc transkripcionog faktora povećavajući aktivnost telomeraza (73).

SIRT1 u procesu kancerogeneze se odlikuje heterogenom ulogom u zavisnosti od tipa tumora, ali i stadijuma procesa razvoja tumora i njegove invazivnosti.

Kao što je prethodno rečeno primarna uloga SIRT1 je deacetilacija histona i regulacija histonskog epigenoma. SIRT1 se regrutuje na mesto ciljanog gena i vrši uklanjanje acetilnih grupa sa lizinskih aminokiseliniskih ostataka u okviru histona H1K26Ac, H3K9Ac i H4K16Ac i indukuje formiranje fakultativnog heterohromatina (74). SIRT1 regrutuje i deacetiluje metiltransferazu SUV39H1 (eng. *Suppressor of variegation 3 to 9 homologue 1*) koja dalje vrši metilaciju histona H3K9 u nivou rDNK i udruženim delovanjem suprimiraju transkripciju rRNK. S obzirom da je biosinteza ribozoma energetske zahtevana proces, ovim načinom se ćelija štiti od gubitka energije i

posledične apoptoze, odnosno omogućava se ćelijsko preživljavanje (75). SIRT1 fizički vezuje i inhibira histon-acetiltransferazu p300, indukujući smanjenje acetilacije histona (76). U malignoj ćeliji, SIRT1 je često lokalizovan u nivou promotora tumor-supresorskih gena, za koje je karakteristično utišavanje metilacijom CpG ostrvaca. SIRT1 deacetiluje DNK metiltransferazu 1 i reguliše njenu aktivnost. DNMT1 može biti deacetilovana na 12 različitih lizinskih rezidua i deacetilacijom različitih pozicija reguliše se aktivnost DNMT1. Tako na primer, deacetilacijom Lys1349 u katalitičkom domenu DNMT1, dolazi po povećane aktivnosti DNMT1, dok se deacetilacijom lizina u okviru glicinsko-lizinskih ponovaka regulatornog domena DNMT1 smanjuje njena aktivnost (77). Pokazano je da inhibicijom SIRT1 dolazi do jačeg genetičkog utišavanja tumor-supresora ER α od strane DNMT1 u MDA-MB-231 ćelijskoj liniji (77), čime se pokazuje višestruki efekat SIRT1 na aktivnost DNMT1 i na sam proces utišavanja tumor-supresorskih gena metilacijom. Analiza transkriptoma i metiloma embrionalnih matičnih ćelija je pokazala da SIRT1 reguliše i aktivnost DNMT3 metiltransferaze, kako na transkripcionom, tako i na proteinskom nivou (78). Neki od tumor-supresorskih gena utišanih SIRT1-posredovanom regulacijom su E-kadherin, MLH1, transkripcioni faktori GATA-5 i GATA-4 i p27 (76).

U ćelijama kancera, SIRT1 vrši i deacetilaciju nehistskih proteina i utiče na regulaciju ćelijske diferencijacije, apoptoze, proliferacije i angiogeneze. Nehistski targeti SIRT1 se mogu podeliti u tri grupe i to su: transkripcioni faktori (p53, FOXO, E2F1, Rb, PGC1 α i dr.), proteini sa funkcijom u reparaciji DNK (Ku-70 i MRE11-RAD50-NBS1) i signalni molekuli (npr. Smad7) (76). SIRT1 reguliše aktivnost p53, takozvanog „čuvara genoma“, čije su glavne funkcije zaustavljanje ćelijskog ciklusa, apoptoza i indukcija popravke DNK, na dva nivoa. Sa jedne strane direktnom deacetilacijom i inaktivacijom p53, a sa druge strane deacetilacijom i inaktivacijom p300 histon-acetiltransferaze, čija aktivnost je neophodna za aktivaciju p53, čime se omogućava ćeliji izbegavanje apoptoze, preživljavanje DNK oštećenja i inicijacija tumorigeneze (67). Zanimljivo je da p53 reguliše transkripciju SIRT1, tako da povećana ekspresija SIRT1 dovodi do njegove represije preko deaktivacije p53 (79). Jedan od faktora koji bi mogao da utiče na regulaciju ove povratne sprege je ćelijska lokalizacija ovih proteina. Naime, i p53 i SIRT1 se mogu naći kako u jedru, tako i u citoplazmi. U ćelijama kancera prostate, pluća, dojke i melanoma, SIRT1 je pretežno lokalizovan u citoplazmi, tako da se onkogeni uloga SIRT1 u smislu deregulacije jedarnog p53 proteina u ovim tipovima kancera smanjuje, odnosno pretpostavlja se da u ovakvom ćelijskom kontekstu SIRT1 ima tumor-supresorsku ulogu (79). Deacetilacijom proteina iz filogenetski očuvane familije FOXO, SIRT1 učestvuje u regulaciji procesa ćelijske diferencijacije, proliferacije i preživljavanja, te deregulacija aktivnosti ovih proteina je takođe povezana sa tumorigenezom (67). Signalni molekul Smad7 je jedan od glavnih inhibitora faktora rasta TGF- β . SIRT1 interakcijom sa Smad7 utiče na aktivnost TGF- β i ćelijske procese kao što su ćelijski rast, diferencijacija, migracija i apoptoza (67).

Jedno od obeležja kancerogeneze je i epitelno-mezenhimska tranzicija (EMT), proces regulisan kompleksnom signalnom kaskadom, koja za posledicu ima tranziciju epitelnog u mezenhimski fenotip čime ćelije gube svoju sposobnost adhezije kao i svoju polarnost. Ovaj mehanizam se nalazi u osnovi ćelijske invazije i metastaza, karakteristika progresije kancera. SIRT1 promovira EMT u nekoliko tipova kancera, tako što između ostalog suprimira i ekspresiju E-kadherina (epitelni marker) dok u isto vreme povećava ekspresiju N-kadherina (mezenhimski marker) i tako stimuliše sposobnost ćelijske migracije i u *in vitro* i u *in vivo* uslovima (80).

1.4.2. SIRT3

Humani gen koji kodira protein SIRT3 je mapiran na lokusu 11p15.5, veličine 22kbp. SIRT3 se primarno eksprimira u mitohondrijama tkiva sa visokom metaboličkom aktivnošću, kao što su jetra, srce, masno tkivo i predstavlja regulator energetskog metabolizma i funkcija u mitohondrijama (81). Humani protein SIRT3 se primarno sintetise u formi od 44kDa, ali se usled signalnih sekvenci na N-terminalnom regionu transportuje u mitohondrije gde se dalje pomoću mitohondrijske peptidaze MMP (eng. *Mitochondrial Matrix Processing Peptidase*) procesuje u formu od 28kDa (82). U mitohondrijama je zastupljena samo kraća forma, dok se duža forma može nalaziti i u jedru i u citoplazmi. Inicijalno se mislilo da je samo forma od 28kDa katalitički aktivna, ali je potom pokazano da i forma od 44kDa, prisutna u jedru, takođe poseduje deacetilaznu sposobnost H3K9Ac i H4K16Ac povezanu sa represijom transkripcije, ali u uslovima oksidativnog stresa i UV oštećenja biva brzo degradirana, za razliku od mitohondrijske forme (83-84). Ova saznanja impliciraju da SIRT3 ima primarnu ulogu u mitohondrijama.

Mitohondrijski proteini su u relativno visokoj meri acetilovani (oko 20% svih mitohondrijskih proteina), tako da je regulacija acetilacije od velikog značaja za samo funkcionisanje mitohondrija (85). Pokazano je da SIRT3, kao najbitniji mitohondrijski sirtuin, interaguje sa najmanje 84 mitohondrijska proteina (86). Regulacijom ovih proteina, SIRT3 je uključen u procese mitohondrijske mitoze, transkripcije, translacije, Krebsov ciklus, metabolizam aminokiselina, glukozni i lipidni metabolizam (86).

Kao što je rečeno, maligna ćelija se odlikuje metaboličkim obrascima koji se razlikuju od normalnih ćelija. Metaboličko reprogramiranje, odnosno Warburgov efekat, je jedan od glavnih karakteristika malignog fenotipa. Većina malignih ćelija kao proces sinteze ATP-a koristi proces aerobne glikolize pre nego proces oksidativne fosforilacije, iako je taj proces energetski nepovoljniji. Metaboličkim reprogramiranjem maligna ćelija stvara sebi mikrookruženje pogodno za proliferaciju i preživljavanje i to na prvom mestu preko signalnog puta PI3K-AKT (86). Uopšteno gledano, SIRT3 reguliše mitohondrijski metabolizam tako što inhibira glikolizu, a stimuliše oksidativnu fosforilaciju, ispoljavajući primarno svoju tumor-supresorsku ulogu. Destabilizacijom i inhibicijom transkripcionog faktora HIF1 α , koji kontroliše sintezu glikolitičkih gena, mitohondrijski SIRT3 inhibira glikolizu i glukoznu oksidaciju (87). Zanimljivo je da jedarni SIRT3 takođe inhibira glikolizu, ali preko PTEN-zavisne negativne regulacije transkripcionog faktora MDM2 i stabilizacije p53 proteina u p53-nemutiranim ćelijskim linijama karcinoma dojke (88).

Pored učestvovanja u reprogramiranju metabolizma, SIRT3 različitim mehanizmima reguliše produkciju slobodnih radikala. Slobodni radikali, odnosno reaktivne kiseonične vrste, aktiviraju signalne puteve koji regulišu ćelijski rast i proliferaciju, diferencijaciju, preživljavanje, inflamaciju i metabolizam. Oksidativna oštećenja koja nastaju na molekulima proteina, lipida i nukleinskih kiselina mogu uzrokovati pojavu mutacija koje dalje doprinose razvoju neoplastične transformacije ćelije. Brojne studije pokazuju da SIRT3 reguliše nivo slobodnih radikala. SIRT3 deacetilacijom i aktivacijom MnSOD (magan superoksid dismutaze) i SOD2, enzima sa ulogom u održavanju homeostaze slobodnih radikala, redukuje nivo slobodnih radikala u ćelji i suprimira oksidativnim stresom indukovanu genomsku nestabilnost. SIRT3 takođe deacetiluje različite komponente elektron-transportnog lanca, implicirajući njegovu tumor-supresorsku ulogu usled smanjenja produkcije slobodnih radikala (90). Još jedna od uloga SIRT3 u supresiji razvoja tumora je indukcija programirane ćelijske smrti aktivacijom molekula p53 i regulacijom proapoptotskih Bax i Fas signalnih molekula (86).

SIRT3 takođe ima ulogu i u očuvanju kako mitohondrijskog tako i jedarnog genoma. Deacetilacijom 8-oksoguanin DNK glikozilaze 1 (OGG1), jednog od proteina za reparaciju DNK,

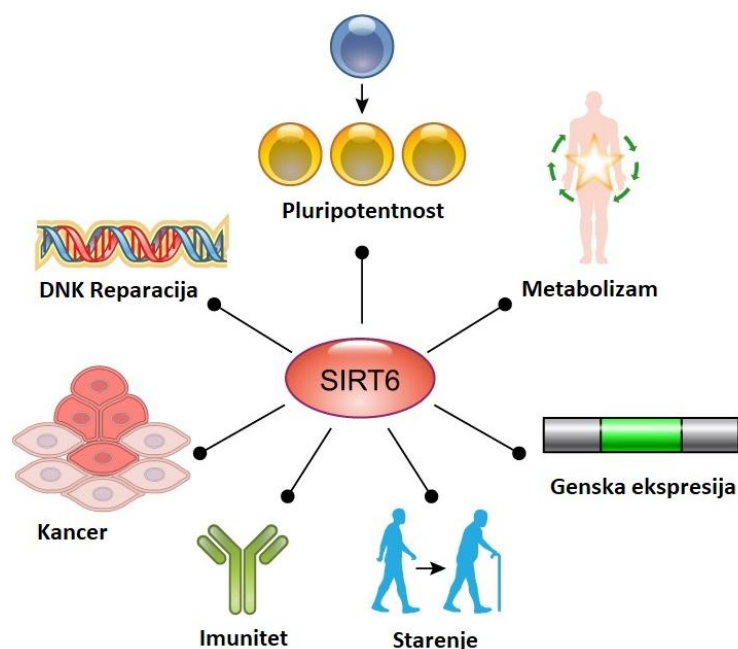
SIRT3 ima ulogu u zaštiti mitohondrijskog genoma od oštećenja nastalih usled oksidativnog stresa (91), dok deacilacijom histona H3K56ac stimuliše NHEJ (92).

S druge strane, pokazana je i onkogeni uloga SIRT3 u procesima kancerogeneze. Povećana SIRT3 ekspresija u malignim ćelijama stimuliše ćelijsko preživljavanje dok u isto vreme inhibira apoptotske signale i na taj način doprinosi procesu tumorigeneze (62). Deacilacijom i aktivacijom izocitrat dehidrogenaze (IDH2), ključnog enzima Krebsovog ciklusa, pospešuje kancerogenezu u hematološkim malignitetima (93). U nesitnoćelijskom karcinomu pluća stimuliše ćelijsku proliferaciju, dok kod kolorektalnog karcinoma i karcinoma ovarijuma povećava aktivnost SOD2 enzima, regulišući produkciju slobodnih radikala i tako adaptirajući ćelije kancera sprečava apoptozu i omogućava preživljavanje ćelije kancera (94-96). Aktivacija SOD2 u ćelijama TNBC inicira epitelno-mezenhimsku tranziciju (97).

Poslednjih godina, povezanost SIRT3 ekspresije sa kliničkopatološkim karakteristikama je ispitivana u različitim tipovima kancera, kao što su kancer dojke, kolona, želuca, pankreasa, prostate, glave i vrata i hepatocelularni kancer (98). Rezultati ranijih studija ukazuju na povezanost SIRT3 sa različitim humanim oboljenjima, oboljenjima povezanim sa starenjem, kancerom, kardiološkim i metaboličkim oboljenjima, što sugeriše da bi SIRT3 mogao biti terapijski target u lečenju ovih oboljenja.

1.4.3. SIRT6

SIRT6 je jedarna NAD⁺ zavisna histon-deacetilaza, koja pored histona, ima i dodatne nehistske katalitičke funkcije kao što su deacilacija i mono-ADP-ribozilacija različitih proteina (99). U normalnim fiziološkim uslovima, preko svojih katalitičkih aktivnosti, SIRT6 ima ulogu u regulaciji DNK reparacije, održavanju telomera, metabolizmu glukoze i lipida, Slika 7.

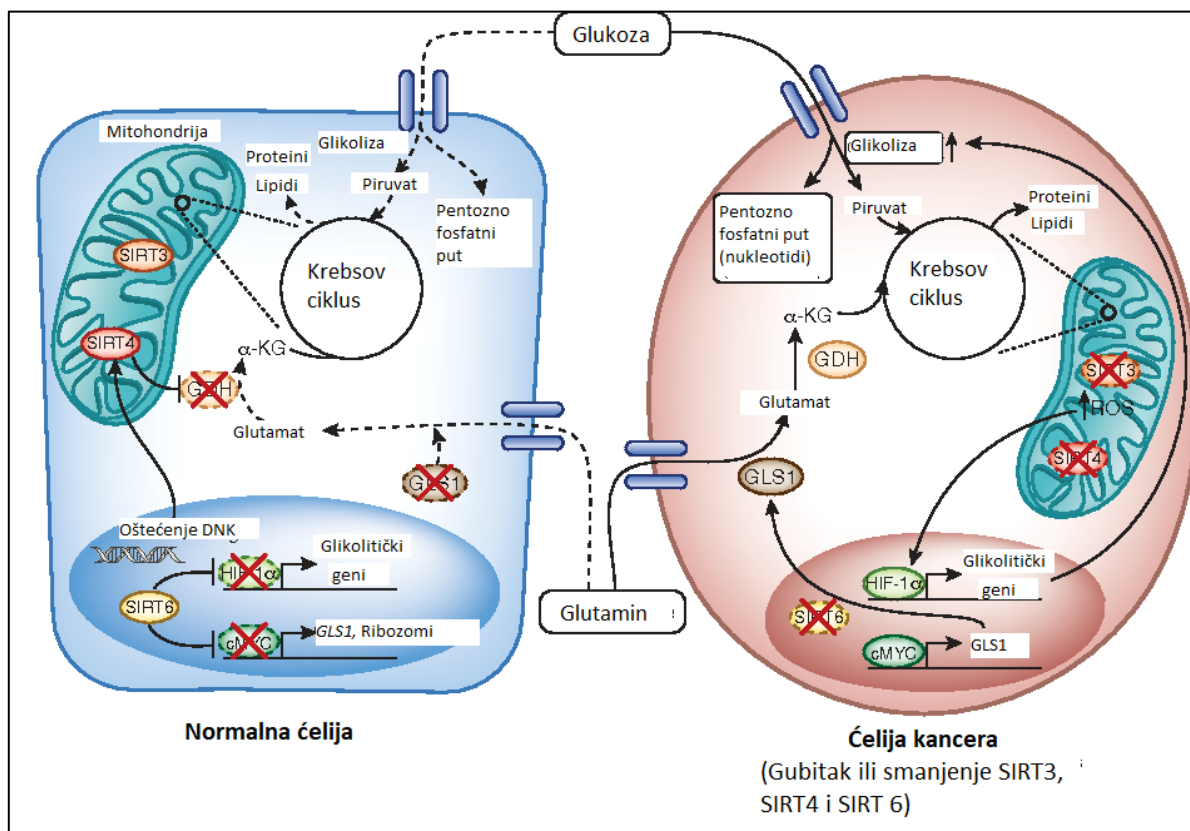


Slika 7. Grafički prikaz različitih uloga SIRT6. Preuzeto i modifikovano: Chang i saradnici 2019 (100)

Gen koji kodira SIRT6 se nalazi na poziciji 19p13.3 i veličine je 8,5kbp. NAD⁺ vezujući domen je u humanim kancerima često mesto mutacija koje za posledicu imaju gubitak funkcije SIRT6 (99). N-terminalni domen, pored toga što je neophodan za lokalizaciju SIRT6 u jedru, takođe je ključan za H3K9 i H3K56 deacetilaznu aktivnost SIRT6 (99). Ovaj domen, očuvan kod sisara, može biti

fosforilisan na poziciji Ser¹⁰ u odgovoru na oksidativan stres i smatra se da takva forma proteina olakšava PARP1-zavisan proces reparacije dvolančanih prekida na DNK (101). Iako je prvobitna uloga SIRT6 bila deacetilacija, novija saznanja upućuju na to da u određenim uslovima SIRT6 preusmerava svoju katalitičku funkciju u smeru ADP-ribozilacije (99). Za razliku od ostalih sirtuina kod kojih se prvo vezuje acetilovani supstrat, pa tek onda NAD⁺, SIRT6 može vezati i NAD⁺ bez prisustva acetilovanog supstrata. Šta više, deacetilazna aktivnost SIRT6 je mnogostruko manja u odnosu na ostale sirtuine (99, 102).

Zajedno sa SIRT3, SIRT6 predstavlja jedan od regulatora glukoznog metabolizma, Slika 8. SIRT6 utiče na glukoznu homeostazu tako što indirektno suprimira PGC1 α što smanjuje produkciju hepatične glukoze, a takođe deacetilacijom H3K9 utiče na regulaciju različitih glikolitičkih gena, sa ulogom korepresora transkripcionog faktora HIF1 α (103). Gubitkom SIRT6 dolazi do metaboličkog reprogramiranja u smeru povećane glikolize, a s druge strane dolazi do povećanja nivoa ekspresije membranskog receptora GLUT1 i povećanja unosa glukoze (103). Tumor supresor p53 učestvuje u regulaciji glukoneogeneze tako što direktno aktivira ekspresiju SIRT6, koji dalje deacetiluje FoxO1, transkripcioni faktor neophodan za aktivnost gena uključenih u proces sinteze glukoze, čime dolazi do njegove translokacije iz jedra u citoplazmu i smanjenja ekspresije gena zaduženih za glukoneogenezu (104). SIRT6 kao korepresor MYC transkripcione aktivnosti utiče na smanjenje ćelijske proliferacije kao i na regulaciju biogeneze ribozoma (105).



Slika 8. Prikaz regulacije Varburgovog efekta aktivnošću SIRT3 i SIRT6. Preuzeto i modifikovano Verdin, 2014 (106)

SIRT6 moduliše različite mehanizme DNK reparacije. U uslovima oksidativnog stresa, SIRT6 se regrutuje na mesto dvolančanog prekida i stimuliše poli-ADP riboziltransferaznu aktivnost PARP1 čime se pospešuje reparacija dvolančanog prekida DNK po principu homologe rekombinacije i nehomologe rekombinacije spajanja krajeva (107). SIRT6 olakšava regrutaciju molekula 53BP1 i NBS1 na mesto oštećenja DNK, a zanimljivo je da je za proces NHEJ neophodna i deacetilazna i ADP-riboziltransferazna aktivnost SIRT6 (107). Pored PARP1 zavisnog načina

reparacije dvolančanih prekida DNK, SIRT6 indukuje globalnu deacilaciju H3K9 i mobilizaciju i stabilizaciju DNK-zavisne protein kinaze, kao i molekula Ku70 i Ku80 na mesto dvolančanog prekida DNK (108). Osim toga, SIRT6 ima ulogu i u baznoj ekscizionoj reparaciji, tako što aktivira glavne enzime BER-a MYH i APE1, ali i proteine kaskade Rad9-Rad1-Hus1, kojom se aktiviraju skoro svi enzimi sistema BER-a (109).

Nekoliko studija je prijavilo ulogu SIRT6 u očuvanju genomske stabilnosti u telomernim i pericentromernim regionima hromatina (99). Telomere su vrlo sklone oštećenjima nastalim usled oksidativnog stresa. Oksidativni stres ubrzava proces skraćanja telomera i neophodna je efikasna reparacija kako bi se očuvala genomska stabilnost. Hromatin u nivou telomera sadrži hipoacetilovane histone, i da bi se obezbedio pristup proteinima zaduženim za reparaciju neophodno je remodelovanje. Pokazano je da je SIRT6 povezan sa hromatinom u nivou telomera implicirajući njegovu esencijalnu ulogu za održavanje stabilnosti telomera (110). Deacilacijom histona H3K9ac i H3K56ac, kao i pozitivnom regulacijom aktivnosti telomerazne reverzne transkriptaze (TERT), SIRT6 učestvuje u održavanju strukture hromatina telomera (111, 112).

Ideja da SIRT6 može imati ulogu u malignom fenotipu zasniva se na saznanjima da gubitak SIRT6 kod miševa dovodi do progresije kancera, da je i u mnogim humanim kancerima zapažen gubitak funkcije SIRT6, kao i utvrđena povezanost SIRT6 ekspresije za preživljavanjem kod nekih tipova humanih kancera, sugerise na tumor-supresorsku ulogu SIRT6 (113). Sve više studija upućuje na to da bi inaktivacija SIRT6 tumor-supresora mogao biti jedan od prvih događaja u procesu kancerogeneze (105). Deacilacijom H3K9, SIRT6 inhibira NF- κ B signalni put i tako utiče na regulaciju gena uključenih u apoptozu, inflamaciju i imunski odgovor (114).

Zahvaljujući svojim ulogama u održavanju genomske stabilnosti i regulaciji metabolizma, SIRT6 se smatra tumor-supresorom. U ćelijama kancera, SIRT6 suprimira glikolizu, inhibirajući sintezu glikolitičkih gena i stimulišući proces oksidativne fosforilacije kao mehanizam sinteze ATP-a. Gubitak SIRT6 doprinosi tumorigenezi čak i bez aktivacije onkogeno (105), implicirajući da je reprogramiranje metabolizma glukoze rani događaj u procesu tumorigeneze. Gubitak SIRT6 takođe dovodi do povećanog metabolizma glutamina kao i do povećane ekspresije ribozomalnih gena, što je karakteristika kasnijih faza tumorigeneze (65).

SIRT6 u različitim tipovima ćelijskih linija kancera indukuje apoptozu, ali ne preko svoje deacilazne aktivnosti, već usled svoje mono-ADP-riboziltransferazne aktivnosti i aktivacije p53 i p73 apoptotskih signalnih puteva (115).

Iako je SIRT6 predominantno okarakterisan kao tumor-supresor, novija istraživanja pokazuju da može imati onkogenu ulogu u procesu kancerogeneze, u zavisnosti od tipa tumora i stadijuma bolesti. Smanjena ekspresija SIRT6 je detektovana kod karcinoma glave i vrata, kolona, pankreasa, jetre i nesitnoćelijskog karcinoma pluća. S druge strane, povećana ekspresija SIRT6 prisutna kod karcinoma skvamoznih ćelija kože, karcinoma prostate i karcinoma dojke povezana je sa lošom prognozom i stvaranjem rezistentnosti na hemioterapiju (65).

Sumirajući dosadašnje podatke o uticaju SIRT6 na proces kancerogeneze, zaključuje se da bi SIRT6 takođe mogao da ima dualnu ulogu u procesu formiranja i progresije kancera dojke, verovatno zavisnu od podtipa kao i od stadijuma bolesti. Dalja ispitivanja bi rasvetlila prognostički potencijal SIRT6, kao i njegovu potencijalnu ulogu terapijskog targeta.

1.4.4. SIRT7

Sirtuin 7 (SIRT7) je član familije III klase histon-deacetilaza, koji za razliku od većine članova svoje familije, ne pokazuje karakterističnu NAD^+ -zavisnu deacetilaznu aktivnost. Gen koji kodira SIRT7 je veličine 6,2kbp i mapiran je na hromozomu 17q25.3, regionu čije česte izmene su povezane sa hematološkim malignitetima (116). Iako je najmanje ispitivani član familije sirtuina, nedavna istraživanja SIRT7 upućuju na njegove potencijalne uloge u regulaciji transkripcije ribozomalne RNK, metabolizmu i popravci DNK oštećenja.

Jedna od glavnih razlika u načinu funkcionisanja SIRT7 u odnosu na ostale članove familije sirtuina je sposobnost selektivne deacetilacije. Selektivna hipoacetilacija H3K18ac povezana je sa onkogenom transformacijom, agresivnim tumorskim fenotipom i lošom prognozom pacijenata. SIRT7 specifično vrši deacetilaciju H3K18ac, modulišući transkripciju gena povezanih sa supresijom tumora, te je neophodan za održavanje malignog fenotipa (117). Osim histon-deacetilazne uloge u ćeliji, SIRT7 deacetilacijom nehistskih proteina može uticati na njihovu aktivnost i na taj način regulisati različite biološke procese. Proteini p53, PAF53, NPM1 i GABP- β 1 su poznati nehistski supstrati SIRT7 aktivnosti (118).

SIRT7 je dominantno lokalizovan u nukleolusu, ali se može naći i u citoplazmi, te se veruje da SIRT7 ima ulogu u kontroli sinteze ribozomalne RNK (rRNK) i transportne RNK (tRNK), što vodi povećanoj biogenezi ribozoma i sintezi proteina, procesima neophodnim za ćelijski rast, proliferaciju i progresiju kancera (119). Iako je ekspresija SIRT7 veća u visoko-proliferativnim tkivima nego u slabo-proliferativnim tkivima te se pretpostavlja da u malignim ćelijama SIRT7 ima ulogu u aktivaciji proliferacije (120), uloga SIRT7 u biogenezi ribozoma je kontroverzna. S jedne strane SIRT7 deacetilazna aktivnost je nepohodna za aktivaciju Polimeraze I, odnosno SIRT7 katalizuje deacetilaciju PAF53, subjedinicu Polimeraze I, čija deacetilovana forma olakšava vezivanje Polimeraze I za promotore na ribozomalnoj DNK (rDNK). Na taj način SIRT7 povećava transkripciju ribozomalnih gena. S druge strane, za razliku od ostalih histon-deacetilaza, SIRT7 ne poseduje DNK-vezujući domen, odnosno za njegovu aktivnost je neophodno prisutvo kofaktora. Najčešće se SIRT7 nalazi u okviru kompleksa sa kofaktorom ELK4 (eng. *ETS-like transcription factor 4*), sa kojim indukuju specifičnu deacetilaciju H3K18ac (121). Specifična deacetilacija H3K18ac se dešava samo u nivou promotora određenog seta gena, najčešće tumor-supresorskih gena, ali i u nivou promotora gena za ribozomske proteine, kao što su *RPS20*, *RPS7*, i *RPS14* (118) (122). Pored sinteze rRNK, SIRT7 učestvuje i u obradi i sazrevanju pre-rRNK. Deacetilacijom U3-55k, SIRT7 olakšava vezivanje U3-55K proteina i U3 snoRNK, male nukleolarne RNK, čime se vrši isecanje i obrada pre-rRNK (123). Ne samo da utiče na aktivnost Polimeraze I, već interakcijom sa mTOR i transkripcionim faktorom TFIIC2 kontoliše aktivnost Polimeraze III, odnosno utiče na sintezu tRNK (119).

Kao što je ranije spomenuto, članovi familije sirtuina povezuju nivo oksigenacije u ćeliji sa regulacijom transkripcije gena koji učestvuju u modulaciji metabolizma ćelije. HIF1 α i HIF2 α su transkripcioni faktori sa ulogom u regulaciji transkripcije u odgovoru na hipoksiju u ćeliji. SIRT7 smanjuje aktivnost transkripcionih faktora HIF1 α i HIF2 α , ali različitim mehanizmom u odnosu na SIRT1, 3 i 6, odnosno mehanizmom koji je nezavisan od njegove deacetilazne uloge. U sojevima miševa kod kojih je SIRT7 katalitički inaktivisan, pokazano je da dolazi smanjenja proteinskog nivoa HIF1 α i HIF2 α , ali to smanjenje HIF1 α i HIF2 α je takođe bilo nezavisno i od proteozomske i lizozomske degradacije proteina HIF1 α i HIF2 α (124). Iako je pokazano da dolazi do fizičke interakcije između SIRT7 i HIF1 α i HIF2 α , tačan mehanizam kojim SIRT7 reguliše nivo ovih proteina u ćeliji još uvek nije poznat, što implicira da bi SIRT7 mogao da ima još neku ulogu u ćeliji.

Pored SIRT1 i SIRT6, SIRT7 je još jedan član iz familije sirtuina koji ima potencijalnu ulogu u reparaciji DNK oštećenja. Sva tri člana familije sirtuina imaju dvojak ulogu u reparaciji DNK oštećenja. S jedne strane histon-deacetilaznom aktivnošću relaksiraju hromatin čime se olakšava pristup i regrutacija proteina zaduženih za reparaciju, a s druge strane direktno aktiviraju proteine zadužene za reparaciju DNK oštećenja (125). Gubitak SIRT7 povezan je sa povećanim nivoom H3K18ac acetilacije na mestu oštećenja DNK, kao i sa nepravilnom NHEJ reparacijom (126) sugerišući ulogu SIRT7 u očuvanju integriteta genoma. Ispitivanja na sojevima mutiranih miševa sa inaktivisanim SIRT7 pokazali su da inaktivacijom SIRT7 dolazi do povećanja osetljivosti na jonizujuće zračenje, akumulacije dvolančanih prekida, aktivacije ATM-zavisnog odgovora na nastala oštećenja i fosforilacije H2AX, hromatinskog markera dvolančanog prekida DNK (127). Pretpostavljeni mehanizam predlaže da se SIRT7 regrutuje na mesto oštećenja DNK na PARP-1-zavisan način i da na mestu DNK oštećenja moduliše. H3K18ac deacilacijom se olakšava pristup 53BP1, p53-vezujućem proteinu, glavnom modulatoru reparacije dvolančanih prekida i povećava efikasnost NHEJ reparacije (127).

SIRT7 je do sada najmanje ispitivani član familije sirtuina, verovatno zbog slabije katalitičke sposobnosti u odnosu na ostale sirtuine. Nedavno otkrivene uloge SIRT7 u regulaciji transkripcije rDNK, biosintezi ribozoma, regulaciji metabolizma, regulaciji reparacije DNK kao i zapažena povećana ekspresija i aktivnost u malignim tkivima, povećala je pažnju naučne javnosti. Iako precizni mehanizmi kojima SIRT7 reguliše proces kancerogeneze i utiče na agresivan fenotip i lošu kliničku sliku pacijenata sa malignitetima tek treba da budu razjašnjeni, SIRT7 predstavlja potencijalnog kandidata za targetovanu terapiju u svrhu lečenja onkoloških pacijenata.

2. Ciljevi rada

Posljednjih godina ispitivanja epigenetičkih mehanizama i njihove uloge u procesu kancerogeneze zauzimaju sve veći značaj. Različita epigenetička obeležja su pokazala veliki potencijal kao prognostički biomarkeri za praćenje i predviđanje kliničkog toka i ishoda pacijenata sa malignim oboljenjima. Takođe, obećavajući je i potencijal različitih epigenetičkih mehanizama za razvoj ciljane personalizovane terapije u svrhu lečenja onkoloških pacijenata.

Imajući u vidu sva dostupna saznanja o značaju histon-deacetilaza u procesu kancerogeneze, osnovni cilj ove doktorske disertacije je bilo ispitivanje ekspresije gena za II i III klasu histon-deacetilaza kao potencijalnih prognostičkih molekularnih biomarkera dva različita tipa karcinoma dojke (trostruko-negativni i hormon receptor-pozitivni). Na osnovu toga, postavljeni su sledeći specifični ciljevi istraživanja:

- Analizirati relativni nivo ekspresije gena za III klasu (*SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT6*, *SIRT7*) i II klasu (*HDAC7*) histon-deacetilaza u grupi pacijentkinja sa TNBC i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke;
- Ispitati postojanje razlike u nivou ekspresije *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT6*, *SIRT7* i *HDAC7* gena između različitih molekularnih tipova karcinoma dojke;
- Analizirati povezanost ekspresije *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT6*, *SIRT7* i *HDAC7* gena sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijentkinja: histološkim tipom, nukleusnim i histološkim gradusom, veličinom tumora, nodalnim statusom i prisustvom metastaza.
- Ispitati povezanost ekspresije *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT6*, *SIRT7* i *HDAC7* gena sa preživljavanjem pacijentkinja sa karcinomom dojke i rizikom za negativan ishod ukupnog preživljavanja.

3. Materijal i metode

3.1. Materijal

3.1.1. Studijska grupa

Studijska grupa je obuhvatila ukupno 135 pacijentkinja sa dijagnostikovanim karcinomom dojke. Od ukupne ispitivane grupe, 61 (45%) pacijentkinja je imala dijagnozu trostruko-negativnog, a 74 (55%) pacijentkinje su imale dijagnozu hormon receptor-pozitivnog, HER2 negativnog tipa karcinoma dojke. Sve pacijentkinje su bile starosne dobi od 33 do 85 godina, sa starosnom medijanom od 60 godina.

Sve pacijentkinje su bile podvrgnute hirurškoj resekciji tumora na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije. Ni jedna od pacijentkinja nije bila izložena hemioterapiji kao ni radioterapiji pre operacije. Uzorci tumorskog tkiva su histološki klasifikovani od strane kliničkog patologa, sveže zamrznuti i čuvani na temperaturi od -196°C u okviru Banke tumora Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije.

Studija je izvedena u skladu sa etičkim standardima Etičkog komiteta Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije (broj etičkog odobrenja je 2829-01, datum donošenja rešenja je 25.07.2019.) i Helsinškom deklaracijom iz 1964. godine, kao i sa njenim kasnijim amandmanima.

Prvi deo ove doktorske disertacije je urađen u grupi od 111 pacijentkinja, od čega su 48 (43%) imale dijagnozu TNBC, a 63 (57%) ER+PR+HER2- tip karcinoma dojke. U ovom delu studije je analizirana povezanost ekspresije *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT6* i *SIRT7* gena sa kliničko-patološkim karakteristikama i preživljavanjem pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon-receptor pozitivnim HER2-negativnim karcinomom dojke. U drugom delu studije, studijska grupa je proširena na konačni broj ispitanica od 135, i dodatno je urađena analiza povezanosti ekspresije *HDAC7* gena sa kliničko-patološkim karakteristikama i preživljavanjem ispitanica ove dve grupe. Klinički i histološki parametri ispitivanih grupa prikazani su u Tabeli 1.

Tabela 1. Prikaz kliničko-patoloških karakteristika pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke

Kliničko-patološke karakteristike		TNBC (N=61)	ER+PR+HER2- (N=74)
Histološki tip	Duktalni	39 (64%)	34 (46%)
	Lobularni	7 (11%)	35 (47%)
	Drugi	15 (25%)	5 (7%)
Starost (medijana)	< 60 godina	22 (36%)	40 (54%)
	≥ 60 godina	39 (64%)	34 (46%)
Menopauza	Premenopauza	6 (10%)	18 (24%)
	Menopauza	55 (90%)	56 (76%)
Veličina tumora	<2 cm	29 (47%)	17 (23%)
	2-5 cm	39 (64%)	55 (74%)
	>5 cm	3 (5%)	2 (3%)
Histološki gradus	hG1/2	27 (44%)	73 (99%)
	hG3	34 (56%)	1 (1%)
Nukleusni gradus	nG1/2	23 (38%)	74 (100%)
	nG3	38 (62%)	0 (0%)
Nodalni status	Negativno	30 (49%)	32 (43%)
	Pozitivno	31 (50%)	42 (57%)
Metastaze	Negativno	45 (74%)	66 (89%)
	Pozitivno	16 (26%)	8 (11%)

TNBC-trostruko-negativni karcinom dojke; ER+PR+HER2- hormon receptor-pozitivni, HER2- karcinom dojke; hG-histološki gradus; nG-nukleusni gradus

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija ukupne RNK

Izolacija ukupne RNK iz uzoraka tumorskog tkiva ispitanica izvedena je koršćenjem TRIzol® reagensa po uputstvu proizvođača. TRIzol® reagens je monofazni rastvor fenola i guanidin-izotiocijanata, i može se koristiti za istovremenu izolaciju RNK, DNK i proteina iz istog uzorka tumora. Tokom homogenizacije tkiva, TRIzol® dovodi do destrukcije ćelija i rastvaranja ćelijskih komponenti, uz očuvanje integriteta RNK. Dodavanjem hloroforma i centrifugiranjem dolazi do razdvajanja donje crvene fenol-hloroformske faze, interfaze i vodene faze. RNK se nalazi u vodenoj fazi i nakon prebacivanja u novu epruvetu može se istaložiti izopropil alkoholom. U organskoj fazi nalaze se DNK i proteini. Precipitacija DNK iz vodene faze i interfaze vrši se dodavanjem etanola. Nakon centrifugiranja fenol-etanolski supernatant se može odbaciti ili sačuvati za izolaciju proteina.

Tkivo tumora je najpre homogenizovano u TRIzol® reagensu (1ml TRIzol® na 50-100mg tkiva) i inkubirano 5 minuta na sobnoj temperaturi. Potom je dodato 0,2ml hloroforma i snažno promućkano u trajanju od 15 sekundi. Uzorci su inkubirani 2-3 minuta na sobnoj temperaturi, a potom centrifugirani na brzini od 12 000×g u trajanju od 15 minuta na 4°C. Vodena faza uzoraka je

prebačena u novu epruvetu za izolaciju RNK. U vodenu fazu je dodato 0,5ml izopropanola, nakon čega je usledila inkubacija 10 minuta na sobnoj temperaturi, a potom je uzorak centrifugiran na brzini od 12 000×g u trajanju od 10 minuta na 4°C. Supernatant je odliven, a RNK pelet je ispran sa 1ml 75% etanola. Nakon centrifugiranja uzoraka na brzini od 7 500xg u trajanju od 5 minuta na temperaturi od 4°C i odbacivanja supernatanta, RNK pelet je resuspendovan u DEPC-om tretiranoj vodi, a uzorci su inkubirani 10 minuta na temperaturi od 55°C. Uzorci su potom čuvani u zamrzivaču na temperaturi od -70°C do dalje upotrebe.

3.2.2. Određivanje koncentracije RNK u uzorku

Koncentracija i čistoća izolovane RNK je određena spektrofotometrijski, odnosno merenjem absorbance na 260 i 280nm talasne dužine. Apsorbanca nukleinskih kiselina se meri na 260nm, dok se apsorbanca proteina meri na talasnoj dužini od 280nm. Merenje absorbance proteina je neophodno kako bi se utvrdilo eventualno prisustvo proteina u rastvoru, odnosno stepen čistoće izolovanih nukleinskih kiselina.

Spektrofotometrija se zasniva na Lamber-Berovom zakonu prema kom intenzitet monohromatske svetlosti, prilikom prolaska kroz određeni rastvor, opada eksponencijalno sa dužinom pređenog puta kroz rastvor i porastom koncentracije molekula koji apsorbuju svetlost u rastvoru. Koncentracija izolovanih RNK se računa sledećom jednačinom:

$$c(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{A_{260} \times R \times F \times OP}{1\ 000}$$

Gde je:

A₂₆₀ - apsorbanca uzorka na 260nm

R - razblaženje (100 puta)

F - faktor konverzije za .RNK (50g/ml)

OP - optički put svetlosti (1cm)

Svi uzorci su razblaženi 100 puta, a koncentracija je merena pomoću optičkog spektrofotometra (Gene Quant, Pharmacia LKB, Švedska).

Čistoća izolovane RNK se određuje odnosom apsorbanci na 260nm i 280nm, odnosno jednačinom:

$$R = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

Kod idealno čistih uzoraka odnos izmerenih apsorbanci na 260 i 280nm bi trebalo da bude između 1,8 – 2,0. U našim uslovima ovaj odnos R je bio u okviru referentnih vrednosti što ukazuje na relativno visok stepen čistoće izolovane RNK koja nije kontaminirana prisustvom proteina.

3.2.3. Reverzna transkripcija

Analiza genske ekspresije najpre zahteva prevođenje izolovane RNK u komplementarnu DNK (cDNK) metodom reverzne transkripcije (RT).

RT-PCR je metoda sinteze cDNK pomoću enzima reverzne transkriptaze, kojom se vrši amplifikacija novosintetisanog cDNK lanca korišćenjem PCR tehnologije. Za uspešnost ove reakcije neophodna je izolovana RNK visokog kvaliteta, što podrazumeva upotrebu DEPC-om tretirane vode za pripremu svih reagenasa. Korišćenjem inhibitora RNaza može se smanjiti degradacija RNK i povećati prinos PCR produkta.

Efikasna reverzna transkripcija se odvija na temperaturi od 37-45°C u trajanju od 30-60 minuta. Reakcija se zaustavlja inkubacijom na 85°C u trajanju od 5 minuta. Moguće je koristiti tri vrste prajmera za sintezu cDNK:

- Oligo dT prajmeri se vezuju za poli-A rep koji se nalazi na 3' kraju većine eukariotskih iRNK. Prilikom izbora oligo dT prajmera, može se desiti da 5' krajevi veoma dugih iRNK ne budu prevedeni u svoje komplementarne sekvence.
- Random heksameri predstavljaju prajmere koji se nasumično vezuju za različite regione na RNK molekulu kreirajući smešu cDNK različitih dužina. Random heksameri ne razlikuju iRNK od ostalih RNK.
- Gen specifični prajmeri se koriste za sintezu cDNK specifičnog gena od interesa i mogu biti naročito korisni ukoliko se uzorak RNK nalazi u maloj koncentraciji.

Kombinacija oligo dT prajmera i random heksamera može povećati efikasnost reverzne transkripcije nekih iRNK. Nakon reverzne transkripcije, uzorci se čuvaju na temperaturi od -20°C do dalje upotrebe.

Reverzna transkripcija je urađena korišćenjem kita za reverznu transkripciju Tetro™ cDNA Synthesis Kit (Bioline, Velika Britanija), po uputstvu proizvođača. U sastav reakcione smeše ulazi: do 500ng totalne RNK, 1µl prajmera, 1µl 10mM dNTP miksa, 4µl 5xRT pufera, 1µl inhibitor RNaze, 1µl enzima reverzna transkriptaza i DEPC voda do finalne zapremine od 20µl. Reakciona smeša je pripremana na ledu i u RNase-free reakcionim tubicama, kako bi se sprečila aktivnost RNaza, koje mogu degradovati molekule RNK. Reakcija reverzne transkripcije je izvedena na aparatu T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD, SAD).

3.2.4. Lančana reakcija polimeraze

Uspešnost reakcije reverzne transkripcije je proverena metodom lančane reakcije polimeraze i amplifikacijom gena za konstitutivno eksprimirani β-aktin.

Osnovni princip PCR reakcije je imitacija replikacije DNK u *in vitro* uslovima. PCR reakcija se odvija u mikrotubama zapremine 0,2 do 1,5ml gde se podvrgava preciznim cikličnim promenama temperature, što za posledicu ima umnožavanje tačno određenog gena ili dela gena. Jedan ciklus se sastoji od denaturacije (proces raskidanja vodoničnih veza između dva komplementarna DNK lanca pod dejstvom visoke temperature), hibridizacije prajmera sa matricom (formiranje vodoničnih veza između prajmera, kojima se definiše sekvenca koja će se umnožavati, i komplementarne sekvence na matrici) i elongacije (proces sinteze DNK pomoću enzima Taq polimeraze).

Inicijalna denaturacija DNK molekula se odvija na temperaturi 94-95°C, najčešće u trajanju od 3 do 5 minuta. Za to vreme se kompletna DNK denaturiše, kako bi prajmeri specifično pronašli

odgovarajuću komplementarnu sekvencu. Hibridizacija prajmera se odvija na temperaturi 42-65°C, u trajanju od 20 sekundi do 1 minuta. Temperatura hibridizacije prajmera zavisi od sekvence i dužine samih prajmera i najčešće se empirijski utvrđuje u odnosu na tačku topljenja prajmera. Elongacija prajmera se odvija na temperaturi od 72°C i obično traje od 20 sekundi do 2 minuta, u zavisnosti od dužine i sekundarne strukture umnoženog fragmenta i takođe se empirijski utvrđuje. Zagrevanjem uzoraka na 95°C u trajanju od 30 sekundi do jednog minuta, omogućava se delimična denaturacija, odnosno denaturacija fragmenta koji je sintetisan u prethodnom koraku. Ponavljanjem ovih ciklusa 25 do 45 puta dobija se eksponencijalno umnožavanje željenog DNK fragmenta.

U sastav reakcije za PCR ulazi: Taq polimeraza u količini 0,5 do 2,5 jedinica za finalni volumen od 50µl, MgCl₂ u koncentraciji 0,5-5mM, nukleotidi (dNTP-ovi) u koncentraciji 20-200µM i DNK matrica (100-500ng). PCR reakcija se najčešće izvodi korišćenjem komercijalnog miksa (eng. *Master mix*) koji sadrži sve komponente PCR smeše osim prajmera i DNK matrice. Pri svakoj PCR reakciji korišćena su pozitivna i negativna kontrola reakcije. Pozitivna kontrola podrazumeva DNK uzorak za koji je pokazano da će se umnožiti pri istim uslovima PCR reakcije i koristi se za detekciju lažno negativnih rezultata. Negativna kontrola je uzorak koji umesto DNK matrice sadrži vodu i koristi se za detekciju lažno pozitivnih rezultata.

Lančana reakcija polimeraze je urađena korišćenjem komercijalnog kita, odnosno 2x AmpliTaqGold Master Mix (Applied Biosystems, SAD), po uputstvu proizvođača, na uređaju T100TM Thermal Cycler (BIO-RAD, SAD). Prajmeri korišćeni sa amplifikaciju gena za β-aktin su F: 5'-GCA CCA CAC CTT CTA CAA TG-3' i R: 5'-TGC TTG CTG ATC CAC ATC TG-3'.

3.2.5. Elektroforeza na agaroznom gelu

Uspešnost amplifikacije gena za β-aktin je proverena elektroforezom na 2% agaroznom gelu.

Elektroforeza, kao metoda razdvajanja naelektrisanih čestica pod dejstvom električnog polja, koristi se za razdvajanje nukleinskih kiselina. Nukleinske kiseline su polianjoni-negativna naelektrisanja koja su ravnomerno raspoređena duž polinukleotidnog lanca, tako da je ukupna količina naelektrisanja molekula DNK proporcionalna njegovoj veličini. DNK molekuli se u zatvorenom električnom polju usmereno kreću od katode ka anodi. Brzina kretanja kraćih molekula DNK je brža u odnosu na duže molekule DNK. Po završetku procesa elektroforeze DNK molekuli različitih dužina se razdvajaju, formirajući trake na gelu koje se mogu vizualizovati.

Agaroz je polisaharid koji rastvaranjem, kuvanjem i hlađenjem formira gustu mrežu čije pore variraju od 100 do 300nm, u zavisnosti od koncentracije rastvora agaroze. Od gustine agaroznog gela, odnosno od veličine pora, od sastava i jonske jačine pufera za elektroforezu, kao i od jačine električne struje zavisi brzina kretanja molekula DNK kroz agarozni gel. Brzina kretanja ispitivanog molekula DNK se poredi sa brzinom kretanja molekula DNK poznate veličine (npr. molekulski markeri), na osnovu čega se procenjuje veličina ispitivanog molekula DNK.

Uspešnost PCR amplifikacije se proverava pomoću elektroforeze na 2% agaroznom gelu. Agaroz u prahu (Serva, Nemačka) je rastvorena u 0,5 x TBE puferu (4,5mM Tris-baza, 10mM EDTA, 87mM borna kiselina; pH=8) i zagrevana do ključanja. U rastvor ohlađen do oko 70°C je dodaje etidijum-bromid u finalnoj koncentraciji od 5µg/ml. Prohlađen gel je izliven u kadicu za elektroforezu, u kojoj su prethodno postavljene češljevi koji će formirati bunariće, i ostavljen da hlađenjem polimeriše. U bunariće gela je stavljeno po 5µl genomske DNK i 2µl boje (6 x loading buffer: 0,25% brom fenol plavo, 0,25% ksilen-cijanolo, 20% fikol 400). Za analizu amplifikata neophodno je koristiti molekulski marker. Elektroforeza se odvija u 0,5 x TBE puferu pri naponu od 80V i struji od 35 - 40mA oko 40 minuta (Pharmacia LKB, Švedska). Gel je analiziran pod kratkotalasnom UV svetlošću transiluminatora (Pharmacia LKB, Švedska).

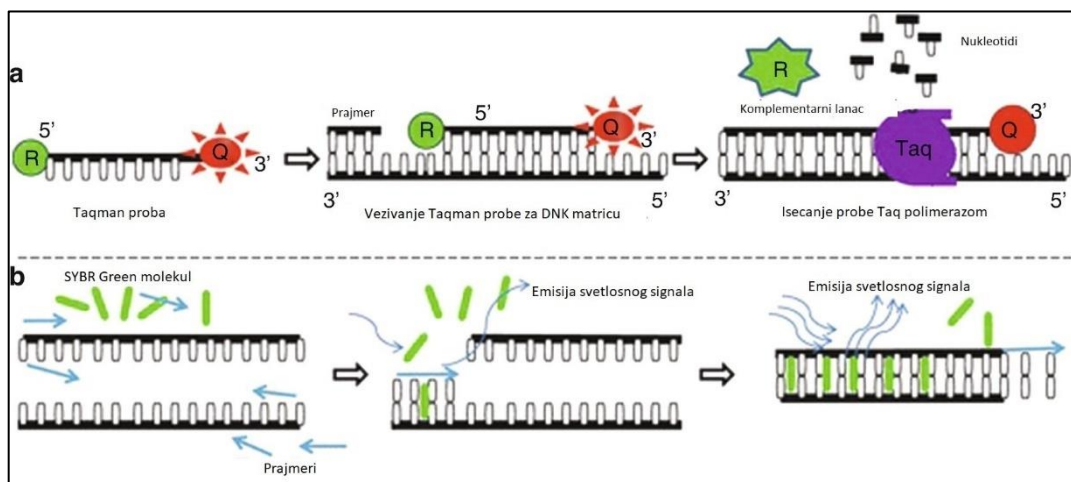
3.2.6. Kvantitativni PCR

Real-Time PCR (PCR u realnom vremenu) ili kvantitativni PCR, je metoda amplifikacije i kvantifikacije DNK na specifičan, senzitivan i reproducibilan način. Sistem se zasniva na detekciji i kvantifikaciji fluorescentnog signala, koji je direktno proporcionalan količini PCR produkta u reakciji. Kao i kod klasične PCR metode, Real-Time PCR podzumeva amplifikaciju ciljanog segmenta usled cikličnog delovanja temperature, odnosno karakterističnog temperaturnog profila. Za razliku od klasičnog PCR-a, kod kojeg se analiza reakcije vrši u završnoj plato fazi reakcije, Real-Time PCR-om se meri kinetika reakcije u eksponencijalnoj fazi PCR reakcije, kada je amplifikacija najbrža, a sama reakcija visoko specifična. Bazalni nivo fluorescence amplifikovanog uzorka, koji je neophodno detektovati, kako bi se amplifikacija smatrala uspešnom, se naziva linija praga fluorescence (eng. *threshold*) i nalazi se u okviru eksponencijalne faze reakcije. Ispitivani uzorci se međusobno razlikuju po broju ciklusa amplifikacije koji su im neophodni za dostizanje zadate vrednosti fluorescence. Ciklus amplifikacije u kojem je nivo fluorescence ispitivanog uzorka jednak nivou zadate fluorescence, naziva se Ct vrednost. Što je Ct vrednost uzorka veća, to znači da je neophodan veći broj ciklusa da bi se dostigla zadata fluorescence, odnosno količina početnog materijala DNK je manja.

Kvantifikacija DNK može biti apsolutna i relativna. Apsolutnom kvantifikacijom se određuje tačan početni broj kopija ispitivane DNK sekvence.

Relativna kvantifikacija određuje promenu u nivou ekspresije gena u nekom uzorku u odnosu na kontrolni uzorak. Da bi se ispitivala ekspresija bilo kog gena, kao početni materijal se koristi molekul RNK, izolovan iz tkiva u kojem se ispituje ekspresija određenih gena. Izolovana RNK se pomoću enzima reverzne transkriptaze prevodi u komplementarnu cDNK, kako je prethodno opisano. Relativna kvantifikacija za analizu podrazumeva korišćenje endogene kontrole i kalibratora. Endogena kontrola predstavlja normalizator količine RNK u uzorku. Za endogenu kontrolu se najčešće uzima gen koji se tkivno i vremenski konstitutivno eksprimira. U zavisnosti od eksperimenta, odnosno tkiva iz kojeg se izoluje RNK, za endogenu kontrolu najčešće se biraju geni koji kodiraju GAPDH (gliceraldehid-3-fosfat), TBP (tata-blok vezujući protein), β aktin, rRNK. Kalibrator je uzorak sa kojim se poredi ekspresija gena ciljnog uzorka. U slučaju da je dizajn eksperimenta takav da su eksperimentalne grupe na neki način tretirane, kalibrator bi u tom slučaju bila netretirana kontrolna grupa. Kao kalibrator se takođe može uzeti i neko drugo tkivo, ukoliko za to postoji biološki smisao.

Pri određivanju relativne kvantifikacije, za detekciju PCR amplifikata moguće je koristiti različite tehnologije, odnosno različite tipove fluorescentnih boja.



Slika 9. Ilustracija mehanizma a) TaqMan i b) SYBR Green tehnologije. TaqMan tehnologija koristi TaqMan probe, fluorescentno obeležene oligonukleotide na čijem 5' kraju se nalazi reporterski, a na 3' kraju molekula prigušivača, koje hibridizuju sa specifičnom sekvencom. Taq polimeraza svojom 5' egzonukleaznom aktivnošću iseca reporter molekula i dovodi do emitovanja fluorescencije. Intenzitet fluoresciranja proporcionalan je količini amplifikata u reakciji. Preuzeto i modifikovano: Gulec i Turgut, 2019 (128)

SYBR Green tehnologija se zasniva na vezivanju fluorescentne SYBR green boje za dvolančanu DNK, koja tako vezana emituje karakterističan fluorescentni signal, koji se detektuje pomoću Real Time PCR aparata. Jačina fluorescentnog signala proporcionalna je količini amplifikata. Ova boja se nespecifično vezuje za dvolančanu DNK, tako da je pri analizi rezultata neophodno koristiti krivu disocijacije. Pojava samo jednog pika govori o vezivanju boje samo za DNK matricu, dok pojava više pikova govori o mogućem formiranju dimera prajmera. Za analizu relativne kvantifikacije korišćen je 7500 System SDS Real Time PCR (Applied Biosystems, SAD).

U sastav reakcione smeše finalne zapremine od 25 μ l ulazi: 2 μ l cDNK (do 500ng), 12,5 μ l Maxima SYBR Green qPCR master miks (2x), (Thermo Fisher Scientific, SAD), po 0,75 μ l svakog prajmera u finalnoj koncentraciji 0,3 μ M i 9 μ l dH₂O. Maxima SYBR Green qPCR master miks koristi univerzalne uslove PCR reakcije, preporučene od proizvođača: 40 ciklusa reakcije, temperatura inicijalne denaturacije 95°C 10 minuta, denaturacije 95°C 15 sekundi, anilinga i elongacije 60°C 1 minut. Sekvence prajmera korišćenih za kvantitativni PCR u ovoj studiji su predstavljeni u Tabeli 2.

Tabela 2. Prikaz sekvenci prajmera korišćenih za kvantitativnu analizu genske ekspresije

Gen	<i>Forward</i> sekvenca (5'-3')	<i>Revers</i> sekvenca (5'-3')
<i>SIRT1</i>	5'-TAGAGCCTCACATGCAAGCTCTA-3'	5'-GCCAATCATAAGATGTTGCTGAC-3'
<i>SIRT3</i>	5'-CATTCGGGCTGACGTGATG-3'	5'-AACCACATGCAGCAAGAACCT-3'
<i>SIRT6</i>	5'-CCCGGATCAACGGCTCTATC-3'	5'-GCCTTCACCCTTTTGGGGG-3'
<i>SIRT7</i>	5'-CGTCCGGAACGCCAAATAC-3'	5'-GACGCTGCCGTGCTGATT-3'
<i>HDAC7</i>	5'-GCTCAGCATGTGCATGTGGAACAC-3'	5'-TGAGAGCCTGGTGTGTCTGGCT-3'
<i>GAPDH</i>	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'

Livakov metod analize relativne kvantifikacije, $2^{-\Delta\Delta C_t}$, se koristi u situacijama kada je efikasnost amplifikacije i target gena i referentnog gena (endogene kontrole) približno jednaka i iznosi oko 100%. U tom slučaju za računanje nivoa relativne kvantifikacije koriste se sledeće formule:

$$\Delta C_t(\text{test}) = C_t(\text{GOI}) - C_t(\text{REF})$$

$$\Delta C_t(\text{kalibrator}) = C_t(\text{GOI, kalibrator}) - C_t(\text{REF, kalibrator})$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{test}) - \Delta C_t(\text{kalibrator})$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t} = \text{normalizovani odnos ekspresije.}$$

Gde je:

GOI - gen od interesa

REF - referentni gen (endogena kontrola)

Ct - broj ciklusa u kojem signal dostiže vrednost bazalne fluorescence

RQ - vrednost relativne kvantifikacije

U ovoj studiji korišćen je Livakov metod, s obzirom da su efikasnosti amplifikacije ispitvanih gena, kao i referentnog gena, odnosno endogene kontrole bile približno iste.

Pri izboru adekvatnog referentnog gena, ispitivali smo stabilnost ekspresije gena za GAPDH (gliceraldehid-3-fosfat), ACTB (β -aktin), 18S (18S ribozomalna RNK), HPRT (hipoksantin-guanin-fosforibozil-transferaza) i TBP (TATA boks vezujući protein). Stabilnost ispitvanih referentnih gena je evaluirana korišćenjem Δ Ct metoda, kao i upotrebom dva softvera NormFinder (129) i BestKeeper (130). NormFinder softver se koristi za evaluaciju varijacija između grupa, kao i varijacija u okviru iste ispitivane grupe, dok se BestKeeper softver koristi za ispitivanje stabilnosti genske ekspresije. Naša analiza je pokazala da *GAPDH* pokazuje najmanje varijacije između ispitvanih grupa kao i najmanje intravarijacije u okviru pojedinačnih grupa, te je dalje korišćen za analizu genske ekspresije Livakovom $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodom. Rezultati su predstavljeni kao N-fold promene genske ekspresije normalizovane u odnosu na ekspresiju *GAPDH*.

3.2.7. Statistička analiza podataka

Statistička analiza podataka je urađena korišćenjem programa SPSS 20.0 (IBM Corporation, SAD). Za uporednu analizu nivoa ekspresije gena *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT6*, *SIRT7* i *HDAC7* normalizovanih u odnosu na ekspresiju *GAPDH* gena, između TNBC i ER+PR+HER2- pacijenata, korišćen je neparametrijski Mann Whitney U test.

Evaluacija ekspresije ispitvanih gena kao potencijalnih biomarkera za praćenje toka i prognoze ishoda bolesti pacijentkinja sa TNBC i ER+PR+HER2- kancerom dojke je urađena metodom ROC krive (eng. *Receiver Operating Characteristic*) i analizom regiona ispod krive AUC (eng. *Area Under the ROC Curve*). ROC kriva se koristi za ispitivanje diskriminacionog potencijala varijabli koje imaju kvantitativnu prirodu. Ona predstavlja grafički prikaz senzitivnosti i specifičnosti za svaku moguću graničnu vrednost ispitivane kontinuirane varijable. Senzitivnost se odnosi na identifikaciju osoba sa stvarno pozitivnim nalazom za ispitivanu varijablu i predstavlja odnos tačno pozitivnih i zbira tačno pozitivnih i lažno negativnih nalaza za ispitivanu vrednost. Specifičnost se odnosi na identifikaciju stvarno negativnih nalaza za ispitivanu varijablu i predstavlja odnos tačno negativnih i zbira tačno negativnih i lažno pozitivnih nalaza za ispitivanu varijablu. Rezultat ROC analize definiše vrednost površine koja se nalazi ispod ROC krive, tzv. AUC vrednost, kao i statistička značajnost razlike te vrednosti u odnosu na referentnu vrednost, odnosno površinu koja se nalazi ispod referentne linije, tj. linije koja prolazi kroz sredinu koordinatnog sistema. Analiza ROC krive kao i metod „Manhattan distance“ (131) su dalje korišćeni za utvrđivanje optimalne vrednosti koja bi se koristila kao granična vrednost za dihotomizaciju genske ekspresije na nisku i visoku.

Za ispitivanje povezanosti nivoa genske ekspresije analiziranih gena i kliničko-patoloških karakteristika pacijentkinja korišćeni su Hi-kvadrat test (χ^2) i Fišerov egzaktni test u slučaju kada je očekivana učestalost u grupi bila manja od 5%.

Analiza ukupnog preživljavanja pacijentkinja izvršena je Kaplan-Meier metodom. Krive su međusobno poređene log-rank testom.

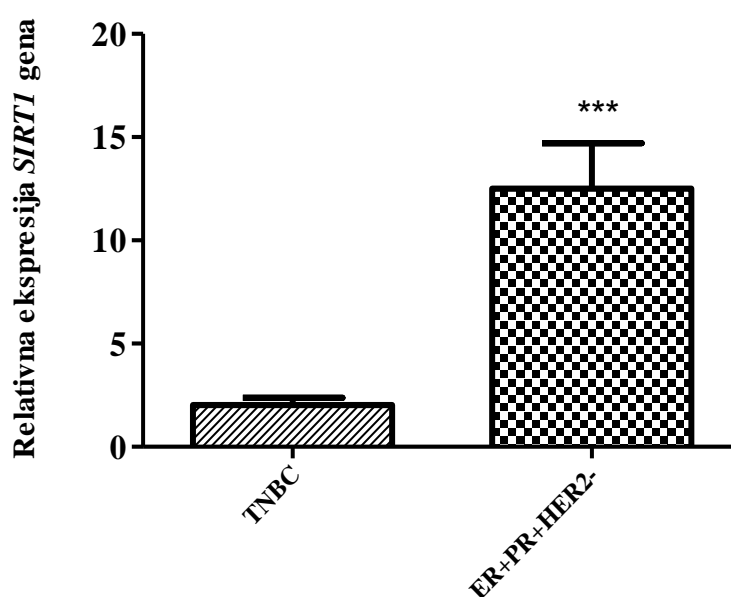
Analiza ispitivanja rizika, odnosno *Hazard Ratio* (HR) je urađena univarijantnom analizom, odnosno Cox-proporcionalnom hazard regresionom analizom, sa intervalom poverenja od 95%. Varijable koje su u univarijantnoj analizi imale statističku značajnost $p < 0,200$ su uključene u multivarijantnu analizu u svrhu ispitivanja nezavisnih prognostičkih parametara koji utiču na ukupno preživljavanje ispitivanih pacijentkinja sa TNBC i ER+PR+HER2- kancerom dojke.

p-vrednosti manje od 0,05 su smatrane statistički značajnim.

4. Rezultati

4.1. Ekspresija *SIRT1* gena kod pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke

Ekspresija *SIRT1* gena je poređena u uzorcima pacijentkinja sa TNBC i ER+PR+HER2- tipom karcinoma dojke. Pokazano je da ispitanice sa TNBC tipom imaju značajno nižu relativnu ekspresiju *SIRT1* gena u odnosu na ispitanice sa ER+PR+HER2- tipom kancera dojke. Izmerena srednja vrednost relativne kvantifikacije normalizovane u odnosu *GAPDH* je bila $2,017 \pm \text{SEM } 0,357$ i $12,504 \pm \text{SEM } 2,202$ redom, $p=0,001$, Slika 10.

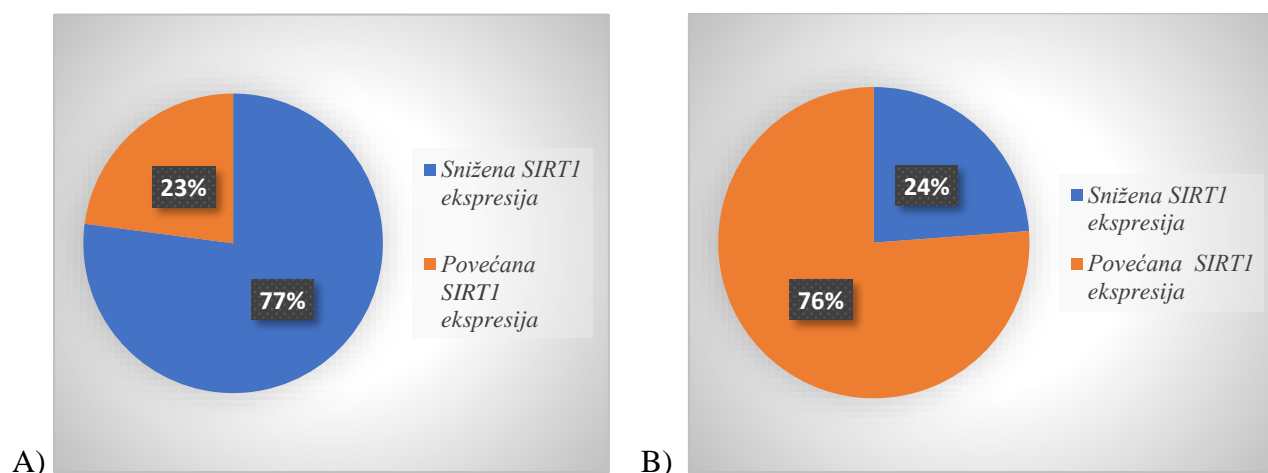


Slika 10. Relativna ekspresija *SIRT1* gena kod pacijentkinja sa TNBC i ER+PR+HER2- tipom karcinoma dojke; *** $p<0,001$.

Analizom ROC krive kod pacijentkinja sa TNBC tipom karcinoma dojke, određena je optimalna granična vrednost kontinuirane varijable kojom se opisuje relativna ekspresija *SIRT1* gena, koja je iznosila 2,51-*fold change*. Za upotrebu 2,51-*fold change* kao granične vrednosti za dihotomizaciju *SIRT1* ekspresije na sniženu i povišenu, vrednost AUC krive iznosila je 0,63, senzitivnost 41,7%, a specifičnost 83,3%.

U grupi pacijentkinja sa ER+PR+HER2- tipom karcinoma dojke, na osnovu analize ROC krive, predložena granična vrednost je iznosila 1,92-*fold change*, sa vrednostima AUC 0,58, senzitivnost 61,1% i specifičnost 62,5%. Međutim, kako granične vrednosti manje od dvostruke promene u nivou ekspresije, odnosno manje od 2-*fold change*, mogu biti efekat nešto slabije preciznosti *SYBR Green* tehnologije, arbitrarno se u ovim slučajevima kao granična vrednost uzima dvostruka promena u genskoj ekspresiji, odnosno 2-*fold change*.

U grupi ispitanica sa TNBC tipom karcinoma dojke, snižena *SIRT1* ekspresija je registrovana kod 77% (37/48) pacijentkinja, dok je povećana *SIRT1* ekspresija registrovana kod 23% (11/48) pacijentkinja. Kod ispitanica sa ER+PR+HER2- tipom karcinoma dojke, sniženu *SIRT1* ekspresiju je imalo 24% (15/63), a povećana ekspresija je zabeležena kod 76% (48/63) ispitanica. Rezultati su prikazani na slici 11.

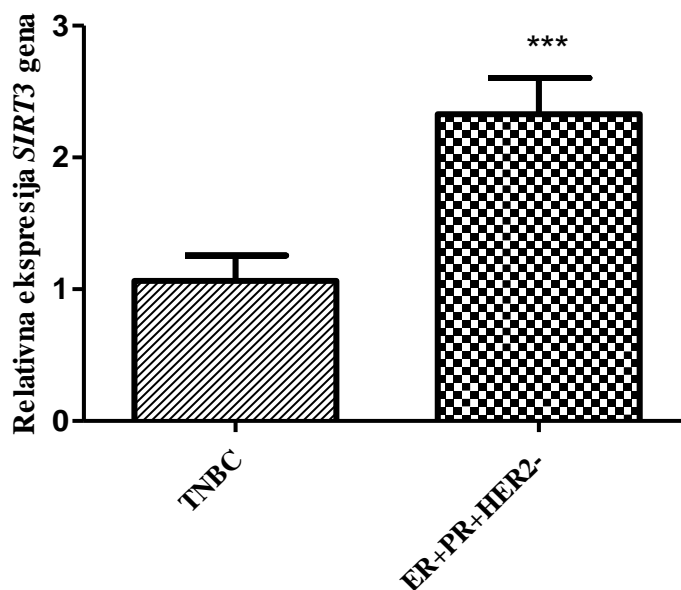


Slika 11. Procentualna zastupljenost pacijentkinja sa sniženom i povećanom *SIRT1* ekspresijom kod A) TNBC pacijentkinja B) ER+PR+HER2- pacijentkinja

4.2. Ekspresija *SIRT3* gena kod pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke

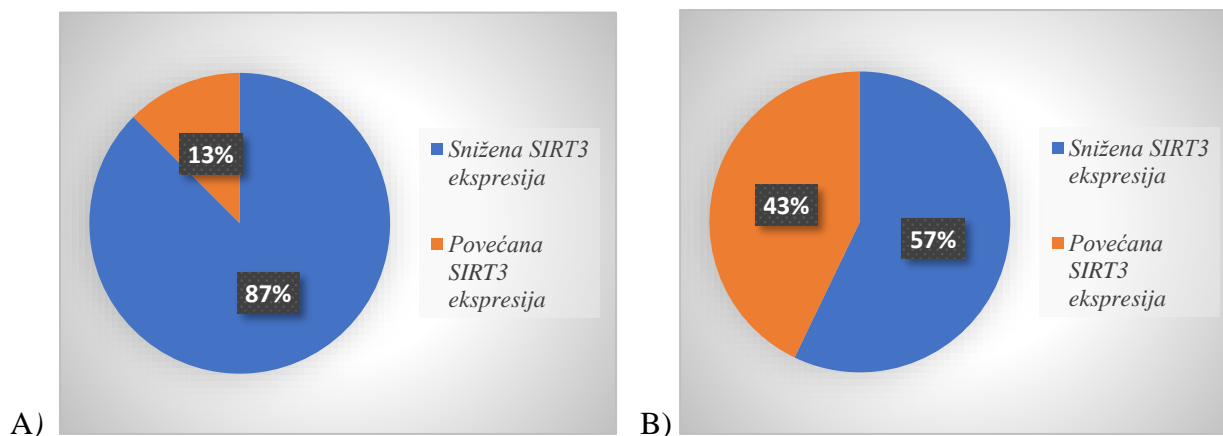
U ispitivanim grupama merena je i poređena ekspresija *SIRT3* gena. Analizom rezultata je ustanovljeno da postoji značajna razlika u nivou relativne genske ekspresije *SIRT3* u uzorcima tumora pacijentkinja sa TNBC i ER+PR+HER2- karcinomom dojke. Naime, pacijentkinje sa TNBC tipom karcinoma dojke su imale značajno niži nivo *SIRT3* genske ekspresije u odnosu na pacijentkinje sa ER+PR+HER2- tipom. Izmerene srednje vrednosti relativne kvantifikacije u ispitivanim grupama pacijentkinja sa TNBC i ER+PR+HER2- tipom karcinoma dojke su bile $1,064 \pm \text{SEM } 0,122$ i $2,330 \pm \text{SEM } 0,274$, redom, $p=0,0001$, Slika 12.

Analizom ROC krive utvrđene su predložene granične vrednosti za obe grupe ispitivanih pacijentkinja. S obzirom da su u oba slučaja te vrednosti bile manje od dvostruke promene u ekspresiji, odnosno manje od *2-fold change*, kao granična vrednosti za dihotomizaciju *SIRT3* ekspresije na sniženu i povećanu, uzeta je vrednost od *2-fold change* i kod pacijentkinja sa TNBC i sa ER+PR+HER2- tipom karcinoma dojke.



Slika 12. Relativna ekspresija *SIRT3* gena kod pacijentkinja sa TNBC i ER+PR+HER2- tipom karinoma dojke; *** $p < 0,001$.

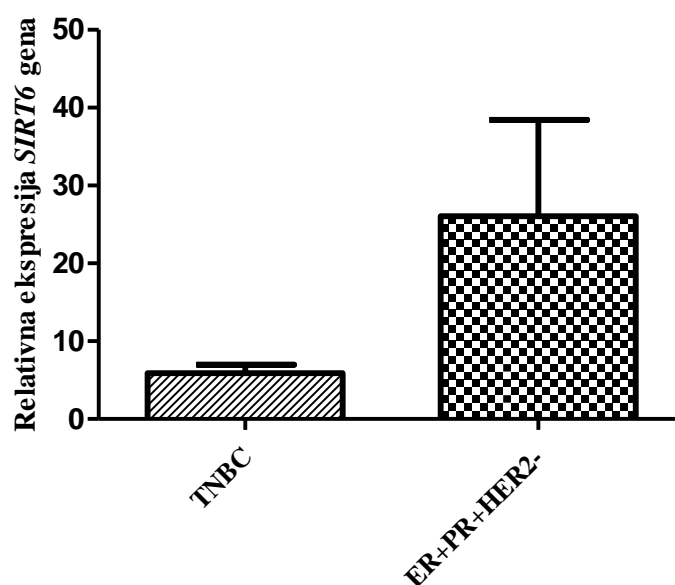
Analizirajući zastupljenost povećane odnosno smanjene *SIRT3* ekspresije kod ove dve ispitivane grupe pacijentkinja sa karinomom dojke, zapaženo je da kod pacijentkinja sa TNBC tipom 87% (42/48) je imalo sniženu, a 13% (6/48) je imalo povećanu *SIRT3* ekspresiju (Slika 13A). U grupi ispitanica sa ER+PR+HER2- tipom karinoma dojke, 57% (36/63) je imalo sniženu, dok je 43% (27/63) imalo povećanu *SIRT3* ekspresiju (Slika 13B).



Slika 13. Procentualna zastupljenost pacijentkinja sa sniženom i povećanom *SIRT3* ekspresijom kod A) TNBC pacijentkinja B) ER+PR+HER2- pacijentkinja

4.3. Ekspresija *SIRT6* gena kod pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke

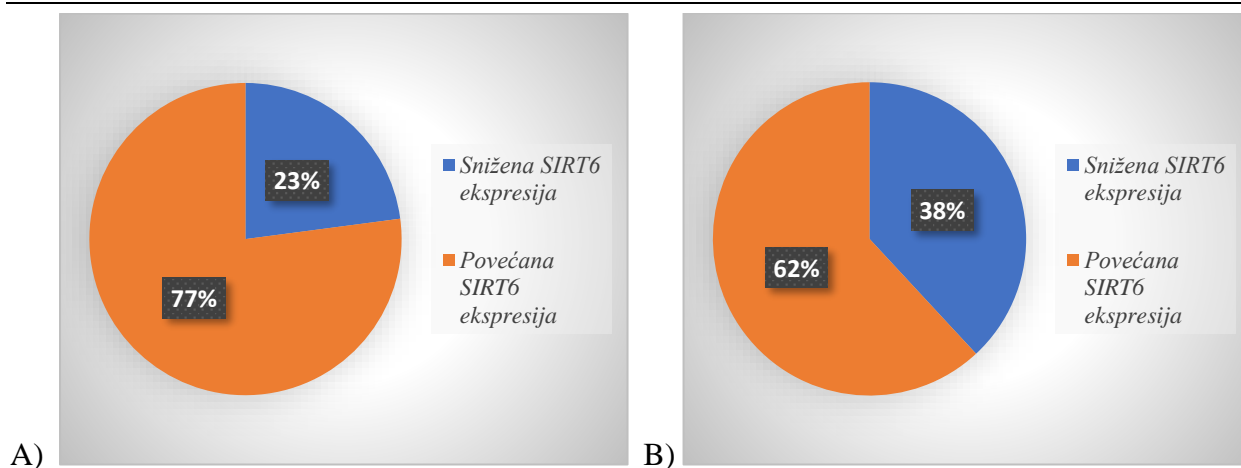
Upoređujući relativni nivo *SIRT6* ekspresije kod pacijentkinja sa TNBC i ER+PR+HER2- tipom karcinoma dojke, nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u nivou *SIRT6* ekspresije u ove dve grupe ispitanica. Izmerene srednje vrednosti relativne genske *SIRT6* ekspresije za TNBC grupu bile su $5,9 \pm \text{SEM } 1,093$, a za ER+PR+HER2- grupu $26,07 \pm \text{SEM } 12,35$ ($p=0,446$), Slika 14.



Slika 14. Relativna ekspresija *SIRT6* gena kod pacijentkinja sa TNBC i ER+PR+HER2- tipom karcinoma dojke

Dihotomizacija vrednosti relativne promene *SIRT6* ekspresije na povećanu i sniženu je izvršena u odnosu na graničnu vrednost koja predstavlja dvostruku promenu u *SIRT6* genskoj ekspresiji, odnosno *2-fold change*.

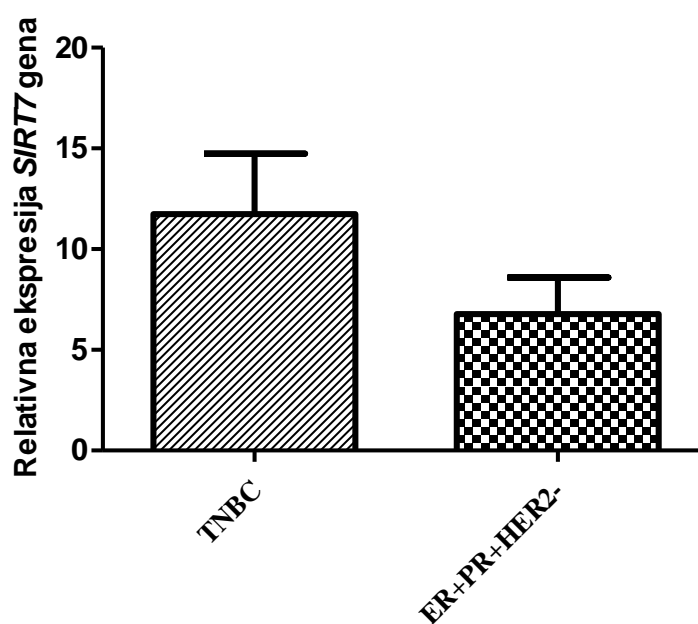
Ispitujući odnos zastupljenosti povećane odnosno smanjenje *SIRT6* ekspresije kod pacijentkinja sa TNBC i ER+PR+HER2- tipom karcinoma dojke, rezultati su pokazali da u TNBC grupi 23% (11/48) je imalo sniženu *SIRT6* ekspresiju, dok 77% (37/48) je imalo povećanu *SIRT6* ekspresiju. U ER+PR+HER2- grupi ispitanica, 45% (24/63) je imalo sniženu, dok je 62% (39/63) imalo povećanu *SIRT6* ekspresiju, Slika 15.



Slika 15. Procentualna zastupljenost pacijentkinja sa sniženom odnosno povećanom *SIRT6* ekspresijom kod A) TNBC pacijentkinja B) ER+PR+HER2- pacijentkinja

4.4. Ekspresija *SIRT7* gena kod pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke

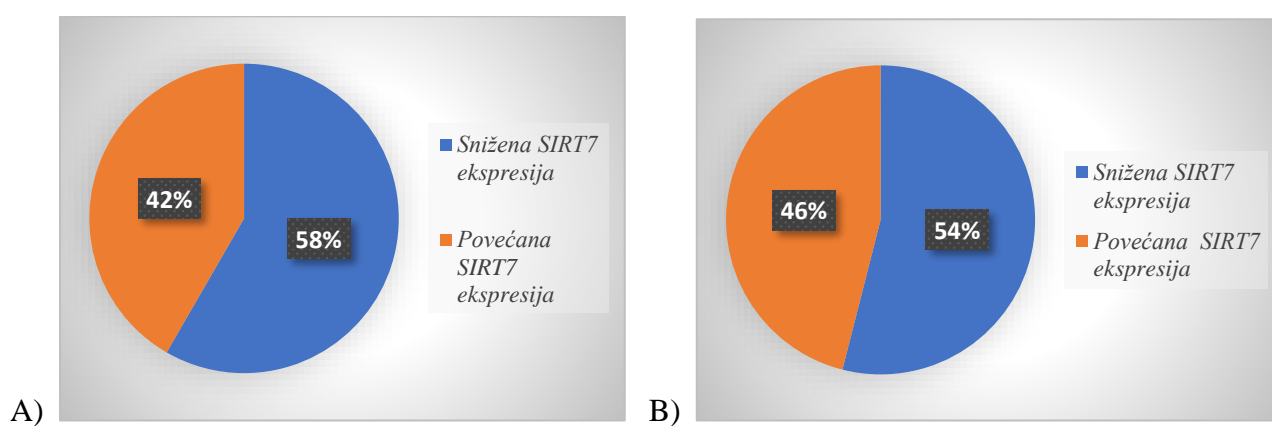
Analizom relativne *SIRT7* ekspresije kod pacijentkinja sa TNBC i ER+PR+HER2- tipom karcinoma dojke nije utvrđeno da postoji značajna razlika u nivou *SIRT7* genske ekspresije između ove dve ispitivane grupe. Izmerene vrednosti u grupi TNBC ispitanica su bile $11,74 \pm \text{SEM } 3,004$, dok su izmerene vrednosti kod ER+PR+HER2- ispitanica bile $6,78 \pm \text{SEM } 1,805$, $p=0,297$, Slika 16.



Slika 16. Relativna ekspresija *SIRT7* gena kod pacijentkinja sa TNBC i ER+PR+HER2- tipom karcinoma dojke

Evaluacijom ROC krive kod pacijentkinja sa TNBC i ER+PR+HER2- tipom karcinoma dojke, utvrđene su granične vrednosti kontinuirane varijable kojom je izražena relativna ekspresija *SIRT7* gena. Vrednost na osnovu koje je izvršena dihotomizacija *SIRT7* ekspresije na povećanu i sniženu kod TNBC pacijentkinja je iznosila 4,7-fold change, sa vrednostima AUC 0,71, senzitivnosti 70% i specifičnosti 30%, dok je kod ER+PR+HER2- pacijentkinja ta vrednost iznosila 3,67-fold change, sa vrednostima AUC 0,56, senzitivnosti 80% i specifičnosti 43%.

Kod ispitanica sa TNBC tipom karcinoma dojke, 58% (28/48) je imalo sniženu *SIRT7* ekspresiju, dok je 42% (42/48) imalo povećanu *SIRT7* ekspresiju. U grupi ispitanica sa ER+PR+HER2- tipom karcinoma dojke, 54% (34/63) je imalo sniženu, a 46% (29/63) je imalo povećanu ekspresiju *SIRT7* gena. Rezultati su prikazani na Slici 17.

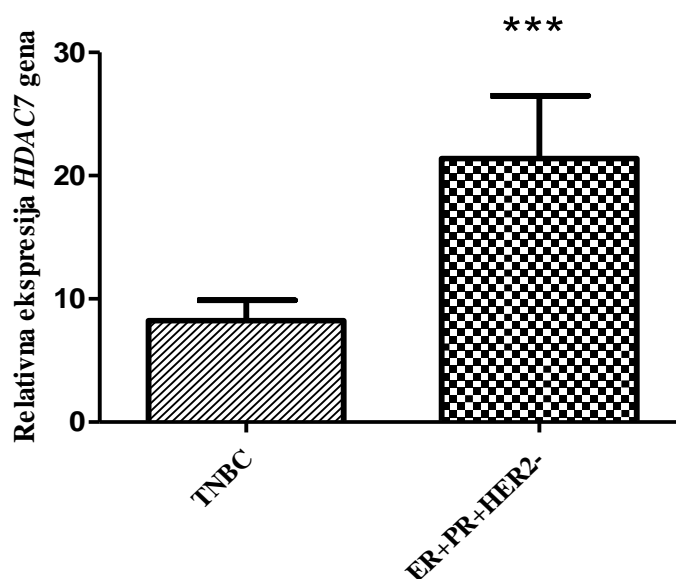


Slika 17. Procentualna zastupljenost pacijentkinja sa sniženom odnosno povećanom *SIRT7* ekspresijom kod A) TNBC pacijentkinja B) ER+PR+HER2- pacijentkinja

4.5. Ekspresija *HDAC7* gena kod pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke

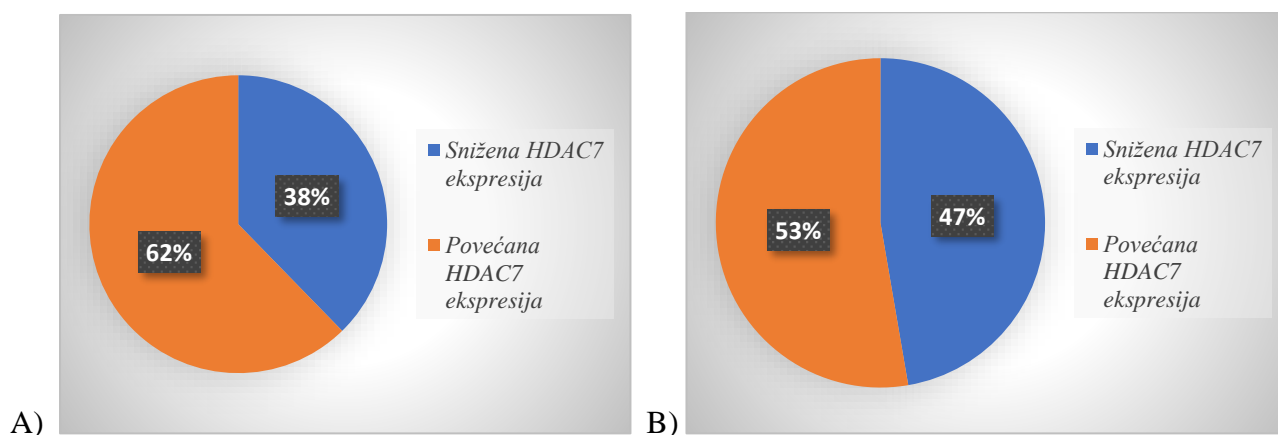
Relativna genska ekspresija je evaluirana kod dva različita molekularna tipa karcinoma dojke, TNBC i ER+PR+HER2-, Slika 18. Poređenjem *HDAC7* ekspresionog nivoa, utvrđeno je da postoji značajno niža ekspresija *HDAC7* gena kod pacijentkinja sa TNBC tipom, u odnosu na ER+PR+HER2- molekularni tip karcinoma dojke. Izmerene srednje vrednosti i standarne greške bile su 8,23 SEM±1,66 i 21,39 SEM±5,09, redom, p=0,005.

Za evaluaciju prognostičkog potencijala *HDAC7* ekspresije, korišćena je ROC analiza. Na osnovu analize ROC krive, utvrđene su vrednosti na osnovu kojih je urađena dihotomizacija *HDAC7* ekspresije na povećanu (+*HDAC7*) i smanjenu (-*HDAC7*). Ove vrednosti su pokazale različit diskriminacioni potencijal. Za TNBC tip karcinoma dojke, ROC analiza je pokazala da vrednost 2,35 ima optimalni diskriminacioni potencijal sa vrednostima za AUC 0,66, senzitivnost 92,9%, specifičnost 47,8%, dok je kod ER+PR+HER2- tipa karcinoma dojke ta vrednost 7,1, sa vrednostima za AUC 0,60, senzitivnost 80%, specifičnost 49,3% .



Slika 18. Relativna ekspresija *HDAC7* gena kod pacijentkinja sa TNBC i ER+PR+HER2- tipom karcinoma dojke; *** $p < 0,001$.

Povećana ekspresija *HDAC7* je zapažena kod 62% pacijentkinja sa TNBC tipom karcinoma dojke (38/61), dok je kod pacijentkinja sa ER+PR+HER2- tipom zastupljenost povećane odnosno snižene *HDAC7* ekspresije bila približno ista (53% (39/74) i 47% (35/74), redom), Slika 19.



Slika 19. Procentualna zastupljenost pacijentkinja sa sniženom odnosno povećanom *HDAC7* ekspresijom kod A) TNBC pacijentkinja B) ER+PR+HER2- pacijentkinja

4.6. Analiza povezanosti ekspresije *SIRT1* gena sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke

U svrhu ispitivanja povezanosti *SIRT1* ekspresije sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijentkinja sa TNBC i ER+PR+HER2- tipom karcinoma dojke izvršena je dihotomizacija *SIRT1* ekspresije na povećanu (+*SIRT1*) i sniženu (-*SIRT1*). Kako je ranije opisano, analizom ROC krive je definisana granična vrednost dihotomizacije.

Utvrđeno je postojanje značajne povezanosti *SIRT1* ekspresije i veličine tumora kod pacijentkinja sa ER+PR+HER2- tipom karcinoma dojke ($p=0,036$). Snižena *SIRT1* ekspresija je povezana sa većom veličinom tumora kod ER+PR+HER2- tipa karcinoma dojke, Tabela 3.

Nije utvrđena povezanost između *SIRT1* ekspresije i kliničko-patoloških karakteristika pacijentkinja sa TNBC tipom karcinoma dojke, Tabela 3.

Tabela 3. Povezanost ekspresije *SIRT1* gena sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke

Karakteristike		Ekspresija gena		TNBC		ER+PR+HER-	
		- <i>SIRT1</i>	+ <i>SIRT1</i>	- <i>SIRT1</i>	+ <i>SIRT1</i>		
Histološki tip	Duktalni	25	6	7	19		
	Lobulari	3	3	8	23		
	Drugi	9	2	0	5		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Starost (medijana)	< 60 godina	16	6	9	29		
	> 60 godina	21	5	6	19		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Menopauza	Premenopauza	6	0	3	18		
	Menopauza	31	11	11	31		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Veličina tumora (cm)	<2 cm	11	2	4	16		
	2-5 cm	24	7	9	32		
	>5 cm	2	2	2	0		
	<i>p</i>	NZ		0,036*			
Histološki gradus	hG1/2	15	5	15	47		
	hG3	22	6	0	1		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Nuklusni gradus	nG1/2	12	4	15	48		
	nG3	23	6	0	0		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Nodalni status	Pozitivno	15	10	7	24		
	Negativno	18	5	8	24		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Metastaze	Pozitivno	9	3	1	7		
	Negativno	28	8	14	31		
	<i>p</i>	NZ		NZ			

NZ-*p* vrednosti koje nemaju statističku značajnost; **p*<0,05; TNBC-trostruko-negativni karcinom dojke; ER+PR+HER2- hormon receptor-pozitivni, HER2- karcinom dojke; -*SIRT1*-snižena ekspresija; +*SIRT1*-povećana ekspresija; hG-histološki gradus; nG-nukleusni gradus

4.7. Analiza povezanosti ekspresije *SIRT3* gena sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke

Ispitivanje povezanosti *SIRT3* genske ekspresije i kliničko-patoloških karakteristika pacijentkinja sa TNBC i ER+PR+HER2- tipom karcinoma dojke je pokazalo da kod TNBC pacijentkinja postoji značajna povezanost između *SIRT3* ekspresije i histološkog gradusa tumora ($p=0,027$), a takođe postoji i tendencija povezanosti *SIRT3* ekspresije i nukleusnog gradusa ($p=0,05$). Naime, kod TNBC pacijentkinja je utvrđeno da postoji povezanost povećane genske ekspresije *SIRT3* i većeg histološkog gradusa tumora ovih pacijentkinja. Takođe, postoji i tendencija povezanosti povećane *SIRT3* genske ekspresije i višeg nukleusnog gradusa tumora, Tabela 4.

U grupi ER+PR+HER2-, ispitanice sa lobularnim histološkim tipom karcinoma dojke imaju značajno nižu ekspresiju *SIRT3* gena u odnosu na ostale histološke tipove ER+PR+HER2-karcinoma dojke ($p=0,047$). Kod ove grupe ispitanica je uočeno postojanje tendencije povezanosti smanjene *SIRT3* ekspresije i starosne dobi. Konkretno, kod pacijentkinja mlađih od 60 godina je zapažena snižena vrednost *SIRT3* ekspresije, ali ova povezanost nije bila statistički značajna ($p=0,087$).

Tabela 4. Povezanost ekspresije *SIRT3* gena sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke

Karakteristike		Ekspresija gena		TNBC		ER+PR+HER-	
		- <i>SIRT3</i>	+ <i>SIRT3</i>	- <i>SIRT3</i>	+ <i>SIRT3</i>	- <i>SIRT3</i>	+ <i>SIRT3</i>
Histološki tip	Duktalni	26	5	13	14		
	Lobulari	6	0	22	9		
	Drugi	10	1	1	4		
	<i>p</i>	NZ		0,047*			
Starost (medijana)	< 60 godina	19	3	25	13		
	> 60 godina	23	3	11	14		
	<i>p</i>	NZ		0,087			
Menopauza	Premenopauza	5	1	14	7		
	Menopauza	37	5	22	20		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Veličina tumora (cm)	<2 cm	10	3	12	8		
	2-5 cm	29	2	22	19		
	>5 cm	3	1	2	0		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Histološki gradus	hG1/2	20	0	36	26		
	hG3	22	6	0	1		
	<i>p</i>	0,027*		NZ			
Nukleusni gradus	nG1/2	16	0	36	27		
	nG3	23	6	0	0		
	<i>p</i>	0,05		NZ			
Nodalni status	Pozitivno	21	2	18	13		
	Negativno	21	4	18	14		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Metastaze	Pozitivno	11	1	4	4		
	Negativno	31	5	5	41		
	<i>p</i>	NZ		NZ			

NZ-p vrednosti koje nemaju statističku značajnost; * $p < 0,05$; TNBC-trostruko-negativni karcinom dojke; ER+PR+HER2- hormon receptor-pozitivni, HER2- karcinom dojke; -*SIRT3*-snižena ekspresija; +*SIRT3*-povećana ekspresija; hG-histološki gradus; nG-nukleusni gradus

4.8. Analiza povezanosti ekspresije *SIRT6* gena sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke

Nije potvrđeno postojanje značajne povezanosti *SIRT6* genske ekspresije i ispitivanih parametara kako kod pacijentkinja sa TNBC tipom karcinoma dojke, tako ni kod pacijentkinja sa ER+PR+HER2-, Tabela 5.

Tabela 5. Povezanost ekspresije *SIRT6* gena sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke

Karakteristike		Ekspresija gena		TNBC		ER+PR+HER-	
		- <i>SIRT6</i>	+ <i>SIRT6</i>	- <i>SIRT6</i>	+ <i>SIRT6</i>		
Histološki tip	Duktalni	7	24	10	17		
	Lobulari	2	4	11	20		
	Drugi	2	9	3	2		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Starost (medijana)	< 60 godina	7	15	14	24		
	> 60 godina	4	22	10	15		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Menopauza	Premenopauza	3	3	7	14		
	Menopauza	8	34	15	27		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Veličina tumora (cm)	<2 cm	2	11	9	11		
	2-5 cm	9	22	14	27		
	>5 cm	0	4	1	1		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Histološki gradus	hG1/2	4	16	23	29		
	hG3	7	21	1	0		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Nukleusni gradus	nG1/2	4	12	24	39		
	nG3	6	23	0	0		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Nodalni status	Pozitivno	6	17	13	18		
	Negativno	5	20	11	21		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Metastaze	Pozitivno	2	10	2	6		
	Negativno	9	27	32	23		
	<i>p</i>	NZ		NZ			

NZ-*p* vrednosti koje nemaju statističku značajnost; **p*<0,05; TNBC-trostruko-negativni karcinom dojke; ER+PR+HER2- hormon receptor-pozitivni, HER2- karcinom dojke; -*SIRT6*-snižena ekspresija; +*SIRT6*-povećana ekspresija; hG-histološki gradus; nG-nukleusni gradus

4.9. Analiza povezanosti ekspresije *SIRT7* gena sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke

Rezultati analize povezanosti dihotomizirane *SIRT7* genske ekspresije sa kliničko-patološkim parametrima ispitivanih pacijentkinja su pokazali da u grupi pacijentkinja sa TNBC tipom karcinoma dojke postoji značajna povezanost smanjene *SIRT7* ekspresije i veličine tumora od 2 do 5cm, dok kod tumora koji su manji od 2cm i veći od 5cm, postoji povezanost sa povećanom *SIRT7* genskom ekspresijom ($p=0,010$), Tabela 6.

Analiza nije pokazala povezanost *SIRT7* ekspresije sa drugim kliničko-patološkim karakteristikama pacijentkinja sa TNBC tipom karcinoma dojke. Takođe, nije utvrđeno postojanje značajne povezanosti *SIRT7* ekspresije i kliničko-patoloških karakteristika pacijentkinja sa ER+PR+HER2- tipom karcinoma dojke.

Tabela 6. Povezanost ekspresije *SIRT7* gena sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke

Karakteristike		Ekspresija gena		TNBC		ER+PR+HER-	
		- <i>SIRT7</i>	+ <i>SIRT7</i>	- <i>SIRT7</i>	+ <i>SIRT7</i>		
Histološki tip	Duktalni	18	15	13	12		
	Lobulari	2	1	17	15		
	Drugi	8	4	4	2		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Starost (medijana)	< 60 godina	12	7	18	17		
	> 60 godina	16	13	16	12		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Menopauza	Premenopauza	4	2	9	7		
	Menopauza	24	18	25	22		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Veličina tumora (cm)	<2 cm	4	9	12	8		
	2-5 cm	23	8	21	20		
	>5 cm	1	3	1	1		
	<i>p</i>	0,010*		NZ			
Histološki gradus	hG1/2	14	5	34	29		
	hG3	14	15	0	0		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Nukleusni gradus	nG1/2	11	5	34	29		
	nG3	17	15	0	0		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Nodalni status	Pozitivno	14	9	17	20		
	Negativno	14	11	17	9		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Metastaze	Pozitivno	7	4	5	3		
	Negativno	21	16	29	26		
	<i>p</i>	NZ		NZ			

NZ-p vrednosti koje nemaju statističku značajnost; * $p < 0,05$; TNBC-trostruko-negativni karcinom dojke; ER+PR+HER2- hormon receptor-pozitivni, HER2- karcinom dojke; -*SIRT7*-snižena ekspresija; +*SIRT7*-povećana ekspresija; hG-histološki gradus; nG-nukleusni gradus

4.10. Analiza povezanosti ekspresije *HDAC7* gena sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke

Asocijacija *HDAC7* ekspresije i kliničko-patoloških karakteristika pacijentkinja sa TNBC i ER+PR+HER2- tipom karcinoma dojke je prikazana u tabeli 7. Nije utvrđeno postojanje značajne povezanosti različite *HDAC7* ekspresije sa kliničko-patološkim karakteristikama ni kod ispitanica sa TNBC, ni kod ispitanica sa ER+PR+HER2- tipom karcinoma dojke.

Tabela 7. Povezanost ekspresije *HDAC7* gena sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke

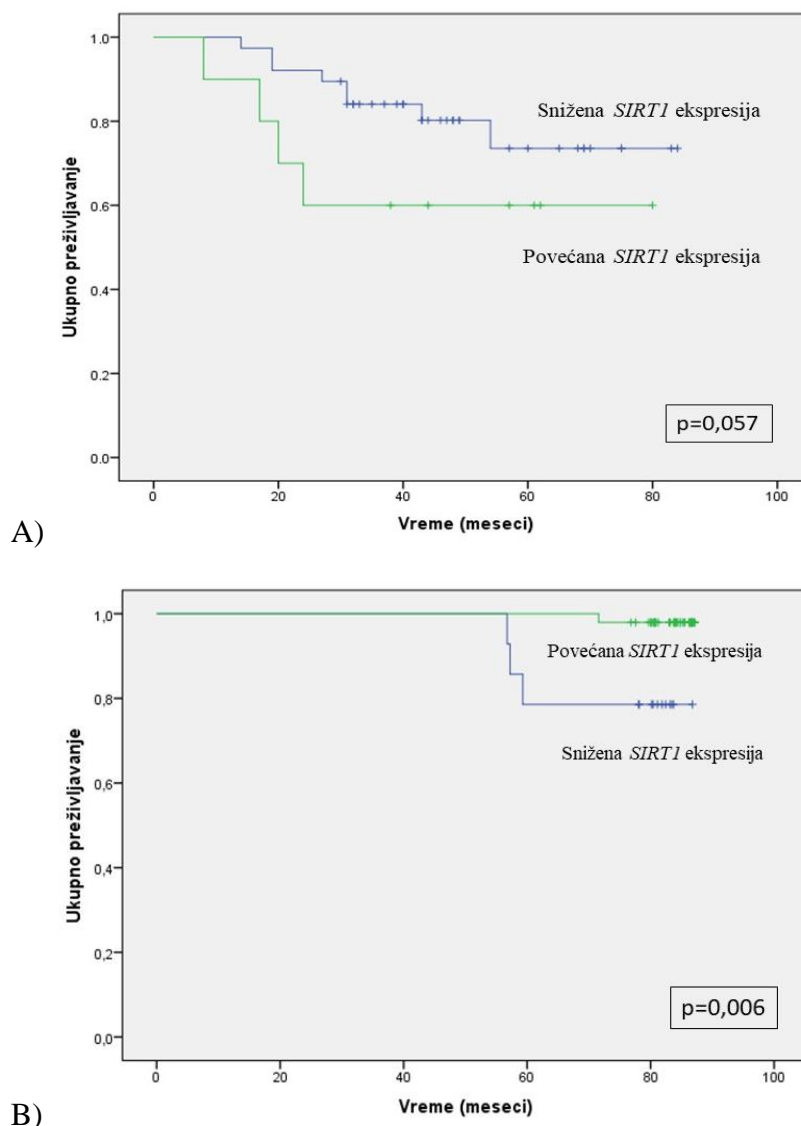
Karakteristike		Ekspresija gena		TNBC		ER+PR+HER-	
		- <i>HDAC7</i>	+ <i>HDAC7</i>	- <i>HDAC7</i>	+ <i>HDAC7</i>	- <i>HDAC7</i>	+ <i>HDAC7</i>
Histološki tip	Duktalni	13	26	14	20		
	Lobulari	5	2	20	15		
	Drugi	5	10	1	4		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Starost (medijana)	< 60 godina	10	12	20	20		
	> 60 godina	13	26	15	19		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Menopauza	Premenopauza	2	4	10	8		
	Menopauza	21	34	25	31		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Veličina tumora (cm)	<2 cm	6	13	5	12		
	2-5 cm	16	23	28	27		
	>5 cm	1	2	2	0		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Histološki gradus	hG1/2	13	14	35	38		
	hG3	10	24	0	1		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Nukleusni gradus	nG1/2	10	13	35	39		
	nG3	13	25	0	0		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Nodalni status	Pozitivno	12	18	14	18		
	Negativno	12	19	21	21		
	<i>p</i>	NZ		NZ			
Metastaze	Pozitivno	18	27	32	34		
	Negativno	5	11	3	5		
	<i>p</i>	NZ		NZ			

NZ-p vrednosti koje nemaju statističku značajnost; * $p < 0,05$; TNBC-trostruko-negativni karcinom dojke; ER+PR+HER2- hormon receptor-pozitivni, HER2- karcinom dojke; -*HDAC7*-snižena ekspresija; +*HDAC7*-povećana ekspresija; hG-histološki gradus; nG-nukleusni gradus

4.11. Analiza ukupnog preživljavanja pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke u odnosu na ekspresiju *SIRT1* gena

Povezanost *SIRT1* ekspresije i ukupnog preživljavanja kod pacijentkinja sa TNBC i ER+PR+HER2- analizirana je Kaplan-Meier krivom, a krive su međusobno poređene log-rank testom. Ukupno vreme praćenja ispitanica je bilo od 8 do 87 meseci, sa medijanom praćenja 80 meseci. Vreme praćenja ispitanica je definisano od datuma uspostavljanja dijagnoze pa do datuma poslednje kontrole ili egzitusa.

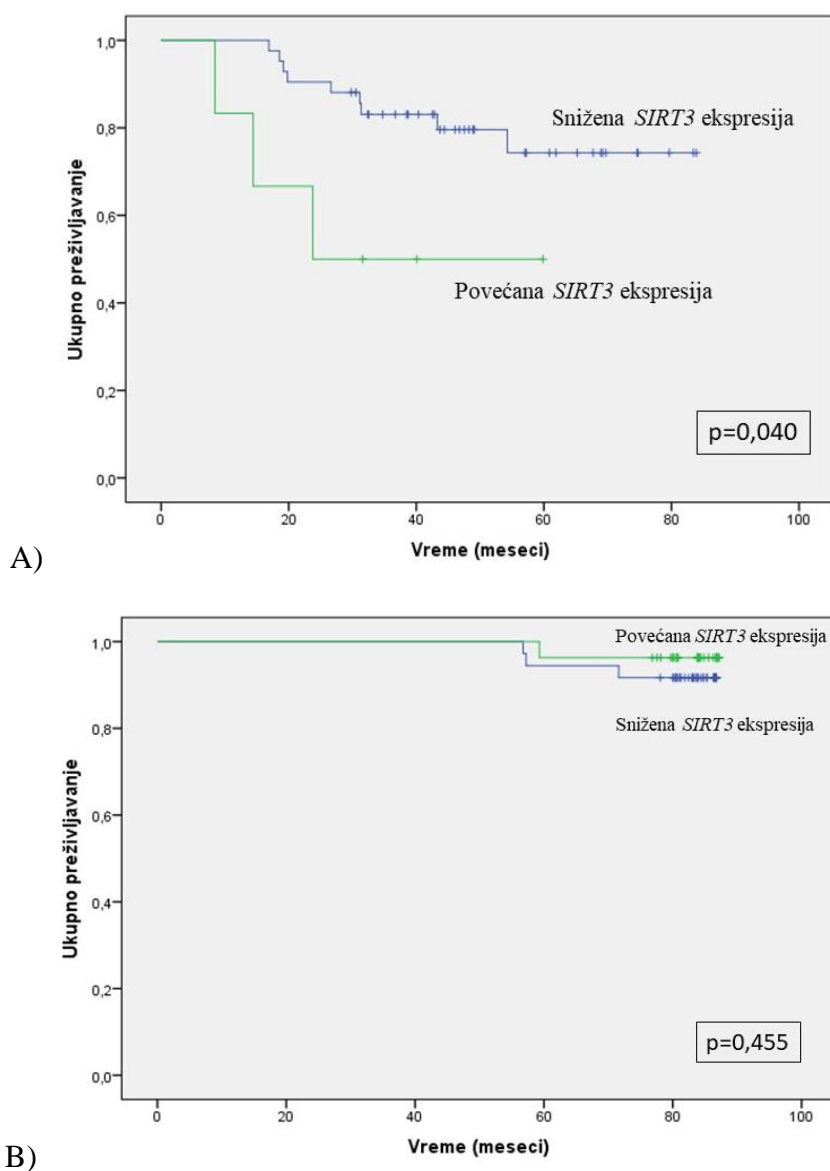
Analiza Kaplan-Meier kriva je pokazala da kod pacijentkinja sa TNBC postoji tendencija lošeg preživljavanja i povećane *SIRT1* ekspresije ($p=0,057$). Pacijentkinje koji su imale povećanu *SIRT1* ekspresiju su imale prosečnu dužinu ukupnog preživljavanja 41 mesec, dok su pacijentkinje sa sniženom *SIRT1* ekspresijom imale prosečno vreme preživljavanja 47 meseci. Kod ispitanica sa ER+PR+HER2- tipom karcinoma dojke, Kaplan-Meier analiza i log-rank test su pokazali da postoji asocijacija snižene *SIRT1* ekspresije i lošeg preživljavanja ($p=0,006$). Prosečno vreme preživljavanja ovih pacijentkinja je bilo 77 meseci, dok je kod pacijentkinja sa povećanom *SIRT1* ekspresijom prosečno vreme preživljavanja bilo 84 meseca. Kaplan-Meier krive preživljavanja su za obe grupe ispitanica prikazane na Slici 20.



Slika 20. Kaplan-Meier krive ukupnog preživljavanja pacijentkinja sa (A) TNBC i (B) ER+PR+HER2-

4.12. Analiza ukupnog preživljavanja pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke u odnosu na ekspresiju *SIRT3* gena

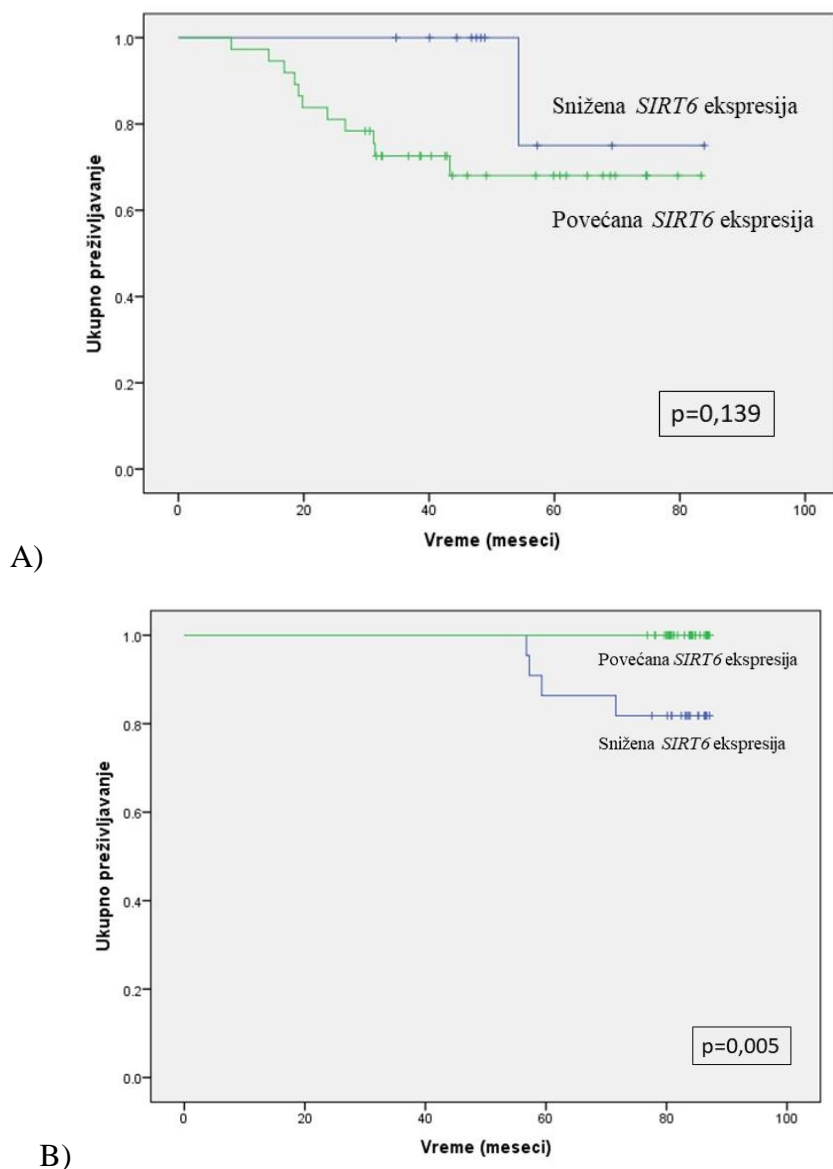
Ispitivanjem povezanosti *SIRT3* genske ekspresije sa ukupnim preživljavanjem pacijentkinja sa TNBC i ER+PR+HER2- negativnim tipom karcinoma dojke, utvrđeno je da postoji povezanost povećane *SIRT3* ekspresije i lošeg preživljavanja pacijentkinja sa TNBC tipom karcinoma dojke ($p=0,040$), Slika 21. Pacijentkinje sa povećanom *SIRT3* ekspresijom su imale prosečno kraće vreme preživljavanja (41 mesec), u odnosu na ispitanice sa sniženom *SIRT3* ekspresijom (47 meseci). U grupi ispitanica sa ER+PR+HER2- tipom karcinoma, nije uočena povezanost nivoa *SIRT3* ekspresije i ukupnog vremena preživljavanja.



Slika 21. Kaplan-Meier krive ukupnog preživljavanja pacijentkinja sa (A) TNBC i (B) ER+PR+HER2-

4.13. Analiza ukupnog preživljavanja pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke u odnosu na ekspresiju *SIRT6* gena

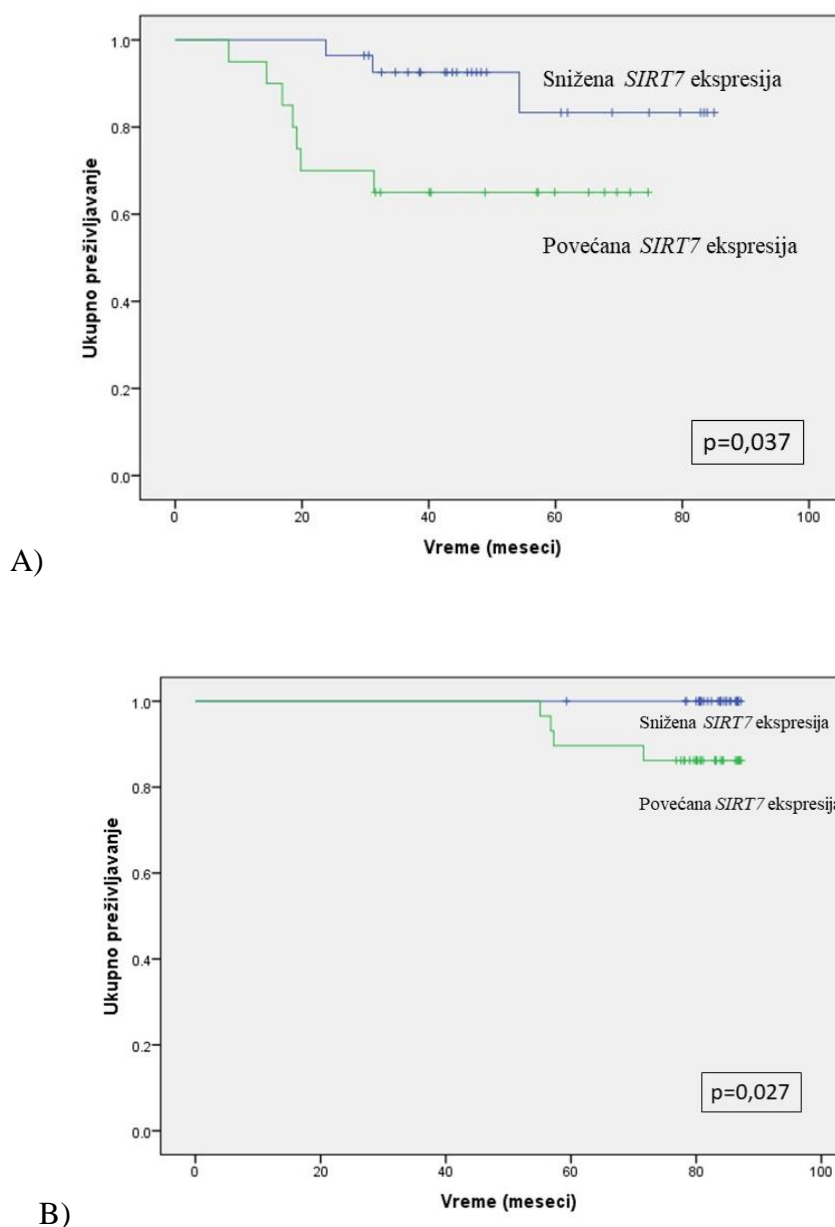
U ispitivanim grupama pacijentkinja sa karcinomom dojke uočena je značajna povezanost snižene *SIRT6* ekspresije i lošeg preživljavanja pacijentkinja sa ER+PR+HER2- karcinomom dojke. ER+PR+HER2- pacijentkinje sa sniženom *SIRT6* ekspresijom su imale kraće vreme ukupnog preživljavanja (80 meseci) u odnosu na one sa povećanom *SIRT6* ekspresijom. Kaplan-Meier krive su prikazane na slici 22.



Slika 22. Kaplan-Meier krive ukupnog preživljavanja pacijentkinja sa (A) TNBC i (B) ER+PR+HER2-

4.14. Analiza ukupnog preživljavanja pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke u odnosu na ekspresiju *SIRT7* gena

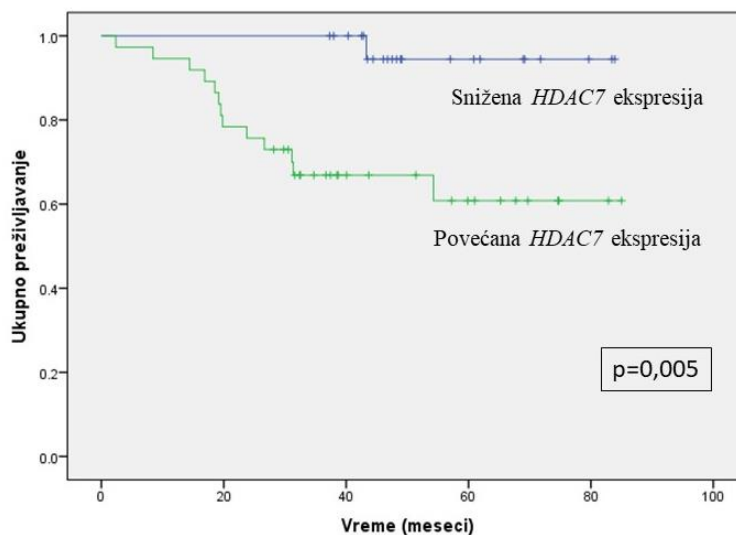
Rezultati Kaplan-Meier analize su pokazali da kod obe grupe ispitivanih pacijentkinja postoji povezanost povećane *SIRT7* ekspresije i lošeg preživljavanja ($p=0,037$), Slika 23. TNBC pacijentkinje sa povećanom *SIRT7* ekspresijom su imale prosečno vreme preživljavanja 39 meseci u odnosu na pacijentkinje sa sniženom *SIRT7* ekspresijom, koje su imale prosečno vreme preživljavanja 52 meseca. ER+PR+HER2- pacijentkinje sa povećanom *SIRT7* ekspresijom su imale prosečno vreme preživljavanja 79 meseci, dok je ono iznosilo u proseku 83 meseca u slučaju pacijentkinja sa sniženom *SIRT7* ekspresijom.



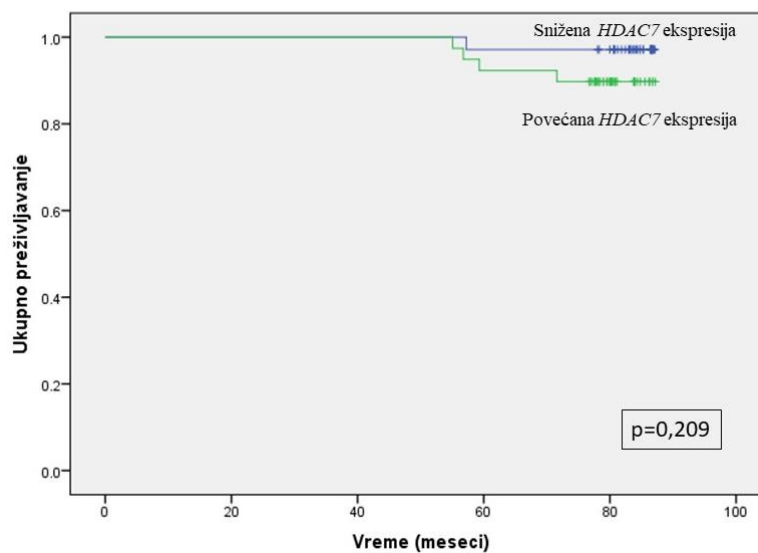
Slika 23. Kaplan-Meier krive ukupnog preživljavanja pacijentkinja sa (A) TNBC i (B) ER+PR+HER2-

4.15. Analiza ukupnog preživljavanja pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke u odnosu na ekspresiju *HDAC7* gena

Analiza Kaplan-Meier kriva preživljavanja u dvema grupama pacijentkinja u odnosu na *HDAC7* ekspresiju, kao i njihovo poređenje, pokazalo je postojanje povezanosti povećane *SIRT7* ekspresije i lošijeg preživljavanja pacijentkinja sa TNBC tipom karcinoma dojke, Slika 24A. Ispitanice sa povećanom *HDAC7* ekspresijom su imale kraće vreme preživljavanja (40 meseci) u odnosu na one sa smanjenom *HDAC7* ekspresijom (55 meseci). Kod pacijentkinja sa ER+PR+HER2- nije utvrđeno postojanje veze *HDAC7* ekspresije i preživljavanja, Slika 24B.



A)



B)

Slika 24. Kaplan-Meier krive ukupnog preživljavanja pacijentkinja sa (A) TNBC i (B) ER+PR+HER2-

4.16. Ispitivanje prognostičkih faktora za preživljavanje pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke univarijantnom analizom

Univarijantna Cox regresiona analiza je pokazala da kod TNBC pacijentkinja veličina tumora (HR=2,917, CI 95% [1,030-8,260], p=0,044), metastaze (HR=5,169, CI 95% [1,595-16,755], p=0,006), recidiv (HR=7,334, CI 95% [2,133-25,217], p=0,002) i povećana *HDAC7* ekspresija (HR=11,460, CI 95% [1,502-87,428], p=0,019), predstavljaju faktore rizika lošeg preživljavanja ovih pacijentkinja. Kod ER+PR+HER2- smanjena *SIRT1* ekspresija predstavlja rizik za loše preživljavanje ispitanica sa ovim tipom karcinoma dojke (HR=11,83, CI 95% [1,23-111,940], p=0,033. Rezultati univarijantne analize su prikazani u tabeli 8.

Tabela 8. Univarijantna Cox regresiona analiza kod pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke

Varijable	TNBC		ER+PR+HER2-	
	HR [95% CI]	<i>p</i>	HR [95% CI]	<i>p</i>
Starost ≥ medijana (60)	1,677 [0,505-5,572]	0,399	0,503 [0,052-4,840]	0,552
Menopauza	1,408 [0,180-11,016]	0,745	1,528 [0,159-14,688]	0,714
Histološki gradus	1,684 [0,507-5,601]	0,395	1,732 [0,028-105,608]	0,793
Nukleusni gradus	1,104 [0,323-3,775]	0,875	21,666 [0-126,000]	0,765
Veličina tumora	2,917 [1,030-8,260]	0,044*	0,456 [0,070-2,989]	0,413
Nodalni status	0,511 [0,154-1,703]	0,275	1 [0,141-7,098]	1
Metastaze	5,169 [1,595-16,755]	0,006*	6,946 [0,980-49,340]	0,053
Recidiv	7,334 [2,133-25,217]	0,002*	4,73 [0,66-33,55]	0,121
<i>SIRT1</i> snižena ekspresija	0,349 [0,110-1,103]	0,073	11,83 [1,23-111,940]	0,033*
<i>SIRT3</i> povećana ekspresija	3,622 [0,972-13,501]	0,055	0,433 [0,045-4,162]	0,468
<i>SIRT6</i> snižena ekspresija	0,251 [0,032-1,947]	0,186	170,189 [0,018-inf.]	0,270
<i>SIRT7</i> povećana ekspresija	3,753 [0,984-14,797]	0,051	4,977 [0,556-44,539]	0,151
<i>HDAC7</i> povećana ekspresija	11,460 [1,502-87,428]	0,019*	3,804 [0,425-34,034]	0,232

**p*-vrednost <0,05

HR-hazard ratio; CI-interval poverenja (eng. *confidence interval*).

4.17. Ispitivanje nezavisnih prediktivnih faktora preživljavanja pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke multivarijantnom Cox regresionom analizom

Svi parametri iz univarijantne regresione anlike koji su imali $p > 0,200$ su uvršteni u multivarijantnu regresionu analizu, Tabela 9. Utvrđeno je da pojava recidiva i povećana *HDAC7* ekspresija predstavljaju nezavisne prognostičke parametre lošeg preživljavanja TNBC pacijentkinja. Kod ER+PR+HER2- pacijentkinja smanjena *SIRT1* ekspresija predstavlja nezavisni prognostički parametar preživljavanja.

Tabela 9. Multivarijantna Cox regresiona analiza kod pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor- pozitivnim karcinomom dojke

Tip karcinoma dojke	Varijabla	HR [95% CI]	<i>p</i>
TNBC	Recidiv	7,334 [2,133-25,217]	0,002**
	<i>HDAC7</i> povećana ekspresija	9,287 [1,203-71,677]	0,033*
ER+PR+HER2-	<i>SIRT1</i> smanjena ekspresija	11,765 [1,234-100]	0,033*

**p*-vrednost <0,05

***p*-vrednost <0,01

HR-hazard ratio; CI-interval poverenja (eng. *confidence interval*).

5. Diskusija

Karcinom dojke se poslednjih godina posmatra kao grupa tumora koji se međusobno razlikuju po molekularnom tipu, kliničkim i patološkim karakteristikama, kao i različitim terapeutskim pristupom i ishodom bolesti (132-133). Otkriće različitih molekularnih profila karcinoma dojke, kao i mehanizama koji se nalaze u osnovi ove heterogenosti je od izuzetnog značaja za izbor adekvatnog principa lečenja pacijenata sa ovim malignitetom.

Iako se u osnovi inicijacije i progresije kancera prevashodno nalaze genske mutacije i hromozomske aberacije, sve se više uviđa značaj koji epigenetički mehanizmi imaju u procesu kancerogeneze (134). Epigenetički mehanizmi poput DNK metilacije, modifikacije histona i nekodirajućih RNK, regulišu gensku ekspresiju i na taj način, posredno, regulišu brojne ćelijske procese. U njih spadaju regulacija metabolizma, popravka oštećenja DNK, ćelijski rast i apoptoza, kako u normalnim fiziološkim uslovima, tako i u brojnim patološkim stanjima, kao što su neurodegenerativna i kardiovaskularna oboljenja, dijabetes i kancer. Danas je prihvaćena činjenica da epigenetičke promene predstavljaju jedno od važnih obeležja kancera.

Brojne studije su pokazale da promene histonskih modifikacija imaju važnu ulogu patogenezi karcinoma dojke. Sporadični nenasledni tip karcinoma dojke čini oko 85-90% svih tipova i naročito se odlikuje promenama na nivou epigenoma (42). S obzirom da modifikacije histona imaju direktan uticaj na ekspresiju gena povezanih sa kancerom, a da se različiti tipovi kancera dojke odlikuju različitim ekspresionim obrascima, promene histonskog epigenoma su verovatno jedan od prvih događaja u procesu onkogene transformacije u tkivu dojke. Deregulacija histonskog epigenoma, zajedno sa drugim epigenetičkim promenama, ima ključnu ulogu u procesima inicijacije i progresije karcinoma dojke (42).

Novija ispitivanja pokazuju da epigenetičke promene imaju veliki prognostički potencijal, dok ih njihova reverzibilna priroda čini potencijalnim kandidatima za nove terapeutske pristupe u lečenju malignih oboljenja (134). U ovoj doktorskoj disertaciji je ispitivana povezanost ekspresije gena za histon-deacetilaze III (*SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT6* i *SIRT7*) i II (*HDAC7*) klase sa kliničko-patološkim karakteristikama i ukupnim preživljavanjem pacijentkinja sa dva fenotipski i prognostički različita tipa karcinoma dojke, odnosno sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim tipom karcinoma dojke.

5.1. Povezanost *SIRT1* genske ekspresije sa kliničko-patološkim karakteristikama i prognostičkim značajem pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim tipom karcinoma dojke

SIRT1, histon-deacetilaza dominantno lokalizovana u jedru, sa ulogama u regulaciji genomske stabilnosti, metabolizmu, ćelijskoj proliferaciji i diferencijaciji, apoptozi i angiogenezi se nalazi u fokusu brojnih novijih istraživanja (67). Posebnu pažnju privlači dvojaka uloga *SIRT1* u procesu kancerogeneze. Naime, u zavisnosti od tipa kancera, stadijuma, ali i ćelijskog konteksta, *SIRT1* u malignoj ćeliji može imati kako ulogu onkogeno tako i tumor-supresora. Različiti ekspresioni obrasci *SIRT1* su pronađeni u različitim tipovima kancera, pa je tako povećana ekspresija *SIRT1* povezana sa lošom prognozom pacijenata sa karcinomima jetre i pluća, dok je pak smanjena ekspresija *SIRT1* primećena kod drugih vrsta karcinoma, kao što su glioblastom, karcinom jajnika, bešike, prostate i kolorektalni karcinom (135).

Prema rezultatima ove doktorske disertacije, ekspresija *SIRT1* gena je bila značajno niža kod pacijentkinja sa TNBC u odnosu na pacijentkinje sa ER+PR+HER2- karcinomom dojke. Naši rezultati su u saglasnosti sa prethodnim studijama (136). Evidentno je da različite molekularne tipove karcinoma dojke, TNBC i ER+PR+HER2- tip, odlikuju različiti obrasci ekspresije *SIRT1*. Prethodno je pokazano da kod hormon receptor-pozitivnih karcinoma, odnosno kod luminalnog A i luminalnog B tipa, kao i kod HER2+ tipa karcinoma dojke dolazi do povećane ekspresije *SIRT1*, za razliku od TNBC tipa, kod kojeg je primećeno smanjenje *SIRT1* ekspresije (136). Moguće objašnjenje različitog nivoa *SIRT1* ekspresije u ova dva molekularno različita tipa karcinoma dojke se može pronaći u samim mehanizmima regulacije *SIRT1* ekspresije. Poznati regulatori ekspresije *SIRT1* su BRCA1 protein i p53 transkripcijski faktor (137-139). Poznato je da mutacije u *BRCA1* genu povećavaju rizik za nastanak karcinoma dojke. BRCA1 je protein sa ulogom u DNK reparaciji, kontroli ćelijskog ciklusa, regulaciji transkripcije i apoptozi. Karcinomi dojke koji imaju mutaciju u *BRCA1* genu su istovremeno imali i nižu *SIRT1* ekspresiju (137). BRCA1 vezujući se za promotorsku sekvencu *SIRT1* gena, deluje kao pozitivan regulatorni faktor. SIRT1 dalje putem epigenetičkih modifikacija na histonu H3 inhibira SURVIVIN, negativni regulator apoptoze visoko eksprimiran u različitim kancerima (137). Kod *BRCA1* mutiranih kancera dolazi do redukcije *SIRT1* ekspresije (137), a od svih tipova karcinoma dojke, TNBC pokazuje upravo najveću stopu *BRCA1* mutacija (140). Iako identifikacija mutacija u *BRCA1* genu kod TNBC pacijentkinja nije bila predmet naše studije, literaturni podaci o visokoj učestalosti ovih mutacija kod pacijenata sa TNBC tipom kancera idu u prilog našim rezultatima.

Mutacije u p53 genu su najčešća genetička promena u humanim malignitetima. Kod karcinoma dojke, mutacije u p53 su povezane sa agresivnim fenotipom i lošim ukupnim preživljavanjem pacijenata. Međutim, iako u odnosu na ostale solidne tumore, učestalost p53 mutacija kod kancera dojke je nešto niža (139), TNBC tip karcinoma dojke se odlikuje visokom učestalošću mutacija u p53 genu (141). Visoka mutaciona stopa p53 u TNBC bi mogla da objasni nižu *SIRT1* ekspresiju kod ovog tipa kancera dojke u odnosu na ER+PR+HER2- tip. Zanimljivo je da SIRT1 pozitivno reguliše aktivnost kako BRCA1 tako i p53 (67, 142).

U kompletnoj grupi ispitivanih pacijentkinja naše studije, smanjena *SIRT1* ekspresija je korelirala sa lošim ukupnim preživljavanjem ispitanica sa karcinomom dojke. Nakon stratifikacije ispitivane grupe u odnosu na molekularni tip, smanjena *SIRT1* ekspresija se pokazala kao nezavisan prediktivni faktor lošeg preživljavanja pacijentkinja sa ER+PR+HER2- tipom kancera (HR 11,83; 95% CI [1,23-111,940], p=0,033), dok kod TNBC pacijentkinja povećana *SIRT1* ekspresija ukazuje na tendenciju ka lošem preživljavanju (p=0,057). Smanjena *SIRT1* ekspresija, koja je u korelaciji sa lošim preživljavanjem pacijentkinja sa ER+PR+HER2- tipom kancera, sugerise na potencijalnu tumor-supresorsku ulogu SIRT1. Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodno objavljenom studijom u kojoj je pokazano da povećana *SIRT1* ekspresija kod hormon-pozitivnog tipa kancera dojke je povezana sa manjim rizikom za nastanak metastaza i opštim kliničkim ishodom (143). Osim u kanceru dojke, tumor-supresorska uloga je do sada pretpostavljena u različitim tipovima kancera, uključujući gliom, kancer bešike, prostate i jajnika (79). Potencijalna tumor-supresorska uloga SIRT1 je potkrepljena rezultatima studija u kojima je pokazan efekat SIRT1 supresije procesa epitelno-mezenhimske tranzicije i formiranja metastaza kod miševa (144), kao i efekat negativne regulacije c-MYC onkogeno (145).

Izvesne studije ukazuju na potencijalnu onkogenu ulogu *SIRT1* u procesu kancerogeneze luminalnih tipova karcinoma dojke (136, 146), što nije u skladu sa našim rezultatima. Onkogeni potencijal SIRT1 je pretpostavljen na osnovu povezanosti smanjene ekspresije *SIRT1* koja je bila u korelaciji sa povećanom agresivnošću kancera kao i sa lošom prognozom pacijentkinja sa ovim tipom kancera dojke (136). SIRT1 pozitivno reguliše estrogenom-indukovani rast kancera dojke, s obzrom da inaktivacija SIRT1 indukuje eliminaciju estrogen/ER α -indukovanog ćelijskog rasta, supresiju razvoja tumora i apoptozu (146). Kod ER-pozitivnih ćelijskih linija kancera dojke je

utvrđeno da se vezivanjem SIRT1 za ER- α uzrokuje transkripciona represija p53, kao i ciklina G2, što dalje indukuje ćelijski rast, a inhibira apoptozu (146).

TNBC tip karcinoma dojke je pokazao obrnuti obrazac *SIRT1* ekspresije, odnosno ispitanice sa povećanom *SIRT1* ekspresijom pokazuju tendenciju ka nepovoljnom kliničkom ishodu ($p=0,057$), što implicira potencijalnu onkogenu ulogu SIRT1 u TNBC tipu karcinoma dojke. Naši rezultati koji govore o potencijalno različitom efektu *SIRT1* na preživljavanje pacijentkinja sa TNBC i pacijentkinja sa ER+PR+HER2- tipom su podržani studijom koja je pokazala da povećana *SIRT1* ekspresija smanjuje rizik za nastanak nodalnih metastaza i loše preživljavanje kod hormon receptor-pozitivnih kancera. Time je sugerisana tumor-supresivna uloga SIRT1 u ovom tipu kancera, za razliku od TNBC tipa gde je negativna korelacija *SIRT1* ekspresije i prisustva nodalnih metastaza kao i lošeg preživljavanja, ukazivala na onkogenu ulogu SIRT1 u TNBC tipu karcinoma dojke (143).

Inhibicija SIRT1 u *in vitro* uslovima je rezultovala redukcijom ćelijskog rasta, proliferacije i vijabilnosti malignih ćelija, što ukazuje na onkogeni potencijal SIRT1 (79). Ranije je pokazana asocijacija SIRT1 sa invazijom kancerskih ćelija, metastazama limfnih čvorova, kao i sa kraćim vremenom preživljavanja do pojave relapsa kod TNBC pacijenata (147). Takođe, inhibicija *SIRT1* ekspresije malim interferišućim RNK suprimira invaziju tumora u MDA-MB-23 ćelijskoj liniji veoma agresivnog i invazivnog tipa karcinoma dojke (147). Suprotno tome, SIRT1 bi u TNBC tipu karcinoma dojke mogao imati i tumor-supresorsku ulogu, inhibišući ćelijsku proliferaciju i rast p53-posredovanim putem (148-149).

Naši rezultati, koji impliciraju potencijalnu tumor-promovišuću ulogu SIRT1 kod TNBC tipa, su u saglasnosti sa studijama koje su pokazale povezanost povećane ekspresije *SIRT1* i loših prognoza kod TNBC pacijenata (147, 149), kao i pokazanim efektom siRNK-suprimirane ekspresije SIRT1 na invaziju tumora kod TNBC ćelijske linije (143). SIRT1 takođe pospešuje rast tumora u *in vitro* i u *in vivo* uslovima kod ER-negativnog tipa kancera dojke preko GPER i posledične aktivacije EGFR/ERK/c-fos/AP-1 signalnog puta (150). Meta-analiza je ukazala da je *SIRT1* ekspresija nepovoljan prognostički parametar kod pacijenata sa kancerom dojke (135).

Brojne studije su potvrdile povezanost SIRT1 sa procesima inicijacije i progresije nekoliko različitih tipova malignih tumora, a *in vitro* eksperimenti ukazuju da inhibicija SIRT1 smanjuje ćelijski rast, proliferaciju i vijabilnost malignih ćelija (79). Povećana ekspresija SIRT1 je povezana sa lošim preživljavanjem i većim gradusom tumora pacijenata sa hepatocelularnim karcinomom (151). Onkogena uloga SIRT1 u hepatocelularnom kanceru se ogleda kroz povezanost povećane ekspresije *SIRT1* i telomeraza-reverzne transkriptaze (TERT) sa jedne strane, i povećane ekspresije c-Myc onkogena, sa druge strane. U oba slučaja je pokazano da inhibicija SIRT1 dovodi do smanjenja proliferacije tumorskih ćelija. Dodatno, pokazano je da bi SIRT1 mogao da bude nezavisan prognostički parametar negativnog ishoda pacijenata sa ovim tipom kancera (151-152). Kod nesitnoćelijskog karcinoma pluća i kancera želuca, povećana SIRT1 ekspresija je takođe korelisana sa lošim prognozama i lošijom kliničkom slikom pacijenata sa ovim oboljenjima (135) (153). Na ćelijama kancera pankreasa i kolorektalnog karcinoma je pokazana veza između povećane *SIRT1* ekspresije i maligne transformacije, proliferacije i migracije ovih ćelija (154) (155). Takođe, kod epitelnog kancera jajnika, povećana *SIRT1* ekspresija doprinosi rezistenciji na hemioterapiju i lošim prognozama (156).

U zaključku, našom studijom je potvrđeno da pacijentkinje sa TNBC tipom imaju niži nivo ekspresije *SIRT1* u odnosu na pacijentkinje sa ER+PR+HER2- tipom, što implicira na različitu ulogu SIRT1 u procesima kancerogeneze u ova dva različita tipa kancera dojke. Kod pacijentkinja sa ER+PR+HER2- tipom snižena *SIRT1* ekspresija predstavlja negativan prognostički parametar preživljavanja ovih ispitanica, dok kod TNBC povećana *SIRT1* ekspresija pokazuje tendenciju ka lošem preživljavanju. Naši rezultati pretpostavljaju da uloga SIRT1 u procesu kancerogeneze ne zavisi samo od tipa kancera dojke, već verovatno i od stadijuma bolesti, odnosno da se kod TNBC

tipa sa povećanjem stepena agresivnosti, menja i obrazac ekspresije *SIRT1* gena. Studije koje su pokazale pozitivan efekat inhibicije *SIRT1* na usporavanje procesa kancerogeneze, ukazuju na snažan terapijski potencijal korišćenja *SIRT1* inhibitora u strategiji lečenja TNBC tipa kancera dojke, za koji do sada ne postoji adekvatna terapija.

5.2. Povezanost *SIRT3* genske ekspresije sa kliničko-patološkim karakteristikama i prognostičkim značajem pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim tipom karcinoma dojke

SIRT3 je najznačajnija mitohondrijska NAD⁺ zavisna deacetilaza sa brojnim ulogama kako u normalnim fiziološkim uslovima, tako i u procesima inicijacije i progresije kancera. *SIRT3* histon-deacetilaza je posebno interesantna jer pored uloga u regulaciji procesa karakterističnih za održavanje malignog fenotipa, u zavisnosti od tipa i ćelijskog konteksta pokazuje i svoju tumorsupresorsku ulogu (157). Studije povezanosti ekspresije *SIRT3* sa prognostičkim i kliničko-patološkim karakteristikama različitih tipova kancera je do sada dala nekonzistentne i često suprotne rezultate. Naša studija je imala za cilj ispitivanje povezanosti *SIRT3* ekspresije sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijentkinja sa TNBC i ER+PR+HER2- kancerom dojke, kao i ispitivanje potencijalnog prognostičkog značaja *SIRT3* ekspresije kod ovih pacijentkinja.

Do sada poznati rezultati sugerišu da je kod kancera dojke generalno snižena ekspresija *SIRT3* u odnosu na normalno tkivo dojke, gde čak do 72% *in situ* i 74% invazivnog kancera dojke ima sniženu ekspresiju *SIRT3* (158). Naša studija je jedna od prvih koja se bavi poređenjem nivoa *SIRT3* genske ekspresije kod različitih molekularnih tipova karcinoma dojke. Pacijentkinje sa TNBC su imale značajno nižu ekspresiju *SIRT3* u poređenju sa pacijentkinjama sa ER+PR+HER2-karcinomom dojke. Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodnom studijom koja je pokazala povišenu ekspresiju u MCF7 (ER+PR+HER2-) ćelijskoj liniji (159). Povišena *SIRT3* ekspresija kod ER+PR+HER2- ispitanica je u saglasnosti sa studijom Desouki i saradnika, koji su takođe utvrdili da je viša ekspresija *SIRT3* gena učestalija kod ER+ nego kod ER- karcinoma dojke (158).

Naši rezultati pokazuju da je povećana *SIRT3* ekspresija u okviru grupe pacijentkinja sa TNBC povezana sa većim histološkim gradusom tumora, što implicira da u ovom tipu tumora, *SIRT3* može imati ulogu u ćelijskoj dediferencijaciji. S obzirom da su promene u nivou produkcije slobodnih radikala jedan od glavnih događaja u ćeliji koje prethode procesu ćelijske dediferencijacije, *SIRT3* kao glavni regulator produkcije slobodnih radikala u ćeliji bi posledično mogao imati ulogu u procesima dediferencijacije ćelija tumora (160). Nivo slobodnih radikala kod malignih ćelija je tkivno specifičan, a novija studija je pokazala da se TNBC karakteriše izuzetno visokim nivoom slobodnih radikala, u odnosu na ER+PR+ karcinome dojke (161). U istoimenoj studiji je potvrđeno postojanje razlika u funkciji mitohondrija kod različitih tipova karcinoma dojke i mitohondrije su identifikovane kao glavni izvor slobodnih radikala u TNBC ćelijskim kulturama (161). Iako je primarna uloga *SIRT3* u regulaciji slobodnih radikala preko deacetilacije i aktivacije superoksid-dismutaza takva da smanjuje njihovu produkciju, pretpostavlja se da zapravo održavanjem određenog nivoa slobodnih radikala u ćeliji kancera, *SIRT3* omogućava ćelijsko preživljavanje, a time i proliferativni i agresivni fenotip ćelija kancera (162). S druge strane, moguće je da upravo slobodni radikali u TNBC stimulišu povećanu ekspresiju *SIRT3* u ovim ćelijama i mehanizmom negativne povratne sprege i *SIRT3*-posredovanom aktivacijom SOD2 odžavaju odgovarajući nivo slobodnih radikala povoljan za preživljavanje ovih tumorskih ćelija (163).

Iako su rezultati pokazali da je u ER+PR+HER2- grupi pacijentkinja povećana *SIRT3* ekspresija zastupljena kod slabo diferenciranog invazivnog duktalnog karcinoma, analiza ukupnog preživljavanja nije pokazala povezanost *SIRT3* ekspresije sa preživljavanjem ovih pacijentkinja. Takođe, nije pokazana ni povezanost *SIRT3* ekspresije sa drugim kliničko-patološkim

karakteristikama ovog tipa karcinoma dojke. Međutim, prethodne studije su pokazale da kod pacijenata sa hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke, povećana ekspresija *SIRT3* je povezana sa lošijim ukupnim preživljavanjem pacijenata sa uznapredovalim stadijomom bolesti (164). Takođe je pokazano da primenom hemioterapije dolazi do povećanja ekspresije *SIRT3*, koji redukcijom slobodnih radikala povećava rezistentnost ovih ćelija kancera na tretman hemioterapijom, konkretno tamoksifenom (164).

Analizom povezanosti *SIRT3* ekspresije i ukupnog preživljavanja pacijentkinja sa TNBC, utvrđeno je da su ispitanice sa povećanom *SIRT3* ekspresijom imale lošije ukupno vreme preživljavanja. Kod ER+PR+HER2- ispitanica, ekspresija *SIRT3* nije uticala na ukupno vreme preživljavanja. Naši rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima prema kojima je povećana *SIRT3* ekspresija povezana sa metastazama limfnih čvorova, gradusom i veličinom tumora, sa vremenom preživljavanja do remisije kao i ukupnim preživljavanjem pacijenata sa kancerom dojke (162). Pokazano je da nakon transfekcije ćelijskih linija MDA-MB231 i BT-549 (ćelijske linije sa fenotipskim karakteristikama TNBC) malim interferišućim RNK, dolazi do značajne inhibicije proliferativnih migracionih sposobnosti ovih ćelija, odnosno utišavanjem *SIRT3* se značajno smanjuje invazivnost MDA-MB231 i BT-549 ćelijskih linija (162).

Rezultati naše studije su takođe podržani rezultatima novijih istraživanja koja impliciraju da kod karcinoma dojke *SIRT3* ima i tumor-promovišuću ulogu (164). Za razliku od naše studije, studija Desouki i saradnika je pokazala povezanost snižene *SIRT3* ekspresije i lošeg preživljavanja pacijenata sa karcinomom dojke, nezavisno od molekularnog tipa, ističući *SIRT3* kao tumor-supresorski gen (158).

Dihotomija ekspresije *SIRT3* u zavisnosti od tipa karcinoma dojke je potvrđena u studiji u kojoj je izvršena transfekcija MCF-7 (ER+) i MDA-MB-231 (TNBC) ćelijskih linija *SIRT3*-plazmidom i simulacija normoksičnih i hipoksičnih uslova. Rezultati ove studije su pokazali da je povećana ekspresija *SIRT3* kod MCF-7 ćelija povezana sa smanjenjem ćelijskog rasta, dok je kod MDA-MB-231 ćelija povezana sa značajnim rastom tumorskih ćelija, sugerišući da tumor-supresorska odnosno onkogeni uloga *SIRT3* u različitim tipovima karcinoma dojke može zavisiti od same invazivnosti tih tipova karcinoma (165).

Studija koja je ispitivala povezanost kliničkog značaja *SIRT3* ekspresije kod nesitnoćelijskog karcinoma pluća je pokazala da se *SIRT3* ekspresija može koristiti kao nezavisan prognostički faktor lošeg preživljavanja ovih pacijenata. Pokazana je jaka korelacija između povećane *SIRT3* ekspresije i kraćeg ukupnog vremena preživljavanja, prisutstva metastaza u limfnim čvorovima, kao i sa višim kliničkim stadijumom bolesti pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća (166). Pretpostavlja se da se u osnovi ove asocijacije nalazi *SIRT3*-posredovana aktivacija Akt signalnog puta (167). Onkogeni uloga *SIRT3* je pretpostavljena takođe i kod oralnog, kao i kod ezofaringealnog kancera, gde je pokazana korelacija visoke ekspresije *SIRT3* sa povećanom proliferacijom (168) i kraćim vremenom ukupnog preživljavanja ovih pacijenata (169). Kod karcinoma kolona takođe je pokazana asocijacija visoke *SIRT3* ekspresije i prisustva metastaza, kao i sa višim stadijumom bolesti, prikazujući povezanost *SIRT3* ekspresije sa povećanim stepenom proliferacije i migracije ćelija tumora, ali je takođe pokazano da *SIRT3* utišavanje stimuliše produkciju slobodnih radikala, kao i apoptozu (170). Kod cervikalnog kancera, pokazano je da *SIRT3* aktivira AMPK/PPAR signalni put, koji je odgovoran za regulaciju metabolizma lipida, čime se značajno povećava intracelularna sinteza triglicerida. Povećan metabolizam masnih kiselina je između ostalog i karakteristika brzo proliferišućih invazivnih tumora, te se smatra da bi *SIRT3* preko AMPK/PPAR signalnog puta mogao stimulisati migraciju i invaziju ćelija cervikalnog kancera i tako uticati na lošu prognozu i visoku stopu smrtnosti kod pacijenata (171). Jedan od mogućih mehanizama kojim *SIRT3* ispoljava svoju onkogeni prirodu je taj što u uslovima oksidativnog i genotoksičnog stresa, štiti malignu ćeliju od apoptoze. Naime, vezujući se za deacetilujući protein Ku70, *SIRT3* stimuliše interakciju Ku70 i BAX i time sprečava translokaciju BAX ka membrani mitohondrija i na taj način inhibira apoptozu u ćelijama kancera (172).

Tumor-supresorska uloga SIRT3 je pokazana kod hepatocelularnog karcinoma, gde je povećana SIRT3 ekspresija povezana sa povećanom apoptozom i direktnim smanjenjem Mdm2-posredovane degradacije p53 molekula (173). Kod adenokarcinoma pluća, povećana ekspresija SIRT3 povećava interakciju BAX/Bcl-2 indukujući apoptozu, povećava nivo p53 i p21 molekula, i smanjuje produkciju slobodnih radikala (174). Kod kancera želuca, nivo SIRT3 inverzno korelira sa stepenom infiltracija tumora, diferencijacijom, stadijumom bolesti kao i sa preživljavanjem pacijenata, implicirajući na njegovu tumor-supresorsku ulogu, verovatno preko povećane ekspresije i stabilizacije HIF-1 α (175).

Sumirajući rezultate različitih studija ispitivanja SIRT3 ekspresije i uloge kod različitih tipova kancera, ali i različitih podtipova istih kancera, može se zaključiti da SIRT3 ekspresija i funkcija zavise od tipa kancera, kao i od ćelijskog konteksta. Dokazi o onkogenom potencijalu SIRT3 upućuju na to da bi SIRT3 mogao biti značajan terapijski target, ali velika heterogenost uloge u malignoj ćeliji implicira da bi razvoj takve terapije trebao da ide u smeru personalizovanog pristupa. Naši rezultati pokazuju da *SIRT3* ima svoj prognostički potencijal kod u grupi TNBC pacijentkinja. Velika diskrepanca u rezultatima objavljenim u različitim studijama se može objasniti korišćenjem različitih graničnih vrednosti pri definisanju povećane/smanjene ekspresije. Takođe, neke od studija su rađene na relativno malom broju uzoraka ili na ćelijskim linijama, tako da su nepohodna dalja ispitivanja u svrhu kliničke primene *SIRT3* kao prognostičkog faktora kod različitih tipova karcinoma dojke.

5.3. Povezanost *SIRT6* genske ekspresije sa kliničko-patološkim karakteristikama i prognostičkim značajem pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim tipom karcinoma dojke

SIRT6 je NAD⁺-zavisna deacetilaza i ADP-riboziltransferaza sa regulatornom ulogom u brojnim ćelijskim procesima, kao što su održavanje genomske stabilnosti i integriteta telomera, reparacija DNK, metabolizam glukoze, apoptoza, inflamacija i imunski odgovor. Uloga SIRT6 u procesu kancerogeneze je heterogena i zavisi od vrste kancera. Kao pozitivan regulator genomske stabilnosti, SIRT6 je definsana kao tumor-supresor i njena aktivnost kao tumor-supresora je primećena kod karcinoma kolona, pankreasa, jetre i jajnika (176-179). Prethodne studije su pokazale kontroverzne rezultate po pitanju ekspresije *SIRT6* kod karcinoma dojke (180-182).

Učestala pojava gubitka heterozigotnosti na lokusu 19p13.3 predstavlja jednu od karakteristika genetičkog profila karcinoma dojke, a delecija SIRT6 sugerise tumor-supresorsku ulogu SIRT6 (183). Kao primer sinergističkog delovanja različitih epigenetičkih mehanizama, pretpostavlja se da bi SIRT6 mogao da bude jedan od najbitnijih faktora regulacije epigenoma u malignim ćelijama, s obzirom da odsustvo SIRT6 utiče na globalnu hipometilaciju i poremećaj u ekspresiji velikog broja gena (184).

Naši rezultati su pokazali da je snižena ekspresija *SIRT6* povezana sa lošijim ukupnim preživljavanjem pacijentkinja sa ER+PR+HER2- karcinomom dojke. Ovi rezultati, koji sugerisu potencijalnu tumor-supresorsku ulogu SIRT6 u hormon receptor-pozitivnom tipu karcinoma dojke, su podržani saznanjima prethodnih studija, koja su pokazala da povećana SIRT6 ekspresija suprimira proliferaciju i progresiju tumora kako u *in vivo*, tako i u MCF7 ćelijskoj liniji karcinoma dojke (113). Jedan od mogućih mehanizama koji se nalaze u osnovi supresije rasta tumora je SIRT6-posredovana apoptoza (115). U skladu sa našim rezultatima, druga studija je pokazala da pacijenti sa karcinomom dojke koji imaju povećanu ekspresiju *SIRT6* imaju bolje vreme ukupnog preživljavanja u odnosu na pacijente sa sniženom *SIRT6* ekspresijom (185). U ovoj studiji je takođe

primećeno da samo nefosforilisani oblik SIRT6 enzima ima tumor-supresorsku ulogu, dok je fosforilisana forma SIRT6 povezana sa lošim preživljavanjem pacijenata sa karcinomom dojke (185).

Jedan od mehanizama kojim SIRT6 ispoljava tumor-supresorsku ulogu je inhibicija PI3K signalnog puta na transkripcionom nivou, posledično smanjujući ćelijski rast, progresiju, ali i gradus karcinoma dojke u mišijem modelu (113). S druge strane, studija urađena od strane Bae i saradnika sugeriše da povećana *SIRT6* ekspresija povećava proliferaciju i predstavlja negativan prognostički faktor kod pacijenata sa karcinomom dojke (180). Pretpostavljeni mehanizam onkogene aktivnosti SIRT6 je regulacija ekspresije β -katenina i posledična proliferacija usled aktivacije β -katenin- zavisnog signalnog puta (180).

SIRT6 inhibira progresiju karcinoma kolona preko modulacije PTEN/AKT signalnog puta. Kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom, smanjena ekspresija *SIRT6* povezana je sa lošom prognozom i ukupnim preživljavanjem pacijenata. Rezultati ove studije pokazali su da povećana ekspresija *SIRT6* kod ovih pacijenata inhibira ćelijsku proliferaciju, invaziju i migraciju, dok u isto vreme pojačava apoptozu (176). Kod dukalnog adenokarcinoma pankreasa, oboljenja koji se karakteriše visokom stopom mortaliteta, SIRT6 inaktivacija dovodi do hiperacetilacije histona u nivou promotora LIN28b, negativnog regulatora let-7 mikroRNK, sinteze HMGA2, IGF2BP1 i IGF2BP3 i regrutovanja Myc-a, neophodnih za ćelijsko preživljavanje, progresiju i formiranje metastaza kod ovog tipa kancera (177). Ova epigenetička regulacija korelira sa lošim preživljavanjem pacijenata sa duktalnim adenokarcinomom pankreasa (177). Kod kancera jajnika je detektovano smanjenje *SIRT6* ekspresije u poređenju sa normalnim tkivom. Povećana ekspresija *SIRT6* u ćelijama karcinoma jajnika inhibira proliferaciju usled SIRT6-posredovane inhibicije Notch3, kako na nivou transkripcije, tako i na nivou proteina (179).

Međutim, kod određenih tipova kancera, SIRT6 pospešuje proces kancerogeneze. Kod hepatocelularnog karcinoma, koji se odlikuje visokom stopom mortaliteta, SIRT6 ispoljava svoju onkogenu ulogu kroz regulaciju proliferacije i apoptoze preko ERK1/2 signalnog puta. Povećana ekspresija *SIRT6* povezana je sa povećanom proliferacijom i smanjenom apoptozom ćelija hepatocelularnog karcinoma usled povećane ekspresije Bcl-2 i fosforilacije ERK-kinaze, što ga čini kandidatom za ispitivanje svojstava kao terapijskog targeta (186). U ćelijama kancera prostate inhibicija SIRT6 redukuje vijabilnost ćelija kancera i povećava senzitivnost na hemoterapeutike (187). Kod kancera kože, SIRT6 učestvuje u epidermalnoj kancerogenezi kao okogen, tako što indukuje ekspresiju proinflammatoryh i „prosurvival“ proteina inhibirajući AMPK signalni put. Na taj način stimuliše ćelijsko preživljavanje i proliferaciju (188).

Hronična inflamacija je jedan od faktora rizika za inicijaciju procesa kancerogeneze. Inflamatorne ćelije sintetišu faktore rasta i često infiltrirajući tumore stvarajući pogodno mikrokruženje, pospešuju rast tumora, stimulišući angiogenezu, remodelovanje ekstracelularnog matriksa, invaziju i metastaze (61). SIRT6 ima dvojaku ulogu u procesu inflamacije. Proinflammatory uloga SIRT6 ogleda se u pojačavanju ekspresije proinflammatoryh citokina faktora nekroze tumora (TNF) (189). U ćelijskim linijama kancera pankreasa, SIRT6 pozitivno reguliše ekspresiju citokina IL-8 i TNF i time stimuliše ćelijsku migraciju (102). S druge strane, SIRT6 suprimira NF- κ B signalni put i ekspresiju pro-apoptotskih gena (114).

U nekoliko studija je ispitivana potencijalna povezanost aktivnosti SIRT6 i odgovora na terapiju pacijenata sa karcinomom dojke. U različitim ćelijskim linijama je zapažena fosforilacija SIRT6 od strane kinaze AKT1, što uzrokuje MDM2-zavisnu ubikvitinaciju SIRT6, a potom i degradaciju SIRT6, dovodeći do tumorogeneze i stvaranja rezistencije na hemioterapiju (konkretno herceptin) (185). Preživljavanje pacijenata sa karcinomom dojke pozitivno korelira sa prisutnošću SIRT6, a negativno sa fosforilacijom SIRT6 (185). Jedna studija je pokazala da snižena ekspresija *SIRT6* kod

hormon receptor-pozitivnih pacijenata koji su primali terapiju tamoksifenom, je povezana sa većim rizikom za pojavu relapsa kod ovih pacijenata (190). S obzirom da je pokazano da gubitak SIRT6 dovodi do pojave rezistentnosti na herceptin, moguće je da se u osnovi rizika za pojavu relapsa kod pacijenata sa terapijom tamoksifenom, nalazi i stvaranje rezistentnosti na tamoksifen usled smanjene ekspresije SIRT6. Iako je moguće da SIRT6 smanjuje rizik od inicijacije tumora, moguće je takođe da kod već postojećih kancera ometa delovanje hemioterapije.

Potencijal SIRT6 kao terapijskog targeta je još uvek nedovoljno ispitan. U pogledu na njegovu tumor-supresorsku ulogu u malignim oboljenjima, studije za sada idu u smeru ispitivanja molekula koji bi bili potencijalni modulatori aktivnosti SIRT6 (99).

5.4. Povezanost *SIRT7* genske ekspresije sa kliničko-patološkim karakteristikama i prognostičkim značajem pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim tipom karcinoma dojke

Kao i ostali članovi familije sirtuina, SIRT7 pokazuje potencijalno dvostruku ulogu u procesu kancerogeneze. Nekoliko studija je pretpostavilo onkogenu ulogu SIRT7 u procesu ćelijske proliferacije (191). S druge strane, SIRT7 bi mogao da ima i tumor-supresorsku ulogu, s obzirom na njegov značaj u regulaciji procesa popravke DNK oštećenja i održavanju integriteta genoma (125).

U ovoj doktorskoj disertaciji je ispitivano postojanje razlike u ekspresiji *SIRT7* kod dva klinički različita tipa karcinoma dojke, TNBC i ER+PR+HER2-. Naši rezultati pokazuju višu ekspresiju *SIRT7* kod TNBC pacijentkinja u odnosu na ER+PR+HER2- pacijentkinje, ali bez statističke značajnosti.

U ovoj studiji je ispitivana povezanost *SIRT7* genske ekspresije sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijentkinja sa TNBC i ER+PR+HER2- tipom karcinoma dojke. Naši rezultati su pokazali značajnu povezanost *SIRT7* povećane ekspresije i veličinom tumora ispitanica sa TNBC tipom. Utvrđena je veća učestalost povećane *SIRT7* ekspresije kod tumora manje veličine, što implicira da bi *SIRT7* ekspresija mogla biti povezana sa ranim događajima u procesu inicijacije karcinoma dojke. Naši podaci su u saglasnosti sa studijom koja je ispitivala *SIRT7* ekspresiju kod pacijenata sa različitim stadijumima karcinoma dojke (191). Ova studija je takođe pokazala povezanost povećanog nivoa *SIRT7* i ranog stadijuma kancera dojke, ističući značaj *SIRT7* ekspresije u ranom stadijumu onkogeneze, ali i potencijalno važnu ulogu u medijaciji mitogenih odgovora na hemioterapiju (191).

Prethodne studije su pokazale da je smanjena *SIRT7* ekspresija karakteristična za neproliferativna tkiva poput moždanog, srčanog i tkiva skeletnih mišića, dok je povećana *SIRT7* ekspresija karakteristična za proliferativna tkiva poput tkiva jetre, testisa i slezine, a naročito za ćelijske linije karcinoma dojke i štitaste žlezde (192, 159). Povećan nivo *SIRT7* ekspresije je takođe utvrđen kod karcinoma jetre, želuca, jajnika i pluća (193, 120, 194-195). Povećana *SIRT7* ekspresija je povezana sa povećanom transkripcijom rRNK, koja je karakteristična za metabolički aktivne ćelije sa visokom proliferativnom stopom (196). Takođe, potreba za sintezom rRNK je u skladu sa povećanom sintezom ribozoma u brzo-rastućim ćelijama kancera (192).

Analizirajući potencijalni uticaj *SIRT7* ekspresije na stopu ukupnog preživljavanja pacijentkinja sa TNBC i ER+PR+HER2- tipom karcinoma dojke, rezultati naše studije su pokazali da postoji značajna povezanost povećane *SIRT7* ekspresije i lošeg preživljavanja kako u grupi TNBC pacijentkinja, tako i u grupi ER+PR+HER2- pacijentkinja. Ranije studije su prijavile povećanu *SIRT7* ekspresiju kod pacijenata sa prisustvom nodalnih metastaza, u odnosu na pacijente na

negativnim limfnim čvorovima (159). Rezultati naše studije su u skladu sa rezultatima studije koja je pokazala da kod karcinoma dojke, SIRT7 ima veliku ulogu u ćelijskom preživljavanju tako što pospešuje ćelijsku proliferaciju i inhibira apoptozu. Takođe je pokazano da gubitak SIRT7 značajno inhibira ćelijsku invaziju, time što blokira progresiju ćelijskog ciklusa i indukuje apoptozu (197). Naši rezultati potvrđuju rezultate studije u kojoj je pokazano da SIRT7 predstavlja nezavisan prognostički faktor lošeg ishoda pacijenata sa karcinomom dojke (198)

SIRT7 utiče na proliferaciju ćelija i aktivacijom RAS-RAF-MEK-ERK signalnog puta. U ćelijama kolorektalnog karcinoma SIRT7 pospešuje ćelijsku proliferaciju, aktivacijom RAS-RAF-MEK-ERK signalnog puta, indukujući fosforilaciju ERK1/2 i povećavajući nivo ciklina D1 (199). SIRT7 takođe utiče i na regulaciju ćelijske invazije i metastaza, dve najbitnije karakteristike malignog fenotipa. Naime, SIRT7 putem aktivacije MAPK signalnog puta, utiče na regulaciju EMT i to tako što smanjuje ekspresiju epitelijskih markera E-kadherina i β -katenina, dok povećava nivo mezenhimskih markera, odnosno fibronektina i vimentina (199). U ćelijama humanog hepatocelularnog karcinoma dokazan je onkogeni potencijal SIRT7. Utišavanje SIRT7 pomoću miR-125a-5p i miR-125b, dovelo je od zaustavljanja ćelijskog ciklusa ćelija kancera jetre u G1/S fazi represije ciklina D1 (120). SIRT7 takođe epigenetički reguliše i ekspresiju miR-34a, člana familije mikro RNK koje u ćelijama kancera imaju ulogu u zaustavljanju ćelijskog ciklusa, starenju ćelija i programiranoj ćelijskoj smrti (138). Naime, u ćelijama karcinoma želuca, deacetilacijom H3K18ac u nivou promotora gena za miR-34a, SIRT7 inhibira apoptozu (193).

S druge strane, jedna studija je pretpostavila tumor-supresorski potencijal SIRT7 implicirajući da SIRT7 deacetilazna aktivnost modulacijom TGF- β , glavnog regulatora EMT, inhibira nastanak metastaza na plućima i povećava preživljavanje pacijenata sa karcinomom dojke (200).

Tumor-supresorsku ulogu SIRT7 pokazuje kroz regulaciju popravke oštećenja DNK nastalih usled genotoksičnog stresa. Naime, SIRT7, zajedno sa SIRT1 i SIRT6 učestvuje u regulaciji reparacije dvolančanih prekida molekula DNK (125). Sirtuni verovatno na dva različita načina modulišu proces DNK popravke. Učestvovanjem u remodeliranju strukture hromatina, olakšavaju pristup i regrutaciju proteina zaduženih za popravku DNK na mesto nastalog oštećenja. S druge strane, oni direktno regulišu aktivnost proteina uključenih u popravku DNK oštećenja (125). Kao odgovor na nastalo oštećenje na molekulu DNK, nekoliko različitih histon-acetilaza i deacetilaza se regrutuje na mesto oštećenja. SIRT7-zavisna deacetilacija H3K18ac je jedan od prvih događaja koji nastaju nakon indukcije DNK oštećenja, što sugeriše na važnu ulogu SIRT7 u procesu održavanja integriteta genoma (126).

Međutim, selektivna H3K18ac deacetilacija je takođe povezana i sa onkogenom transformacijom, agresivnim fenotipom kancera i lošim prognozama pacijenata usled transkripcione represije gena uključenih u supresiju tumora (201-202). Takođe, pokazano je da SIRT7-zavisna H3K18ac deacetilacija neophodna za održavanje osnovnih karakteristika ćelija kancera, kao što su nezavisan ćelijski rast i gubitak kontaktne inhibicije ćelija (202). Moguće je da SIRT7 u početnim fazama kancerogeneze pospešuje onkogeni transformaciju i rast tumora, dok u kasnijim fazama inhibira diseminaciju, migraciju i invaziju malignih ćelija.

SIRT7 je najmanje ispitivani član familije sirtuina, ali s obzirom na značajnu povezanost njegove ekspresije sa lošom kliničkom slikom i negativnim ishodom pacijenata sa različitim onkološkim oboljenjima, a naročito sa karcinomom dojke, neophodna su dalja ispitivanja kako njegove biološke uloge, tako i njegovog potencijalnog prognostičkog i terapijskog značaja.

5.5. Povezanost *HDAC7* genske ekspresije sa kliničko-patološkim karakteristikama i prognostičkim značajem pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim tipom karcinoma dojke

Histon-deacetilaza 7 učestvuje u regulaciji velikog broja procesa koji se nalaze u osnovi kancerogeneze, kao što su proliferacija, invazija, metastaze i apoptoza (50). Promena u regulaciji ekspresije *HDAC7* je utvrđena kod nekoliko različitih tipova karcinoma (54, 59, 203), uključujući i karcinom dojke (204, 60, 205). Tačna uloga u patofiziologiji karcinoma dojke, kao i potencijalni uticaj na preživljavanje pacijenata sa različitim tipovima ovog karcinoma još uvek nije potpuno rasvetljen. Uloga *HDAC7* u kompleksnoj mreži drugih histon-deacetilaza, kao i transkripcioni odgovor njihovih ciljnih gena u karcinomu dojke još uvek je velikim delom nepoznat.

Do sada je mali broj studija ispitivao potencijalni prognostički značaj ekspresije *HDAC7*. Po našim saznanjima, ova studija je jedna od prvih koja se bavi ispitivanjem i poređenjem prognostičkog potencijala *HDAC7* u klinički i prognostički različitim tipovima karcinoma dojke, TNBC i ER+PR+HER2-. Naši rezultati su pokazali da TNBC ispitanice sa povišenom *HDAC7* ekspresijom imaju značajno lošije ukupno preživljavanje, za razliku od ER+PR+HER2- ispitanica, kod kojih ekspresija *HDAC7* nije imala efekat na ukupno preživljavanje. Prethodne studije su pokazale da povećana ekspresija *HDAC7* korelira sa lošim kliničkim ishodom pacijenata sa kancerom pluća, jajnika, želuca, kao i nazofaringealnim kancerom (59, 206-207, 54, 208). Osim povezanosti *HDAC7* ekspresije sa ukupnim preživljavanjem TNBC pacijentkinja, naši rezultati nisu pokazali značajnu asocijaciju sa drugim kliničko-patološkim parametrima ovih pacijentkinja. Povećana *HDAC7* ekspresija bi mogla biti nezavisan prognostički faktor lošeg preživljavanja ovih pacijenata.

Naši rezultati su pokazali da, iako ER+PR+HER2- pacijentkinje imaju veću ekspresiju *HDAC7* u odnosu na TNBC pacijentkinje, prognostički značaj povećane *HDAC7* ekspresije je primećen jedino kod TNBC pacijentkinja, što ukazuje na to da *HDAC7* može imati potencijalno različite uloge u zavisnosti od tipa karcinoma dojke. Povezanost povećane *HDAC7* ekspresije i lošeg preživljavanja do sada je pokazan kod pacijenata sa akutnom limfoblastnom leukemijom (203), kancerom jajnika (206), želuca (207), pluća (54, 59) i kolorektalnim karcinomom (209).

Iako je pretpostavljena onkogeno priroda *HDAC7* kod TNBC tipa kancera, tačan mehanizam kojim *HDAC7* utiče na preživljavanje kod TNBC pacijenata još uvek nije potpuno rasvetljen. U različitim tipovima karcinoma, *HDAC7* stimuliše proliferaciju ćelija indukcijom aktivacije c-Myc onkogeno (50-51). Kao jedan od potencijalnih mehanizama kojim *HDAC7* pokazuje svoju onkogeno ulogu je i regulacija migracije endotelijalnih ćelija i stimulacija procesa angiogeneze. Pokazano je da *HDAC7* utiče na vaskularni integritet i angiogenezu tako što inhibira ekspresiju matriksne metaloproteinaze 10 (MMP10) (57), kao i PDGF i njegovog receptora, glavne medijatore naprednih stadijuma angiogeneze (53). Šta više, utišavanje *HDAC7* je dovoljno da bi se *in vitro* inhibirao proces angiogeneze (53). Osim toga, u ćelijama karcinoma pluća, *HDAC7* pospešuje kancerogenezu inhibirajući STAT3 (54), kao i tumor-supresor plakoglobin, što posledično vodi proliferaciji i invaziji ćelija karcinoma pluća (59). Ova saznanja upućuju na to da bi *HDAC7* mogao da bude potencijalni molekularni target anti-angiogenih i anti-proliferativnih terapeutika u lečenju kancera.

U ovoj doktorskoj disertaciji nije utvrđena povezanost *HDAC7* ekspresije i kliničko-patoloških karakteristika pacijentkinja sa ER+PR+HER2- tipom karcinoma dojke. Prethodne studije su pokazale da inhibitori histon-deacetilaza, valproična kiselina i entinostat, mogu da izvrše konverziju ER-negativnih u ER-pozitivne ćelijske linije (210-211), što implicira da bi histon-deacetilaze mogle da imaju bitnu ulogu u regulaciji ekspresije estrogenskog receptora. Pretpostavlja se da *HDAC7* ima

jedinstvenu ulogu u represiji transkripcije ER α i regulaciji ekspresije gena koji su pod kontrolom ER α , uključujući i inhibitor ćelijskog ciklusa, Reprimo (56). Interakcija HDAC7, ER α i FoxA1 indukuje transkripcionu represiju Reprimo inhibitora, što posledično vodi ćelijskoj proliferaciji (56).

Utvrđeno je da HDAC1, ali i druge histon-deacilaze, poput HDAC3, regulišu aktivnost HDAC7 (60). Pretpostavlja se da HDAC7 ima važnu ulogu u inicijaciji i održavanju matičnih ćelija karcinoma dojke upravo putem regulacije velikog broja gena povezanih sa nastankom i progresijom kancera. Nedavna studija je pokazala da su aktivnosti HDAC1 i HDAC7 neophodne za uspostavljanje i održavanje specifičnih osobina matičnih ćelija karcinoma dojke i jajnika (205). Šta više, povećana HDAC7 ekspresija je dovoljna kako bi se istakao fenotip karakterističan za matične ćelije kancera (205). U matičnim ćelijama karcinoma dojke, HDAC7 se vezuje za regione promotora i pojačivača regulišući transkripciju gena povezanih sa razvojem kancera, kao što su *c-MYC*, *CD44*, *CDKN1B*, *SMAD3*, *VEGFA*, *HIF1 α* i *p21* (50, 60). Inhibicija HDAC1 i HDAC3 različitim HDAC inhibitorima dovodi do smanjenja aktivnosti HDAC7, ali i do povećanja globalne H3K27 acetilacije i hipoacetilacije u nivou promotora i enhensera kancer-specifičnih gena (60).

Sve više studija upućuje na mogućnost korišćenja HDAC inhibitora kao obećavajući princip terapije u lečenju TNBC pacijenata (212-213), ER+PR+HER2- pacijenata sa uznapredovalim stadijumom bolesti (214), kao i pacijenata kod kojih se razvila rezistencija na primenjenu terapiju (215). Iako je od nedavno poznata jedna klasa selektivnih HDAC inhibitora koji smanjuju ekspresiju HDAC7 na proteinskom nivou, lekovi koji specifično inhibiraju HDAC7 još uvek nisu dostupni (205). Pokazano je da HDAC inhibitori utiču na enzimsku aktivnost cele familije histon-deacetilaza, međutim, jedino u slučaju HDAC7 ta inhibicija se ogleda i na proteinskom, ali i na nivou genske ekspresije (51). Ovi rezultati sugerišu da bi upravo HDAC7 mogao da bude mesto konvergencije inhibicije histon-deacetilaza, odnosno nizvodni target cele HDAC familije (51).

Novija saznanja upućuju na to da bi HDAC7 specifični inhibitor potencijalno bio bolji terapijski target u odnosu na opšte HDAC inhibitore, naročito kad su u pitanju matične ćelije kancera. Inhibicija HDAC7 bi mogla imati višestruki inhibitorski efekat na proces kancerogeneze, s obzirom na potencijalnu represiju velikog broja mogućih HDAC7 targetnih onkogeno. Dalja ispitivanja tačne uloge HDAC7 u različitim tipovima karcinoma dojke bi mogla da doprinesu razumevanju kliničkog značaja HDAC7, kako u smislu prognostičkog pokazatelja, tako i kao kandidata za tretman selektivnim inhibitorima kao terapijski pristup u lečenju karcinoma dojke.

6. Zaključci

Na osnovu analize dobijenih rezultata prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji izvedeni su sledeći zaključci:

- Kod pacijentkinja sa TNBC tipom karcinoma dojke uočen je niži nivo ekspresije *SIRT1*, *SIRT3* i *HDAC7* gena u odnosu na pacijentkinje sa ER+PR+HER2- tipom. Različiti ekspresioni profil *SIRT1*, *SIRT3* i *HDAC7* gena ukazuje na njihove moguće različite uloge kod različitih molekularnih tipova karcinoma dojke.
- Nije utvrđena razlika u nivou ekspresije *SIRT6* i *SIRT7* između dve ispitivane grupe pacijentkinja sa karcinomom dojke.
- Uočena je povezanost povećane *SIRT1* ekspresije i manje veličine tumora kod ispitanica sa ER+PR+HER2- karcinomom dojke, što može da ukaže na potencijalnu protektivnu ulogu *SIRT1* kod ovog tipa karcinoma dojke.
- Kod TNBC ispitanica, povećana *SIRT3* ekspresija je povezana sa većim histološkim gradusom tumora ovih pacijentkinja, što upućuje na negativan efekat *SIRT3* u procesu dediferencijacije tumorskih ćelija ovog tipa karcinoma dojke.
- Uočena je povezanost povećane *SIRT7* ekspresije i veličine tumora kod pacijentkinja sa TNBC kancerom dojke. Ovi rezultati ukazuju na potencijalnu ulogu *SIRT7* u procesu proliferacije tumorskih ćelija.
- Kaplan-Meier analiza je pokazala povezanost snižene *SIRT1* ekspresije i lošeg preživljavanja pacijentkinja sa ER+PR+HER2- karcinomom dojke. Snižen nivo *SIRT1* ekspresije predstavlja negativan prognostički faktor lošeg preživljavanja ovih pacijentkinja, ukazujući na potencijalnu tumor-supresorsku ulogu *SIRT1* gena u ovom tipu karcinoma dojke.
- Pokazana je povezanost povećane *SIRT3* ekspresije i lošeg preživljavanja ispitanica sa TNBC karcinomom dojke, sugerišući onkogenu ulogu *SIRT3* gena u ovom molekularnom tipu karcinoma dojke koji se inače odlikuje najnepovoljnijim preživljavanjem.
- Uočena je povezanost snižene *SIRT6* ekspresije i lošeg preživljavanja ispitanica sa ER+PR+HER2- karcinomom dojke, ukazujući na potencijalno tumor-supresorski potencijal *SIRT6* u ovom tipu karcinoma dojke.
- Kod obe ispitivane grupe pokazana je povezanost povećane *SIRT7* ekspresije i lošeg ukupnog preživljavanja, implicirajući onkogenu ulogu *SIRT7* u ovim tipovima karcinoma dojke.
- Kod TNBC pacijentkinja pokazana je povezanost povećane *HDAC7* ekspresije i lošeg ukupnog preživljavanja. Povećana *HDAC7* ekspresija predstavlja negativan prognostički parametar lošeg preživljavanja ovih pacijentkinja. Ovakav rezultat ukazuje na onkogeni potencijal *HDAC7* u TNBC tipu karcinoma dojke.
- Kod ER+PR+HER2- pacijentkinja smanjena *SIRT1* ekspresija predstavlja nezavisan prediktivni faktor negativnog kliničkog ishoda ovih pacijentkinja.
- Kod TNBC pacijentkinja povećana *HDAC7* ekspresija predstavlja nezavisan prediktivni faktor negativnog kliničkog ishoda ovih pacijentkinja.

7. Literatura

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*.
3. Henderson BE, Feigelson HS. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):427–33.
4. Shiovitz S, Korde LA. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Ann Oncol*. 2015;26(7):1291–9.
5. Yang X, Leslie G, Doroszuk A, Schneider S, Allen J, Decker B, et al. Cancer Risks Associated With Germline PALB2 Pathogenic Variants: An International Study of 524 Families. *J Clin Oncol*. 2019;38(7):674–85.
6. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res* 2017;50.
7. Falck A-K, Fernö M, Bendahl P-O, Rydén L. St Gallen molecular subtypes in primary breast cancer and matched lymph node metastases - aspects on distribution and prognosis for patients with luminal A tumours: results from a prospective randomised trial. *BMC Cancer*. 2013;13:558.
8. Bao T, Davidson NE. Gene Expression Profiling of Breast Cancer. *Adv Surg*. 2008;42:249–60.
9. Yin L, Duan J-J, Bian X-W, Yu S. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res*. 2020;22(1):61.
10. Dogra A, Mehta A, Doval DC. Are Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancers Really Different? *J Oncol*. 2020;2020:e4061063.
11. Cserni G, Chmielik E, Cserni B, Tot T. The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Arch Int J Pathol*. 2018;472(5):697–703.
12. Luo M, Yuan H, Long C, Su K, Li F, Zeng J. Analysis of factors related to N2- or N3-stage breast cancer associated with 1–2 positive sentinel lymph nodes in Chinese patients. *Transl Cancer Res*. 2020
13. Sawaki M, Shien T, Iwata H. TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group). *Jpn J Clin Oncol*. 2019;49(3):228–31.
14. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res BCR*. 2010;12(4):207.
15. Fallahpour S, Navaneelan T, De P, Borgo A. Breast cancer survival by molecular subtype: a population-based analysis of cancer registry data. *CMAJ Open*. 2017;5(3):E734–9.

16. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2007;13(15 Pt 1):4429–34.
17. Turner NC, Reis-Filho JS. Tackling the diversity of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2013;19(23):6380–8.
18. Pareja F, Geyer FC, Marchiò C, Burke KA, Weigelt B, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants. *Npj Breast Cancer.* 2016;2:16036.
19. Greenup R, Buchanan A, Lorzio W, Rhoads K, Chan S, Leedom T, et al. Prevalence of BRCA mutations among women with triple-negative breast cancer (TNBC) in a genetic counseling cohort. *Ann Surg Oncol.* 2013;20(10):3254–8.
20. Temian DC, Pop LA, Irimie AI, Berindan-Neagoe I. The Epigenetics of Triple-Negative and Basal-Like Breast Cancer: Current Knowledge. *J Breast Cancer.* 2018;21(3):233–43.
21. Understanding metastasis: current paradigms and therapeutic challenges in breast cancer progression | RCSI Student Medical Journal
22. Al-Mahmood S, Sapiezynski J, Garbuzenko OB, Minko T. Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options. *Drug Deliv Transl Res.* 2018;8(5):1483–507.
23. Neophytou C, Boutsikos P, Papageorgis P. Molecular Mechanisms and Emerging Therapeutic Targets of Triple-Negative Breast Cancer Metastasis. *Front Oncol.* 2018;8.
24. Medina MA, Oza G, Sharma A, Arriaga LG, Hernández Hernández JM, Rotello VM, et al. Triple-Negative Breast Cancer: A Review of Conventional and Advanced Therapeutic Strategies. *Int J Environ Res Public Health* 2020;17(6).
25. Freeland A, Brown LJ, Parker A, Segara D, Portman N, Lau B, et al. Molecular Biomarkers for Contemporary Therapies in Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. *Genes.* 2021;12(2).
26. Pan H, Gray R, Braybrooke J, Davies C, Taylor C, McGale P, et al. 20-Year Risks of Breast-Cancer Recurrence after Stopping Endocrine Therapy at 5 Years. *N Engl J Med.* 2017;377(19):1836–46.
27. Mohammed H, Russell IA, Stark R, Rueda OM, Hickey TE, Tarulli GA, et al. Progesterone receptor modulates estrogen receptor- α action in breast cancer. *Nature.* 2015;523(7560):313–7.
28. Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER2. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2001;12 Suppl 1:S3-8.
29. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.
30. Kim JK, Samaranayake M, Pradhan S. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci.* 2008;66(4):596.
31. Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell.* 2007;128(4):693–705.

32. Roberti A, Valdes AF, Torrecillas R, Fraga MF, Fernandez AF. Epigenetics in cancer therapy and nanomedicine. *Clin Epigenetics*. 2019;11.
33. Baylin SB, Jones PA. Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(9).
34. Hur K, Cejas P, Feliu J, Moreno-Rubio J, Burgos E, Boland CR, et al. Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to activation of proto-oncogenes in human colorectal cancer metastasis. *Gut*. 2014;63(4):635–46.
35. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010;31(1):27–36.
36. Esteller M, Fraga MF, Guo M, Garcia-Foncillas J, Hedenfalk I, Godwin AK, et al. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet*. 2001;10(26):3001–7.
37. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*. 1994;54(18):4855–78.
38. Hałas M, Wawruszak A, Przybyszewska A, Jaruga A, Guz M, Kałafut J, et al. H3K18Ac as a Marker of Cancer Progression and Potential Target of Anti-Cancer Therapy. *Cells*. 2019;8(5).
39. Zhuang J, Huo Q, Yang F, Xie N. Perspectives on the Role of Histone Modification in Breast Cancer Progression and the Advanced Technological Tools to Study Epigenetic Determinants of Metastasis. *Front Genet*. 2020;11.
40. Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, Powe DG, Ahmed RA, Collins HM, et al. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer Res*. 2009;69(9):3802–9.
41. Lachner M, O’Sullivan RJ, Jenuwein T. An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci*. 2003;116(11):2117–24.
42. Rifai K, Judes G, Idrissou M, Daures M, Bignon Y-J, Penault-Llorca F, et al. SIRT1-dependent epigenetic regulation of H3 and H4 histone acetylation in human breast cancer. *Oncotarget*. 2018;9(55):30661–78.
43. Chuang D-M, Leng Y, Marinova Z, Kim H-J, Chiu C-T. Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. *Trends Neurosci*. 2009;32(11):591–601.
44. Ilango S, Paital B, Jayachandran P, Padma PR, Nirmaladevi R. Epigenetic alterations in cancer. *Front Biosci Landmark Ed*. 2020;25:1058–109.
45. Fkih M’hamed I, Privat M, Ponelle F, Penault-Llorca F, Kenani A, Bignon Y-J. Identification of miR-10b, miR-26a, miR-146a and miR-153 as potential triple-negative breast cancer biomarkers. *Cell Oncol Dordr*. 2015;38(6):433–42.
46. de Ruijter AJM, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg ABP. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*. 2003;370(Pt 3):737–49.

47. Li Y, Seto E. HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(10).
48. Park S-Y, Kim J-S. A short guide to histone deacetylases including recent progress on class II enzymes. *Exp Mol Med.* 2020;52(2):204–12.
49. Verdin E, Dequiedt F, Kasler HG. Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet.* 2003;19(5):286–93.
50. Zhu C, Chen Q, Xie Z, Ai J, Tong L, Ding J, et al. The role of histone deacetylase 7 (HDAC7) in cancer cell proliferation: regulation on c-Myc. *J Mol Med Berl Ger.* 2011;89(3):279–89.
51. Dokmanovic M, Perez G, Xu W, Ngo L, Clarke C, Parmigiani RB, et al. Histone deacetylase inhibitors selectively suppress expression of HDAC7. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(9):2525–34.
52. Kato H, Tamamizu-Kato S, Shibasaki F. Histone deacetylase 7 associates with hypoxia-inducible factor 1alpha and increases transcriptional activity. *J Biol Chem.* 2004;279(40):41966–74.
53. Mottet D, Bellahcène A, Pirotte S, Waltregny D, Deroanne C, Lamour V, et al. Histone deacetylase 7 silencing alters endothelial cell migration, a key step in angiogenesis. *Circ Res.* 2007;101(12):1237–46.
54. Lei Y, Liu L, Zhang S, Guo S, Li X, Wang J, et al. Hdac7 promotes lung tumorigenesis by inhibiting Stat3 activation. *Mol Cancer.* 2017;16.
55. Li B, Samanta A, Song X, Iacono KT, Bembas K, Tao R, et al. FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(11):4571–6.
56. Malik S, Jiang S, Garee JP, Verdin E, Lee AV, O'Malley BW, et al. Histone deacetylase 7 and FoxA1 in estrogen-mediated repression of RPRM. *Mol Cell Biol.* 2010;30(2):399–412.
57. Chang S, Young BD, Li S, Qi X, Richardson JA, Olson EN. Histone deacetylase 7 maintains vascular integrity by repressing matrix metalloproteinase 10. *Cell.* 2006;126(2):321–34.
58. Margariti A, Zampetaki A, Xiao Q, Zhou B, Karamariti E, Martin D, et al. Histone deacetylase 7 controls endothelial cell growth through modulation of beta-catenin. *Circ Res.* 2010;106(7):1202–11.
59. Sang Y, Sun L, Wu Y, Yuan W, Liu Y, Li S-W. Histone deacetylase 7 inhibits plakoglobin expression to promote lung cancer cell growth and metastasis. *Int J Oncol.* 2019;54(3):1112–22.
60. Caslini C, Hong S, Ban YJ, Chen XS, Ince TA. HDAC7 regulates histone 3 lysine 27 acetylation and transcriptional activity at super-enhancer-associated genes in breast cancer stem cells. *Oncogene.* 2019;38(39):6599–614.
61. Chalkiadaki A, Guarente L. The multifaceted functions of sirtuins in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(10):608–24.
62. Kleszcz R, Paluszczak J, Baer-Dubowska W. Targeting aberrant cancer metabolism – The role of sirtuins. *Pharmacol Rep.* 2015;67(6):1068–80.

63. Phan LM, Yeung S-CJ, Lee M-H. Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. *Cancer Biol Med*. 2014;11(1):1–19.
64. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science*. 1956;123(3191):309–14.
65. Mei Z, Zhang X, Yi J, Huang J, He J, Tao Y. Sirtuins in metabolism, DNA repair and cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016;35:182.
66. Fang Y, Tang S, Li X. Sirtuins in Metabolic and Epigenetic Regulation of Stem Cells. *Trends Endocrinol Metab*. 2019;30(3):177–88.
67. Lin Z, Fang D. The Roles of SIRT1 in Cancer. *Genes Cancer*. 2013;4(3–4):97–104.
68. Lim J-H, Lee Y-M, Chun Y-S, Chen J, Kim J-E, Park J-W. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell*. 2010;38(6):864–78.
69. Bordone L, Motta MC, Picard F, Robinson A, Jhala US, Apfeld J, et al. Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol*. 2006;4(2):e31.
70. Jeong SM, Haigis MC. Sirtuins in Cancer: a Balancing Act between Genome Stability and Metabolism. *Mol Cells*. 2015;38(9):750–8.
71. Jeong J, Juhn K, Lee H, Kim S-H, Min B-H, Lee K-M, et al. SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70. *Exp Mol Med*. 2007;39(1):8–13.
72. Lin Y-H, Yuan J, Pei H, Liu T, Ann DK, Lou Z. KAP1 Deacetylation by SIRT1 Promotes Non-Homologous End-Joining Repair. *PloS One*. 2015;10(4):e0123935.
73. De Bonis ML, Ortega S, Blasco MA. SIRT1 Is Necessary for Proficient Telomere Elongation and Genomic Stability of Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rep*. 2014;2(5):690–706.
74. Vaquero A, Scher M, Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Human SirT1 Interacts with Histone H1 and Promotes Formation of Facultative Heterochromatin. *Mol Cell*. 2004;16(1):93–105.
75. Murayama A, Ohmori K, Fujimura A, Minami H, Yasuzawa-Tanaka K, Kuroda T, et al. Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. *Cell*. 2008;133(4):627–39.
76. Liu T, Liu PY, Marshall GM. The Critical Role of the Class III Histone Deacetylase SIRT1 in Cancer. *Cancer Res*. 2009;69(5):1702–5.
77. Peng L, Yuan Z, Ling H, Fukasawa K, Robertson K, Olashaw N, et al. SIRT1 Deacetylates the DNA Methyltransferase 1 (DNMT1) Protein and Alters Its Activities ∇ . *Mol Cell Biol*. 2011;31(23):4720–34.
78. Heo J, Lim J, Lee S, Jeong J, Kang H, Kim Y, et al. Sirt1 Regulates DNA Methylation and Differentiation Potential of Embryonic Stem Cells by Antagonizing Dnmt3l. *Cell Rep*. 2017;18(8):1930–45.
79. Wilking MJ, Ahmad N. The Role of SIRT1 in Cancer. *Am J Pathol*. 2015;185(1):26–8.

80. Choupani J, Mansoori Derakhshan S, Bayat S, Alivand MR, Shekari Khaniani M. Narrower insight to SIRT1 role in cancer: A potential therapeutic target to control epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. *J Cell Physiol.* 2018;233(6):4443–57.
81. He X, Zeng H, Chen J-X. Emerging role of SIRT3 in endothelial metabolism, angiogenesis and cardiovascular disease. *J Cell Physiol.* 2019;234(3):2252–65.
82. Schwer B, North BJ, Frye RA, Ott M, Verdin E. The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J Cell Biol.* 2002;158(4):647–57.
83. Scher MB, Vaquero A, Reinberg D. SirT3 is a nuclear NAD⁺-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress. *Genes Dev.* 2007;21(8):920–8.
84. Iwahara T, Bonasio R, Narendra V, Reinberg D. SIRT3 Functions in the Nucleus in the Control of Stress-Related Gene Expression. *Mol Cell Biol.* 2012;32(24):5022–34.
85. Kim SC, Sprung R, Chen Y, Xu Y, Ball H, Pei J, et al. Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol Cell.* 2006;23(4):607–18.
86. Zhang J, Xiang H, Liu J, Chen Y, He R-R, Liu B. Mitochondrial Sirtuin 3: New emerging biological function and therapeutic target. *Theranostics.* 2020;10(18):8315–42.
87. Finley LWS, Carracedo A, Lee J, Souza A, Egia A, Zhang J, et al. SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1 α destabilization. *Cancer Cell.* 2011;19(3):416–28.
88. Zhao K, Zhou Y, Qiao C, Ni T, Li Z, Wang X, et al. Oroxylin A promotes PTEN-mediated negative regulation of MDM2 transcription via SIRT3-mediated deacetylation to stabilize p53 and inhibit glycolysis in wt-p53 cancer cells. *J Hematol Oncol/J Hematol Oncol.* 2015;8.
89. Kim H-S, Patel K, Muldoon-Jacobs K, Bisht KS, Aykin-Burns N, Pennington JD, et al. SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell.* 2010;17(1):41–52.
90. Finley LWS, Haigis MC. Metabolic regulation by SIRT3: implications for tumorigenesis. *Trends Mol Med.* 2012;18(9):516–23.
91. Cheng Y, Ren X, Gowda ASP, Shan Y, Zhang L, Yuan Y-S, et al. Interaction of Sirt3 with OGG1 contributes to repair of mitochondrial DNA and protects from apoptotic cell death under oxidative stress. *Cell Death Dis.* 2013;4:e731.
92. Sengupta A, Haldar D. Human sirtuin 3 (SIRT3) deacetylates histone H3 lysine 56 to promote nonhomologous end joining repair. *DNA Repair.* 2018;61:1–16.
93. Bergaggio E, Riganti C, Garaffo G, Vitale N, Mereu E, Bandini C, et al. IDH2 inhibition enhances proteasome inhibitor responsiveness in hematological malignancies. *Blood.* 2019;133(2):156–67.
94. LI H, FENG Z, WU W, LI J, ZHANG J, XIA T. SIRT3 regulates cell proliferation and apoptosis related to energy metabolism in non-small cell lung cancer cells through deacetylation of NMNAT2. *Int J Oncol.* 2013;43(5):1420–30.

95. Wang Q, Ye S, Chen X, Xu P, Li K, Zeng S, et al. Mitochondrial NOS1 suppresses apoptosis in colon cancer cells through increasing SIRT3 activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;515(4):517–23.
96. Kim YS, Vallur PG, Jones VM, Worley BL, Shimko S, Shin D-H, et al. Context-dependent activation of SIRT3 is necessary for anchorage-independent survival and metastasis of ovarian cancer cells. *Oncogene.* 2020;39(8):1619–33.
97. Neeli PK, Gollavilli PN, Mallappa S, Hari SG, Kotamraju S. A novel metadherin Δ 7 splice variant enhances triple negative breast cancer aggressiveness by modulating mitochondrial function via NF κ B-SIRT3 axis. *Oncogene.* 2020;39(10):2088–102.
98. Yu F-Y, Xu Q, Wu D-D, Lau ATY, Xu Y-M. The Prognostic and Clinicopathological Roles of Sirtuin-3 in Various Cancers. *PLOS ONE.* 2016;11(8):e0159801.
99. Klein MA, Denu JM. Biological and catalytic functions of sirtuin 6 as targets for small-molecule modulators. *J Biol Chem.* 2020;295(32):11021–41.
100. Chang AR, Ferrer CM, Mostoslavsky R. SIRT6, a Mammalian Deacetylase with Multitasking Abilities. *Physiol Rev.* 2019;100(1):145–69.
101. Van Meter M, Simon M, Tomblin G, May A, Morello TD, Hubbard BP, et al. JNK Phosphorylates SIRT6 to Stimulate DNA Double-Strand Break Repair in Response to Oxidative Stress by Recruiting PARP1 to DNA Breaks. *Cell Rep.* 2016;16(10):2641–50.
102. Bauer I, Grozio A, Lasigliè D, Basile G, Sturla L, Magnone M, et al. The NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT6 promotes cytokine production and migration in pancreatic cancer cells by regulating Ca²⁺ responses. *J Biol Chem.* 2012;287(49):40924–37.
103. Zhong L, D'Urso A, Toiber D, Sebastian C, Henry RE, Vadysirisack DD, et al. The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1 α . *Cell.* 2010;140(2):280–93.
104. Zhang P, Tu B, Wang H, Cao Z, Tang M, Zhang C, et al. Tumor suppressor p53 cooperates with SIRT6 to regulate gluconeogenesis by promoting FoxO1 nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(29):10684–9.
105. Sebastián C, Zwaans BMM, Silberman DM, Gymrek M, Goren A, Zhong L, et al. The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism. *Cell.* 2012;151(6):1185–99.
106. Verdin E. The Many Faces of Sirtuins: Coupling of NAD metabolism, sirtuins and lifespan. *Nat Med.* 2014;
107. Mao Z, Hine C, Tian X, Van Meter M, Au M, Vaidya A, et al. SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science.* 2011;332(6036):1443–6.
108. McCord RA, Michishita E, Hong T, Berber E, Boxer LD, Kusumoto R, et al. SIRT6 stabilizes DNA-dependent Protein Kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. *Aging.* 2009;1(1):109–21.
109. Hwang B-J, Jin J, Gao Y, Shi G, Madabushi A, Yan A, et al. SIRT6 protein deacetylase interacts with MYH DNA glycosylase, APE1 endonuclease, and Rad9–Rad1–Hus1 checkpoint clamp. *BMC Mol Biol.* 2015;16.

110. Michishita E, McCord RA, Berber E, Kioi M, Padilla-Nash H, Damian M, et al. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature*. 2008;452(7186):492–6.
111. Michishita E, McCord RA, Boxer LD, Barber MF, Hong T, Gozani O, et al. Cell cycle-dependent deacetylation of telomeric histone H3 lysine K56 by human SIRT6. *Cell Cycle Georget Tex*. 2009;8(16):2664–6.
112. Li Y, Meng X, Wang W, Liu F, Hao Z, Yang Y, et al. Cardioprotective Effects of SIRT6 in a Mouse Model of Transverse Aortic Constriction-Induced Heart Failure. *Front Physiol*. 2017;8.
113. Ioris RM, Galié M, Ramadori G, Anderson JG, Charollais A, Konstantinidou G, et al. SIRT6 Suppresses Cancer Stem-like Capacity in Tumors with PI3K Activation Independently of Its Deacetylase Activity. *Cell Rep*. 2017;18(8):1858–68.
114. Kawahara TLA, Michishita E, Adler AS, Damian M, Berber E, Lin M, et al. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to control of NF- κ B dependent gene expression and organismal lifespan. *Cell*. 2009;136(1):62–74.
115. Van Meter M, Mao Z, Gorbunova V, Seluanov A. SIRT6 overexpression induces massive apoptosis in cancer cells but not in normal cells. *Cell Cycle*. 2011;10(18):3153–8.
116. Voelter-Mahlknecht S, Letzel S, Mahlkecht U. Fluorescence in situ hybridization and chromosomal organization of the human Sirtuin 7 gene. *Int J Oncol*. 2006;28(4):899–908.
117. Barber MF, Michishita-Kioi E, Xi Y, Tasselli L, Kioi M, Moqtaderi Z, et al. SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. *Nature*. 2012;487(7405):114–8.
118. Kiran S, Anwar T, Kiran M, Ramakrishna G. Sirtuin 7 in cell proliferation, stress and disease: Rise of the Seventh Sirtuin! *Cell Signal*. 2015;27(3):673–82.
119. Paredes S, Villanova L, Chua KF. Molecular Pathways: Emerging Roles of Mammalian Sirtuin SIRT7 in Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2014;20(7):1741–6.
120. Kim JK, Noh JH, Jung KH, Eun JW, Bae HJ, Kim MG, et al. Sirtuin7 oncogenic potential in human hepatocellular carcinoma and its regulation by the tumor suppressors MiR-125a-5p and MiR-125b. *Hepatology Baltim Md*. 2013;57(3):1055–67.
121. Lee HS, Jung W, Lee E, Chang H, Choi JH, Kim HG, et al. SIRT7, H3K18ac, and ELK4 Immunohistochemical Expression in Hepatocellular Carcinoma. *J Pathol Transl Med*. 2016;50(5):337–44.
122. Li L, Bhatia R. The controversial role of Sirtuins in tumorigenesis — SIRT7 joins the debate. *Cell Res*. 2013;23(1):10–2.
123. Blank MF, Grummt I. The seven faces of SIRT7. *Transcription*. 2017;8(2):67–74.
124. Hubbi ME, Hu H, Kshitiz, Gilkes DM, Semenza GL. Sirtuin-7 Inhibits the Activity of Hypoxia-inducible Factors. *J Biol Chem*. 2013;288(29):20768–75.
125. Vazquez BN, Thackray JK, Serrano L. Sirtuins and DNA damage repair: SIRT7 comes to play. *Nucleus*. 2017;8(2):107–15.

126. Vazquez BN, Thackray JK, Simonet NG, Kane-Goldsmith N, Martinez-Redondo P, Nguyen T, et al. SIRT7 promotes genome integrity and modulates non-homologous end joining DNA repair. *EMBO J.* 2016 15;35(14):1488–503.
127. Panier S, Boulton SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(1):7–18.
128. Güleç GU, Turgut YB. Real-Time PCR: Advanced Technologies and Applications. In: Turgut M, Challa S, Akhaddar A, editors. *Fungal Infections of the Central Nervous System: Pathogens, Diagnosis, and Management.* 2019 p. 463–9.
129. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res.* 2004;64(15):5245–50.
130. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett.* 2004;26(6):509–15.
131. Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, Györfy B, Schmitt WD, Darb-Esfahani S, et al. Cutoff Finder: A Comprehensive and Straightforward Web Application Enabling Rapid Biomarker Cutoff Optimization. *PLOS ONE.* 2012;7(12):e51862.
132. Park S, Koo JS, Kim MS, Park HS, Lee JS, Lee JS, et al. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *Breast Edinb Scotl.* 2012;21(1):50–7.
133. Wiechmann L, Sampson M, Stempel M, Jacks LM, Patil SM, King T, et al. Presenting features of breast cancer differ by molecular subtype. *Ann Surg Oncol.* 2009;16(10):2705–10.
134. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis.* 2010;31(1):27–36.
135. Wang C, Yang W, Dong F, Guo Y, Tan J, Ruan S, et al. The prognostic role of Sirt1 expression in solid malignancies: a meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8(39):66343–51.
136. Rifai K, Judes G, Idrissou M, Daures M, Bignon Y-J, Penault-Llorca F, et al. Dual SIRT1 expression patterns strongly suggests its bivalent role in human breast cancer. *Oncotarget.* 2017;8(67):110922–30.
137. Wang R-H, Zheng Y, Kim H-S, Xu X, Cao L, Lahusen T, et al. Interplay among BRCA1, SIRT1 and Survivin during BRCA1-Associated Tumorigenesis. *Mol Cell.* 2008;32(1):11–20.
138. Yamakuchi M, Lowenstein CJ. MiR-34, SIRT1 and p53: the feedback loop. *Cell Cycle Georget Tex.* 2009;8(5):712–5.
139. Gasco M, Shami S, Crook T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2002;4(2):70.
140. Pogoda K, Niwińska A, Sarnowska E, Nowakowska D, Jagiełło-Gruszfeld A, Siedlecki J, et al. Effects of BRCA Germline Mutations on Triple-Negative Breast Cancer Prognosis. *J Oncol.* 2020;2020.

141. Lee M, Park IA, Heo S-H, Kim Y-A, Gong G, Lee HJ. Association between p53 Expression and Amount of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancer. *J Pathol Transl Med.* 2019;53(3):180–7.
142. Lahusen TJ, Kim S-J, Miao K, Huang Z, Xu X, Deng C-X. BRCA1 function in the intra-S checkpoint is activated by acetylation via a pCAF/SIRT1 axis. *Oncogene.* 2018;37(17):2343–50.
143. Chung YR, Kim H, Park SY, Park IA, Jang JJ, Choe J-Y, et al. Distinctive role of SIRT1 expression on tumor invasion and metastasis in breast cancer by molecular subtype. *Hum Pathol.* 2015;46(7):1027–35.
144. Simic P, Williams EO, Bell EL, Gong JJ, Bonkowski M, Guarente L. SIRT1 Suppresses the Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Metastasis and Organ Fibrosis. *Cell Rep.* 2013;3(4).
145. Yuan J, Minter-Dykhouse K, Lou Z. A c-Myc–SIRT1 feedback loop regulates cell growth and transformation. *J Cell Biol.* 2009;185(2):203–11.
146. Elangovan S, Ramachandran S, Venkatesan N, Ananth S, Gnana-Prakasam JP, Martin PM, et al. SIRT1 is essential for oncogenic signaling by estrogen/estrogen receptor α in breast cancer. *Cancer Res.* 2011;71(21):6654–64.
147. Chung SY, Jung YY, Park IA, Kim H, Chung YR, Kim JY, et al. Oncogenic role of SIRT1 associated with tumor invasion, lymph node metastasis, and poor disease-free survival in triple negative breast cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2016;33(2):179–85.
148. Yi YW, Kang HJ, Kim HJ, Kong Y, Brown ML, Bae I. Targeting Mutant p53 by a SIRT1 Activator YK-3-237 Inhibits the Proliferation of Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Oncotarget.* 2013;4(7):984–94.
149. Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, et al. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell.* 2001;107(2):149–59.
150. Santolla MF, Avino S, Pellegrino M, De Francesco EM, De Marco P, Lappano R, et al. SIRT1 is involved in oncogenic signaling mediated by GPER in breast cancer. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1834.
151. Chen J, Zhang B, Wong N, Lo AWI, To K-F, Chan AWH, et al. Sirtuin 1 is upregulated in a subset of hepatocellular carcinomas where it is essential for telomere maintenance and tumor cell growth. *Cancer Res.* 2011;71(12):4138–49.
152. Jang KY, Noh SJ, Lehwald N, Tao G-Z, Bellovin DI, Park HS, et al. SIRT1 and c-Myc promote liver tumor cell survival and predict poor survival of human hepatocellular carcinomas. *PLoS One.* 2012;7(9):e45119.
153. Feng AN, Zhang LH, Fan XS, Huang Q, Ye Q, Wu HY, et al. Expression of SIRT1 in gastric cardiac cancer and its clinicopathologic significance. *Int J Surg Pathol.* 2011;19(6):743–50.
154. Kriegl L, Vieth M, Kirchner T, Menssen A. Up-regulation of c-MYC and SIRT1 expression correlates with malignant transformation in the serrated route to colorectal cancer. *Oncotarget.* 2012;3(10):1182–93.

155. Jin J, Chu Z, Ma P, Meng Y, Yang Y. SIRT1 promotes the proliferation and metastasis of human pancreatic cancer cells. *Tumor Biol.* 2017;39(3):1010428317691180.
156. Shuang T, Wang M, Zhou Y, Shi C. Over-expression of Sirt1 contributes to chemoresistance and indicates poor prognosis in serous epithelial ovarian cancer (EOC). *Med Oncol Northwood Lond Engl.* 2015;32(12):260.
157. Alhazzazi TY, Kamarajan P, Verdin E, Kapila YL. SIRT3 and Cancer: Tumor Promoter or Suppressor? *Biochim Biophys Acta.* 2011;1816(1):80–8.
158. Desouki MM, Doubinskaia I, Gius D, Abdulkadir SA. Decreased mitochondrial SIRT3 expression is a potential molecular biomarker associated with poor outcome in breast cancer. *Hum Pathol.* 2014;45(5):1071–7.
159. Ashraf N, Zino S, Macintyre A, Kingsmore D, Payne AP, George WD, et al. Altered sirtuin expression is associated with node-positive breast cancer. *Br J Cancer.* 2006;95(8):1056–61.
160. Park S-H, Ozden O, Jiang H, Cha YI, Pennington JD, Aykin-Burns N, et al. Sirt3, Mitochondrial ROS, Ageing, and Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2011;12(9):6226–39.
161. Sarmiento-Salinas FL, Delgado-Magallón A, Montes-Alvarado JB, Ramírez-Ramírez D, Flores-Alonso JC, Cortés-Hernández P, et al. Breast Cancer Subtypes Present a Differential Production of Reactive Oxygen Species (ROS) and Susceptibility to Antioxidant Treatment. *Front Oncol.* 2019;9.
162. He S, He C, Yuan H, Xiong S, Xiao Z, Chen L. The SIRT 3 expression profile is associated with pathological and clinical outcomes in human breast cancer patients. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2014;34(6):2061–9.
163. Chen Y, Zhang J, Lin Y, Lei Q, Guan K-L, Zhao S, et al. Tumour suppressor SIRT3 deacetylates and activates manganese superoxide dismutase to scavenge ROS. *EMBO Rep.* 2011;12(6):534–41.
164. Torrens-Mas M, Pons DG, Sastre-Serra J, Oliver J, Roca P. SIRT3 Silencing Sensitizes Breast Cancer Cells to Cytotoxic Treatments Through an Increment in ROS Production. *J Cell Biochem.* 2017;118(2):397–406.
165. Podgorski II, Pinterić M, Sobočanec S, Popović Hadžija M, Paradžik M, Dekanić A, et al. The effect of Sirt3 expression on human breast cancer cells in normoxia and hyperoxia. *Libri Oncol.* 2018;25.
166. Yang G-C, Fu B-C, Zhang D-Y, Sun L, Chen W, Bai L, et al. The Expression and Related Clinical Significance of SIRT3 in Non-Small-Cell Lung Cancer. Vol. 2017, *Disease Markers.* Hindawi; 2017 p. e8241953.
167. Xiong Y, Wang M, Zhao J, Wang L, Li X, Zhang Z, et al. SIRT3 is correlated with the malignancy of non-small cell lung cancer. *Int J Oncol.* 2017;50(3):903–10.
168. Alhazzazi TY, Kamarajan P, Joo N, Huang J-Y, Verdin E, D’Silva NJ, et al. Sirtuin-3 (SIRT3), a novel potential therapeutic target for oral cancer. *Cancer.* 2011;117(8):1670–8.
169. Zhao Y, Yang H, Wang X, Zhang R, Wang C, Guo Z. Sirtuin-3 (SIRT3) expression is associated with overall survival in esophageal cancer. *Ann Diagn Pathol.* 2013;17(6):483–5.

170. Liu C, Huang Z, Jiang H, Shi F. The Sirtuin 3 Expression Profile Is Associated with Pathological and Clinical Outcomes in Colon Cancer Patients. Vol. 2014, BioMed Research International. Hindawi; 2014 p. e871263.
171. Xiao J-B, Ma J-Q, Yakefu K, Tursun M. Effect of the SIRT3-AMPK/PPAR pathway on invasion and migration of cervical cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2020;13(10):2495–501.
172. Sundaresan NR, Samant SA, Pillai VB, Rajamohan SB, Gupta MP. SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70. *Mol Cell Biol*. 2008;28(20):6384–401.
173. Zhang Y-Y, Zhou L-M. Sirt3 inhibits hepatocellular carcinoma cell growth through reducing Mdm2-mediated p53 degradation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;423(1):26–31.
174. Xiao K, Jiang J, Wang W, Cao S, Zhu L, Zeng H, et al. Sirt3 is a tumor suppressor in lung adenocarcinoma cells. *Oncol Rep*. 2013;30(3):1323–8.
175. Yang B, Fu X, Shao L, Ding Y, Zeng D. Aberrant expression of SIRT3 is conversely correlated with the progression and prognosis of human gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;443(1):156–60.
176. Tian J, Yuan L. Sirtuin 6 inhibits colon cancer progression by modulating PTEN/AKT signaling. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. 2018;106:109–16.
177. Kugel S, Sebastián C, Fitamant J, Ross KN, Saha SK, Jain E, et al. SIRT6 Suppresses Pancreatic Cancer through Control of Lin28b. *Cell*. 2016;165(6):1401–15.
178. Min L, Ji Y, Bakiri L, Qiu Z, Cen J, Chen X, et al. Liver cancer initiation is controlled by AP-1 through SIRT6-dependent inhibition of survivin. *Nat Cell Biol*. 2012;14(11):1203–11.
179. Zhang J, Yin X-J, Xu C-J, Ning Y-X, Chen M, Zhang H, et al. The histone deacetylase SIRT6 inhibits ovarian cancer cell proliferation via down-regulation of Notch 3 expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(5):818–24.
180. Bae JS, Park S-H, Jamiyandorj U, Kim KM, Noh SJ, Kim JR, et al. CK2 α /CSNK2A1 Phosphorylates SIRT6 and Is Involved in the Progression of Breast Carcinoma and Predicts Shorter Survival of Diagnosed Patients. *Am J Pathol*. 2016;186(12):3297–315.
181. Igci M, Kalender ME, Borazan E, Bozgeyik I, Bayraktar R, Bozgeyik E, et al. High-throughput screening of Sirtuin family of genes in breast cancer. *Gene*. 2016;586(1):123–8.
182. Wang D, Li C, Zhang X. The promoter methylation status and mRNA expression levels of CTCF and SIRT6 in sporadic breast cancer. *DNA Cell Biol*. 2014;33(9):581–90.
183. Yang T-L, Su Y-R, Huang C-S, Yu J-C, Lo Y-L, Wu P-E, et al. High-resolution 19p13.2-13.3 allelotyping of breast carcinomas demonstrates frequent loss of heterozygosity. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004;41(3):250–6.
184. Marquardt JU, Fischer K, Baus K, Kashyap A, Ma S, Krupp M, et al. Sirtuin-6-dependent genetic and epigenetic alterations are associated with poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma patients. *Hepatology*. 2013;58(3):1054–64.

185. Thirumurthi U, Shen J, Xia W, LaBaff AM, Wei Y, Li C-W, et al. MDM2-mediated degradation of SIRT6 phosphorylated by AKT1 promotes tumorigenesis and trastuzumab resistance in breast cancer. *Sci Signal*. 2014;7(336):ra71.
186. Zhang C, Yu Y, Huang Q, Tang K. SIRT6 regulates the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma via the ERK1/2 signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2019;20(2):1575–82.
187. Liu Y, Xie QR, Wang B, Shao J, Zhang T, Liu T, et al. Inhibition of SIRT6 in prostate cancer reduces cell viability and increases sensitivity to chemotherapeutics. *Protein Cell*. 2013;4(9):702–10.
188. Ming M, Han W, Zhao B, Sundaresan NR, Deng C-X, Gupta MP, et al. SIRT6 Promotes COX-2 Expression and Acts as an Oncogene in Skin Cancer. *Cancer Res*. 2014;74(20):5925–33.
189. Van Gool F, Gallí M, Gueydan C, Kruys V, Prevot P-P, Bedalov A, et al. Intracellular NAD levels regulate tumor necrosis factor protein synthesis in a sirtuin-dependent manner. *Nat Med*. 2009;15(2):206–10.
190. McGlynn L, Curle J, Edwards J, Shiels P. Evaluating the Role of Sirtuins 5, 6 & 7 in Breast Cancer. *Cancer Res*. 2009;69(24 Supplement):3034–3034.
191. Aljada A, Saleh A, Alkathiri M, Bani Shamsa H, Al-Bawab A, Nasr A. Altered Sirtuin 7 Expression is Associated with Early Stage Breast Cancer. *Breast Cancer Basic Clin Res*. 2015;2015:3–8.
192. Ford E, Voit R, Liszt G, Magin C, Grummt I, Guarente L. Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes Dev*. 2006;20(9):1075–80.
193. Zhang S, Chen P, Huang Z, Hu X, Chen M, Hu S, et al. Sirt7 promotes gastric cancer growth and inhibits apoptosis by epigenetically inhibiting miR-34a. *Sci Rep*. 2015;5.
194. Wang H-L, Lu R-Q, Xie S-H, Zheng H, Wen X-M, Gao X, et al. SIRT7 Exhibits Oncogenic Potential in Human Ovarian Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2015;16(8):3573–7.
195. Shi H, Ji Y, Zhang D, Liu Y, Fang P. MicroRNA-3666-induced suppression of SIRT7 inhibits the growth of non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep*. 2016;36(5):3051–7.
196. Grummt I. Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1999;62:109–54.
197. Chen K-L, Li L, Yang F-X, Li C-M, Wang Y-R, Wang G-L. SIRT7 depletion inhibits cell proliferation, migration and increases drug sensitivity by activating p38MAPK in breast cancer cells. *J Cell Physiol*. :n/a-n/a.
198. Geng Q, Peng H, Chen F, Luo R, Li R. High expression of Sirt7 served as a predictor of adverse outcome in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(2):1938–45.
199. Yu H, Ye W, Wu J, Meng X, Liu R, Ying X, et al. Overexpression of Sirt7 Exhibits Oncogenic Property and Serves as a Prognostic Factor in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2014;20(13):3434–45.

200. Tang X, Shi L, Xie N, Liu Z, Qian M, Meng F, et al. SIRT7 antagonizes TGF- β signaling and inhibits breast cancer metastasis. *Nat Commun.* 2017;8(1):318.
201. Seligson DB, Horvath S, McBrian MA, Mah V, Yu H, Tze S, et al. Global levels of histone modifications predict prognosis in different cancers. *Am J Pathol.* 2009;174(5):1619–28.
202. Barber MF, Michishita-Kioi E, Xi Y, Tasselli L, Kioi M, Moqtaderi Z, et al. SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. *Nature.* 2012;487(7405):114–8.
203. Moreno DA, Scrideli CA, Cortez MAA, de Paula Queiroz R, Valera ET, da Silva Silveira V, et al. Differential expression of HDAC3, HDAC7 and HDAC9 is associated with prognosis and survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2010;150(6):665–73.
204. Weichert W. HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer Lett.* 2009;280(2):168–76.
205. Witt AE, Lee C-W, Lee TI, Azzam DJ, Wang B, Caslini C, et al. Identification of a cancer stem cell-specific function for the histone deacetylases, HDAC1 and HDAC7, in breast and ovarian cancer. *Oncogene.* 2017;36(12):1707–20.
206. Yano M, Yasuda M, Sakaki M, Nagata K, Fujino T, Arai E, et al. Association of histone deacetylase expression with histology and prognosis of ovarian cancer. *Oncol Lett.* 2018;15(3):3524–31.
207. Yu Y, Cao F, Yu X, Zhou P, Di Q, Lei J, et al. The expression of HDAC7 in cancerous gastric tissues is positively associated with distant metastasis and poor patient prognosis. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex.* 2017;19(8):1045–54.
208. Li Q-G, Xiao T, Zhu W, Yu Z-Z, Huang X-P, Yi H, et al. HDAC7 promotes the oncogenicity of nasopharyngeal carcinoma cells by miR-4465-EphA2 signaling axis. *Cell Death Dis.* 2020;11(5):1–13.
209. Gao S, Liu H, Hou S, Wu L, Yang Z, Shen J, et al. MiR-489 suppresses tumor growth and invasion by targeting HDAC7 in colorectal cancer. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex.* 2018;20(6):703–12.
210. Zhou Q, Atadja P, Davidson NE. Histone deacetylase inhibitor LBH589 reactivates silenced estrogen receptor alpha (ER) gene expression without loss of DNA hypermethylation. *Cancer Biol Ther.* 2007;6(1):64–9.
211. Sabnis GJ, Goloubeva O, Chumsri S, Nguyen N, Sukumar S, Brodie AMH. Functional activation of the estrogen receptor- α and aromatase by the HDAC inhibitor entinostat sensitizes ER-negative tumors to letrozole. *Cancer Res.* 2011;71(5):1893–903.
212. Huang JP, Ling K. EZH2 and histone deacetylase inhibitors induce apoptosis in triple negative breast cancer cells by differentially increasing H3 Lys27 acetylation in the BIM gene promoter and enhancers. *Oncol Lett.* 2017;14(5):5735–42.
213. Su Y, Hopfinger NR, Nguyen TD, Pogash TJ, Santucci-Pereira J, Russo J. Epigenetic reprogramming of epithelial mesenchymal transition in triple negative breast cancer cells with DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors. *J Exp Clin Cancer Res CR.* 2018;37.

214. Zhang Q, Wang T, Geng C, Zhang Y, Zhang J, Ning Z, et al. Exploratory clinical study of chidamide, an oral subtype-selective histone deacetylase inhibitor, in combination with exemestane in hormone receptor-positive advanced breast cancer. *Chin J Cancer Res Chung-Kuo Yen Cheng Yen Chiu*. 2018;30(6):605–12.
215. Ediriweera MK, Tennekoon KH, Samarakoon SR. Emerging role of histone deacetylase inhibitors as anti-breast-cancer agents. *Drug Discov Today*. 2019;24(3):685–702.

Biografija

Bojana M. Uzelac (rođena Milićević), rođena je 13. avgusta 1985. godine u Beogradu. Diplomirala je na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu (studijska grupa Molekularna biologija, usmerenje Eksperimentalna biomedicina) 2011. godine sa prosečnom ocenom 8,76. Diplomski rad sa temom "Ispitivanje sijalinizacije CA125 antigena iz amnionske tečnosti" uradila je u laboratoriji Odeljenja za imunohemiju i glikobiologiju Instituta za primenu nuklearne energije-INEP. Školske 2012/2013. godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na modulu Biologija, smer Genetika.

Od 2012. godine je zaposlena u laboratoriji za Molekulsku genetiku Instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije u Beogradu, gde je uključena kako u dijagnostičke aktivnosti laboratorije, tako i u naučno-istraživački rad. Od 2013. godine je uključena u nastavu na osnovnim studijama na Medicinskom fakultetu Vojnomedicinske akademije kao saradnik za vežbe na predmetima Humana genetika i Klinička genetika.

2020. godine je završila akademsku specijalizaciju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Biologija, modul Imunobiologija sa mikrobiologijom. Rad sa naslovom „Povezanost polimorfizma nukleotidne sekvence RS4143815 i RS822336 u *PD-L1* genu sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijenata sa oralnim karcinomom“ je realizovan u okviru Instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije.

Do sada ima objavljena ukupno 3 naučna rada u međunarodnim časopisima kategorija M21, M22 i M23, kao i 2 saopštenja na kongresima sa međunarodnim učešćem. Rezultati doktorske disertacije su do sada objavljeni u 2 naučna časopisa.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Bojana M. Uzelac

Broj indeksa B3040/2012

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

“Prognostički značaj ekspresije gena za histon-deacetilaze kod pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke”

- 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.

U Beogradu, 28.04.2021.

Potpis autora



Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Bojana M.Uzelac

Broj indeksa B3040/2012

Studijski program Biologija

Naslov rada “Prognostički značaj ekspresije gena za histon-deacetilaze kod pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke”

Mentori prof. dr Gordana Šupić, prof. dr Katarina Zeljić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjivanja u Digitalnom repozitorijumu 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.

U Beogradu, 28.04.2021.

Potpis autora



Izjava o korišćenju

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

“Prognostički značaj ekspresije gena za histon-deacetilaze kod pacijentkinja sa trostruko-negativnim i hormon receptor-pozitivnim karcinomom dojke”

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 (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.

Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

U Beogradu, 28.04.2021.

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.