

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

mr Milena M. Krajnović

**Prognostički značaj aberantne metilacije  
CpG ostrvaca u folikularnim i difuznim  
B-krupnoćelijskim limfomima čoveka**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Mr. sci. Milena M. Krajnović

**Prognostic significance of aberrant CpG  
islands methylation in human follicular  
and diffuse large B-cell lymphoma**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

## **Mentori**

dr Kovička Krtolica Žikić, naučni savetnik Instituta za nuklearne nauke „Vinča“

dr Goran Brajušković, docent Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

## **Članovi komisije**

dr Milica Radojković, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Ova doktorska disertacija je osmišljena i urađena u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, u okviru projekta „Molekularne determinante za dizajn tumor markera“. U realizaciji ovog rada su učestvovala brojne kolege i prijatelji.*

*Najveću zahvalnost dugujem dr Kovički Krtolica Žikić, mom mentoru, na ukazanom poverenju, razumevanju i strpljenju, kao i na stručnoj pomoći i znanju koje mi je prenela, tokom svih ovih godina.*

*Doc. dr Goranu Brajuškoviću, komentoru, zahvaljujem se na razumevanju i korektnom odnosu prilikom izrade teze.*

*Veliku zahvalnost dugujem i doc. dr Milici Radojković, članu komisije, na profesionalnom odnosu, prijateljskom stavu i korisnim sugestijama prilikom izrade teze.*

*Posebno se zahvaljujem svom profesoru i rukovodiocu projekta, prof. dr Bogomiru Dimitrijeviću, na pruženoj šansi i podršci da se bavim istraživanjima u oblasti molekularne genetike kancera.*

*Zahvaljujem se i svim kolegama iz Laboratorije za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, a posebno dr Snežani Jovanović Čupić, na svakodnevnoj podršci, nesebičnoj pomoći i prijateljskim savetima, kao i dr Vesni Mandušić na korisnim sugestijama i pomoći pri statističkoj obradi rezultata. Želela bih da se zahvalim i kolegama Radoslavu Davidoviću dipl. molekularnom biologu i Ani Božović, dipl. biologu, na praktičnoj pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dela teze i prijateljskoj atmosferi, bez koje bi sve ovo bilo mnogo teže.*

*Zahvaljujem se i svim kolegama sa Institutu za hematologiju KCS, VMA, Klinici za internu medicinu KBC Dr Dragiša Mišović, u Beogradu i Institutu za onkologiju Vojvodine, Sremska Kamenica, koji su neposredno ili posredno učestvovali u izradi ove teze. Posebno bih izdvojila dragu saradnicu, mr Nadu Kraguljac Kurtović, sa Institutu za hematologiju KCS u Beogradu, na velikom entuzijazmu i nesebičnoj pomoći prilikom rešavanja različitih problema koji su se javljali prilikom izrade ove teze.*

*Dragom kumu Đorđu Čupiću dugujem zahvalnost za tehnička rešenja prilikom finalnog uobličavanja teze.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem svojoj porodici na beskrajnoj ljubavi, podršci i razumevanju koje su mi pružili.*

## ***Prognostički značaj aberantne metilacije CpG ostrvaca u folikularnim i difuznim B-krupnoćelijskim limfomima čoveka***

### *Rezime*

Difuzni B-krupnoćelijski limfom (DBKL) i folikularni limfom (FL), predstavljaju najučestalije entitete nehoćkinovih limfoma i zajedno čine oko 50 % svih B-ćelijskih neoplazija. To su klinički i biološki heterogena oboljenja, sa visoko varijabilnim odgovorom na terapiju i uprkos značajnom napretku u terapiji, u velikom broju slučajeva ostaju neizlečiva. Aktuelni terapijski pristupi su praćeni brojnim neželjenim efektima i dovode do dugotrajne remisije i preživljavanja kod svega 50 % bolesnika. Najznačajniji klinički prediktor ishoda bolesti do danas je internacionalni prognostički indeks (IPI za DBKL, odnosno, FLIPI za FL), koji obuhvata odgovarajuće kliničke prognostičke parametre. Uprkos tome, oboleli koji pripadaju istim IPI/FLIPI kategorijama ispoljavaju značajne razlike u odgovoru na terapiju i preživljavanju, što ukazuje na postojanje značajne biološke heterogenosti u okviru svake IPI/FLIPI kategorije. Zbog toga je neophodno pronalaženje novih prognostičkih molekularnih parametara, koji bi omogućili precizniju podelu obolelih u grupe različitog stepena rizika i izbor odgovarajuće terapije. Primenom PCR metode specifične za metilaciju (MSP), ispitivan je metilacioni status *p16*, *p15*, *MGMT* i *DAPK* gena kod obolelih od DBKL i FL, kao bi se utvrdio njihov potencijalni prognostički značaj. Kod obolelih od DBKL, metilacija nijednog gena nije pokazala prognostički značaj, mada je uočena tendencija ka akumulaciji metilacije *p15* gena kod ispitanika sa povoljnijim kliničko-patološkim karakteristikama. Kod obolelih od FL metilacija *p16*, *p15* i *MGMT* gena bi mogla da ima određeni prognostički značaj, ukoliko se kombinuje sa FLIPI, gradusom tumora, odnosno starosnim dobom obolelihi. Istovremena metilacija *MGMT* i *DAPK* gena bi mogla da ukaže na grupu obolelih potencijalno hemorezistentnih na primenjenu hemoterapiju i sklonu recidivima bolesti.

***Ključne reči:*** difuzni B-krupnoćelijski limfom (DBKL), folikularni limfom (FL), metilacija, *p16*, *p15*, *MGMT*, *DAPK*

***Naučna oblast:*** Molekularna biologija

***Uža naučna oblast:*** Molekularna genetika kancera

***UDK broj:*** 577.21: 616-006.44 (043.3)

***Prognostic significance of aberrant CpG islands methylation in human follicular and diffuse large B-cell lymphoma***

*Abstract*

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and follicular lymphoma (FL) are the most common subgroups of non-Hodgkin's lymphoma and comprise approximately 50 % of all cases. They represent clinically and biologically heterogeneous diseases, characterized with highly variable response to the treatment, and remain incurable despite the significant advances in therapy. Actual therapy regimens are aggressive, and long-term remission and survival are achieved in only 50 % of patients. The strongest clinical predictor of outcome to date in DLBCL and FL patients is the International Prognostic Index (IPI for DLBCL and FLIPI for FL) which includes several clinicopathological prognostic parameters. However, patients with identical IPI/FLIPI still exhibit marked variability in survival, suggesting the presence of significant biological heterogeneity within the same risk category. So, it is important to investigate additional molecular markers in order to further stratify patients into different risk groups, choose appropriate treatment strategy and improve prognosis. In this study, methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) was used to investigate the role and potential prognostic significance of the methylation status of *p16*, *p15*, *MGMT* and *DAPK* genes in patients with DLBCL and FL. No one of four examined genes showed prognostic significance in patients with DLBCL, though we observed a tendency toward accumulation of *p15* methylation with favorable clinicopathological parameters. However, in patients with FL, our results suggest that promoter methylation of *p16*, *p15* and *MGMT* genes could have some prognostic value when used in combination with the FLIPI, tumor grade and patients age, respectively. Concurrent methylation of *MGMT* and *DAPK* genes could be the marker of tumor chemoresistance and disease recurrence.

**Keywords:** Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), Follicular lymphoma (FL), Methylation, *p16*, *p15*, *MGMT*, *DAPK*

**Scientific field:** Molecular biology

**Special topic:** Molecular genetics of cancer

**UDC number:** 577.21: 616-006.44 (043.3)

## SKRAĆENICE

**ABC-DBKL**, difuzni B-krupnoćelijski limfom poreklom od aktiviranih B ćelija (eng. *activated B cell like diffuse large B-cell lymphoma, ABC-DLBCL*)

**ALCL**, anaplastični limfom velikih T ćelija (eng. *anaplastic large T-cell lymphoma, ALCL*)

**ALK**, anaplastična limfomska kinaza (eng. *anaplastic lymphoma kinase, ALK*)

**AML**, akutna mijeloidna leukemija (eng. *acute myeloid leukemia, AML*)

**bcl-2**, B-ćelijski limfom 2 (eng. *B-cell lymphoma 2, bcl-2*)

**bcl-6**, B-ćelijski limfom 6 (eng. *B-cell lymphoma 6, bcl-6*)

**B-NHL**, nehoćkinov limfom B-ćelijskog tipa (eng. *B-cell non-Hodgkin lymphoma, B-NHL*)

**BL**, Burkitt-ov limfom (eng. *Burkitt lymphoma, BL*)

**bp**, bazni par (eng. *base pair, bp*)

**BS**, B simptomi (eng. *B symptoms, BS*)

**BSA**, albumin govedeg seruma (eng. *bovine serum albumin, BSA*)

**CDK**, ciklin-zavisna kinaza (eng. *cyclin-dependent kinase, CDK*)

**CD10 (CALLA)**, antigen akutne limfoblastne leukemije (eng. *common acute lymphoblastic leukemia antigen, CALLA*)

**CHOP**, ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin, prednizon (eng. *cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone, CHOP*)

**CIMP**, CpG metilator fenotip (eng. *CpG island methylator phenotype, CIMP*)

**CpG**, citozin-pirofosfat-guanin (eng. *cytosine-pyrophosphate-guanine, CpG*)

**DAPK**, „sa smrću“-asocirana protein kinaza (eng. *death-associated protein kinase, DAPK*)

**DBKL**, difuzni B-krupnoćelijski limfom (eng. *diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL*)

**ddH<sub>2</sub>O**, dejonizovana destilovana voda (eng. *deionized distilled water, ddH<sub>2</sub>O*)

**DFS**, vremenski period bez ikakvih znakova i simptoma bolesti (eng. *disease-free survival, DFS*)

**DMAPI1**, DNMT1-asociran protein 1 (eng. *DNMT1 associated protein 1, DMAPI1*)

**DMSO**, dimetil sulfoksid (eng. *dimethyl sulfoxide, DMSO*)

**DNK**, dezoksiribonukleinska kiselina (eng. *deoxyribonucleic acid, DNA*)

**DNMT**, DNK-metiltransferaza (eng. *DNA-methyltransferase, DNMT*)

**EBV**, Epštajn-Barov virus (eng. *Epstein-Barr virus, EBV*)

**ECOG**, Istočna kooperativna onkološka grupa (eng. *Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG*)

**EDTA**: etilendiaminotetrasirćetna kiselina (eng. *ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA*)

**E2F**, familija transkripcionih faktora kod viših eukariota (eng. *family of transcription factors in higher eukaryotes, E2F*)

**EtOH**: etanol (eng. *ethyl alcohol, EtOH*)

**EZH2**, enzim histon-lizin N-metiltransferaza (eng. *histone-lysine N-methyltransferase, EZH2*)

**FFS**, vremenski period do pojave progresije bolesti ili smrtnog ishoda (eng. *failure-free survival, FFS*)

**FL**, folikularni limfom (eng. *follicular lymphoma, FL*)

**FLIPI**, internacionalni prognostički indeks za FL (eng. *follicular lymphoma international prognostic index, FLIPI*)

**GC-DBKL**, DBKL poreklom od B ćelija germinativnog centra (eng. *germinal center B-cell like DLBCL, GC-DLBCL*)

**Hb**, hemoglobin (eng. *hemoglobin, Hb*)

**HDAC**, histon deacetilaza (eng. *histone deacetylase, HDAC*)

**HIV**, virus humane imunodeficijencije (eng. *human immunodeficiency virus, HIV*)

**HP1**, heterohromatinski protein 1 (eng. *heterochromatin protein 1, HP1*)

**HTLV-1**, humani T-limfotropni virus 1 (eng. *human T-cell lymphotropic virus type 1, HTLV-1*)

**H3K27me3**, lizin 27 u histonu 3, sa dodate tri metil-grupe (eng. *trimethylated Lys 27 of histone 3, H3K27me3*)

**IFN- $\alpha$** , interferon- $\alpha$  (eng. *interferon- $\alpha$ , IFN- $\alpha$* )

**INK4**, inhibitori ciklin-zavisne kinaze CDK4 (eng. *inhibitors of cyclin-dependent kinase CDK4*)

**IPI**, internacionalni prognostički indeks (eng. *international prognostic index, IPI*)

**iRNK**, informaciona RNK (eng. *informational RNK, iRNK*)



**KR**, kompletna remisija (eng. *complete remission, CR*)

**KRAB**, protein sa „Kruppel“-asociranim domenom (eng. *Kruppel-associated box, KRAB*)

**KS**, kostna srž (eng. *bone marrow, BM*)

**LDH**, laktat dehidrogenaza (eng. *lactate dehydrogenase, LDH*)

**LL**, limfoblastni limfom (eng. *lymphoblastic lymphoma, LL*)

**LSD1**, za lizin-specifična demetilaza histona 1 (eng. *lysine-specific histone demethylase 1, LSD1*)

**m**, metilovan (eng. *methylated, m*)

**MALT**, B-ćelijski limfom marginalne zone (eng. *mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma, MALT*)

**MBP**, metil-vezujući protein (eng. *methyl binding protein, MBP*)

**MBD**, metil-CpG-vezujući domen (eng. *methyl-CpG-binding domain, MBD*)

**5mC**, 5-metil citozin (eng. *5-methyl cytosine, 5mC*)

**MCL**, mantle-ćelijski limfom (eng. *mantle cell lymphoma, MCL*)

**MeCP**, metil CpG vezujući proteini (eng. *methyl CpG binding proteins MeCP*)

**MGMT**, O<sup>6</sup>-metilguanin-DNK-metiltransferaza (eng. *O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT*)

**miRNK**, mikro RNK (eng. *micro RNA, miRNA*)

**MSP**, reakcija lančane polimeraze specifična za metilaciju (eng. *methylation specific polymerase chain reaction, MSP*)

**MZL**, nodalni limfom marginalne zone (eng. *marginal zone lymphoma, MZL*)

**n**, nemetilovan (eng. *unmethylated, u*)

**ND**, ne postoji podatak (eng. *not determined, ND*)

**NL**, normalni limfociti (eng. *normal lymphocytes, NL*)

**NS**, razlika koja nije statistički značajna (eng. *not significant, NS*)

**NHL**, nehoćkinov limfom (eng. *non-Hodgkin lymphoma, NHL*)

**OD**, optička gustina (eng. *optical density, OD*)

**PAA**, poliakrilamid (eng. *polyacrylamide, PAA*)

**PB**, progresija bolesti (eng. *progressive disease, PB*)

**PK**, pozitivna kontrola (eng. *positive control, PC*)

**PR**, parcijalna remisija (eng. *partial remission, PR*)

**PRMT5**, protein arginin-metiltransferaza 5 (eng. *protein arginine methyltransferase 5, PRMT5*)

**PS**, performans status (eng. *performance status, PS*)

**PTCL**, periferni T-ćelijski limfom (eng. *peripheral T-cell lymphoma, PTCL*)

**Rb**, retinoblastoma (eng. *retinoblastoma, Rb*)

**R-CHOP**, rituksimab, ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin, prednizon (eng. *rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone, R-CHOP*)

**rDNK**, ribozomalna DNK (eng. *ribosomal DNA, rDNA*)

**RNK**, ribonukleinska kiselina (eng. *ribonucleic acid, RNA*)

**SAM**, S-adenozil-L-metionin (eng. *S-adenosyl-L-methionine, SAM*)

**SB**, stabilna bolest (eng. *stable disease, SD*)

**SLL**, mali limfocitni limfom (eng. *small lymphocytic lymphoma, SLL*)

**St**, standard (eng. *molecular weight marker, Mw*)

**SZO**, Svetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization, WHO*)

**TGF- $\beta$** , tkivni faktor rasta  $\beta$  (eng. *tissue growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$* )

**TEMED**, tetrametiletilendiamin (eng. *tetramethylethylenediamine, TEMED*)

**TNF- $\alpha$** , faktor tumorske nekroze  $\alpha$  (eng. *tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$* )

**T-NHL**, nehoćkinov limfom T-ćelijskog tipa (eng. *T-cell non-Hodgkin lymphoma, T-NHL*)

**TRAIL**, ligand srodan TNF-u, koji indukuje apoptozu (eng. *TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL*)

**TRIS**: tris hidroksimetil aminometan (eng. *tris hydroxymethyl aminomethane, TRIS*)

**VTM**, veličina tumorske mase (eng. *bulky tumor, BT*)

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Nechočkinovi limfomi.....	1
1.2. Difuzni B-krupnoćelijski limfom .....	2
1.3. Folikularni limfom.....	3
1.4. Patogeneza B-NHL limfoma .....	4
1.4.1. Genetičke karakteristike DBKL .....	5
1.4.2. Genetičke karakteristike FL .....	5
1.5. Epigenetički mehanizmi kancerogeneze .....	6
1.5.1. Metilacija DNK .....	6
1.5.1.1. Mehanizam metilacije DNK.....	7
1.5.1.2. Metilacija DNK i regulacija transkripcije .....	8
1.5.1.3. Uloga metilacije DNK u funkcionisanju normalne ćelije .....	11
1.5.1.4. Uloga metilacije DNK u kancerogenezi.....	11
1.5.1.5. Uzroci i mehanizmi aberantne metilacije DNK u kancerogenezi .....	12
1.5.1.6. Geni koji podležu hipermetilaciji u kancerogenezi .....	13
1.6. Epigenetičke promene kod DBKL i FL .....	14
1.6.1. <i>p16</i> gen .....	14
1.6.2. <i>p15</i> gen .....	16
1.6.3. <i>MGMT</i> gen.....	17
1.6.4. <i>DAPK</i> gen.....	20
1.7. Terapijski pristup kod obolelih od DBKL i FL .....	22
1.8. Prognostički parametri kod obolelih od DBKL i FL.....	23
1.8.1. Bcl-2 kao prognostički marker kod obolelih od DBKL i FL .....	24
1.8.2. Bcl-6 kao prognostički marker kod obolelih od DBKL i FL .....	25
1.8.3. CD10 kao prognostički marker kod obolelih od DBKL i FL.....	25
1.8.4. Ki67 kao prognostički marker kod obolelih od DBKL i FL .....	26
1.9. Prognostički značaj i klinička primena epigenetičkih markera .....	27
<b>2. CILJ RADA .....</b>	<b>29</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>30</b>

3.1. Materijal .....	30
3.1.1 Uzorci tkiva DBKL .....	30
3.1.2 Uzorci tkiva FL.....	33
3.1.3. Kontrolni uzorci.....	34
3.2. Metode.....	35
3.2.1. Izolacija DNK.....	35
3.2.1.1. Izolacija DNK iz parafinskih isečaka tkiva .....	35
3.2.1.2. Izolacija DNK iz limfocita periferne krvi.....	37
3.2.1.3. Merenje koncentracije izolovane DNK .....	37
3.2.2. <i>In vitro</i> metilacija DNK izolovane iz limfocita periferne krvi .....	37
3.2.3. Bisulfitna modifikacija DNK .....	38
3.2.4. Amplifikacija DNK MSP tehnikom .....	40
3.2.5. Elektroforeza .....	41
3.2.5.1. Elektroforeza na agaroznom gelu .....	42
3.2.5.2. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu .....	42
3.2.6. Statistička obrada rezultata.....	43
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>44</b>
4.1. Opšte karakteristike ispitanika obolelih od DBKL .....	44
4.1.1. Ispitivanje metilacionog statusa <i>p16</i> , <i>p15</i> , <i>MGMT</i> i <i>DAPK</i> gena u uzorcima tkiva DBKL .....	44
4.1.2. Ispitivanje povezanosti metilacionog statusa <i>p16</i> , <i>p15</i> , <i>MGMT</i> i <i>DAPK</i> gena sa kliničko-patološkim karakteristikama obolelih od DBKL .....	47
4.1.3. Ipitivanje korelacije između metilacije pojedinačnih gena .....	51
4.1.3.1. Karakteristike grupe sa kometilacijom <i>p15m/p16m</i> .....	51
4.1.3.2. Karakteristike grupe sa kometilacijom <i>p16m/DAPKm</i> .....	52
4.1.3.3. Karakteristike grupe sa kometilacijom <i>MGMTm/DAPKm</i> .....	53
4.1.4. Poređenje grupa ispitanika sa recidivom i bez recidiva bolesti kod obolelih od DBKL .....	53
4.1.5. Analiza preživljavanja kod obolelih od DBKL .....	54
4.2. Opšte karakteristike ispitanika obolelih od FL.....	58
4.2.1. Ispitivanje metilacionog statusa <i>p16</i> , <i>p15</i> , <i>MGMT</i> i <i>DAPK</i> gena u uzorcima tkiva FL .....	58

4.2.2. Ispitivanje povezanosti metilacionog statusa <i>p16</i> , <i>p15</i> , <i>MGMT</i> i <i>DAPK</i> gena sa kliničko-patološkim karakteristikama obolelih od FL .....	60
4.2.3. Molekularne i kliničko-patološke karakteristike grupe sa istovremenom metilacijom <i>MGMT</i> i <i>DAPK</i> gena ( <i>MGMTm/DAPKm</i> ) .....	62
4.2.4. Poređenje grupa ispitanika sa recidivom i bez recidiva bolesti kod obolelih od FL .....	63
4.2.5. Analiza preživljavanja kod obolelih od FL .....	64
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>73</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>91</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>93</b>

# 1. UVOD

Istraživanja u oblasti kancerogeneze koja su sprovedena u prethodne dve decenije, pružila su veliki broj dokaza koji ukazuju na to da kancer nije samo genetičko, nego i epigenetičko oboljenje (Esteller i Herman, 2002). Štaviše, utvrđeno je da između genetičkih i epigenetičkih događaja postoji međusobna povezanost koja vodi progresiju tumora od najranijih do najkasnijih stadijuma (Baylin i sar., 2001).

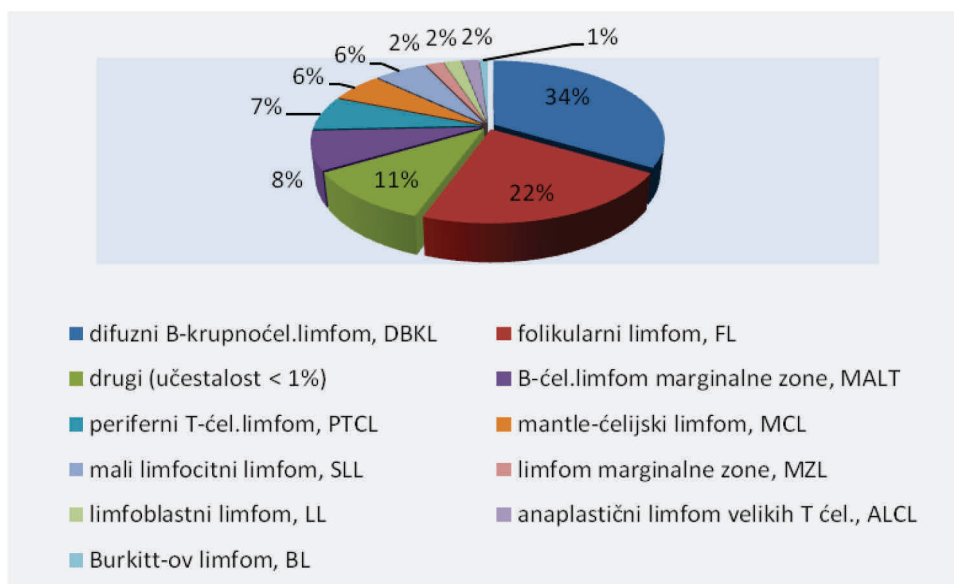
Posebno značajni podaci u tom smislu potiču iz istraživanja humanih nehočkinovih limfoma (NHL). I pored značajnog napretka u razumevanju patogeneze i molekularnih mehanizama njihovog nastanka, većina entiteta u okviru NHL još uvek predstavlja neizlečive bolesti (Jaffe i sar., 2001). Takvo stanje ukazuje na potrebu za identifikacijom novih molekularnih markera koji bi preciznije odredili biološke karakteristike tumora i njihovo kliničko ponašanje. Pronalaženjem odgovarajućih genetičkih i epigenetičkih markera, kao i otkrivanjem njihove međusobne povezanosti, stvorili bi se uslovi za kreiranje visokoeфикаsnih terapijskih pristupa (Esteller, 2003).

## 1.1. Nehočkinovi limfomi

Nehočkinovi limfomi predstavljaju heterogenu grupu neoplazmi limfnog tkiva, koje se međusobno razlikuju po biološkim i kliničkim karakteristikama. Heterogenost limfoma nastaje zbog mogućnosti maligne transformacije na bilo kom stupnju razvoja i diferencijacije B i T limfocita. NHL primarno zahvataju limfne čvorove, ali zbog rasprostranjenosti limfocita u organizmu, kao i njihove sposobnosti migracije, limfomi mogu da zahvate i druga tkiva i organe. Učestalost NHL je u stalnom porastu i oni čine oko 4.5 % svih malignih oboljenja. Prosečna starost obolelih od NHL je između šeste i sedme decenije života, a nešto češće oboljevaju muškaraci nego žene, kao i pripadnici bele rase u odnosu na ostale. Iako etiologija limfoma još uvek nije sasvim razjašnjena, glavni poznati faktori rizika za njihov nastanak su različite abnormalnosti imunog sistema, uključujući imunodeficientna stanja i autoimune bolesti. Značajnu ulogu imaju i infektivni agensi, kao što su: Epstein-Barr virus (EBV), humani herpes virus-8, virus humane imunodeficijencije (HIV), humani T-limfotropni virus (HTLV-1), *Helicobacter pylori* i *Borrelia burgdorfferi* (Jaffe i sar., 2001). Važnu ulogu u nastanku NHL imaju i

faktori spoljašnje sredine kao što su kancerogeni hemijski agensi i jonizujuće zračenje (Weisenburger, 1994). Uprkos značajnom napretku u terapiji NHL, poslednjih godina je zabeležena povećana stopa smrtnosti od ovog tipa malignih obolenja.

Savremeni sistem za klasifikaciju NHL, prema preporukama Svetske zdravstvene organizacije (SZO), uzima u obzir morfološke, imunofenotipske, genetičke i kliničke karakteristike limfoma, u cilju definisanja entiteta koji su biološki homogeni i koji imaju klinički značaj (Jaffe i sar., 2001), (Slika 1.1.). Skoro 85 % svih NHL predstavljaju limfomi B-ćelijskog tipa (B-NHL), dok na NHL T-ćelijskog tipa (T-NHL) otpada svega 15 % slučajeva NHL. Najučestaliji entiteti B-NHL su difuzni B-krupnoćelijski limfom (DBKL) i folikularni limfom (FL), koji zajedno čine oko 50 % svih B-ćelijskih neoplazija (The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997).



*Slika 1.1. Zastupljenost različitih tipova NHL prema klasifikaciji SZO*

## 1.2. Difuzni B-krupnoćelijski limfom

Difuzni B-krupnoćelijski limfom (DBKL) predstavlja najčešći tip adultnih B-NHL u zapadnim zemljama, sa učestalošću 30-40 %. DBKL spada u grupu agresivnih limfoma, i karakteriše se difuznom proliferacijom velikih neoplastičnih B limfoidnih ćelija poreklom od B ćelija germinativnog centra i postgerminativnih ćelija. Iako je prema klasifikaciji SZO izdvojen kao poseban entitet, uočava se velika heterogenost u

pogledu kliničke prezentacije, morfologije i molekularnih karakteristika (Pileri i sar., 2002, Lossos, 2005). DBKL obično nastaju *de novo*, ali u pojedinim slučajevima mogu da nastanu transformacijom hronične limfocitne leukemije ili manje agresivnih limfoma, kao što su FL, limfom marginalne zone i limfoplazmocitni limfom (Gatter i Warnke, 2001). DBKL mogu da se manifestuju u obliku nodalne i ektranodalne bolesti. Ekstranodalna lokacija bolesti ima svoje osobenosti s obzirom na kliničke karakteristike i patogenetske mehanizme (Jaffe i sar., 2001). DBKL odlikuje i morfološka heterogenost, a prema preovladavajućem morfološkom tipu ćelija razlikuje se šest podtipova DBKL: centroblastični, imunoblastični, DBKL bogat T-limfocitima/histiocitima, anaplastični, plazmoblastični i DBKL sa ćelijama sličnim Reed-Sternberg ćelijama i ekspresijom ALK proteina (Jaffe i sar., 2001). Danas ne postoji opšte prihvaćen stav o potrebi razlikovanja morfoloških podtipova DBKL, iako neke studije ukazuju na njihov mogući klinički značaj (Baars i sar., 1999, Diebold i sar., 2002).

Ćelije DBKL eksprimiraju pan-B ćelijske markere CD19, CD20, CD22, CD79a, dok je pozitivnost intracitoplazmatičnih, odnosno, površinskih imunoglobulinskih markera, kao i markera CD5, CD10, CD30 i CD45 različito izražena (Jaffe i sar., 2001).

Nedavnom primenom tehnologije mikročipova (eng. *microarray*), kojom je analizirana ekspresija velikog broja gena, identifikovane su dve glavne grupe DBKL: 1) DBKL poreklom od B ćelija germinativnog centra (GC-DBKL) i 2) DBKL poreklom od aktiviranih B ćelija (ABC-DBKL). Osim što se razlikuju po profilu genske ekspresije, navedene grupe imaju i različitu prognozu (Alizadeh i sar., 2000, Rosenwald i sar., 2002).

### **1.3. Folikularni limfom**

Folikularni limfom (FL) je drugi po učestalosti adultni B-NHL u zapadnim zemljama i obuhvata oko 22 % svih slučajeva. Spada u grupu tzv. indolentnih limfoma (The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997). FL nastaju malignom transformacijom B ćelija germinativnog centra i karakteriše ih folikularni rast. Uz klonalne B ćelije unutar neoplastičnih folikula nalaze se i folikularno specifični reaktivni T limfociti, folikularne dendritične antigen-prezentujuće ćelije, kao i



makrofagi (Harris i sar., 1999). Ovo je biološki i klinički heterogeno oboljenje, koje karakteriše visoko varijabilan odgovor na terapiju i česta pojava recidiva. Uprkos indolentnom toku bolesti i značajnom napretku u terapijskim pristupima, FL u velikom procentu ostaje neizlečiv (Fisher i sar., 2005).

Prema klasifikaciji SZO razlikuju se tri histološka tipa FL: FL gradusa I, FL gradusa II i FL gradusa III (a i b) (Mann i Berard, 1983, Harris i sar., 1999). Dok FL gradusa I i II spadaju u indolentne limfome, tumori gradusa III, naročito IIIb imaju agresivniji tok i kliničko ponašanje bolesti ima više sličnosti sa DBKL (Wendum i sar, 1997). FL imaju tendenciju da se tokom vremena transformišu u agresivnije limfome, najčešće DBKL, a ređe u Burkitt-ov ili anaplastični NHL (Bastion i sar., 1997).

FL ekspiriraju pan-B ćelijske markere CD19, CD20, CD22 i CD79a. U većem broju slučajeva ekspirirani su CD10, Bcl-2 i Bcl-6, a negativni su na CD5 i CD23 antigene (Jaffe i sar., 2001).

#### **1.4. Patogeneza B-NHL limfoma**

Iako dosta ispitivana, etiopatogeneza B-NHL još uvek nije u potpunosti razjašnjena. Zna se da je maligna transformacija normalnih B-limfocita višestepen i kompleksan proces koji uključuje akumulaciju i sinergističko delovanje višestrukih genetičkih lezija, što dovodi do aktivacije protoonkogena i inaktivacije tumor-supresor gena (Bagg i Kallakury, 1999). Za razliku od solidnih tumora, najčešći genetički poremećaji kod B-NHL su hromozomske translokacije, koje se javljaju u preko 85 % slučajeva (Ong i Le Beau, 1998) Generalno, hromozomske translokacije detektovane kod B-NHL se karakterišu postavljanjem protoonkogena sa jednog hromozoma u blizinu regulatornih sekvenci gena za imunoglobuline sa drugog hromozoma. Uobičajena posledica ovakvog rearanžmana je pojačana ekspresija protoonkogena, do čega u najvećem broju slučajeva dolazi zbog toga što translocirani gen potpada pod uticaj pojačivača regulatornog dela gena za imunoglobuline (Solomon i sar., 1991). Precizni genetički mehanizmi putem kojih se odvijaju hromozomske translokacije su nedovoljno poznati. Pretpostavlja se da translokacije koje uključuju gene za imunoglobuline predstavljaju greške mašinerije uključene u antigen-receptor genske rearanžmane, kao i somatske hipermutacije u normalnim limfoidnim ćelijama. Postojeće

translokacije obično definišu specifičnu kliničko-patološku kategoriju B-NHL i predstavljaju pogodan molekularni marker za dijagnozu i procenu odgovora na terapiju (Gaidano i sar., 1995). Pored hromozomskih translokacija, važnu ulogu u patogenezi B-NHL imaju delecije i amplifikacije odgovarajućih hromozomskih regiona, kao i tačkaste mutacije u pojedinim genima (Rossi i sar., 2005).

#### 1.4.1. Genetičke karakteristike DBKL

DBKL se karakteriše brojnim hromozomskim aberacijama. Najučestalije abnormalnosti su: hromozomske translokacije  $t(3;14)(q27;q32)$ ,  $t(8;14)(q24;q23)$  i  $t(14;18)(q32;q21)$ , koje dovode do narušene ekspresije *bcl-6* (3q27), *c-myc* (8q24) i *bcl-2* (18q21) gena (Dalla-Favera i sar., 1994), zatim, pojava dodatnih hromozoma 7, 9, 12 i X; gubitak hromozoma 1, 4, 6, 17 i Y, kao i delecije regiona 6q21-25, 1p22-36, 1q32-44, 2p23-25, 4q31-35, 13p13-14 i 17p11-13 (Dave i sar., 2002, Berglund i sar., 2002). Dektovane su i tačkaste mutacije u tumor-supresor genu *p53* (Lossos i Morgensztern, 2006), kao i u genu za  $\beta 2$ -mikroglobulin (*B2M*) (Pasqualucci i sar., 2011), a otkrivene su i amplifikacije gena *rel*, *c-myc*, *bcl-2*, *gli*, *cdk4* i *mdm2* (Rao i sar., 1998).

Klinički značaj svake pojedinačne promene nije utvrđen, ali su pojedine promene povezane sa uznapredovalim kliničkim stadijumom ili lošijim odgovorom na terapiju (Rao i sar., 1998, Jerkeman i sar., 1999, Bea i sar., 2004).

#### 1.4.2. Genetičke karakteristike FL

Patogeneza FL je kompleksan, višestepeni proces koji uključuje akumulaciju višestrukih genetičkih lezija koje dovode do selekcije malignog klona. Translokacija  $t(14;18)$  je glavno citogenetičko obeležje FL i prisutna je kod približno 90% obolelih (Tsujimoto i sar., 1985, Weiss i sar., 1987). Ovaj rearanžman dovodi do prekomerne ekspresije antiapoptotskog proteina Bcl-2 i sprečavanja programirane ćelijske smrti, apoptoze (Korsmeyer, 1992). Međutim, ovaj događaj sam po sebi nije dovoljan, već su za kompletnu malignu transformaciju i nastanak FL neophodne dodatne genetičke alteracije (Bende i sar., 2007).

U malom broju slučajeva FL se sreće translokacija  $t(2;18)(p12;q21)$ , pri čemu se *bcl-2* gen postavlja uz gen lakog lanca imunoglobulina na hromozomu 2. Takođe se

sreću i drugi genetički poremećaji kao što su delecija hromozoma 6 (6q27) (Gaidano, 1997) i poremećaji na hromozomu 17p koji su udruženi sa lošijom prognozom i transformacijom u agresivnije oblike NHL (Tilly i sar., 1994, Viardot i sar., 2002). Dodatne citogenetičke abnormalnosti FL su izrazito heterogene i najčešće uključuju promene broja hromozoma i balansirane translokacije +X, +7, +12, +12q13-14, +18, kao i delecije del6q, del13q, 1p36-, 17p13- i del10q22-24 (Viardot i sar, 2002, Lestou i sar 2003). Velika heterogenost i pojava rastućeg broja molekularnih promena sa porastom gradusa FL ukazuje na postojanje različitih puteva klonalne evolucije (Hoglund i sar., 2004).

## **1.5. Epigenetički mehanizmi kancerogeneze**

Epigenetičke promene, koje se definišu kao nasledne izmene u ekspresiji gena, a koje ne uključuje izmene u nukleotidnoj sekvenci DNK (Russo i sar., 1996), imaju važnu ulogu u procesu nastanka malignih limfoma i kancerogenezi, uopšte (Esteller, 2003). Glavni mehanizmi epigenetičke regulacije su: 1) metilacija DNK, 2) modifikacija histona i 3) regulacija ekspresije gena posredstvom regulatornih nekodirajućih molekula mikro RNK (miRNK). Navedeni epigenetički mehanizmi nisu nezavisni događaji, već deluju koordinisano u kontroli i uspostavljanju obrazaca genske ekspresije (Esteller i sar., 2001b).

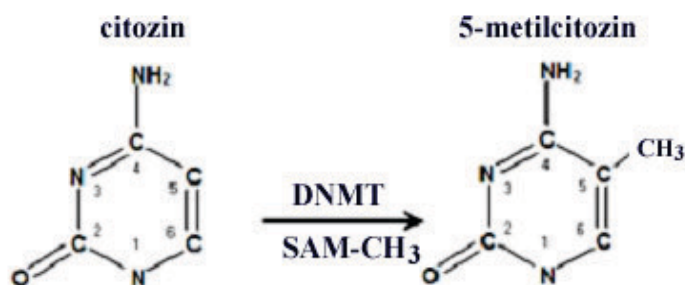
### **1.5.1. Metilacija DNK**

Najznačajnija epigenetička modifikacija u humanom genomu je metilacija citozinskih ostataka u okviru CpG dinukleotida. Genom eukariota nije metilovan uniformno, već sadrži metilovane regione sa mozaično raspoređenim nemetilovanim domenima (Bird, 1986). Metilovani regioni su karakteristični za veći deo genoma koji se odlikuje kondenzovanim hromatinom, odsustvom transkripcije i kasnom replikacijom (Tazi i Bird, 1990). Najveći broj metilovanih CpG dinukleotida je smešten u repetitivnim sekvencama (satelitski i centromerni ponovci, rDNK) (Fruhwald i Plass, 2002, Herman i Baylin, 2003), kao i u retrovirusnim i transpozonskim sekvencama koje čine oko 40 % humanog genoma (Yoder, 1997). Metilacija ovih elementa predstavlja zaštitni mehanizam kojim se sprečava njihova transkripciona aktivacija koja bi mogla

da dovede do narušavanja integriteta i stabilnosti genoma (Bestor, 1990). Nasuprot većini genoma, postoje manji regioni DNK, nazvani „CpG ostrvca“, veličine 0.5-5 kb, sa pojavljivanjem na svakih 100 kb, koji imaju drugačije odlike. Ovi regioni su nemetilovani, bogati CG parovima (60-70 %), sa odnosom CpG/GpC najmanje 0.6 (Antequera i Bird., 1993, Cross i Bird, 1995). Hromatin u okolini CpG ostrvaca se odlikuje otvorenijom strukturom, veoma je acetilovan, histon H1 je prisutan u veoma malim količinama i nema nukleozoma, što je povezano sa aktivnom transkripcijom (Tazi i Bird, 1990). Približno polovina svih humanih gena, uključujući „housekeeping“ gene koji se konstitutivno eksprimiraju u svim ćelijama, kao i pojedine tkivno-specifične gene, sadrži CpG ostrvca u svojim promotorima i prvom egzonu (Antequera i Bird., 1993, Cross i Bird, 1995). CpG ostrvca ovih regiona su nemetilovana pod normalnim uslovima, što je povezano sa njihovom aktivnom transkripcijom. Izuzetak predstavljaju geni na inaktiviranom X hromozomu ženki (Panning i Jaenisch, 1998) i odgovarajući autozomalni geni inaktivirani imprintingom (Li i sar., 1993), a primećeno je da CpG ostrvca pojedinih gena postaju progresivno metilovana sa starenjem (Issa, 2000).

### 1.5.1.1. Mehanizam metilacije DNK

Metilacija DNK je postreplikativni proces koji se odvija uz međusobno delovanje bar tri različita enzima iz familije DNK-metiltransferaza (DNMT) (Robertson i Wolfee, 2000). Ovi enzimi katalizuju kovalentno dodavanje metil grupe na C5 poziciju citozinskog prstena u okviru CpG sekvence (Slika 1.2.), uz učešće S-adenozil-L-metionina (SAM) kao donora metil grupe (Bird, 1996).

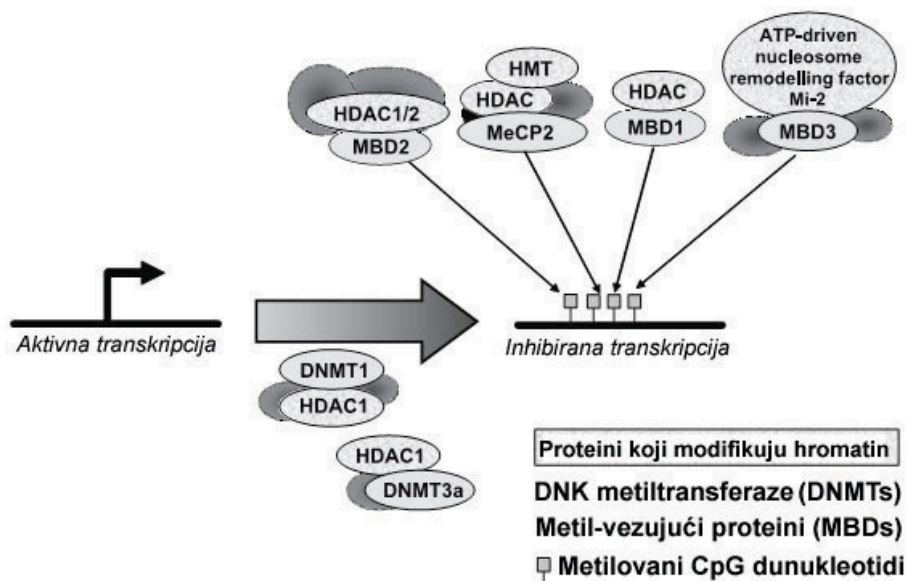


*Slika 1.2. Mehanizam metilacije citozina (Herman i Baylin, 2003)*

Dok je DNMT1 prevashodno zadužena za održavanje postojećih metilacionih obrazaca, DNMT3a/DNMT3b kompleks ima ulogu u *de novo* metilaciji DNK. Metilacioni obrasci uspostavljeni vrlo rano tokom razvića sisara omogućavaju tkivno i vremenski specifičnu ekspresiju gena, a održavaju se putem ćelijske deobe (Monk, 1995, Rottach i sar., 2009).

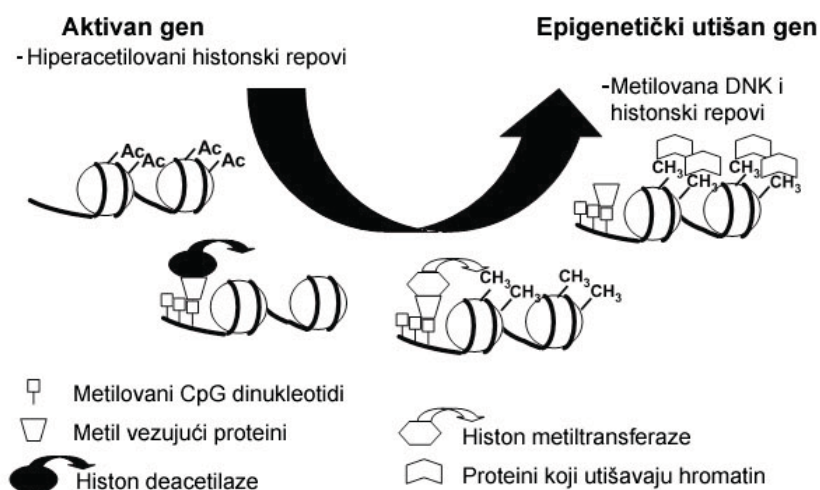
### 1.5.1.2. Metilacija DNK i regulacija transkripcije

Regulacija transkripcije je kompleksan proces koji podrazumeva sinergističko delovanje metilacije DNK i modifikacije histona. Rana istraživanja su pokazala da 5mC može direktno da inhibira vezivanje nekih specifičnih transkripcionih faktora, kao što su c-Myc/Myn, AP-2, E2F i dr, čije mesto vezivanja uključuje nemetilovane CpG dinukleotide (Wade i sar., 1999). Ovaj model je prihvatljiv samo u manjem broju slučajeva, pošto ne zahtevaju svi transkripcioni faktori prisustvo specifičnog mesta vezivanja (Worm i Guldborg, 2002). S druge strane, metilacija citozina u okviru CpG dinukleotida dovodi do vezivanja metil-citozin vezujućih proteina-MBP (MBD1, MBD2, MBD3, MBD4, MeCP1, MeCP2), što dalje dovodi do angažovanja enzima histondeacetilaze (HDAC) i drugih proteina koji modifikuju histone i time učestvuju u formiranju zatvorene hromatinske strukture, čime se onemogućava pristup transkripcione mašinerije (Jones i sar., 1998), (Slika 1.3.).



*Slika 1.3. Metilacija DNK i inhibicija transkripcije (Moggs i sar., 2004)*

N-terminalni „repovi“ histona podležu čitavom nizu posttranslacionih kovalentnih modifikacija, koje pored acetilacije uključuju i metilaciju, fosforilaciju, sumoilaciju i ubikvitinizaciju. Na taj način je omogućeno dalje struktuiranje hromatina i regulacija njegove dostupnosti transkripcionim faktorima (Kouzarides, 2007), (Slika 1.4.).



*Slika 1.4. Epigenetički model regulacije ekspresije gena (Moggs i sar., 2004)*

Iz ovoga se vidi da metilacija DNK i modifikacija histona nisu nezavisni događaji, već su koordinisani i visokoorganizovani mehanizmi regulacije ekspresije gena. Modifikacioni status histonskih repova je ključan za dalje angažovanje faktora koji dovode do organizovanja heterohromatina. Specifična kombinacija histonskih modifikacija u odgovarajućem regionu hromatina određuje interakciju između histona i DNK, kao i nehistskih proteina sa hromatinom, i ova epigenetička informacija se označava kao „histonski kod“ (Margueron i sar., 2005). Najnovija istraživanja su pokazala da „histonski kod“ učestvuje u usmeravanju metilacije na određene regione DNK i razdvajanju transkripciono aktivnog od transkripciono neaktivnog hromatina (Jones i Baylin, 2002). Istovremeno, različite nekovalentne modifikacije, kao što su remodelovanje nukleozoma i zamena uobičajenih histonskih proteina koji ih sačinjavaju drugim varijantama, takođe imaju važnu ulogu u organizaciji hromatina i regulaciji ekspresije gena. Istraživanja su pokazala da se to, pre svega, odvija menjanjem dostupnosti regulatornih sekvenci na molekulu DNK za odgovarajuće transkripcione faktore (Jiang i Pugh, 2009).

I pored svega što se zna o regulaciji metilacije, još uvek nije jasno šta je primarni mehanizam u kontroli genske ekspresije, metilacija DNK ili struktuiranje hromatina. Brojni eksperimenti idu u prilog tome da metilacija DNK predstavlja inicijalni događaj u formiranju zatvorene strukture hromatina koja će onemogućiti transkripciju (Kass i sar., 1997). Pokazano je da i sama DNMT1 takođe može da učestvuje u u inhibiranju genske aktivnosti putem angažovanja HDAC2 i proteina DMAP1 (DNMT1-asociran protein 1) koji ima ulogu represora transkripcije (Rountree i sar., 2000). Drugi eksperimenti su pokazali da proteini koji se ili vezuju za modifikovane histone (heterohromatinski protein 1, HP1) ili direktno modifikuju histone (lizin-specifična demetilaza 1, LSD1 i protein arginin-metiltransferaza 5, PRMT5), angažuju DNMT kako bi se indukovala metilacija već utišanih gena (Smallwood i sar., 2007, Wang i sar., 2009, Zhao i sar., 2009).

Sve je više dokaza koji govore da miRNK imaju centralnu ulogu u kontroli epigenetičkih procesa (Chuang i Jones, 2007). miRNK su male nekodirajuće RNK, čija dužina iznosi oko 22 nukleotida. Ovi mali molekuli su uključeni i u metilaciju DNK i u modifikaciju histona. Njihova uloga u kontroli genske ekspresije se ostvaruje putem posttranskripcionog utišavanja ciljnih gena, tako što vezivanjem za ciljnu iRNK izazivaju njenu degradaciju ili inhibiciju translacije (He i sar., 2004). Pokazano je da neke miRNK imaju visok afinitet vezivanja za CpG ostrvca i da svojim vezivanjem mogu da dovedu bilo do metilacije ili do demetilacije ostrvaca, u zavisnosti od stadijuma razvića ili od tipa tkiva (Tollefsbol, 2009). Osim toga, miRNK mogu da modulišu epigenetičke regulatorne mehanizme u ćeliji putem interakcije sa metiltransferazama DNMT3a i DNMT3b i enzimima uključenim u modifikaciju histona (EZH2) (Fabbri i sar., 2007, Friedman i sar., 2009). Kao i u slučaju drugih gena, ekspresija miRNK može da bude regulisana epigenetičkim mehanizmima (Saito, 2006).

Postojeće interakcije između različitih komponenata epigenetičke mašinerije još jednom naglašavaju kompleksnu prirodu epigenetičkih mehanizama uključenih u regulaciju genske ekspresije.

Brojne studije su pokazale da su u kancerogenezi značajno narušena sva tri nivoa epigenetičke kontrole ekspresije gena (Jones i Baylin, 2007). Da bi se bolje shvatila uloga ovih složenih alteracija u patogenezi tumora, neophodno je poznavanje

uloge epigenetičkih modifikacija u održavanju normalnog, fiziološkog, stanja ćelije. Najviše je, u tom smislu, ispitivana i proučena metilacija DNK.

#### **1.5.1.3. Uloga metilacije DNK u funkcionisanju normalne ćelije**

Metilacija DNK, kao epigenetička modifikacija koja može da suprimira ekspresiju gena, ima važnu ulogu u kontroli mnogih fizioloških procesa. Neophodna je za normalno embrionalno razviće, koje podrazumeva vremenski definisanu aktivaciju i inaktivaciju različitih klasa gena (Kafri i sar., 1992), a eksperimenti na miševima su pokazali da gubitak oba alela bilo koje metiltransferaze dovodi do letalnog ishoda u embrionalnom ili ranom postnatalnom stadijumu (Okano i sar., 1999). Tokom embrionalnog razvića se putem metilacije uspostavljaju odgovarajući obrasci genske ekspresije, karakteristični za svaku ćeliju adultnog organizma. Primarna uloga metilacije nakon razvića jeste održavanje većine nekodirajućeg dela genoma u transkripciono neaktivnom stanju (Bird i Wolffe, 1999). Metilacija učestvuje u inaktivaciji specifičnih gena na X hromozomu ženki (Rigs i Pfeifer, 1992), imprintingu (Falls i sar., 1999), u inaktivaciji parazitskih DNK integrisanih u genom domaćina (Schaefer i sar., 1997), sprečavanju homologne rekombinacije između nealelskih repetitivnih sekvenci i generalno, u održavanju integriteta hromozoma i stabilnosti genoma (Robertson, 2001).

#### **1.5.1.4. Uloga metilacije DNK u kancerogenezi**

Normalni obrasci metilacije DNK su često značajno narušeni u malignoj ćeliji, što podrazumeva globalnu hipometilaciju (Feinberg i Vogelstein, 1983), region specifičnu hipermetilaciju (Baylin i sar., 1987) i povećan nivo ekspresije metiltransferaza (Kautiainen i Jones, 1986). Procesom demetilacije su zahvaćeni CpG dinukleotidi koji nisu grupisani u CpG ostrvca, već su rasuti po genomu, što dovodi do hromozomske nestabilnosti, gubitka imprintinga, reaktivacije transpozona i retrovirusa, kao i aktivacije pojedinih onkogenata (Robertson, 2001). Pod hipermetilacijom se podrazumeva *de novo* metilacija normalno nemetilovanih CpG ostrvaca u sastavu promotorskih regiona gena, što deluje kao snažan supresor genske ekspresije i povezano je sa formiranjem transkripciono neaktivnih struktura hromatina. Pokazano je da su



pojedini geni u humanim tumorima inaktivirani isključivo na ovaj način, a metilacija DNK tako predstavlja alternativni mehanizam mutacijama i delecijama u suprimiranju ekspresije gena (Toyota i Issa, 2000, Baylin i sar., 2001).

#### **1.5.1.5. Uzroci i mehanizmi aberantne metilacije DNK u kancerogenezi**

Iako je aberantna metilacija u manjoj ili većoj meri zapažena u svim ispitivanim humanim tumorima, o uzrocima i mehanizmima njenog nastanka se još uvek malo zna. Iako nije jasno šta inicira epigenetičke alteracije u kancerogenezi, mnoge studije su pokazale da pojedine promene mogu da se jave veoma rano u procesu kancerogeneze i time doprinesu inicijaciji maligne transformacije (Feinberg i sar., 2006). Drugo pitanje koje se postavlja je zbog čega dolazi do hipermetilacije inače nemetilovanih CpG ostrvaca i zbog čega su pojedini geni selektovani u odnosu na druge. Na osnovu do sada objavljenih radova, nudi se više mogućih odgovora. Po jednom modelu, moguće je da dolazi do gubitka specifičnih protektivnih faktora sa CpG ostrvaca pojedinih gena koji ih štite od metilacije, a pretpostavlja se i da postoje tzv. hromozomske „vruće tačke“, koje su posebno osetljive na aberantnu metilaciju (Esteller, 2002). Takođe je moguće da struktura samog gena i njegovog promotora utiče na predispoziciju ka aberantnoj metilaciji (Herman, 1999), što bi moglo da objasni zbog čega pojedini geni, iako međusobno blisko locirani, ne podležu istovremenoj metilaciji u različitim tipovima tumora. Rezultati pojedinih studija ukazuju da bi metilacija odgovarajućih CpG ostrvaca u kanceru mogla da se odvija putem za sekvencu-specifičnog mehanizma, kojim se DNMT postavljaju uz specifične gene putem asocijacije sa onkogenim transkripcionim faktorima. Ovo je pokazano na primeru odgovarajućih gena kod akutne promijelocitne leukemije (Di Croce i sar., 2002). S obzirom da aberantna metilacija može da zahvati veće regione DNK moguće je da pojedina CpG ostrvca postaju hipermetilovana kao rezultat njihove lokacije unutar takvih regiona genoma, koji podležu epigenetičkom reprogramiranju (Frigola i sar., 2006). Još jedan mehanizam pretpostavlja postojanje histonskih markera u regionima gena koji će biti hipermetilovani. Pokazano je da su regioni koji su hipermetilovani u kanceru često prethodno obeleženi polikombnim markerom H3K27me3 u embrionalnim matičnim ćelijama (Widschwendter i sar., 2007, Ohm i sar., 2007), što upućuje na postojanje veze između regulacije razvića i

kancerogeneze. Ovo zapažanje bi bar delimično moglo da objasni postojanje tzv. CIMP fenotipa (eng. *CpG island methylator phenotype*), pod kojim se podrazumeva istovremena metilacija većeg broja CpG ostrvaca različitih gena kod pojedinih tumora, s obzirom da su mnogi CIMP lokusi poznate ciljne sekvence za proteine polikombnog kompleksa (Weisenberger i sar., 2006, Widschwendter i sar., 2007). Istraživanja na hematološkim tumorima su pokazala da u osnovi epigenetičkih promena u kancerogenezi mogu da budu genetički defekti u genima uključenim u metilaciju DNK i remodelovanje hromatina (Esteller, 2003). Na kraju, treba imati u vidu da su izmenjeni obrasci metilacije možda samo odraz krupnijih poremećaja u brojnim ćelijskim procesima do kojih dolazi tokom dugotrajnog procesa kancerogeneze, bez bilo kakvih efekata na sam proces formiranja tumora (Warnecke i Bestor, 2000).

Ova oblast još uvek nije dovoljno istražena i očekuje se da će joj se u budućnosti posvetiti veća pažnja.

#### **1.5.1.6. Geni koji podležu hipermetilaciji u kancerogenezi**

Aberantna metilacija je u manjoj ili većoj meri zapažena u svim ispitivanim humanim tumorima. Geni inaktivirani hipermetilacijom u kancerogenezi regulišu ključne ćelijske puteve, kao što su: ćelijski ciklus (*p16, p15, p14*), sistem za ispravljanje grešaka na DNK (*MGMT, hMLH1, BRCA1*), apoptoza (*DAPK*), ćelijska adhezija (*CDH1, CDH13*), detoksifikacija (*GSTP1*), angiogeneza (*THBS1*), inhibicija metastaze (*TIMP3*) i dr. (Feinberg, 2001, Esteller, 2002). U svakom tipu tumora je moguća istovremena metilacija i inaktivacija gena iz nekoliko različitih grupa, što dovodi do narušavanja ključnih ćelijskih funkcija. Svaki tip tumora pokazuje specifičan profil metilacije ili „metilotip“. Neki geni, kao što je to slučaj sa *p16*, su metilovani u većini tumora (Esteller i sar., 2001b) dok je metilacija drugih karakteristična za samo određeni tip tumora, što reflektuje njihovu posebnu ulogu u specifičnom tkivu, odnosno, njegovoj malignoj transformaciji. Tako je metilacija *p15* prisutna samo u hematološkim tumorima (Herman i sar., 1996b), a *BRCA1* gena u ovarijalnim i karcinomima dojke (Esteller i sar., 2001b).

Pojava epigenetičkih lezija je često rani događaj u kancerogenezi, mada prisustvo aberantne metilacije samo za sebe ne mora da znači postojanje invazivnog

tumora, pošto nije redak slučaj da se metilacione promene detektuju i u premalignim stanjima. Tako je pokazano da je metilacija *p16* i *MGMT* gena prisutna i u kolorektalnim adenomima (Toyota i Issa, 1999, Esteller i sar., 2001b, Baylin i sar., 2001). Rani gubitak gena koji kontrolišu proliferaciju neophodan je za imortalizaciju ćelija, što je preduslov za nastanak kancera. S druge strane, inaktivacija gena čiji produkti učestvuju u korigovanju grešaka na DNK dovodi do akumulacije različitih genetičkih lezija, od tačkastih mutacija do krupniji genomskih alteracija. Ukoliko su i geni koji regulišu apoptozu inaktivirani, ćelija neometano stiče sve više karakteristika koje je vode putem kancerogeneze (Esteller, 2000). Ovi podaci jasno ukazuju da je hipermetilacija CpG ostrvaca važan događaj u ranim fazama nastanka tumora i da može da bude ključni događaj u njegovoj inicijaciji.

## **1.6. Epigenetičke promene kod DBKL i FL**

Skorašnja istraživanja su pokazala da u DBKL i FL veći broj gena može da bude pogođen aberantnom metilacijom, što vodi ka deregulaciji mnogih ćelijskih puteva, uključujući ćelijski ciklus (Martinez-Delgado i sar., 1998, Villuendas i sar., 1998, Baur i sar., 1999, Chim i sar., 2007), sistem za korigovanje grešaka na molekulima DNK (Rossi i sar, 2004) i apoptozu (Voso i sar., 2006). Iako postoje snažni dokazi da ovakve epigenetičke promene mogu da doprinesu limfomagenezi i biološkom ponašanju tumora (Guo i sar., 2005, Bennett i sar., 2009, Choi i sar., 2010), uticaj metilacije pojedinačnih gena na prognozu i ishod bolesti još uvek nije razjašnjen.

### **1.6.1. *p16* gen**

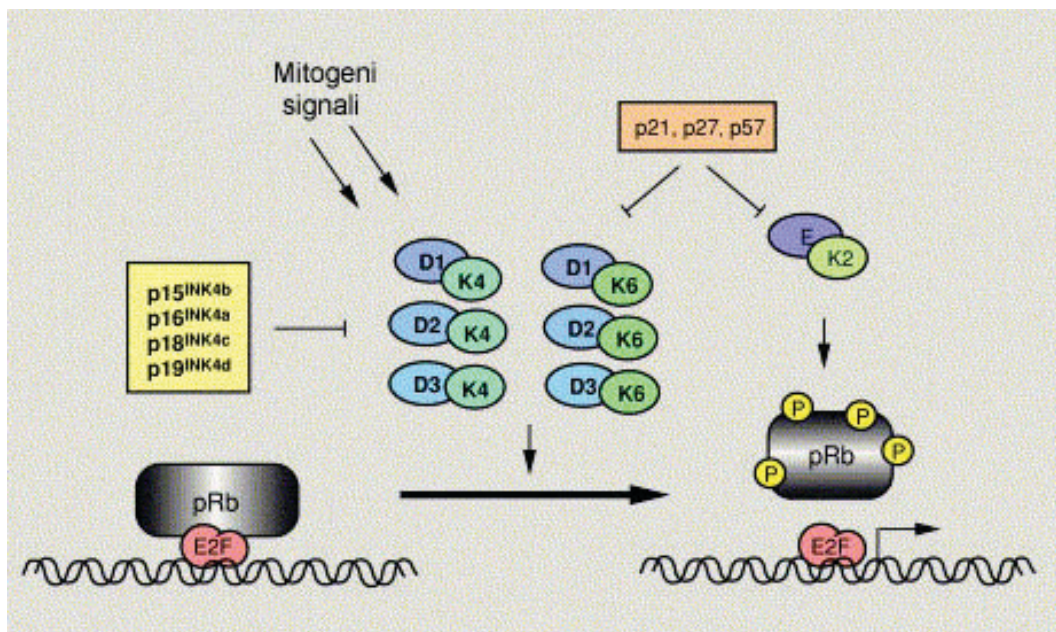
Tumor-supresor gen *p16* pripada INK4 familiji regulatora ciklin D/Rb puta ćelijskog ciklusa i lociran je na poziciji 9p21 u humanom genomu (Sherr i Roberts., 1999). U fiziološkim uslovima protein P16 sprečava progresiju iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa, održavajući, posredno, Rb protein u aktivnoj nefosforilisanom formi (Kamb i sar., 1994, Herman i sar., 1995).

Molekularni sistem koji kontroliše ćelijski ciklus zasniva se na aktivnosti familije protein kinaza, koje su poznate kao ciklin-zavisne kinaze (CDK) (Sherr i Roberts, 1999). U svom aktivnom obliku CDK su vezane za specifične proteinske

subjedinice-cikline. Kada do ćelije stignu odgovarajući mitogeni signali, prve CDK koje se aktiviraju su CDK4 i CDK6, i to putem asocijacije sa D tipom ciklina. Aktivacija CDK4-6/D kinaza je zatim praćena aktivacijom CDK2/ciklin E i CDK2/ciklin A kinaza, što dovodi do ulaska ćelije u S fazu ćelijskog ciklusa i replikacije DNK. Kada je replikacija završena, dolazi do aktiviranja CDK1/ciklin B kinaze, što dovodi do mitoze (Bringold i Serrano, 2000).

Ciklin-zavisne kinaze su veoma važne u regulaciji proliferacije, pa je i njihova sama aktivnost vrlo precizno kontrolisana. Kao negativni regulator CDK javlja se grupa proteina označenih kao CDK inhibitori. Poznate su dve familije ovih proteina: INK4 familija, sastavljena od četiri člana: *p16<sup>INK4A</sup>*, *p15<sup>INK4B</sup>*, *p18<sup>INK4C</sup>* i *p19<sup>INK4D</sup>*, i Cip/Kip familija, koju čine tri člana: *p21<sup>Cip1</sup>*, *p27<sup>Kip1</sup>* i *p57<sup>Kip2</sup>* (Ruas i Peters, 1998). CDK inhibitori koji pripadaju INK4 familiji se specifično vezuju za CDK4-6 kinaze umesto D tipa ciklina, inhibirajući na taj način progresiju iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa. Retinoblastoma tumor-supresor protein (Rb) je glavni supstrat CDK4-6 kinaza. U svojoj aktivnoj formi u kojoj onemogućava ćelijsku proliferaciju, Rb protein je asociiran sa E2F grupom transkripcionih faktora, čime inhibira njihove transaktivacione funkcije. Ovi transkripcioni faktori su neophodni za replikaciju DNK jer aktiviraju ekspresiju A i E ciklina. Kada posredstvom ciklin-zavisnih protein kinaza CDK4 i CDK6 dođe do fosforilacije Rb proteina, E2F transkripcioni faktori se oslobađaju i aktiviraju sintezu DNK (Kaelin, 1999). Na ovaj način, putem inhibiranja CDK4-6 kinaza, INK4 familija proteina učestvuje u održavanju Rb proteina u nefosforilisanom stanju koje je povezano sa supresijom ćelijske proliferacije, (Slika 1.5.).

*p16/CDK4/D1/Rb* put je deregulisan u većini humanih tumora, i to inaktivacijom *p16* ili *Rb* gena, ili aktivacijom onkogeno *cdk4* ili ciklina *D1* (Bringold i Serrano, 2000). Inaktivacija ovog puta je neophodna za imortalizaciju ćelija, tj. sticanje sposobnosti nekontrolisane proliferacije, što je osnovna odlika svih tumora. *p16* je inaktiviran u velikom broju humanih solidnih i hematoloških tumora, uključujući i limfome (Ruas i Peters, 1998, Villuendas i sar., 1998, Baur i sar., 1999). Glavni mehanizam inaktivacije *p16* gena u ovom tipu malignih oboljenja je metilacija CpG ostrvaca promotorskog regiona, koja se prema podacima iz literature javlja kod 27-46 % slučajeva DBKL i 30-60 % slučajeva FL (Baur i sar., 1999, Sanchez-Beato i sar., 2001, Garcia i sar., 2002, Chim i sar., 2007).



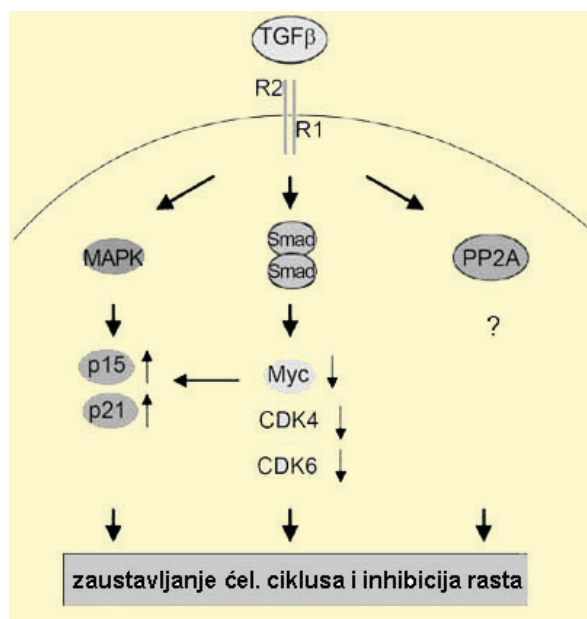
Slika 1.5. Regulacija G1/S tranzicije (Ruas i Peters, 1998)

### 1.6.2. p15 gen

Tumor-supresor gen *p15* se takođe nalazi na hromozomskom lokusu 9p21, na svega 14 kb udaljenosti u odnosu na *p16* gen (Hannon i Beach, 1994), i baš kao i *p16*, pripada INK4 familiji regulatora ciklin D/Rb puta ćelijskog ciklusa (Sherr i Roberts 1999). Indukovani P15 protein se vezuje za molekule CDK4, ali i za one iz katalitički aktivnog kompleksa p27<sup>Kip1</sup>-ciklin D-CDK4 (Warner i sar., 1999). Na taj način P15 indirektno dovodi do inhibicije vezivanja p27<sup>Kip1</sup> za ciklin D-CDK4/6 komplekse (Reynisdottir i sar., 1995) i kao posledica toga, do inhibicije kinazne aktivnosti p27<sup>Kip1</sup> kompleksa u ćelijama. P15 ostvaruje svoje dejstvo indukujući redistribuciju p27<sup>Kip1</sup> između ciklin D-CDK4/6 i ciklin E-CDK2 kompleksa (Reynisdottir i sar., 1995).

Literaturni podaci ukazuju da je P15 protein jedan od centralnih intraćelijskih medijatora i efektor signala koji su indukovani multifunkcionalnim citokinom TGF- $\beta$  (eng. *tissue growth factor- $\beta$* ), (Hannon i Beach, 1994), (Slika 1.6.). Paralelno sa indukcijom *p15* dolazi i do indukcije CDK inhibitora p21<sup>Cip1</sup>, ali i negativne regulacije *c-myc* gena, čiji produkt sprečava indukciju *p15* i inhibiciju G1 faze ćelijskog ciklusa (Warner i sar., 1999). Ispitivanja u *in vitro* uslovima su pokazala da *c-myc* direktno

interferira sa aktivacijom p15 puta posredstvom TGF- $\beta$ , i to direktno, vršeci represiju promotorske aktivnosti *p15* gena (Warner i sar., 1999).



**Slika 1.6.** Uloga *p15* u kontroli ćelijskog ciklusa (Li i sar., 2006)

Protein P15 u humanim limfocitima ima ulogu ključnog intraćelijskog medijatora još jednog važnog citokina-IFN- $\alpha$  (interferon- $\alpha$ ), koji svoj antiproliferativni efekat ispoljava indukcijom proteina p21<sup>Cip1</sup> i P15, čime dolazi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G1 fazi (Sangfelt i sar., 1999).

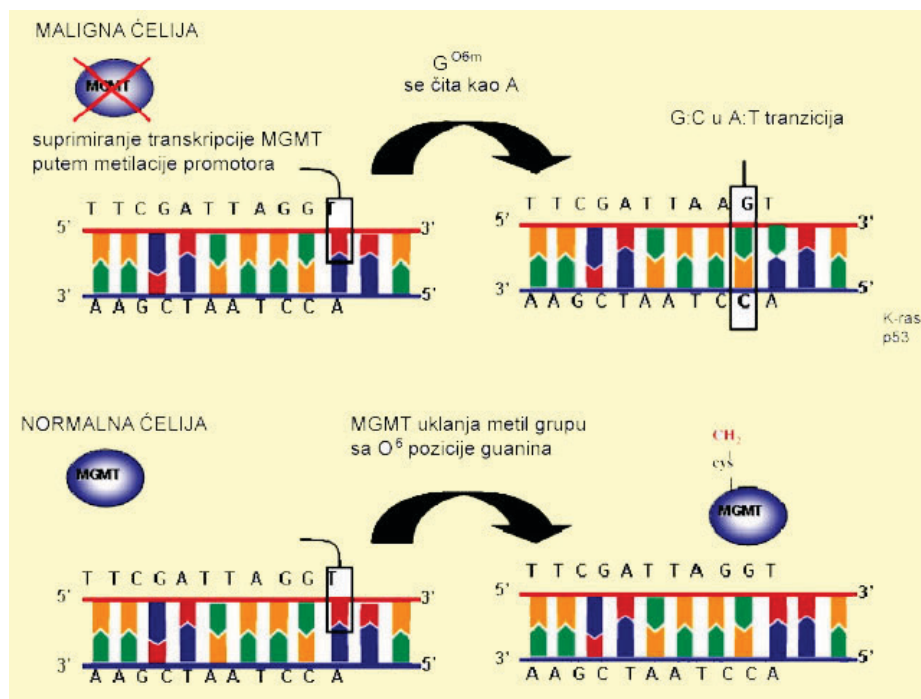
Inaktivacija *p15* gena putem aberantne metilacije promotorskih CpG otvaca se retko sreće u solidnim humanim tumorima, ali je zato česta kod leukemija i limfoma (Herman i sar., 1996b, Baur, 1999). Prema podacima iz literature, metilacija *p15* gena je zastupljena u oko 47-77 % slučajeva DBKL i 30 % FL (Baur i sar., 1999, Sanchez-Beato i sar., 2001, Garcia i sar., 2002).

### 1.6.3. *MGMT* gen

O<sup>6</sup>-metilguanin-DNK-metiltransferaza (MGMT), poznat još i kao O<sup>6</sup>-alkilguanin-DNK-alkiltransferaza, je enzim koji katalizuje uklanjanje mutagenih i citotoksičnih alkil-grupa sa O<sup>6</sup> pozicije guanina (Pegg, 1990). Gen koji kodira ovaj enzim je lociran na poziciji 10q26 u humanom genomu (Natarajan i sar., 1992). Alkilacija na O<sup>6</sup> poziciji guanina predstavlja važan korak u nastanku mutacija bitnih za

kancerogenezu, zbog tendencije O<sup>6</sup>-metilguanina da se sparuje sa timinom tokom replikacije DNK, što dovodi do konverzije G→C u A→T par (Coulondre i Miller, 1977), (Slika 1.7.) Ova tranzicija dovodi do nastanka tačkastih mutacija u odgovarajućim genima kao što su *K-ras* i *p53* i do nastanka tzv. „mutator fenotipa“ (Esteller i Herman, 2004). Osim toga, O<sup>6</sup>-alkilguanin produkti u DNK, a naročito O<sup>6</sup>-hloroetilguanin, mogu da se vezuju za citozinske ostatke u naspramnom lancu DNK, blokirajući na taj način replikaciju (Ericson i sar., 1980). MGMT štiti ćelije od nastanka ovakvih lezija tako što uklanja alkil grupu sa O<sup>6</sup> pozicije guanina, koja se prebacuje na sam enzim. Za svaku korigovanu leziju dolazi do inaktivacije jednog molekula MGMT (Pegg, 1990). Alkilovani MGMT protein se zatim uklanja sa DNK i degradira putem ubikvitinacije (Srivenugopal i sar., 2000). Sposbnost ćelije da se brani od navedenih oštećenja je direktno povezana sa brojem prisutnih MGMT molekula i od intenziteta *de novo* sinteze MGMT proteina (Esteller i Herman., 2004). MGMT može da deluje sa različitom efikasnošću na čitav spektar O<sup>6</sup>-alkil grupa, ali je delovanje na O<sup>6</sup>-metilguanin najviše ispitivano, zbog efekata koje ova modifikovana baza ispoljava u ćeliji. Pokazano je da O<sup>6</sup>-metilguanin utiče na metilaciju citozina (Hepburn i sar., 1991), vezivanje transkripcionih faktora (Bonfanti i sar., 1991), rekombinaciju (White i sar, 1986) i replikaciju DNK (Ceccotti i sar., 1993).

Funkcija *MGMT* gena je narušena u različitim tipovima humanih tumora, uključujući i limfome (Esteller i sar., 1999). Kao glavni mehanizam inaktivacije ovog gena javlja se hipermetilacija CpG ostrvaca promotorskog regiona (Esteller i sar., 1999, Danam i sar., 1999), što je povezano sa odsustvom sinteze iRNK (Esteller i sar., 2000b, Yin i sar., 2003), i ekspresije MGMT proteina (Esteller i sar., 1999, Herfarth i sar., 1999). *In vitro* tretman ćelija tumora demetilirajućim agensima dovodi do reaktivacije *MGMT* gena i ponovnog uspostavljanja svih navedenih funkcija (Quian i Brent, 1997). Prema literaturnim podacima, metilacija *MGMT* se sreće kod 36-76 % slučajeva DBKL i 25 % slučajeva FL (Rossi i sar, 2004, Al-Kuraya i sar, 2006).



**Slika 1.7.** Inaktivacija MGMT dovodi do mutacija na DNK (Jacinto i Esteller, 2007)

Ispitivanja velikih serija humanih primarnih tumora su pokazala da inaktivacija *MGMT* gena može da se javi vrlo rano u procesu kancerogeneze, što omogućava akumulaciju različitih genetičkih lezija u ćeliji, koje su neophodne za promociju malignog procesa (Esteller i sar., 2000b).

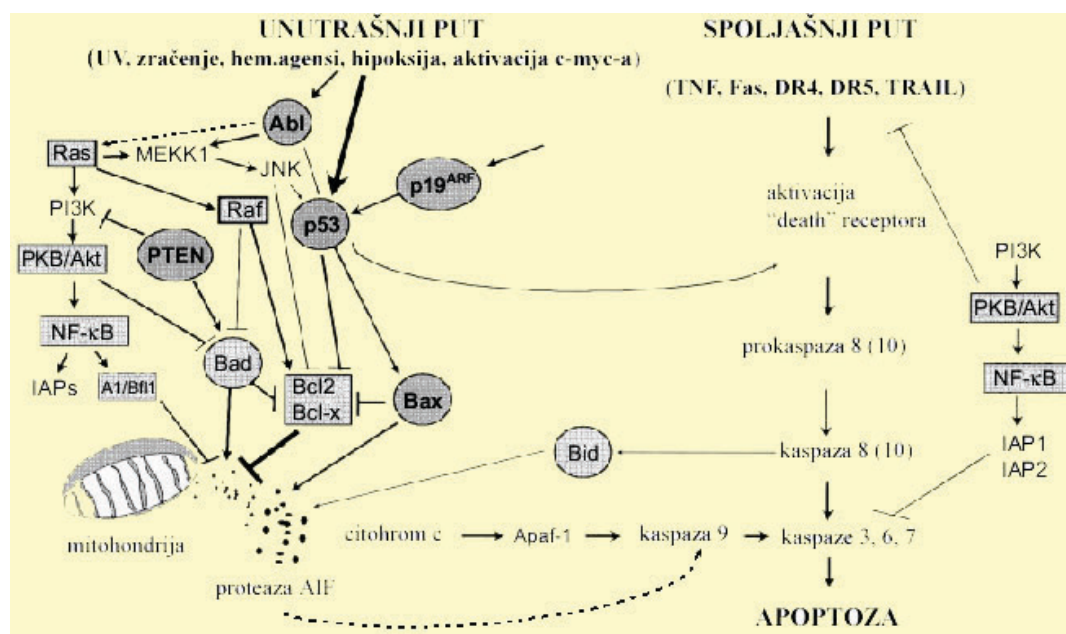
Pored toga, aberantna metilacija *MGMT* gena, praćena odsustvom sinteze *MGMT* proteina, može da igra važnu ulogu i u modulaciji hemosenzitivnosti na primenjenu hemoterapiju (Esteller i Herman, 2004). Stvaranje produkata na O<sup>6</sup> poziciji guanina predstavlja primarni mehanizam citotoksičnosti alkilirajućih agenasa, koji su sastavni deo hemoterapije (Gerson, 2002). Na taj način inaktivacija *MGMT* gena dovodi do povećanja broja toksičnih i/ili mutagenih lezija na DNK, što malignu ćeliju vodi do programirane ćelijske smrti, apoptoze. Određivanje metilacionog statusa *MGMT* gena u humanim tumorima je zbog toga važno, da bi se predvideo odgovor na hemoterapiju (Gerson, 2002, Esteller i Herman, 2004).

Prethodna istraživanja su pokazala da je aberantna metilacija *MGMT* gena faktor povoljnije prognoze kod obolelih od DBKL i glioma tretiranih alkilirajućim agensima (Esteller i sar., 2000a, Esteller i sar., 2004.). Do danas ne postoji mnogo podataka o metilacionom statusu *MGMT* gena u humanim FL.



#### 1.6.4. *DAPK* gen

*DAPK* (eng. *death-associated protein kinase*) gen je lociran na poziciji 9q21.33 u humanom genomu i kodira enzim  $\text{Ca}^{2+}$ /kaldmodulin-regulisano serin-treonin kinazu, uključenu u regulaciju programirane ćelijske smrti, apoptoze (Bialik i Kimchi, 2006). Apoptoza se pokreće u sklopu različitih fizioloških procesa, ali i kao rezultat oštećenja ćelija usled različitih patoloških činilaca, kada one postaju opasne za organizam. Sam proces je kontrolisan brojnim ekstraćelijskim i intraćelijskim signalima (Renehan i sar, 2001) koji preko odgovarajućih posrednika dovode do pokretanja kaskade proteolitičkih enzima, kaspaza, koje uništavaju oštećenu ćeliju. U zavisnosti od načina pokretanja, razlikuju se spoljašnji i unutrašnji, tj. mitohondrijalni put apoptoze (Slika 1.8.). Danas se zna da su ova dva puta povezana i da molekuli iz jednog, mogu da utiču na molekule iz drugog puta apoptoze (Igney and Krammer, 2002).



**Slika 1.8.** Molekularni mehanizmi regulacije apoptoze (Kopnin, <http://nature.web.ru>)

*DAPK* inicira spoljašnji put apoptoze putem fosforilacije serinskih i treoninskih ostataka u odgovarajućim supstratima, što dalje dovodi do pokretanja apoptoze posredstvom  $\gamma$ -interferona, FAS liganda, TNF- $\alpha$  (eng. *tumor necrosis factor- $\alpha$* ) i TNF-povezanim (TRAIL) ligandima (Cohen i Kimchi, 2001, Ng 2002, Michie i sar., 2010). Nedavno je pokazano da *DAPK* učestvuje i u sprečavanju *c-myc*-om indukovane

transformacije, aktiviranjem unutrašnjeg,  $p14^{ARF}/p53$ , apoptotskog puta (Raveh i sar., 2001).

Programiranu ćelijsku smrt reguliše veći broj gena, od kojih glavnu ulogu imaju protoonkogeni *bcl-2* i *c-myc*, kao i tumor-supresori *p53* i *DAPK* (Wyllie, 1995, Michie i sar., 2010.). *bcl-2* kao antiapoptotski gen inhibira apoptozu, dok je *c-myc* u isto vreme i snažan induktor apoptoze i ćelijske proliferacije, što ukazuje da su ovi procesi povezani. Da li će preovladati ćelijska proliferacija ili apoptoza zavisi od prisustva faktora rasta. Kada faktori rasta nedostaju, proliferacija je blokirana i preovladava apoptoza indukovana *c-myc*-om. Tumor-supresor *p53* se aktivira u ćeliji u kojoj je došlo do oštećenja DNK. Povećan nivo P53 proteina indukuje apoptozu, aktivacijom CD95 receptora ćelijske smrti koji povećava transkripciju *bax*, proapoptoznog člana *bcl-2* familije gena i utiče na oslobađanje citohroma *c* iz mitohondrija. Takođe, poremećaj ekspresije *c-myc* i *bcl-2* gena modulira funkciju *p53* i dovodi do ćelijske proliferacije i transformacije (Ryan i sar., 1994). S druge strane, aktivacija *p53* gena, inicirana oštećenjima na DNK ili ekspresijom onkogeno, dovodi do uvećane ekspresije DAPK proteina (Martoriati i sar., 2005). Pošto i prekomerna ekspresija DAPK dovodi do uvećane ekspresije *p53* proteina, pretpostavlja se da postoji autoregulatorna povratna sprega između ova dva gena (Raveh i sar., 2001, Martoriati i sar., 2005). U prilog tome idu podaci koji govore da inaktivacija *DAPK* redukuje indukciju  $p14^{ARF}/p53$ , i na taj način inaktivira *p53*-zavisni put apoptoze, što može da bude važan faktor za malignu transformaciju *in vivo* (Raveh i sar., 2001). Na taj način, različiti poremećaji genske regulacije imaju sinergistički efekat, što može da doprinese nastanku i progresiji tumora (Fanidi i sar., 1992).

Poremećaj regulacije apoptoze je značajan u patogenezi malignih oboljenja (Thompson, 1995). S obzirom na to da hemoterapija koja se koristi u tretmanu kancera indukuje apoptozu malignih ćelija, inhibicija apoptoze je jedan od mehanizama rezistencije tumora na primenjenu terapiju (Wyllie, 1997). To su potvrdile i studije u kojima je pokazano da inaktivacija *DAPK* gena, može da bude mehanizam rezistencije na apoptozu indukovanu hemoterapijom (Voso i sar., 2006). Pored toga, *DAPK* ima kritičnu ulogu u inhibiranju ćelijske migracije i samim tim, u sprečavanju invazije malignih ćelija (Kuo i sar., 2006). Studije na mišjim modelima su pokazale da reaktivacija *DAPK* gena i uspostavljanje ekspresije DAPK proteina suprimira

metastatski potencijal ćelija kancera pluća, naglašavajući tako tumor-supresorski kapacitet *DAPK* (Inbal i sar., 1997).

Pored kontrole apoptoze, *DAPK* ima ulogu i u regulisanju procesa autofagije (Inbal i sar., 2002). Autofagija ili programirana ćelijska smrt II je proces razgradnje unutarćelijskih proteina i organela u autofagolizozomima, u cilju očuvanja energije i ćelijske homeostaze u stresnim uslovima (Galluzzi i sar., 2008). *In vitro* eksperimenti na ćelijskim kulturama i *Caenorhabditis elegans* su pokazali da inhibicija autofagije može da dovede do apoptoze i da je nivo *DAPK* proteina kritičan za odabir puta kojim će ćelija krenuti (Kang i Avery, 2005, Kang i Avery, 2007, Lin i sar., 2009). Ovi podaci naglašavaju ulogu *DAPK* u integrisanju signala iz različitih ćelijskih puteva. Na ovaj način, *DAPK* funkcioniše kao molekularni reostat koji ima ključnu ulogu u donošenju odluke o sudbini ćelije u odgovarajućim uslovima (Michie i sar., 2010.).

Inaktivacija *DAPK* gena putem aberantne metilacije promotorskog regiona je opisana u različitim tipovima humanih tumora, (Esteller i sar., 2001b, Herman i Baylin, 2003), a posebno je čest događaj u B-ćelijskim limfomima, naročito u FL, u kojima se javlja u oko 80 % slučajeva (Rossi i sar, 2004, Voso i sar., 2006, Kim i sar., 2009). Metilacija ovog gena je prema literaturnim podacima u značajnom procentu zastupljena i u humanim DBKL gde se sreće sa učestalošću od preko 50 % (Rossi i sar, 2004, Amara i sar, 2008).

## **1.7. Terapijski pristup kod obolelih od DBKL i FL**

Prognoza i lečenje bolesnika obolelih od DBKL i FL određeni su histološkim karakteristikama tumora i kliničkim prognostičkim parametrima obuhvaćenim internacionalnim prognostičkim indeksom (IPI za DBKL, odnosno, FLIPI za FL) (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993, Solal-Celigny i sar., 2004).

DBKL je biološki agresivan limfom, i ako se ne leči, medijana preživljenja je 1-2 godine (Mason i Harris, 2001). Iako je prema kriterijumima SZO DBKL definisan kao poseban kliničko-morfološki entitet, različit odgovor na terapiju ukazuje na biološku heterogenost tumora. Standardna terapija se bazira na primeni CHOP/R-CHOP (ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin, prednizon, sa ili bez rituksimaba) protokola

(Feugier i sar., 2005, Pfeunds Schuh i sar., 2006). Dugotrajna remisija se postiže kod 40-50% bolesnika (Mason i Harris, 2001), dok kod preostalih dolazi do pogoršanja bolesti (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993, The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997). Kod ovakvih pacijenata terapija uključuje visoko dozu hemoterapiju, kao i transplantaciju matičnih ćelija periferne krvi. Ovako agresivna terapija može da prouzrokuje ozbiljne sekundarne efekte u kardiovaskularnom i/ili renalnom sistemu, pa njena upotreba treba da bude ograničena na najrizičnije grupe obolelih (Haioun i sar., 2000, Fisher i sar., 2005).

U vreme postavljanja dijagnoze većina bolesnika sa FL je u uznapređovalom kliničkom stadijumu bolesti. Klinički tok FL varira u širokom rasponu biološkog ponašanja, od slučajeva spontane remisije (15-20%), slučajeva indolentnog kliničkog toka sa prisutnim odgovorom na terapiju, recidivima bolesti i medijanom preživljavanja 9-10 godina, do agresivnih kliničkih slučajeva (Horning i Rosenberg, 1984, Mason i Harris, 2001). Smrtni ishod je najčešće posledica rezistencije na terapiju, transformacije u agresivniji DBKL ili toksičnog efekta terapije (Mason i Harris, 2001, Rohatiner i Lister, 2005, Plancarte i sar., 2006). Pristup lečenju FL obuhvata različite mogućnosti, od praćenja bolesnika bez terapije do primene agresivne hemoterapije sa transplantacijom matičnih ćelija (Mason i Harris, 2001, Chau i sar., 2003). Izbor optimalne terapije je uslovljen kliničkom agresivnošću i histološkim stadijumom FL (Chau i sar., 2003).

## **1.8. Prognostički parametri kod obolelih od DBKL i FL**

Najznačajniji klinički prediktor ishoda bolesti do danas je internacionalni prognostički indeks (IPI za DBKL, odnosno, FLIPI za FL). IPI obuhvata pet nezavisnih kliničkih prognostičkih parametara: 1) starost bolesnika, 2) klinički stadijum bolesti, 3) ECOG (eng. *Eastern Cooperative Oncology Group*) performans status, koji se odnosi na opšte stanje bolesnika, 4) nivo serumske laktat dehidrogenaze (LDH) i 5) broj zahvaćenih ektranodalnih lokacija (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993). Na osnovu navedenih parametara, oboleli se svrstavaju u kategorije niskog, umereno-niskog, umereno-visokog i visokog stepena rizika. FLIPI, pored prva četiri navedena parametra, obuhvata i 5) nivo hemoglobina,

kao i 6) broj zahvaćenih nodalnih regija (Solal-Celigny i sar., 2004). Na osnovu FLIPI skora, oboleli se svrstavaju u kategorije niskog, srednjeg i visokog stepena rizika. Uprkos tome, oboleli sa identičnim stepenom rizika, ispoljavaju značajne varijacije u dužini preživljavanja i odgovoru na terapiju, što ukazuje na postojanje velike molekularno-genetičke heterogenosti u okviru svake IPI/FLIPI kategorije. (Armitage i Weisenburger, 1998, Sehn i sar., 2012). Zbog toga je poslednjih godina velika pažnja usmerena na pronalaženje novih molekularnih prognostičkih markera koji bi mogli da pomognu u daljoj podeli pacijenata u grupe različitog stepena rizika (Amara i sar., 2008). Identifikacija novih molekularno-genetičkih markera bi omogućila precizniju prognozu, poboljšanje efikasnosti terapije i samim tim, povoljniji ishod bolesti (Lossos i Morgensztern, 2006).

Iako su nedostaci savremene terapije doveli do pokušaja razvoja novih prognostičkih modela koji bi se zasnivali na molekularnim karakteristikama tumora, do sada nije razvijen jednostavan i pouzdan model koji bi bio primenljiv u kliničkoj praksi. Ipak, postoji više molekularnih biomarkera sa potencijalnim prognostičkim značajem kod obolelih od DBKL i FL.

### **1.8.1. Bcl-2 kao prognostički marker kod obolelih od DBKL i FL**

Bcl-2 (eng. *B cell lymphoma-2*) je antiapoptotski mitohondrijalni protein koji učestvuje u kontroli unutrašnjeg puta programirane ćelijske smrti, apoptoze (Hockenbery i sar., 1990). Povećana ekspresija Bcl-2 proteina prisutna je u većini slučajeva FL i 30-60% DBKL (Skinnider i sar., 1999). Najčešće nastaje kao posledica translokacije t(14;18) koja je prisutna kod 70-85% FL, odnosno 20-30% DBKL, i smatra se inicijalnim događajem u patogenezi FL (Jaffe i sar., 2001, Broudy i sar., 2004). Povećana ekspresija Bcl-2 proteina nije vezana isključivo za t(14;18), već može da nastane i usled amplifikacije i mutacije *bcl-2* gena (Rantanen i sar., 2001). Prekomerna ekspresija Bcl-2 proteina sprečava apoptozu i odgovorna je za rezistenciju na hemoterapeutske agense (Miyashita i Reed, 1993). Zbog toga je, generalno, povezana sa lošom prognozom kod obolelih od DBKL, dok su u slučaju FL rezultati kontroverzni (Kramer i sar., 1986, Pezzella i sar., 1992, Hermine i sar., 1996, Gascoyne i sar., 1997, Logsdon i sar., 1999, Peruničić Jovanović i sar., 2009). Prisustvo t(14;18),

u do sada sprovedenim studijama, nije definisano kao pokazatelj preživljenja kod obolelih od FL (Tilly i sar., 1994, Montoto i sar., 2003, Radojković i sar., 2008), dok su u slučaju DBKL rezultati kontroverzni. U pojedinim studijama nije zapažen prognostički značaj, (Hill i sar., 1996, Gascoyne i sar., 1997, Iqbal i sar., 2004), dok se u nekim drugim prisustvo t(14;18) vezuje za agresivniji tok bolesti i lošiji ishod (Jacobson i sar., 1993, Kramer i sar., 1998, Barrans i sar., 2003).

### **1.8.2. Bcl-6 kao prognostički marker kod obolelih od DBKL i FL**

Bcl-6 (eng. *B-cell lymphoma-6*) protein ima ulogu za sekvencu-specifičnog inhibitora transkripcije. Uključen je u represiju gena bitnih za aktivaciju i diferencijaciju limfocita, u kontrolu ćelijskog ciklusa i inflamaciju (Ye i sar., 1995). Ekspresija *bcl-6* gena je deregulisana u 40-80 % slučajeva DBKL i u oko 60 % slučajeva FL (Capello i sar., 2000). Deregulacija se postiže na dva načina, translokacijom koja uključuje lokus 3q27 ili tačkastim mutacijama u okviru 5' nekodirajućeg regiona (Ye i sar., 1993, Lo Coco i sar., 1994, Wang i sar., 2002). Prognostički značaj uvećane ekspresije Bcl-6 je nejasan. Pojedine studije povezuju ovaj događaj sa dužim preživljavanjem (Lossos i sar., 2001), dok u drugim nije potvrđen uticaj na ishod bolesti (Colomo i sar., 2003). Pretpostavlja se da biološke posledice ekspresije Bcl-6 mogu da variraju u zavisnosti od prisustva ili odsustva alteracija *bcl-6* gena i njihove prirode (Artiga i sar., 2002). Fiziološka osnova veze između bolje prognoze i uvećane ekspresije Bcl-6 može da bude uvećana senzitivnost na apoptozu kod ćelija koje prekomerno ekspimiraju Bcl-6 (Artiga i sar., 2002, Bai i sar., 2003).

### **1.8.3. CD10 kao prognostički marker kod obolelih od DBKL i FL**

CD10 (ili CALLA, eng. *common acute lymphoblastic leukemia antigen*), protein je membranska metaloproteinaza koja se detektuje kod ranih limfoidnih progenitora, kao i kod različitih stromalnih i epitelnih ćelija (LeBien i McCormack, 1989). U sekundarnim limfoidnim organima, ekspresija CD10 je ograničena na germinativne centre sekundarnih folikula (McIntosh i sar., 1999). CD10 je ekspimiran u 20-40 % DBKL i u većini slučajeva FL (Dogan i sar., 2000, Ohshima i sar., 2001, Fabiani i sar., 2002). Prognostički značaj ekspresije CD10 je razmatran u nekoliko studija, a dobijeni

rezultati su kontroverzni. U nekim studijama se ekspresija ovog proteina vezuje za dobru (Ohshima i sar., 2001, Go i sar., 2002), u nekima za lošu prognozu (Xu i sar., 2001, Uherova i sar., 2001), dok u nekim studijama nije zapažen nikakav prognostički značaj. (Fabiani i sar., 2002, Colomo i sar., 2003). Istovremena ekspresija Bcl-6 i CD10 karakteriše tzv. GC fenotip, prisutan kod oko jedne trećine DBKL. Ovaj fenotip je povezan sa prisustvom t(14;18), što ukazuje na moguće poreklo ovih tumora iz ćelija germinativnog centra ili transformisanih FL. DBKL sa GC fenotipom su povezani sa boljom prognozom u odnosu na ABC podtip (King i sar., 2000, Colomo i sar., 2003).

#### **1.8.4. Ki67 kao prognostički marker kod obolelih od DBKL i FL**

Ki67 je jedarni protein, prisutan u svim ćelijama koje se dele, pa zbog toga služi kao marker ćelijske proliferacije (Gerdes i sar., 1991). Kod kancera, procenat ćelija koje ekspresiraju Ki67 reflektuje proporciju tumorskih ćelija koje se aktivno dele (Lossos i Morgensztern, 2006). Visoko-poliferišući tumori su oni kod kojih je proliferativni indeks, tj. ekspresija Ki67 > 60 %. Prognostički značaj ekspresije Ki67 kod DBKL je kontroverzan. U pojedinim studijama je visok proliferativni indeks povezan sa lošom prognozom (Miller i sar., 1994, Peruničić Jovanović i sar., 2009), dok u drugim nije utvrđen prognostički značaj Ki67 (Jerkeman i sar., 2004). Tumori sa niskim Ki67 indeksom mogu da ispolje hemorezistenciju, s obzirom da je u takvim slučajevima većina malignih ćelija u G0/G1 fazi ćelijskog ciklusa, i tako rezistentna na hemoterpeutske agense. Pored toga, zaustavljenje u G0/G1 fazi ćelijskog ciklusa omogućava ćelijama da isprave oštećenja na DNK koja su nastala kao posledica delovanja hemoterapije i da prežive (Lossos i Morgensztern, 2006). Procenat ćelija koje ispoljavaju ekspresiju Ki67 kod DBKL je obično visok (> 40%), a u nekim slučajevima može da bude i preko 90% (Jerkeman i sar., 2004). Kod FL, ekspresija Ki67 raste sa porastom gradusa, što podrazumeva agresivnije ponašanje tumora, a pokazano je i da je ekspresija ovog jedarnog proteina veća kod FL bez prisustva t(14;18) (Leich i sar., 2009).

## 1.9. Prognostički značaj i klinička primena epigenetičkih markera

S obzirom da su epigenetičke promene rani i potencijalno reverzibilan događaj u kancerogenezi, otvara se niz mogućnosti za primenu aberantne metilacije DNK u ranoj dijagnozi, prognozi i tretmanu obolelih (Herman i Baylin, 2003).

Razvojem tehnika zasnovanih na lančanoj reakciji polimeraze (PCR) moguće je detektovati jedan metilovani u više od 50000 nemetilovanih alela (Palmisano i sar., 2000), iz male količine uzorka, kako u tumorima, tako i u odgovarajućim telesnim tečnostima (Herman i Baylin, 2003). Na osnovu metilacije odgovarajućih gena, moguća je rana dijagnoza kancera, kao i razlikovanje benignih od malignih promena (Jeronimo i sar., 2001). Utvrđeno je da u sputumu pušača prekancerogene promene mogu da budu otkrivene na osnovu detekcije hipermetilacije *p16* i *MGMT* gena i do tri godine pre kliničkih manifestacija karcinoma pluća (Herman i Baylin, 2003), a metilacija istih gena se sreće i u kolorektalnim adenomima (Toyota i Issa, 1999, Esteller i sar., 2001b, Baylin i sar., 2001).

Informacija o metilacionom statusu odgovarajućih gena može da posluži kao prognostički faktor koji bi ukazivao na ponašanje tumora. Tako su pojedine studije pokazale da je metilacija *p16* gena povezana sa lošim ishodom kod obolelih od DBKL (Shiozawa i sar., 2006, Amara i sar., 2008), kolorektalnog karcinoma (Esteller i sar., 2001a) i karcinoma glave i vrata (Koscielny i sar., 2007), a metilacija *DAPK* gena kod obolelih od DBKL (Amara i sar., 2008) i karcinoma pluća (Tang i sar., 2000). Metilacija *p15* gena se pokazala kao prediktor kraćeg trajanja vremenskog perioda bez ikakvih znakova i simptoma bolesti (eng. *disease-free survival, DFS*) kod obolelih od akutne promijelocitne leukemije (Chim i sar., 2003), dok je metilacija većeg broja gena kod obolelih od akutne limfoblastne leukemije marker lošije prognoze (Shen i sar., 2003).

Određivanje metilacionog statusa pojedinih gena u kanceru može da bude važan parametar u predviđanju odgovora na hemoterapiju. Pokazano je da metilacija *MGMT* gena kod obolelih od glioma i DBKL ukazuje na pacijente koji će biti senzitivni na terapiju alkilirajućim agensima (Gerson i sar., 2002, Esteller i Herman, 2004) i da je metilacija *MGMT* u ovom slučaju najpouzdaniji prediktivni faktor (Esteller i sar., 2000a). Stečena hipermetilacija *hMLH1* gena tokom terapije alkilirajućim agensima kod



ovarijalnog karcinoma se dovodi u vezu sa lošim ishodom bolesti (Gifford i sar., 2004), dok je metilacija *WRN* gena marker hipersenzitivnosti na inhibitor topoizomeraze, irinotekan, kod obolelih od kolorektalnog karcinoma (Agrelo i sar., 2006).

Potencijalna reverzibilnost epigenetičkih promena predstavlja mogućnost za dizajniranje novih terapijskih pristupa. Osnovni cilj je reaktivacija gena inaktiviranih metilacijom i ponovno uspostavljanje narušenih ćelijskih procesa. Jedan prilaz ovom problemu je upotreba inhibitora DNMT, 5-azacitidina i 2' deoksi-5-azacitidina, kao i inhibitora HDAC, trihostatina A. Za sada ostaje problem nedovoljne specifičnosti ovih agenasa. Drugi pristup je upotreba „*antisense*“ oligonukleotida koji inhibiraju DNMT1 iRNK (Strathdee i Brown, 2002). Pokazano je da na ovaj način dolazi do redukovanja nivoa DNMT1 i ekspresije *p16* gena u humanim malignim ćelijama (Fournel i sar., 1999), kao i do inhibicije tumorskog rasta na mišijim eksperimentalnim modelima (Ramchandani i sar., 1997). Najveće dostignuće u ovoj vrsti tretmana je terapija akutne mijeloidne leukemije i mijelodisplastičnog sindroma 5-azacitidinom, što predstavlja manje agresivan pristup od standardne hemoterapije citostaticima (Groshal i Bai, 2007). U toku je istraživanje terapije koja bi se zasnivala na primeni miRNK, a prvi rezultati su postignuti na ćelijskim linijama (Lu i sar., 2009).

Utvrđivanje metilacionog profila tumora, tj. „metilotipa“ na osnovu koga bi se predvideo odgovor na hemoterapiju bi u budućnosti moglo da doprinese uvođenju individualne terapije kancera (Toyota i sar., 1999).

## 2. CILJ RADA

Ciljevi ovog rada su bili:

1. određivanje učestalosti aberantne metilacije *p16*, *p15*, *MGMT* i *DAPK* gena u uzorcima tkiva DBKL i FL;
2. ispitivanje korelacija metilacije *p16*, *p15*, *MGMT* i *DAPK* gena sa pojedinačnim kliničko-patološkim parametrima, uključujući: pol i starost ispitanika, stadijum bolesti, histološki tip tumora (kod FL), ECOG performans status, prisustvo B simptoma bolesti, veličinu tumorske mase, lokaciju tumora, kao i prisustvo tumora u kostnoj srži, nivo serumske LDH, nivo Hb (za FL);
3. ispitivanje korelacija metilacije navedenih gena sa internacionalnim prognostičkim indeksom, IPI za DBKL, odnosno, FLIPI za FL;
4. ispitivanje korelacija metilacije navedenih gena sa imunohistochemijskim parametrima, uključujući Bcl-2, Bcl-6, CD10 i Ki67 kod DBKL, odnosno, Bcl-2 i prisustvo t(14;18) kod FL;
5. ispitivanje uticaja metilacije analiziranih gena na odgovor na primenjenu terapiju i preživljavanje kod obolelih od DBKL i FL;
6. procena eventualnog prognostičkog značaja aberantne metilacije *p16*, *p15*, *MGMT* i *DAPK* gena kao bioloških markera kod ovih tipova malignih oboljenja.

## 3. MATERIJAL I METODE

### 3.1. Materijal

U ispitivanje je bilo uključeno ukupno 83 bolesnika, 51 sa dijagnozom DBKL i 32 sa dijagnozom FL. Analizirani uzorci limfoma su dobijeni prilikom postavljanja dijagnoze, biopsijom ili resekcijom tkiva (limfni čvor, kostna srž, a u slučaju ektranodalne lokacije bolesti-tonzila, jezik, slezina, jetra, GIT, CNS, pluća, bubrezi). Svi uzorci su dobijeni u obliku parafinskih isečaka tkiva. Nakon postavljanja dijagnoze, pacijenti su lečeni različitim hemoterapijskim protokolima. Odgovor na indukcionu terapiju je definisan prema kriterijumima koje su uspostavili Cheson i sar., 1999, i to kao: kompletna remisija (KR), što podrazumeva potpuni nestanak svih znakova bolesti i normalizaciju laboratorijskih i radiografskih rezultata, parcijalna remisija (PR), što podrazumeva redukciju tumorske mase i ostalih parametara za preko 50 %, stabilna bolest (SB), što podrazumeva odsustvo promena ili redukciju svih parametara  $\leq$  od 50 % u odnosu na stanje bolesti u trenutku dijagnoze, i progresija bolesti (PB), što podrazumeva novi momenat ili uvećanje tumorske mase za najmanje 25 % u odnosu na prezentaciju. Ukupno preživljavanje je definisano kao vreme proteklo od početka bolesti do završetka istraživanja (datum poslednje kontrole ili smrtni ishod). Određivan je i broj recidiva, a kod obolelih od FL je određivan i FFS (eng. *failure-free survival*), koji označava vremenski period od početka bolesti do znakova progresije bolesti, recidiva nakon postizanja KR, smrtnog ishoda ili poslednje kontrole ako nema znakova progresije bolesti.

#### 3.1.1 Uzorci tkiva DBKL

Grupa obolelih od DBKL je obuhvatala 51 ispitanika koji su lečeni na Institutu za hematologiju KCS u Beogradu, Vojno Medicinskoj Akademiji u Beogradu i Institutu za onkologiju Vojvodine, Sremska Kamenica, u periodu od 2001-2012 godine. Za analizu su izabrani pacijenti sa *de novo* nastalim DBKL. Oboleli od DBKL su lečeni standardnim CHOP/R-CHOP (ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin, prednizon, sa ili

bez rituksimaba) protokolom, ili CHOP-sličnim protokolima. Kliničko-patološke karakteristike ispitanika, imunohistohemijski podaci, kao i podaci vezani za praćenje bolesnika su prikupljeni iz pisane medicinske dokumentacije (istorije bolesti, zdravstveni kartoni, lekarski izveštaji) navedenih ustanova.

U analizi su korišćene sledeće karakteristike: bolesnika: 1) pol; 2) starost; 3) klinički stadijum bolesti, određen prema Ann Arbor klasifikaciji; 4) ECOG performan status, kojim se opisuje opšte stanje bolesnika vezano za kvalitet života i sposobnost za svakodnevne aktivnosti i rad (Oken i sar., 1982); 5) vrednosti enzima laktat dehidrogenaze (LDH) u serumu, pri čemu su se kao povišene smatrale vrednosti > 450 j/l; 6) primarna lokacija bolesti (nodalno ili ektranodalno), kao i broj ektranodalnih lokacija; 7) internacionalni prognostički indeks (IPI); 8) prisustvo B simptoma, tj. opštih simptoma bolesti, što podrazumeva postojanje bar jednog od sledećih simptoma: gubitak u telesnoj težini veći od 10 % za poslednjih šest meseci, povišena telesna temperatura, i obilno noćno znojenje; 9) zahvaćenost kostne srži malignim ćelijama; 10) veličinu tumorske mase. Od imunohistohemijskih karakteristika tumora, razmatrane su ekspresija Bcl-2, Bcl-6, Bcl-10 i Ki67 proteina. U slučaju prva tri parametra, vrednosti su uzimane kao pozitivne ukoliko je najmanje 50 % tumorskih ćelija ekspimiralo navedene markere. U slučaju Ki67 proteina, ekspresija u 0-30 % tumorskih ćelija je uzimana kao slaba, u preko 30-60 % kao umerena, a u preko 60 % ćelija kao jaka (Peruničić Jovanović i sar., 2009). Svi podaci su prikazani u Tabeli 3.1.

**Tabela 3.1. Kliničko-patološke karakteristike obolelih od DBKL**

red.br. uzorka	god./pol	IPI/stadijum	PS/BS/KS/VTM( $\geq 10\text{cm}$ )	LDH	lokacija/br. ex.nod.lok.	Bcl-2/Bcl-6	CD10/Ki67
1	73/m	visok/IV	$\geq 2/\text{da}/\text{da}/\text{ne}$	uvećan	nod./1	+/+	+/70%
3	75/ž	visok/IV	$\geq 2/\text{da}/\text{da}/\text{ne}$	referentan	ex.nod./2	+/+	+/60%
8	63/m	visok/IV	4/da/da/ne	uvećan	nod./0	+/+	+/>80%
11	66/m	sr.visok/III	0/ne/ne/ne	uvećan	nod./0	-/+	+/10-30%
12	50/ž	sr.visok/IV	0/da/da/da	uvećan	nod./1	+/+	-/ND
13	71/ž	sr.visok/III	0/ne/ne/ne	uvećan	nod./0	+/ND	-/70%
17	75/ž	visok/IV	$\geq 2/\text{da}/\text{da}/\text{ne}$	uvećan	nod./0	+/-	+/ND
23	19/m	sr.visok/IV	1/da/da/ne	uvećan	nod./0	+/-	ND/40%
25	56/m	sr.nizak/III	1/da/ne/ne	referentan	nd./0	ND/ND	ND/ND
27	65/ž	sr.visok/IV	1/da/da/ne	uvećan	nod./1	-/ND	ND/80%
28	79/ž	sr.visok/IV	1/da/da/ne	uvećan	nod./0	-/ND	ND/ND
29	67/ž	visok/IV	$\geq 2/\text{da}/\text{da}/\text{ne}$	referentan	nod./>1	-/+	ND/ND
32	32/m	visok/III	2/da/ne/da	uvećan	nod./1	-/+	-/>80%
36	81/m	visok/IV	3/da/da/da	uvećan	ex.nod./5	-/-	-/90%
37	51/ž	nizak/II	0/da/ne/ne	referentan	ex.nod./1	-/+	ND/90%
39	52/m	sr.visok/III	1/da/ne/da	uvećan	ex.nod./1	+/ND	-/80%
41	52/ž	sr.visok/IV	1/da/da/da	uvećan	nod./0	+/ND	ND/60%
42	72/m	sr.nizak/III	0/da/ne/da	referentan	nod./0	+/ND	ND/80%
43	66/ž	sr.visok/IV	1/da/ne/ne	uvećan	nod./0	-/+	-/100%
44	74/m	sr.visok/IV	1/da/da/ne	uvećan	nod./0	+/+	ND/>80%
46	67/m	visok/IV	2/da/da/ne	uvećan	nod./1	+/ND	ND/25%
48	78/m	visok/III	2/ne/ne/ne	uvećan	nod./0	-/-	ND/70%
51	65/m	sr.visok/III	1/da/ne/ne	uvećan	nod./0	+/ND	ND/ND
53	77/ž	sr.nizak/IV	1/da/ne/da	referentan	nod./1	ND/ND	ND/ND
59	46/m	visok/III	$\geq 2/\text{da}/\text{ne}/\text{ne}$	referentan	ex.nod./>1	ND/ND	+/ND
63	36/m	sr.visok/IV	1/da/ne/ne	uvećan	nod./1	-/-	ND/50%
67	53/m	visok/IV	0/da/da/da	uvećan	nod./1	+/-	ND/ND
77	67/m	sr.visok/IV	0/ne/ne/ne	referentan	ex.nod./>1	+/-	ND/>80%
79	40/ž	sr.nizak/III	1/da/ne/ne	uvećan	nod./0	-/-	ND/ND
80	58/ž	sr.nizak/IV	0/ne/ne/ne	referentan	ex.nod./1	-/ND	ND/ND
81	46/m	visok/IV	3/ND/ne/ND	uvećan	ex.nod./2	-/ND	+/>60%
82	50/m	visok/IV	3/da/da/da	uvećan	nod./2	-/ND	ND/40%
83	40/ž	sr.nizak/IV	0/ne/ne/ne	referentan	ex.nod./1	-/ND	ND/60%
84	58/m	visok/IV	2/da/da/ne	uvećan	nod./2	-/+	ND/70%
85	21/ž	sr.nizak/IV	0/ne/da/ne	referentan	ex.nod./2	ND/+	ND/>60%
86	64/ž	visok/IV	0/ne/ne/ne	uvećan	ex.nod./2	-/+	ND/60%
87	52/m	nizak/II	0/ne/ne/ne	referentan	ex.nod./1	+/+	ND/60%
88	26/m	sr.visok/IV	2/ND/ne/ND	referentan	ex.nod./2	ND/ND	ND/ND
89	72/m	sr.nizak/IV	0/ne/da/ne	referentan	nod./1	-/+	ND/ND
90	64/m	nizak/II	0/ne/ne/da	referentan	ex.nod./1	-/-	-/ND
91	56/ž	sr.visok/III	1/da/ne/ne	uvećan	nod./0	-/-	ND/ND
92	47/ž	visok/IV	3/da/da/da	uvećan	ex.nod./4	+/+	-/70%
95	73/ž	sr.visok/III	1/da/ne/ne	uvećan	nod./0	-/-	-/60-70%
104	54/ž	sr.nizak/II	1/da/ne/ne	uvećan	nod./0	-/-	-/40-50%
105	62/m	sr.nizak/III	0/ne/ne/ne	referentan	ex.nod./1	-/+	+/50%
107	36/m	sr.visok/III	0/ne/ne/ne	uvećan	nod./0	-/-	-/>60%
109	57/ž	nizak/II	1/da/ne/ne	ND	nod./0	-/+	+/30-40%
110	71/m	nizak/I	1/ne/ne/ne	referentan	ex.nod./1	-/-	-/40-50%
111	32/m	sr.visok/III	2/da/ne/da	referentan	ex.nod./1	+/+	+/70%
114	25/ž	sr.visok/II	0/ne/ne/ne	referentan	ex.nod./1	-/-	-/30%
118	49/ž	nizak/I	0/ne/ne/ne	referentan	ex.nod./1	-/+	+/70%

IPI, internacionalni prognostički indeks; PS, performans status; BS, B simptomi; KS, kostna srž; VTM, veličina tumorske mase; LDH, laktat dehidrogenaza; +, prisutna ekspresija; -, odsutna ekspresija; ND, podatak nije dostupan.

### 3.1.2 Uzorci tkiva FL

Grupa obolelih od FL je obuhvatala 32 ispitanika koji su dijagnostikovani i lečeni na Institutu za hematologiju KCS u Beogradu, na Klinici za internu medicinu KBC Dr Dragiša Mišović u Beogradu i na Vojno Medicinskoj Akademiji u Beogradu, u periodu od 1990-2003 godine. Oboleli od FL su lečeni različitim hemioterapijskim protokolima (LP, LOP, LOPP, COP, BACOP, ProMACECytaBOM, CAMP, CNOP, FC). Kod jednog pacijenta sa dijagnozom FL je primenjeno i antiCD20 monoklonsko antitelo-rituksimab. Kod nekih je primenjena i dopunska terapija zračenjem. Kliničko-patološke karakteristike ispitanika, imunohistohemijski i cito-genetički podaci, kao i podaci vezani za praćenje bolesnika su dobijeni od dr Milice Radojković iz KBC Dr Dragiša Mišović, u Beogradu (doktorska disertacija, 2004).

U analizi su korišćene sledeće karakteristike bolesnika: 1) pol; 2) starost; 3) klinički stadijum bolesti, određen prema Ann Arbor klasifikaciji; 4) histo-patološki tip, tj. gradus tumora, 5) ECOG performan status, 6) vrednosti enzima laktat dehidrogenaze (LDH) u serumu, pri čemu su se kao povišene smatrale vrednosti  $> 320$  j/l; 7) vrednosti hemoglobina (Hb), pri čemu su se kao snižene smatrale vrednosti  $< 120$  g/l; 8) internacionalni prognostički indeks za FL (FLIPI); 9) prisustvo B simptoma bolesti; 10) zahvaćenost kostne srži malignim ćelijama; 11) veličinu tumorske mase. Od imunohistohemijskih karakteristika tumora, razmatrana je ekspresija Bcl-2 proteina. Na osnovu procenta tumorskih ćelija koje su ekspimirale Bcl-2, ekspresija je označena kao slaba, umerena, odnosno jaka. Od cito-genetičkih karakteristika FL, razmatrano je prisustvo translokacije t(14;18). Svi podaci su prikazani u Tabeli 3.2.

**Tabela 3.2. Kliničko-patološke karakteristike obolelih od FL.**

r.br. uzorka	godine/pol	FLIPI/stadijum/gradus	PS/BS/KS/VTM (≥ 10 cm)	LDH/Hb	Bcl-2	t(14;18)
38	58/m	srednji/IV/I	1/da/da/ne	ref./ref.	ND	da
39	49/ž	srednji/IV/II	1/da/da/da	uvećan/ref.	+++	ne
42	46/m	nizak/II/I	0/ne/ne/ne	ref./ref.	+	da
43	67/ž	visok/IV/II	1/ne/dane	ref./ref.	ND	da
45	69/m	srednji/IV/I	1/da/da/ne	ref./ref.	+	da
49	61/m	visok/IV/I	3/da/da/da	uvećan/snižen	ND	da
52	74/ž	visok/IV/III	3/da/da/da	uvećan/ref.	+	da
55	61/ž	srednji/IV/I	1/ne/da/ne	ref./ref.	+	da
57	68/m	visok/IV/III	3/da/da/da	uvećan/snižen	++	da
60	44/ž	nizak/IV/I	1/da/da/ne	ref./ref.	+++	da
63	78/m	srednji/IV/I	1/ne/da/ne	ref./ref.	+	da
69	53/m	visok/III/II	2/da/ne/da	uvećan/snižen	+	da
71	49/m	visok/IV/II	3/da/da/da	uvećan/snižen	+	da
78	81/m	visok/III/III	2/da/ne/da	uvećan/ref.	ND	da
83	51/ž	nizak/II/II	1/ne/ne/ne	ref./ref.	+	da
91	52/m	visok/IV/I	1/ne/da/ne	uvećan/ref.	ND	da
94	52/ž	nizak/IV/I	0/ne/da/ne	ref./ref.	ND	ne
95	72/m	visok/IV/III	3/da/da/da	uvećan/snižen	ND	da
96	66/ž	srednji/II/II	1/ne/ne/ne	ref./snižen	+	da
97	74/m	visok/II/II	3/da/ne/da	ref./ref.	ND	da
98	67/m	srednji/IV/I	1/ne/da/ne	ref./ref.	ND	da
99	78/m	visok/IV/III	1/ne/da/ne	ref./ref.	ND	da
100	65/m	visok/IV/I	2/da/da/ne	uvećan/snižen	+	ne
125	77/ž	visok/III/I	3/da/da/da	uvećan/snižen	+	ne
126	46/m	nizak/IV/I	1/ne/da/ne	ref./snižen	+	da
128	36/m	srednji/IV/II	1/ne/da/ne	ref./ref.	+	da
129	53/m	srednji/IV/I	1/ne/da/ne	ref./ref.	ND	ne
130	67/m	srednji/IV/I	1/ne/da/ne	ref./ref.	ND	ne
131	40/ž	srednji/IV/I	1/da/da/ne	ref./snižen	+++	ne
132	58/ž	srednji/IV/I	1/ne/da/ne	ref./ref.	+++	da
133	46/m	nizak/I/I	0/ne/ne/ne	ref./ref.	+++	da
135	50/m	srednji/IV/I	1/da/da/ne	ref./snižen	++	da

FLIPI, FL internacionalni prognostički indeks; PS, performans status; BS, B simptomi; KS, kostna srž; VTM, veličina tumorske mase; LDH, laktat dehidrogenaza; Hb, hemoglobin; +, slaba ekspresija; ++, umerena ekspresija; +++, jaka ekspresija; ND, podatak nije dostupan.

### 3.1.3. Kontrolni uzorci

U ispitivanje su bile uključene i odgovarajuće pozitivne i negativne kontrole. Kao standardno zdravo tkivo su korišćeni limfociti periferne krvi zdravih odraslih osoba, čije su DNK služile kao pozitivne kontrole za nemetilovane, odnosno kao negativne kontrole za metilovane alele *p16*, *p15*, *MGMT* i *DAPK* gena. Ista DNK, metilovana *in vitro*, uz prisustvo enzima M.SssI (BioLabs, New England), služila je kao pozitivna kontrola za metilovane alele svih ispitivanih gena.

## 3.2. Metode

Za analizu metilacionog statusa *p16*, *p15*, *MGMT* i *DAPK* gena korišćene su sledeće metode molekularne genetike:

- izolacija DNK iz isečaka tkiva DBKL, FL i limfocita periferne krvi zdravih osoba;
- *in vitro* metilacija DNK izolovane iz limfocita periferne krvi zdravih osoba;
- bisulfitna modifikacija izolovane DNK;
- umnožavanje željenih fragmenata modifikovane DNK PCR tehnikom specifičnom za metilaciju, MSP (eng. *methylation specific PCR*), korišćenjem specijalno dizajniranih prajmera za metilovanu, tj. nemetilovanu DNK;
- analiza rezultata dobijenih u MSP reakcijama elektroforezom na agaroznim i poliakrilamidnim gelovima;
- statistička obrada dobijenih rezultata

### 3.2.1. Izolacija DNK

DNK je iz svih uzoraka izolovana klasičnom fenol/hloroform/izoamil-alkohol procedurom (Ausubel, 1987). Nakon fenolske ekstrakcije, postupci za izolaciju DNK iz isečaka tkiva, odnosno limfocita periferne krvi su se donekle razlikovali. DNK iz isečaka tkiva je delimično fragmentisana, pa su zbog toga uzorci, nakon dodavanja amonijum acetata i izopropil-alkohola taloženi preko noći na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2.1.1. Izolacija DNK iz parafinskih isečaka tkiva

- svakom uzorku je dodato je po 1 ml ksilola, kako bi se uklonio parafin, pa je lagano mućkano ručno 30 minuta, centrifugirano 5 min/15300 g, nakon čega je pažljivo uklonjen ksilol nastavkom;
- postupak sa dodavanjem ksilola je ponovljen, nakon mućkanja 15 min i centrifugiranja 5 min/17900 g je uklonjen ksilol;
- dodato je po 500  $\mu\text{l}$  apsolutnog EtOH, lagano mućkano 5 min, centrifugirano 5 min/17900 g, nakon čega je pažljivo uklonjen EtOH nastavkom;
- postupak sa dodavanjem apsolutnog EtOH je ponovljen;



- nakon centrifugiranja 5 min/17900 g, EtOH je pažljivo uklonjen nastavkom;
- isečki tkiva su osušeni u otvorenim epruветama pored plamenika, tokom 20 do 30 min;
- u svaki uzorak je dodato po 500  $\mu$ l digestionog pufera koji u finalnoj koncentraciji sadrži 25 mM EDTA, pH 8.0; 100 mM NaCl; 10 mM TRIS-HCl, pH 8.0; 0.5% SDS i 100  $\mu$ g (19.6 mg/ml) proteinaze K (MBI Fermentas, Litvanija);
- uzorci su inkubirani preko noći na temperaturi 50-55°C, uz povremeno mućkanje. Veći komadi tkiva su zahtevali duže vreme inkubacije (do 48 h), i dodatne količine digestionog pufera i proteinaze K;
- u svaki uzorak (500  $\mu$ l) je dodata ista količina smeše koja sadrži fenol/hloroform/izoamil-alkohol (F/H/I) u odnosu 25:24:1, nakon čega je mućkano ručno 10 min, uzorci su zatim centrifugirani 5 min/10600g, pa je izdvojena vodena faza nastavkom sa odsečenim vrhom, i prebačena u novu epruветu;
- postupak sa fenolom je ponovljen još 1-2 x;
- vodenoj fazi je dodata ista zapremina smeše H/I (24:1), nakon čega je mućkano ručno 10 min i centrifugiramo 5 min/10600 g;
- vodena faza je izdvojena u novu epruветu;
- svakom uzorku u vodenoj fazi je dodato po 1/2 zapremine 7.5M amonijum acetata (Serva 39751, Nemačka) i 2 zapremine izopropil-alkohola, nakon čega su uzorci ostavljeni na -20°C da se DNK taloži preko noći;
- uzorci su centrifugirani 20 min/12000g/4°C, odliven je supernatant i dodato je 1/2 zapremine hladnog 70 % EtOH;
- uzorci su centrifugirani 15 min/12000g/4°C, odliven je supernatant, epruветe su ostavljene otvorene pored plamenika 15-30 min. dok sav EtOH ne upari;
- DNK je rastvorena u odgovarajućoj zapremini (50-100  $\mu$ l) ddH<sub>2</sub>O, nakon čega je odložena na 4°C.

### 3.2.1.2. Izolacija DNK iz limfocita periferne krvi

- nakon fenolske ekstrakcije DNK iz taloga limfocita periferne krvi, prethodno dobijenog prema protokolu koji je opisao Boyum (1968), vodenoj fazi je dodata 1/10 zapremine 3 M natrijum acetata, pH 5.2 i 2 zapremine hladnog apsolutnog EtOH, nakon čega je, uz ručno mućkanje, došlo do precipitacije DNK u vidu končića;
- makroskopski vidljivi končići DNK su zatim namotani na staklenu Pasterovu pipetu, zatopljenog i zakrivljenog vrha;
- DNK je isprana uranjanjem Pasterove pipete u 70 % EtOH, a zatim je sušena na vazduhu 15 min, rastvorena u 100-200  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O i odložena na 4°C.

### 3.2.1.3. Merenje koncentracije izolovane DNK

Koncentracija i kvalitet izolovane DNK su određeni merenjem apsorbance na spektrofotometru BioSpec-nano (Shimadzu corporation, Japan). Maksimum apsorbance za nukleinske kiseline je na 260 nm i na osnovu njega se računa koncentracija DNK u našem izolatu (1OD = 50 ng). Maksimum apsorbance soli je na 230 nm, a za proteine na 280 nm. Visoko prečišćena DNK ima odnos apsorbanci  $A_{260}/A_{280} > 1,8$ , što je bio slučaj i sa našim uzorcima.

### 3.2.2. *In vitro* metilacija DNK izolovane iz limfocita periferne krvi

DNK izolovana iz limfocita periferne krvi zdravih osoba je metilovana *in vitro*, upotrebom enzima CpG metiltransferaze M.SssI (New England Biolabs M0226M). Ovaj enzim, pod odgovarajućim uslovima, dodaje metil grupe na C5 poziciju svih citozina u okviru CpG dinukleotida u DNK supstratu. Reakcija se odvijala u zapremini od 20  $\mu$ l. Na 2  $\mu$ g izolovane DNK iz limfocita periferne krvi zdravih osoba, dodata su 2  $\mu$ l 10 x NE pufera (finalna koncentracija 10mM Tris-HCl, pH 7.9, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT), 0.4  $\mu$ l 32mM SAM (finalna koncentracija 0.64 mM) i 8 j enzima M.SssI (4.j/ $\mu$ g DNK). Uzorci su inkubirani 4h/37°C, nakon čega je usledila inaktivacija enzima dodatnim inkubiranjem 20 min/65°C. Tako metilovana DNK je čuvana na 4°C do bisulfitne modifikacije.

### 3.2.3. Bisulfitna modifikacija DNK

Osnovni koraci protokola za bisulfitnu modifikaciju DNK su: denaturacija genomske DNK natrijum hidroksidom, tretiranje jednolančane DNK koncentrovanim rastvorom natrijum bisulfita i hidrohina na pH 5.0, desulfonovanje natrijum hidroksidom, uklanjanje soli, neutralizacija, taloženje i rastvaranje modifikovane DNK u vodi ili odgovarajućem puferu. U ovom radu bisulfitni tretman je izvođen prema protokolu koji su opisali Herman i sar., (1996b), uz manje izmene u pojedinim koracima (Grunau i sar., 2001).

- 2 µg DNK u zapremini od 50 µl je denaturisano dodavanjem 3 M NaOH (fin. 0.3 M) i inkubiranjem 30 min/42°C;
- prethodno denaturisanoj DNK dodato je 550 µl sveže pripremljenog rastvora natrijum bisulfita (5.20-5.69 M HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>; pošto je komercijalno dostupan natrijum bisulfit mešavina natrijum bisulfita i metabisulfita, procenjuje se da je finalna koncentracija HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> u napravljenom rastvoru 5.20-5.69 M), pH 5.0, sa 10 mM hidrohonom (Tabela 3.3.), nakon čega je usledila inkubacija 18h/55°C.

**Tabela 3.3. Rastvori za bisulfitnu modifikaciju DNK**

0.2 M hidrohion (1 ml)

0.22 g hidrohiona (Sigma H – 9003, SAD) je rastvoreno u 1 ml ddH<sub>2</sub>O

NaHSO<sub>3</sub> pH 5.0 (10 ml)

5.41 g NaHSO<sub>3</sub> (Sigma S-8890, SAD) je rastvoreno u 8 ml ddH<sub>2</sub>O i dodavanjem 10 M NaOH, pH vrednost je podešena na 5.0. Zatim je bisulfitnom rastvoru dodato 500 µl sveže pripremljenog rastvora hidrohiona. Nakon kompletnog rastvaranja NaHSO<sub>3</sub>, dodavanjem ddH<sub>2</sub>O zapremina rastvora je podešena na 10 ml.

Nakon bisulfitnog tretmana, modifikovana DNK je prečišćena upotrebom KIT-a za ekstrakciju DNK (MBI Fermentas K0512, Litvanija). Postupak prečišćavanja se zasnivao na sledećem principu: u prisustvu haotropnih soli, 6 M rastvora natrijum jodida (u daljem tekstu BS-, „*Binding Solution*“), DNK se prvo vezuje za specijalno dizajnirane staklene čestice, a zatim se, da bi se dobila prečišćena DNK, ove soli i zaostale nečistoće uklanjaju ispiranjem u odgovarajućem puferu koji sadrži u jednakom odnosu supstance TRIS, NaCl, EDTA i 95% EtOH (WB-, „*Washing Buffer*“). Nakon ispiranja, DNK se eluira sa staklenih čestica pomoću ddH<sub>2</sub>O ili odgovarajućeg pufera.

- nakon bisulfitne modifikacije sadržaj svake epruvete podeljen je na dva jednaka dela i dodato je po tri zapremine BS rastvora i odgovarajuća zapremina resuspendovane suspenzije silicijum dioksida koja sadrži staklene čestice za vezivanje DNK;
- uzorci su inkubirani 5-15 min na 55°C da bi se DNK vezala za čestice SiO<sub>2</sub>-pudera, uz vorteksovanje svaka 2 min kako bi se SiO<sub>2</sub>-puder održao u suspenziji;
- nakon centrifugiranja 5 s/13000 g i odlivanja supernatanta, epruvete su centrifugirane još jednom 2-3 s i preostali BS je uklonjen nastavkom;
- dodato je po 500 µl hladnog WB, nakon čega je talog resuspendovan nastavkom i uzorci su centrifugirani 5 s/13000g;
- nakon odlivanja supernatanta postupak sa WB je ponovljen još 2 x;
- nakon poslednjeg ispiranja i odlivanja supernatanta, epruvete sa SiO<sub>2</sub>-puder suspenzijom su centrifugirane još 1 x i preostali WB je uklonjen nastavkom; epruvete su ostavljene otvorene 10-15 min na vazduhu da se talog osuši;
- DNK je eluirana sa staklenih čestica dodavanjem 40 µl 1 mM TRIS-HCl, pH 8.0, talog je resuspendovan nastavkom, nakon čega je usledilo inkubiranje 5 min/55°C;
- nakon centrifugiranja 30 s/13000 g supernatant je prenesen u novu epruvetu, izbegavajući staklene čestice; postupak je ponovljen još 2 x sa istom količinom 1 mM TRIS-HCl, pH 8.0; da bi se uklonile eventualno zaostale staklene čestice, epruvete sa eluiranom DNK su centrifugirane 30 s/13000 g i supernatant je pažljivo prenet u nove epruvete;
- uzorcima je dodata odgovarajuća zapremina sveže pripremljenog 3 M NaOH (fin. 0.3 M) i uzorci su stavljeni na inkubaciju 20 min/37°C;
- desulfonovanoj DNK je dodato 1/2 zapremine 7.5 M NH<sub>4</sub> acetata (Serva, Nemačka), pH 7.0, 2.5 zapremine hladnog apsolutnog EtOH i 1 µg tRNK (yeast tRNK 1 mg/µl, GibcoBRL, SAD) kao nosača, nakon čega je usledilo taloženje na -20°C preko noći;
- nakon centrifugiranja od 20 min/13000 g/4°C, dekantovan je supernatant i dodata je 1/2 zapremine 70 % EtOH;
- nakon centrifugiranja 10 min/13000 g/4°C, dekantovan je supernatant i epruvete su ostavljene otvorene 15-30 min dok sav EtOH nije upario;

- DNK je rastvorena u 40  $\mu$ l 1 mM TRIS-HCl, pH 8.0 i odložena na -20°C. Ovako modifikovana i prečišćena DNK je predstavljala uzorak za amplifikaciju MSP tehnikom.

### 3.2.4. Amplifikacija DNK MSP tehnikom

Metilacioni status *p16*, *p15*, *MGMT* i *DAPK* gena je ispitivan amplifikacijom modifikovane DNK PCR tehnikom specifičnom za metilaciju, MSP, uz korišćenje odgovarajućih prajmera za metilovanu, odnosno nemetilovanu DNK. Za svaki uzorak modifikovane DNK urađene su po dve PCR reakcije za odgovarajući gen: jedna sa setom za metilovane i druga sa setom za nemetilovane prajmere.

Pored odgovarajućih uzoraka u svaku PCR reakciju se uključuju još tri epruvete: tzv. „slepa kontrola“ (ddH<sub>2</sub>O umesto DNK), kao kontrola specifičnosti reakcije, pozitivna i negativna kontrola za uzorke (nemetilovana i *in vitro* metilovana DNK iz limfocita zdrave osobe). U Tabeli 3.4. su prikazane sekvence prajmera koji su korišćeni za amplifikaciju *p16* (Herman i sar., 1996b), *p15* (Herman i sar., 1996b), *MGMT* (Esteller i sar., 1999) i *DAPK* (Katzenellenbogen i sar, 1999) gena.

**Tabela 3.4. Prajmeri za MSP**

prajmer	sens 5'→3'	antisens 5'→3'	dužina produkta/ hibridizacija
p15m	GCGTTCGTATTTTGCGGTT	CGTACAATAACCGAACGACCGA	148bp / 57°C
p15n	TGTGATGTGTTTGTATTTGTGGTT	CCATACAATAACCAAACAACCAA	154bp / 57°C
p16m	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCCGAACCGCGACCGTAA	150 bp / 65°C
p16n	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CAACCCCAAACCACAACCATAA	151 bp / 60°C
MGMTm	TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTCGC	GCACTCTTCCGAAAACGAAAACG	81bp / 57 °C
MGMTn	TTTGTGTTTGATGTTGTAGGTTTGT	AACTCCACACTCTCCAAAAACAAAAA	93 bp / 57 °C
DAPKm	GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC	CCCTCCCAAACGCCGA	98 bp / 60°C
DAPKn	GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT	CAAATCCCTCCCAAACACCAA	106 bp / 60°C

m-metilovani; n-nemetilovani; bp-bazni par

MSP je izvođen na PCR aparatu Applied Biosystems 2720 (SAD) u Eppendorf epruvetama (0.2 ml) u finalnoj zapremini od 50  $\mu$ l. Amplifikacija se odvijala u toku 40 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije DNK (45 s na 95°C), hibridizacije (45 s na odgovarajućoj temperaturi u zavisnosti od ispitivanog gena, Tabela 3.4.) i elongacije (60 s na 72°C). Prvi ciklus amplifikacije je započet sa 5 min denaturacije na 95°C, a u

poslednjem je elongacija produžena na 4 min na 72°C. Za svaku PCR reakciju su pripremljeni odgovarajuće PCR smeše u čiji sastav ulaze komponente prikazane u Tabeli 3.5.

**Tabela 3.5. Sastav smeše za MSP**

<b>komponente</b>	<b>finalna koncentracija u 50 <math>\mu</math>l</b>
10 x PCR pufer*	1 x
25 mM MgCl <sub>2</sub>	6. 25 mM
10 mM dNTP	1.25 mM
300 ng 50 $\mu$ M sense prajmera	0.8-1.0 $\mu$ M
300 ng 50 $\mu$ M antisense prajmera	0.8-1.0 $\mu$ M
100% DMSO	5%
20 mg/ml BSA	0.4 mg/ml

\*pufer koji je korišćen za PCR je napravljen prema protokolu koji su dali Herman i sar., (1996b). i omogućava specifičnu i visoko efikasnu amplifikaciju. MgCl<sub>2</sub> koji prema originalnom protokolu ulazi u sastav 1 x PCR pufera je dodavan posebno u PCR reakcionu smešu. Sastav 1 x pufera: 16.6 mM amonijum sulfat, 67 mM Tris-HCl pH 8.8, 10 mM 2-merkaptetanol.

Nakon dodavanja i mešanja svih komponenata, jednaka zapremina PCR reakcione smeše je razdeljena u epruvete za PCR, nakon čega je dodata 1/10 od zapremine modifikovane DNK. Epruvete su u aparatu za PCR zagrevane 5 min/95°C (inicijalna denaturacija) i nakon isteka ovog vremena u svaku epruvetu je dodata po 1.25 jedinica Taq polimeraze (MBI Fermentas, Litvanija) razblažene u 4.75  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O. Dodavanje jedne od komponenata PCR reakcije naknadno, nakon koraka inicijalne denaturacije, označava se kao „hot start“ reakcija i izvodi se u cilju povećanja specifičnosti amplifikacije.

### **3.2.5. Elektroforeza**

Detekcija amplifikovanih sekvenci DNK je vršena elektroforezom na agaroznom i poliakrilamidnom gelu. Ova tehnika omogućava vrlo precizno razdvajanje fragmenata čija brzina kretanja i međusobno rastojanje na gelu zavise od molekulske mase, dužine fragmenata, primarne i sekundarne strukture. U ovom radu, fragmenti su razdvajani na osnovu njihove dužine. Nakon elektroforeze gelovi su arhivirani pomoću sistema za snimanje i analizu gelova GDS8000-Gel Documentation System (UVP Inc, Upland, SAD) koji se sastoji od mračne komore sa UV/belom svetlošću, CCD kamere,

transiluminatora, procesora i odgovarajućeg programa za obradu podataka. Utvrđivanje veličine ispitivanih fragmenata je vršeno u odnosu na odgovarajući marker.

### 3.2.5.1. Elektroforeza na agaroznom gelu

Provera uspešnosti amplifikacije PCR reakcije je radjena na 2 % agaroznom gelu koji je pripreman prema sledećem protokolu prikazanom u Tabeli 3.6.

**Tabela 3.6 Komponente za pripremu agaroznog gela**

<b>komponente za 2 % gel</b>	<b>količina(25 ml)</b>
agarozna	0.5 g
10xTAE*	2.5 ml
SYBR Green I (Sigma, USA)	2.5 µl
dH <sub>2</sub> O	22.5 ml

\*10xTAE pufer, pH 8.0 (48.4 g Tris, 11.42 ml CH<sub>3</sub>COOH, 20 ml 0.5 M EDTA, dH<sub>2</sub>O do 1000 ml)

Razdvajanje fragmenata DNK se odvijalo na sistemu za horizontalnu elektroforezu u polju jačine 80 V (7.5 V/cm) u trajanju od 40 min. Na gel je nanošeno po 10µl uzorka pomešanog sa 2µl boje bromfenol plavo (0,25% bromfenol plavo, 0.25% ksilen-cijanol u 30% glicerolu) ili oranž G (0.4% oranž G, 30 % glicerol). Vizuelizacija traka nakon elektroforeze se odvijala pod UV-svetlošću transiluminatora.

### 3.2.5.2. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu

Razdvajanje fragmenata DNK i analiza rezultata PCR reakcije, postignuta je elektroforezom na 6% poliakrilamidnom (PAA) gelu u nenedenaturišućim uslovima. Gel je pripreman prema protokolu prikazanom u Tabeli 3.7.

**Tabela 3.7 Komponente za pripremu poliakrilamidnog gela**

<b>komponente za 6% gel</b>	<b>količina (25 ml)</b>
PAA štok* 40%	5.0 ml
10 x TBE**	2.5 ml
10% amonijum persulfat	210 µl
N, N, N', N' TEMED	16 µl
ddH <sub>2</sub> O	17.5 µl

\*38:2 (akrilamid:bis-akrilamid); \*\*10 x TBE pufer, pH 8.3 (108 g Tris, 55 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 40 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0, dH<sub>2</sub>O do 1000.

Elektroforeza se odvijala u vertikalnom polju u kadama sa 1x TBE puferom, u trajanju od 15 min/70 V (4 V/cm), a zatim 75 min/140V (7.5 V/cm). Na gel je nanošeno po 10  $\mu$ l uzorka pomešanog sa 2  $\mu$ l boje bromfenol plavo (0,25 % bromfenol plavo, 0,25 % ksilen-cijanol u 30 % glicerolu). Vizuelizacija razdvojenih DNK fragmenata na gelu je postignuta postupkom bojenja srebronitratom (Hiort i sar., 1994).

### 3.2.6. Statistička obrada rezultata

Dobijeni rezultati su obrađeni i prikazani u tabelama i na grafikonima uz propratnu diskusiju istih a u zavisnosti od prirode posmatrane varijable.

Deskripcija numeričkih obeležja je urađena klasičnim metodama opisne statistike i to aritmetičkom sredinom, i medijanom od srednjih vrednosti, a od mera varijabiliteta standardnom devijacijom, koeficijentom varijacije i standardnom greškom, kao i minimalnom i maksimalnom vrednošću. Relativni brojevi su korišćeni u svim tabelama.

U analizi rezultata, u zavisnosti od prirode samih varijabli, korišćeni su Pirsonov  $\chi^2$ -test, i to u obliku testova slaganja i tablica kontingencija, za poređenje razlike između učestalosti kod neparametarskih obeležja i to za jedno odnosno dva obeležja. Kod numeričkih ograničenja tablice 2x2 primenjen je Fišerov egzaktni test.

Za poređenje prosečnih vrednosti parametarskih obeležja upotrebljen je Studentov t-test za dve grupe podataka.

Kod poređenja tri ili više grupa podataka korišćena je Fišerova parametarska analiza varijanse (ANOVA) kod parametarskih podataka, i neparametarska analiza varijanse za proporcije za neparametarske podatke.

Za analizu preživljavanja obolelih korišćena je Kaplan-Majerova metoda, kao i Log-Rank test za poređenje preživljavanja među ispitivanim grupama.

U svim primenjenim analitičkim metodama prihvaćeni nivo statističke značajnosti je bio  $p \leq 0.05$ .

Za obradu podataka je korišćen licencirani program za statističku analizu Sigma Plot 10.0.



## 4. REZULTATI

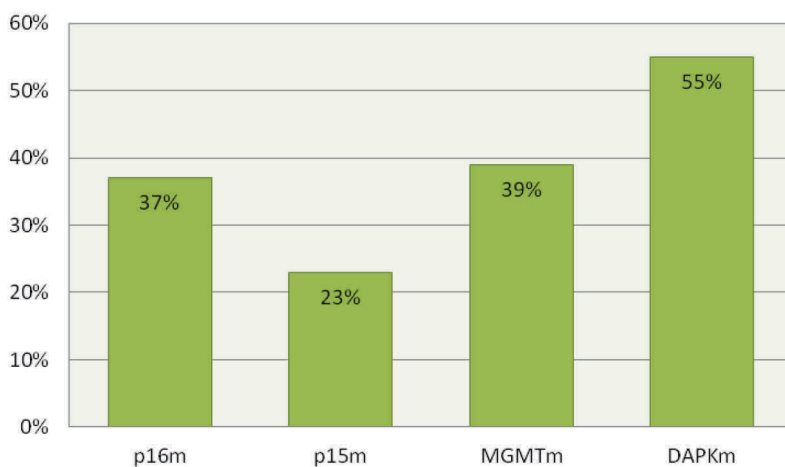
### 4.1. Opšte karakteristike ispitanika obolelih od DBKL

Grupa obolelih od DBKL je obuhvatila 51 ispitanika, čija je prosečna starost iznosila  $52.4 \pm 17.5$  godina (opseg 19-83). Dvadeset pet (49 %) ispitanika je bilo ženskog, a 26 (51 %) ispitanika muškog pola. Njihova prosečna starost se nije statistički značajno razlikovala ( $55.9 \pm 17.3$  vs.  $49.0 \pm 17.7$  godina,  $p = 0.169$ ). Tridest (58.8 %) ispitanika je bilo mlađe, a 21 (41.2 %) starije od 60 godina. Sedamnaestoro (33.3 %) ispitanika je pripadalo kategoriji niskog/umereno-niskog IPI rizika, a 34 ispitanika (66.7 %) kategoriji umereno-visokog/visokog IPI rizika. Najveći broj ispitanika (84.3 %) je bio u uznapredovalom kliničkom stadijumu bolesti (klinički stadijum III/IV). Uvećan nivo serumske LDH ( $> 450$  j/l) je zabeležen u 56.9 % slučajeva. Skor ECOG performans statusa  $\geq 2$  je utvrđen kod 31.4 % ispitanika, a kod 23.5 % je bila prisutna i tumorska masa veličine  $\geq 10$  cm. B simptome je ispoljavalo 64.7 % ispitanika. Imunohistohemijski nalaz za Bcl-2 protein je bio pozitivan kod 39.1 % ispitanika (od 46 ispitanika za koje je postojao podatak, 18/46), za Bcl-6 kod 65.7 % (23/35), CD10 kod 47.8 % (11/23), a Ki67 je u visokom procentu ( $> 60$  %) bio eksprimiran kod 58.3 % ispitanika (21/36). Kada je analiziran odgovor na indukcionu terapiju, 83.7 % ispitanika je odgovorilo kompletnom ili parcijalnom remisijom, dok kod 16.3% ispitanika nije bilo odgovora na primenjenu terapiju ili je došlo do progresije bolesti. Do recidiva bolesti je tokom petogodišnjeg perioda praćenja došlo kod 29.5 % (13/44) obolelih od DBKL, a smrtni ishod je zabeležen kod 42.6 % (20/47) slučajeva.

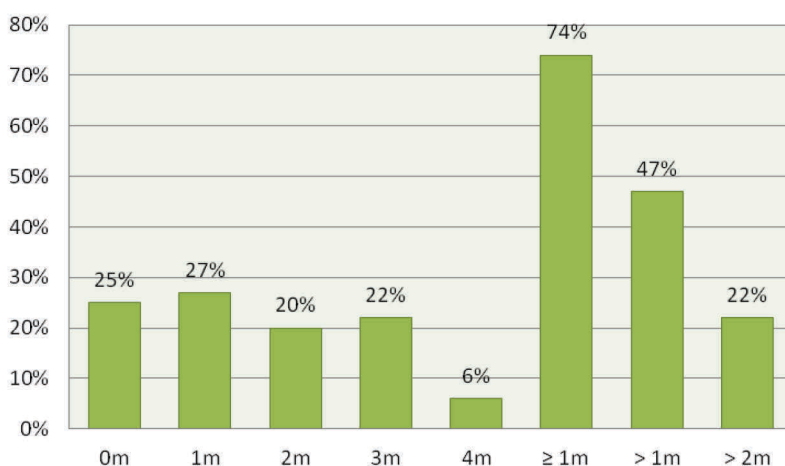
#### 4.1.1. Ispitivanje metilacionog statusa *p16*, *p15*, *MGMT* i *DAPK* gena u uzorcima tkiva DBKL

Od 51 analiziranog uzorka tkiva DBKL, metilacija *p16*, *p15*, *MGMT* i *DAPK* gena je detektovana u 37.2 %, (19/51), 23.5 % (12/51), 39.2 % (20/51), odnosno 54.9 % (28/51) slučajeva, (Slika 4.1.). Kod 74.5 % (38/51) uzoraka je detektovana metilacija najmanje jednog gena, dok kod 25.5 % (13/51) nije detektovana metilacija ni jednog od

ispitivanih gena. Ostale karakteristike koje se odnose na metilacioni profil uzoraka DBKL su prikazane na Slici 4.2.



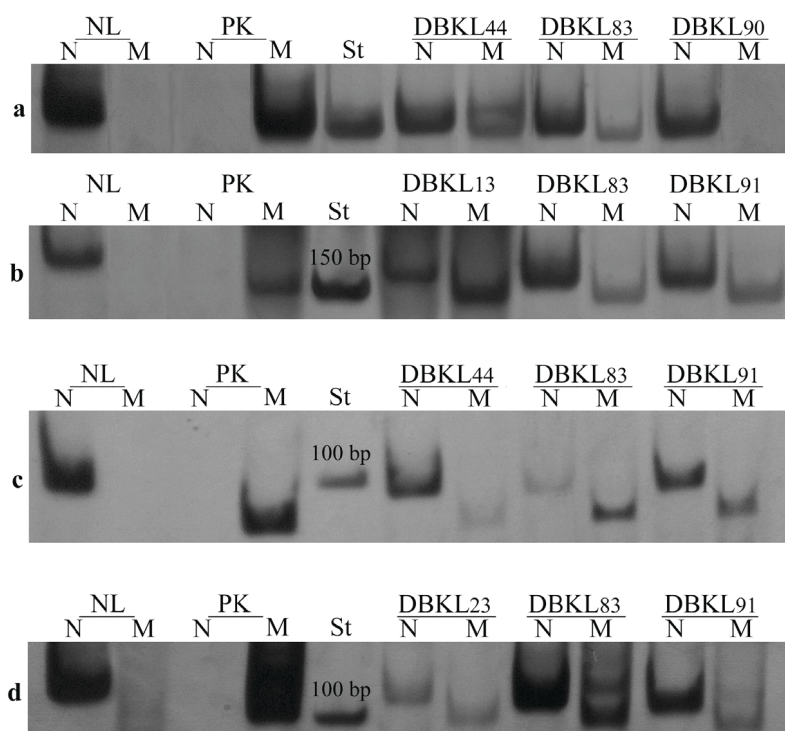
**Slika 4.1.** Metilacioni profil uzoraka DBKL



**Slika 4.2.** Metilacioni profil uzoraka DBKL

Metilacija bilo kog od četiri analizirana gena nije detektovana ni u jednoj kontrolnoj DNK iz limfocita periferne krvi zdravih osoba. Trake koje odgovaraju nemetilovanom *p16*, *p15*, *MGMT* i *DAPK* genu su detektovane u svim ispitivanim uzorcima tkiva DBKL, ali su različitog intenziteta, što ukazuje na prisustvo veće ili manje proporcije nemetilovanih alela u tumorskim uzorcima kod kojih je detektovana i metilacija odgovarajućih gena. Na slici 4.3. su prikazani reprezentativni uzorci razdvojeni elektroforezom na 6 % PAA gelu. Dužina dobijenih produkata je određena

na osnovu molekularnog markera sa umnošcima DNK od 50 bp (O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder, ready-to-use, Thermo Scientific, SAD).



**Slika 2. Rezultati MSP za (a) p16, (b) p15, (c) MGMT i (d) DAPK gen za uzorke DBKL.** Traka u koloni N ukazuje na prisustvo nemetilovanog (151, 154, 93, odnosno, 106 bp), a traka u koloni M na prisustvo metilovanog alela (150, 148, 81, odnosno, 98 bp) za odgovarajuće gene; NL, normalni limfociti kao pozitivna kontrola za nemetilovane alele svih analiziranih gena; PK, DNK iz normalnih limfocita metilovana in vitro, kao pozitivna kontrola za metilovane alele sva četiri gena; St, molekularni marker (50 bp).

#### **4.1.2. Ispitivanje povezanosti metilacionog statusa p16, p15, MGMT i DAPK gena sa kliničko-patološkim karakteristikama obolelih od DBKL**

Rezultati ispitivanja povezanosti metilacionog statusa *p16*, *p15*, *MGMT* i *DAPK* gena sa kliničko-patološkim karakteristikama obolelih su prikazani u Tabeli 4.1. Metilacija *p16* gena je statistički značajno bila češća kod ispitanika sa referentnim vrednostima serumske LDH ( $p = 0.035$ ), kao i kod ispitanika sa niskim/umereno-niskim stepenom rizika prema IPI klasifikaciji ( $p = 0.034$ ). Iako je metilovani *p16* gen u dvostruko većem procentu detektovan kod ispitanika mlađih od 60 godina u odnosu na one preko 60 godina starosti, ova razlika nije dostigla stističku značajnost ( $p = 0.143$ ). U slučaju metilacije *p15* gena zabeležen je trend ka češćoj pojavi metilovanog *p15* gena kod ispitanika mlađih od 60 godina ( $p = 0.091$ ), referentnih vrednosti serumske LDH ( $p = 0.090$ ), kod obolelih sa skorom ECOG performans statusa  $< 2$  ( $p = 0.095$ ), kao i kod onih sa niskim/umereno-niskim stepenom IPI rizika ( $p = 0.076$ ). Metilacija *DAPK* gena je takođe bila češća, mada ne i statistički značajno, kod obolelih nižih IPI kategorija rizika ( $p = 0.143$ ). U slučaju metilacionog statusa *MGMT* gena nije zabeležena povezanost ni sa jednom ispitivanom karakteristikom. Iako je metilacija *MGMT* gena u skoro dvostruko većem procentu bila zabeležena kod ispitanika ispod 60 godina starosti, kao i kod onih sa prisutnim B simptomima bolesti, ove razlike nisu bile statistički značajne ( $p = 0.250$ , odnosno,  $p = 0.219$ ). Metilacija nijednog analiziranog gena nije značajno korelirala sa ispitivanim imunohistohemijskim markerima, iako je metilacija *p15* gena detektovana sa nešto većom učestalošću kod ispitanika sa ekspresijom Bcl-6 ( $p = 0.207$ ) i CD10 proteina ( $p = 0.317$ ), a metilacija *MGMT* gena kod ispitanika sa odsutnom ekspresijom Bcl-6 proteina ( $p = 0.252$ ).

Rezultati praćenja toka i ishoda bolesti su pokazali da je metilacija *p15* gena statistički značajno bila češća kod ispitanika kod kojih nije došlo do recidiva ( $p = 0.019$ ), a zabeležen je i trend ka češćoj pojavi metilacije ovog gena kod obolelih kod kojih u toku petogodišnjeg perioda nije došlo do smrtnog ishoda ( $p = 0.086$ ). Metilacioni status preostala tri gena nije imao uticaj na ishod, kao ni na pojavu recidiva bolesti.

**Tabela 4.1. Metilacija p16, p15, MGMT i DAPK gena u korelaciji sa kliničko-patološkim karakteristikama obolelih od DBKL**

<b>karakteristike</b>	<b>p16m</b>	<b>p15m</b>	<b>MGMTm</b>	<b>DAPKm</b>	<b>p</b>
<b>ukupno</b>	19/51 (37.2 %)	12/51 (23.5 %)	20/51 (39.2 %)	28/51 (54.9 %)	
<b>pol</b>					
muški	9/26 (34.6 %)	4/26 (15.4 %)	11/26 (42.3 %)	14/26 (53.8 %)	
ženski	10/25 (40 %)	8/25 (32 %)	9/25 (36 %)	14/25 (56 %)	NS
<b>godine (x ± SD)</b>					
metilovani	51.0 ± 18.8	48.2 ± 17.8	51.9 ± 17.7	50.6 ± 18.0	
nemetilovani	53.2 ± 17.2	53.7 ± 17.7	52.7 ± 17.9	54.6 ± 17.4	NS
<b>starost (godine)</b>					
≤ 60	14/30 (46.7 %)	10/30 (33.3 %)	14/30 (46.7 %)	19/30 (63.3 %)	
>60	5/21 (23.8 %)	2/21 (9.5 %)*	6/21 (28.6 %)	9/21 (42.9 %)	0.091*
<b>stadijum</b>					
I, II	4/8 (50 %)	2/8 (25 %)	2/8 (25 %)	5/8 (62.5 %)	
III, IV	15/43 (34.9 %)	10/43 (23.2 %)	18/43 (41.9 %)	23/43 (53.5 %)	NS
<b>LDH</b>					
referentan	11/20 (55 %)	7/20 (35 %)	7/20 (35 %)	12/20 (60 %)	0.035*
uvećan (> 450 j/l)	6/29 (20.7 %)*	4/29 (13.8%)**	12/29 (41.4 %)	14/29 (48.3 %)	0.090**
<b>ekstranodalne lokacije</b>					
0, 1	14/39 (35.9 %)	10/39 (25.6 %)	14/39 (35.9 %)	20/39 (51.3 %)	
> 1	5/12 (41.7 %)	2/12 (16.7 %)	6/12 (50 %)	8/12 (66.7 %)	NS
<b>ECOG performans status</b>					
< 2	14/35 (40 %)	10/35 (28.6 %)	13/35 (37.1 %)	21/35 (60 %)	
≥ 2	5/16 (31.2 %)	2/16 (12.5 %)*	7/16 (43.7 %)	7/16 (43.7 %)	0.095*
<b>IPI</b>					
nizak/sr. nizak	10/17(58.8%)*	7/17 (41.2%)**	7/17 (41.2 %)	12/17 (70.6 %)	0.034*
sr.visok/visok	9/34 (26.5 %)	5/34 (14.7 %)	13/34 (38.2 %)	16/34 (47 %)	0.076**
<b>B simptomi</b>					
odsutni	7/16 (43.7 %)	4/16 (25 %)	4/16 (25 %)	8/16 (50 %)	
prisutni	12/33 (36.4 %)	7/33 (21.2 %)	15/33 (45.4 %)	18/33 (54.5 %)	NS
<b>infiltracija kostne srži</b>					
odsutna	13/32 (40.6 %)	9/32 (28.1 %)	13/32 (40.6 %)	20/32 (62.5 %)	
prisutna	6/19 (31.6 %)	3/19 (15.8 %)	7/19 (36.8 %)	8/19 (42.1 %)	NS
<b>VTM (≥ 10 cm)</b>					
odsutna	15/38 (39.5 %)	9/38 (23.7 %)	15/38 (39.5 %)	21/38 (55.3 %)	
prisutna	4/11 (36.4 %)	3/11 (27.3 %)	4/11 (36.4 %)	5/11 (45.4 %)	NS
<b>ekspresija Bcl-2</b>					
odsutna	11/28 (39.3 %)	6/28 (21.4 %)	9/28 (32.1 %)	14/28 (50 %)	
prisutna	4/18 (22.2 %)	4/18 (22.2 %)	8/18 (44.4 %)	9/18 (50 %)	NS
<b>ekspresija Bcl-6</b>					
odsutna	5/12 (41.7 %)	1/12 (8.3 %)	5/12 (41.7 %)	7/12 (58.3 %)	
prisutna	8/23 (34.8 %)	5/23 (21.7 %)	6/23 (26.1 %)	11/23 (47.8 %)	NS
<b>ekspresija CD10</b>					
odsutna	4/12 (33.3 %)	1/12 (8.3 %)	5/12 (41.7 %)	6/12 (50 %)	
prisutna	3/11 (27.3 %)	3/11 (27.3 %)	5/11 (45.4 %)	7/11 (63.6 %)	NS
<b>ekspresija Ki67</b>					
slaba/umerena	5/15 (33.3 %)	3/15 (20 %)	5/15 (33.3 %)	7/15 (46.7 %)	
visoka	7/21 (33.3 %)	6/21 (28.6 %)	8/21 (38.1 %)	12/21 (57.1 %)	NS
<b>odgovor na terapiju</b>					
KR/PR	14/41 (34.1 %)	10/41 (24.4 %)	16/41 (39 %)	21/41 (51.2 %)	
SB/PB	4/8 (50 %)	1/8 (12.5 %)	3/8 (37.5 %)	6/8 (75 %)	NS
<b>pojava recidiva</b>					
ne	13/31 (41.9%)	11/31 (35.5 %)	10/31 (32.2 %)	17/31 (54.8 %)	
da	4/13 (30.8 %)	0/13 (0 %)*	7/13 (53.8 %)	6/13 (46.1 %)	0.019*
<b>smrtni ishod u toku 5 godina</b>					
ne	11/27 (40.7 %)	9/27 (33.3 %)	10/27 (37 %)	16/27 (59.3 %)	
da	6/20 (30 %)	2/20 (10 %)*	8/20 (40 %)	9/20 (45 %)	0.086*

LDH, laktat dehidrogenaza; IPI, internacionalni prognostički indeks; VTM, veličina tumorske mase; KR, kompletna remisija; PR, parcijalna remisija; SB, stabilna bolest; PB, progresija bolesti; NS, statistički nesignifikantne razlike; p, verovatnoća statističke značajnosti je ispitivana Fišerovim egzaktnim testom i Studentovim t-testom.

U cilju daljeg ispitivanja eventualnog značaja metilacije kao epigenetičke modifikacije genske aktivnosti za patogenezu DBKL, poredili smo grupu ispitanika kod kojih je detektovana metilacija najmanje jednog od analiziranih gena ( $\geq 1m$ ) sa grupom u kojoj su sva četiri gena bila nemetilovana. Dve grupe smo analizirali u kombinaciji sa odgovarajućim kliničko-patološkim karakteristikama, imunohistohemijskim podacima, kao i odgovorom na terapiju i tokom i ishodom bolesti. Metilacija najmanje jednog ispitivanog gena ( $\geq 1m$ ) je bila češće, mada ne i statistički značajno, zastupljena kod mladih ispitanika ( $p = 0.109$ ), kod obolelih sa referentnim vrednostima LDH ( $p = 0.197$ ), niskog/umereno-niskog IPI stepena rizika ( $p = 0.175$ ), kao i kod obolelih bez infiltracije kostne srži ( $p = 0.192$ ). Metilacija najmanje jednog gena je u nešto većem procentu bila zastupljena kod ispitanika bez recidiva bolesti ( $p = 0.295$ ), kao i kod onih kod kojih nije došlo do smrtnog ishoda tokom petogodišnjeg perioda praćenja ( $p = 0.311$ ). Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 4.2.

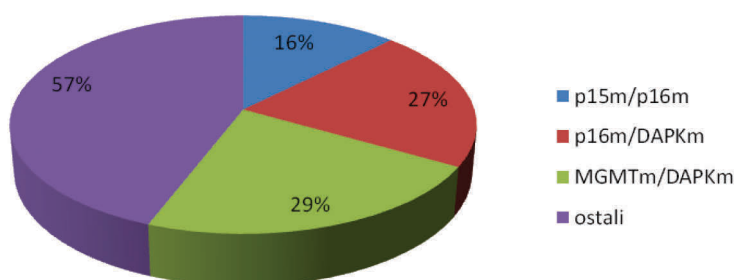
**Tabela 4.2. Stepen metilacije u korelaciji sa kliničko-patološkim karakteristikama obolelih od DBKL**

<b>karakteristike</b>	<b>≥ 1m</b>	<b>sva 4 gena nemetilovana</b>	<b>p</b>
<b>ukupno</b>	38/51 (74.5 %)	13/51 (25.5 %)	
<b>pol</b>			
muški	18/26 (69.2 %)	8/26 (30.8 %)	
ženski	20/25 (80 %)	5/25 (20 %)	0.523
<b>godine (x ± SD)</b>	50.8 ± 18.8	57.0 ± 13.3	0.280
<b>starost</b>			
≤ 60	25/30 (83.3 %)	5/30 (16.7 %)	
>60	13/21 (61.9 %)	8/21 (38.1 %)	0.109
<b>klinički stadijum</b>			
I/II	7/8 (87.5 %)	1/8 (12.5 %)	
III/IV	31/43 (72.1 %)	12/43 (27.9 %)	0.662
<b>LDH</b>			
referentan	17/20 (85 %)	3/20 (15 %)	
uvećan (> 450 j/l)	20/30 (66.7 %)	10/30 (33.3 %)	0.197
<b>primarna lokacija tumora</b>			
nodalno	28/39 (71.8 %)	11/39 (28.2 %)	
ekstranodalno	10/12 (83.3 %)	2/12 (16.7 %)	0.204
<b>ekstranodalne lokacije</b>			
0, 1	28/38 (73.7 %)	10/38 (26.3 %)	
> 1	10/12 (83.3 %)	2/12 (16.7 %)	0.706
<b>ECOG performans status</b>			
< 2	23/30 (76.7 %)	7/30 (23.3 %)	
≥ 2	15/20 (75 %)	5/20 (25 %)	1.000
<b>IPI</b>			
nizak/sr.nizak	15/17 (88.2 %)	2/17 (11.8 %)	
sr.visok/visok	23/34 (67.6 %)	11/34 (32.3 %)	0.175
<b>B simptomi</b>			
odsutni	12/16 (75 %)	4/16 (25 %)	
prisutni	23/33 (69.7 %)	10/33 (30.3 %)	1.000
<b>infiltracija kostne srži</b>			
odsutna	26/32 (81.2 %)	6/32 (18.7 %)	
prisutna	12/19 (63.1 %)	7/19 (36.8 %)	0.192
<b>VTM (≥ 10 cm)</b>			
odsutna	29/38 (76.3 %)	9/38 (23.7 %)	
prisutna	7/11 (63.6 %)	4/11 (36.4 %)	0.451
<b>ekspresija Bcl-2</b>			
odsutna	20/28 (71.4 %)	8/28 (28.6 %)	
prisutna	13/18 (72.2 %)	5/18 (27.8 %)	1.000
<b>ekspresija Bcl-6</b>			
odsutna	11/15 (73.3 %)	4/15 (26.7 %)	
prisutna	13/20 (65 %)	7/20 (35 %)	1.000
<b>ekspresija CD10</b>			
odsutna	9/13 (69.2 %)	4/13 (30.8 %)	
prisutna	8/10 (80 %)	2/10 (20 %)	1.000
<b>ekspresija Ki67</b>			
slaba/umerena	10/15 (66.7 %)	5/15 (33.3 %)	
visoka	16/21 (76.2 %)	5/21 (23.8 %)	0.709
<b>odgovor na terapiju</b>			
KR/PR	31/41 (75.6 %)	10/41 (24.4 %)	
SB/PB	6/8 (75 %)	2/8 (25 %)	1.000
<b>pojava recidiva</b>			
ne	24/31 (77.4 %)	7/31 (22.6 %)	
da	8/13 (61.5 %)	5/13 (38.5 %)	0.295
<b>smrtni ishod u toku 5 god.</b>			
ne	22/27 (81.5 %)	5/27 (18.5 %)	
da	13/20 (65 %)	7/20 (35 %)	0.311

LDH, laktat dehidrogenaza; IPI, internacionalni prognostički indeks; VTM, veličina tumorske mase; KR, kompletna remisija; PR, parcijalna remisija; SB, stabilna bolest; PB, progresija bolesti; p, verovatnoća statističke značajnosti je ispitivana Fišerovim egzaktnim testom i Studentovim t-testom.

### 4.1.3. Ipitivanje korelacije između metilacije pojedinačnih gena

U analiziranoj grupi uzoraka DBKL su uočene statistički značajne korelacije između metilacije pojedinih gena. Tako se metilacija *p15* javljala češće u kombinaciji sa istovremenom metilacijom *p16* gena, nego kao samostalan događaj (66.7 %,  $p = 0.037$ ), metilacija *p16* gena se češće javljala u kombinaciji sa metilovanim *DAPK* genom (73.7 %,  $p = 0.047$ ), dok se metilacija *MGMT* gena javljala češće sa istovremenom metilacijom *DAPK* gena (75 %,  $p = 0.025$ ). Procentualna zastupljenost svake kometilacije u ispitivanoj grupi uzoraka DBKL je prikazana na Slici 4.4. Grupa „ostali“ podrazumeva 13 uzoraka kod kojih su sva četiri gena nemetilovana, 14 kod kojih je samo jedan gen metilovan (1 sa *p15m*, 3 sa *p16m*, 2 sa *MGMTm* i 8 sa *DAPKm*) i 2 uzorka sa istovremenom metilacijom *p15* i *MGMT* gena. Zbir svih prikazanih uzoraka prelazi vrednost od 100 % zbog toga što se uzorci iz pojedinih grupa sa odgovarajućim kometilacijama preklapaju.



Slika 4.4. Procentualna zastupljenost istovremene metilacije ispitivanih gena

#### 4.1.3.1. Karakteristike grupe sa kometilacijom *p15m/p16m*

Metilacija *MGMT* gena je detektovana kod polovine (4/8) ispitanika sa istovremenom metilacijom *p15* i *p16* gena, dok je metilacija *DAPK* gena bila prisutna kod 75 % (6/8) ispitanika iz *p15m/p16m* grupe, u odnosu na 51.2 % (22/43) iz grupe bez istovremene metilacije *p15* i *p16* gena. Ova razlika nije bila statistički značajna ( $p = 0.269$ ).



Istovremena metilacija *p15* i *p16* gena (*p15m/p16m*) nije bila značajno povezana ni sa jednom kliničko-patološkom karakteristikom obolelih od DBKL, kada je poređenje vršeno u odnosu na sve ostale ispitanike (metilacija samo *p15* ili *p16* gena ili oba gena nemetilovana). Međutim, primećena je akumulacija kometilacije *p15m/p16m* kod ispitanika sa parametrima koji se vezuju za manje agresivan tok bolesti. Tako je 75 % (6/8) ispitanika sa *p15m/p16m* bilo ženskog pola ( $p = 0.140$ ) i sa referentnim vrednostima LDH ( $p = 0.100$ ), a 87.5 % (7/8) je bilo mlađe od 60 godina ( $p = 0.119$ ) i sa skorom ECOG performans statusa  $< 2$  ( $p = 0.127$ ). Pet od 8 (62.5 %) ispitanika sa *p15m/p16m* je pripadalo kategoriji niskog/umereno-niskog IPI rizika ( $p = 0.099$ ), dok recidiv bolesti nije zabeležen ni u jednom slučaju ( $p = 0.086$ ). Kada je poređenje vršeno samo u odnosu na grupu sa *p15n/p16n*, istovremena metilacija *p15* i *p16* gena je bila statistički značajno češća kod ispitanika sa niskim/umereno-niskim IPI stepenom rizika ( $p = 0.024$ ) i sa referentnim vrednostima serumske LDH ( $p = 0.033$ ), a uočen je trend ka češćoj pojavi *p15m/p16m* kod ispitanika mlađih od 60 godina ( $p = 0.053$ ), kao i kod onih kod kojih nije došlo do recidiva bolesti ( $p = 0.071$ ).

#### **4.1.3.2. Karakteristike grupe sa kometilacijom *p16m/DAPKm***

U grupi ispitanika sa istovremenom metilacijom *p16* i *DAPK* (*p16m/DAPKm*) gena metilacija *MGMT* gena je bila prisutna u znatno većem procentu u odnosu na grupu bez *p16m/DAPKm*, što je na samoj granici statističke značajnosti (64.3 % vs. 29.7 %,  $p = 0.051$ ). Zabeležen je i trend ka većoj učestalosti metilacije *p15* gena u grupi *p16m/DAPKm* ispitanika, u odnosu na grupu bez ovog događaja (42.9 % vs. 16.2 %,  $p = 0.066$ ). Kod 85.7 % (10/12) uzoraka sa kometilacijom *p16m/DAPKm* je detektovana i metilacija *p15* i/ili *MGMT* gena.

Kada je poređenje vršeno u odnosu na ispitanike sa *p16n/DAPKn*, *p16n/DAPKm* ili *p16m/DAPKn*, istovremena metilacija *p16m/DAPKm* je statistički značajno bila zastupljenija kod ispitanika niskog/umereno-niskog IPI stepena rizika ( $p = 0.045$ ), a primećena je i akumulacija kometilacije *p16m/DAPKm* kod ispitanika sa referentnim vrednostima LDH ( $p = 0.100$ ), kao i kod onih koji su odgovorili na indukcionu terapiju kompletnom ili parcijalnom remisijom ( $p = 0.183$ ). Prisustvo kometilacije *p16m/DAPKm* nije imalo uticaj na recidiv ( $p = 1.000$ ) i ishod bolesti ( $p = 0.735$ ). Kada

je poređenje vršeno u odnosu na grupu sa *p16n/DAPKn*, istovremena metilacija *p16m/DAPKm* je i dalje bila statistički značajno češća kod ispitanika niskog/umerenog IPI stepena rizika ( $p = 0.027$ ), a zabeležen je i trend ka češćoj pojavi *p16m/DAPKm* kod ispitanika sa referentnim vrednostima LDH ( $p = 0.079$ ) i mlađih od 60 godina ( $p = 0.087$ ).

#### **4.1.3.3. Karakteristike grupe sa kometilacijom *MGMTm/DAPKm***

U grupi sa kometilacijom *MGMTm/DAPKm* učestalost metilacije *p16* gena je bila dvostruko veća u odnosu na grupu bez istovremene metilacije ova dva gena, mada ova razlika nije bila statistički značajna ( $p = 0.260$ ). Metilacija *p15* gena je u podjednakom procentu bila zastupljena u obe grupe (26.7 % vs. 22.2 %). I pojava recidiva je u dvostruko većem procentu detektovana u grupi sa istovremenom metilacijom *MGMTm/DAPK*, u odnosu na sve ostale ispitanike, ali ni ta razlika nije bila statistički značajna (46.1 % vs. 22.6 %,  $p = 0.155$ ). Uočen je i trend ka češćoj pojavi *MGMTm/DAPKm* kod ispitanika mlađeg starosnog doba (80 %,  $p = 0.064$ ). Kometilacija ova dva gena nije imala uticaj na ishod bolesti. Poređenje sa grupom u kojoj su i *MGMT* i *DAPK* geni nemetilovani nije dala značajne rezultate.

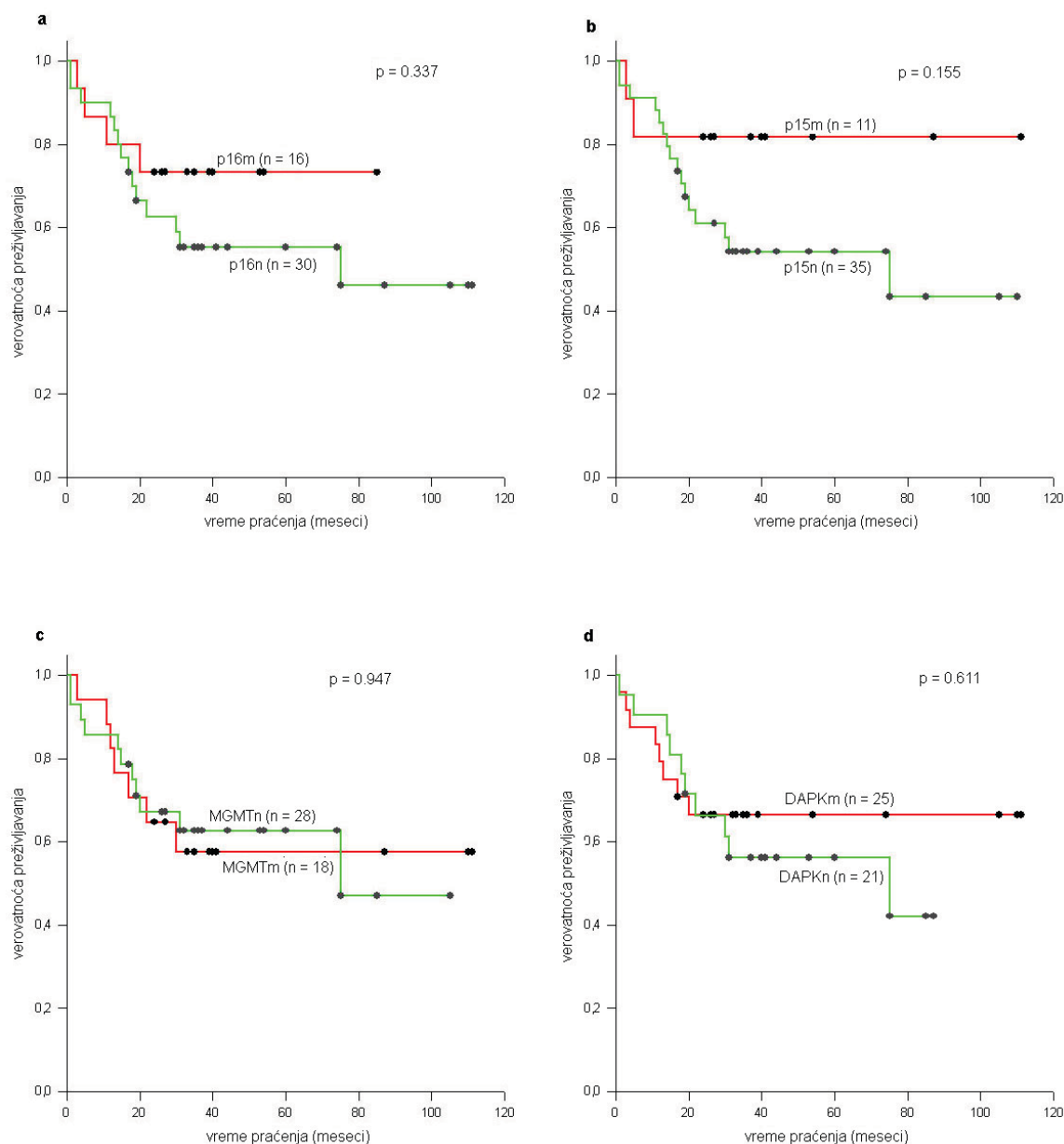
#### **4.1.4. Poređenje grupa ispitanika sa recidivom i bez recidiva bolesti kod obolelih od DBKL**

Podaci o recidivu bolesti za obolele od DBKL su dobijeni za 44 ispitanika. Do recidiva je tokom perioda praćenja došlo kod 29.5 % (13/44) ispitanika. Rezultati u odnosu na metilacioni status analiziranih gena su prikazani u Tabeli 4.1. Ni kod jednog ispitanika sa recidivom bolesti nije detektovana metilacija *p15* gena, dok je ovaj gen bio metilovan kod 35.5 % (13/31) obolelih bez recidiva, što je i statistički značajna razlika ( $p = 0.019$ ). Učestalost metilacije *p16* gena je bila približno ista u obe grupe ispitanika, što je bio slučaj i sa metilacijom *DAPK* gena. Metilacija *MGMT* gena je bila nešto češća kod ispitanika sa recidivom mada ne i statistički značajno. U grupi ispitanika sa pojavom recidiva, svi kod kojih je detektovana metilacija *DAPK* imali su istovremenu metilaciju i *MGMT* gena (46.1 %), dok je istovremena metilacija ova dva gena bila prisutna kod 22.6 % ispitanika bez recidiva bolesti.

#### 4.1.5. Analiza preživljavanja kod obolelih od DBKL

Podaci o preživljavanju su bili dostupni za 46 obolelih sa dijagnozom DBKL. Medijana praćenja je iznosila 30.5 meseci (opseg 1-111). Petogodišnje preživljavanje u celoj grupi je iznosilo 60.7 % (95 %, CI 45.25-74.42). Ukupno preživljavanje je bilo značajno kraće kod obolelih koji su pripadali jednoj od sledećih kategorija: umereno-visok/visok IPI ( $p = 0.043$ ), skor ECOG performans statusa  $\geq 2$  ( $p = 0.001$ ), prisustvo B simptoma ( $p = 0.037$ ). Trend ka kraćem ukupnom preživljavanju je zabeležen kod obolelih starijih od 60 godina ( $p = 0.078$ ), uznapređovalog stadijuma bolesti ( $p = 0.099$ ), kao i u slučaju odsustva ekspresije Bcl-6 proteina ( $p = 0.086$ ). Recidiv bolesti nije uticao na ukupno preživljavanje ( $p = 0.166$ ).

Kada je analizirana cela grupa, nije uočena razlika u ukupnom preživljavanju u odnosu na metilacioni status bilo kog od ispitivanih gena, mada je prosečna dužina preživljavanja bila nešto veća kod ispitanika sa metilovanim *p15* u odnosu na ispitanike sa nemetilovanim *p15* genom (91 vs. 63 meseci,  $p = 0.155$ ). Rezultati su prikazani na Grafiku 4.1.

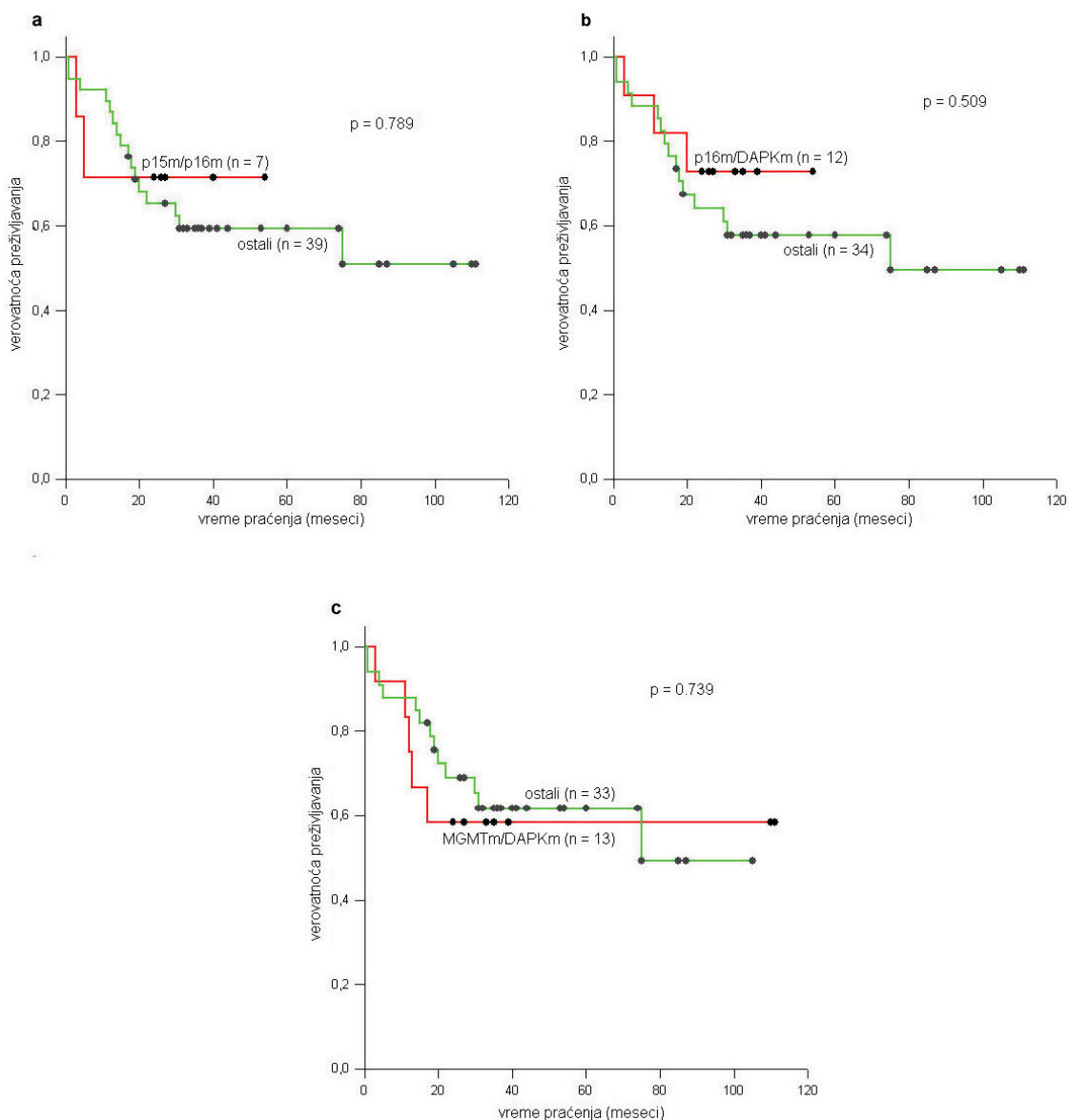


**Grafik 4.1. Ukupno preživljavanje kod ispitanika obolelih od DBKL u odnosu na metilacioni status (a) p16, (b) p15, (c) MGMT i (d) DAPK gena.** Kaplan-Majerove krive preživljavanja pokazuju da metilacioni status analiziranih gena ne utiče značajno na ukupno preživljavanje. Najveća razlika je zabeležena u odnosu na metilacioni status p15 gena, gde je ukupno preživljavanje bilo nešto duže kod ispitanika sa metilovanim u odnosu na nemetilovani p15 gen ( $p = 0.155$ ).  $p$ , verovatnoća statističke značajnosti ispitivana je Log-Rank testom.

U cilju dalje analize, preživljavanje je prećeno u grupama različitog stepena IPI rizika, pola i starosti. Metilacija ni jednog od analiziranih gena nije značajno uticala na ukupno preživljavanje kako u grupi niskog/umereno-niskog stepena IPI rizika, tako ni u

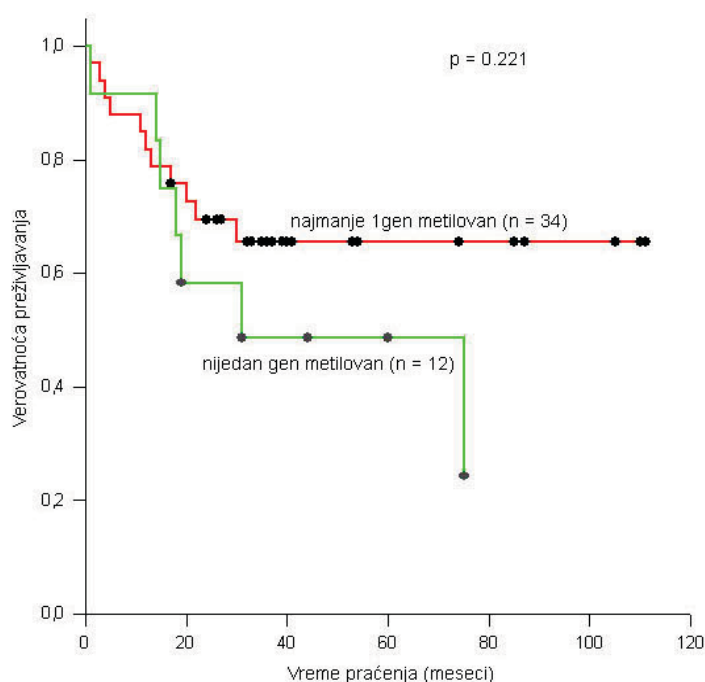
grupi umereno-visokog/visokog IPI stepena rizika. Metilacioni status ni jednog od analiziranih gena nije imao uticaj ni na ukupno preživljavanje u grupama ispitanika različitog pola, odnosno, starosti (rezultati nisu prikazani).

Istovremena metilacija *p15m/p16m*, *p16m/DAPKm*, odnosno *MGMTm/DAPKm* gena nije imala uticaj na ukupno preživljavanje. Rezultati su prikazani na Grafiku 4.2.



**Grafik 4.2. Ukupno preživljavanje kod ispitanika obolelih od DBKL u odnosu na kometilaciju (a) *p15m/p16m*, (b) *p16m/DAPKm* i (c) *MGMTm/DAPKm*. Kaplan-Majerove krive preživljavanja pokazuju da metilacioni status analiziranih gena ne utiče značajno na ukupno preživljavanje. *p*, verovatnoća statističke značajnosti ispitivana je Log-Rank testom.**

Prosečna dužina preživljavanja je bila nešto veća u grupi ispitanika sa metilacijom najmanje jednog analiziranog gena u odnosu na grupu sa sva četiri nemetilovana gena, mada ova razlika nije bila statistički značajna (76 vs. 47 meseci,  $p = 0.221$ ). Rezultati su prikazani na Grafiku 4.3. Metilacija više od jednog gena, nije imala uticaj na ukupno preživljavanje ni u različitim grupama IPI rizika, pola, odnosno, starosti (rezultati nisu prikazani).



**Grafik 4.3. Ukupno preživljavanje kod ispitanika obolelih od DBKL u odnosu na broj metilovanih gena.** Kaplan-Majerove krive preživljavanja pokazuju da je ukupno preživljavanje nešto duže kod ispitanika sa metilacijom najmanje jednog gena u odnosu na ispitanike kod kojih su sva četiri gena nemetilovana.  $p$ , verovatnoća statističke značajnosti ispitivana je Log-Rank testom.

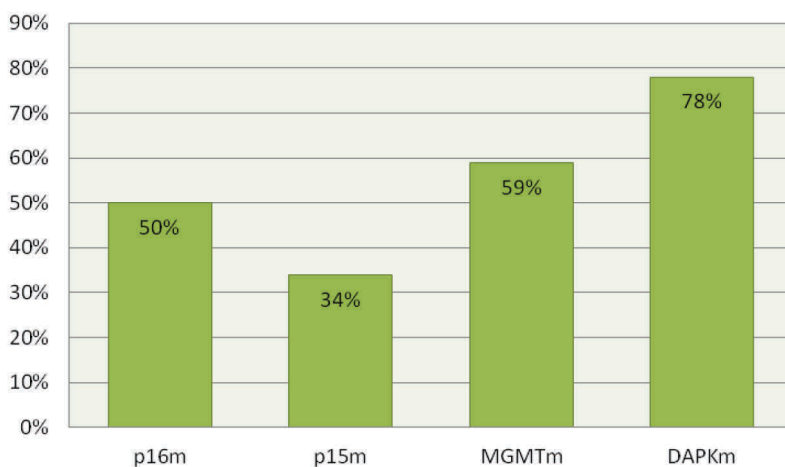
## 4.2. Opšte karakteristike ispitanika obolelih od FL

Prosečna starost 32 ispitanika sa dijagnozom FL je iznosila  $59.6 \pm 12.0$  godina (opseg 36-81). Grupa je bila sastavljena od 11 (34.4 %) ispitanika ženskog i 21 (65.6 %) ispitanika muškog pola, čija se prosečna starost nije statistički značajno razlikovala ( $58.1 \pm 12.1$  vs.  $60.4 \pm 12.8$  godina,  $p = 0.620$ ). Polovina ispitanika je bila mlađa od 60 godina. Šest (18.8 %) ispitanika je pripadalo kategoriji niskog FLIPI rizika, 13 (40.6 %) kategoriji umerenog FLIPI rizika, i isto toliko kategoriji visokog FLIPI rizika. U ispitivanoj grupi su preovlađivali tumori nižeg histopatološkog gradusa I/II (84.4 %), dok je histopatološki tip III bio prisutan u svega 15.6 % slučajeva. Najveći broj ispitanika (87.5 %) je bio u uznapređovalom kliničkom stadijumu bolesti (III/IV). Uvećan nivo serumske LDH ( $> 320$  j/l), odnosno nivo Hb  $< 120$  g/l je zabeležen u 34.4 % slučajeva. Skor ECOG performans statusa  $\geq 2$  je zabeležen kod 31.2 % ispitanika, a kod isto toliko njih je bila prisutna i tumorska masa veličine  $\geq 10$  cm. B simptome je ispoljavalo 50 % ispitanika. Translokacija t(14;18) je detektovana kod 78.1 % ispitanika. Podaci o ekspresiji Bcl-2 proteina su bili dostupni za 20 ispitanika, od kojih je najveći broj ispoljavao slabu ekspresiju (60 %), kod 10 % je zabeležana umerena, a kod 25 % jaka ekspresija Bcl-2 proteina. Kada je analiziran odgovor na indukcionu terapiju, 75 % ispitanika je odgovorilo kompletnom ili parcijalnom remisijom, dok kod 25 % ispitanika nije bilo odgovora na primenjenu terapiju. Do recidiva bolesti je tokom petogodišnjeg perioda praćenja došlo kod 18.8 % (6/32) obolelih od FL, a smrtni ishod je u istom period zabeležen u 31.2 % (10/32) slučajeva.

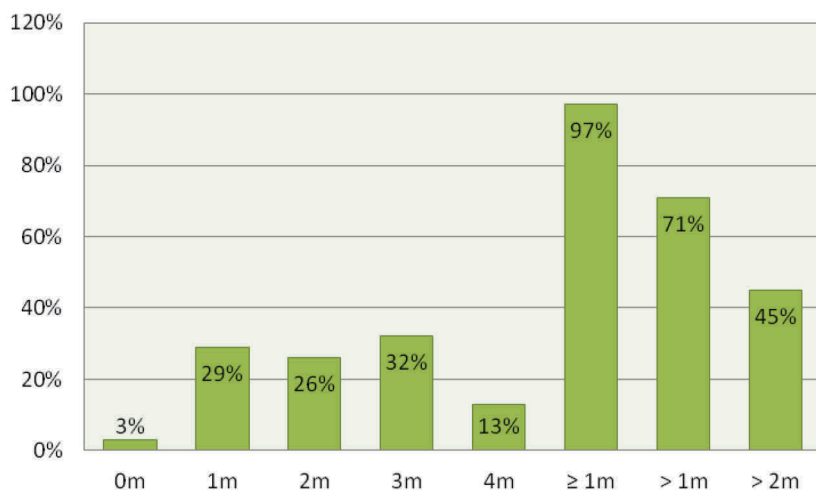
### 4.2.1. Ispitivanje metilacionog statusa *p16*, *p15*, *MGMT* i *DAPK* gena u uzorcima tkiva FL

Od 32 analizirana uzorka tkiva FL, metilacija *p16*, *p15*, *MGMT* i *DAPK* gena je detektovana kod 50 %, (16/32), 34 % (11/32), 59 % (19/32), odnosno 78 % (25/32) slučajeva, (Slika 4.5.). Kod svih osim jednog ispitanika (97 %) je detektovana metilacija najmanje jednog gena, a kod 71 % njih (22/31) je detektovana metilacija više od jednog gena. Nije uočena korelacija između metilacije analiziranih gena, mada je istovremena

metilacija *MGMT* i *DAPK* gena detektovana u 50% slučajeva. Ostale karakteristike grupe koje se odnose na metilacioni status ispitivanih gena su prikazane na Slici 4.6.



**Slika 4.5.** Metilacioni profil uzoraka FL

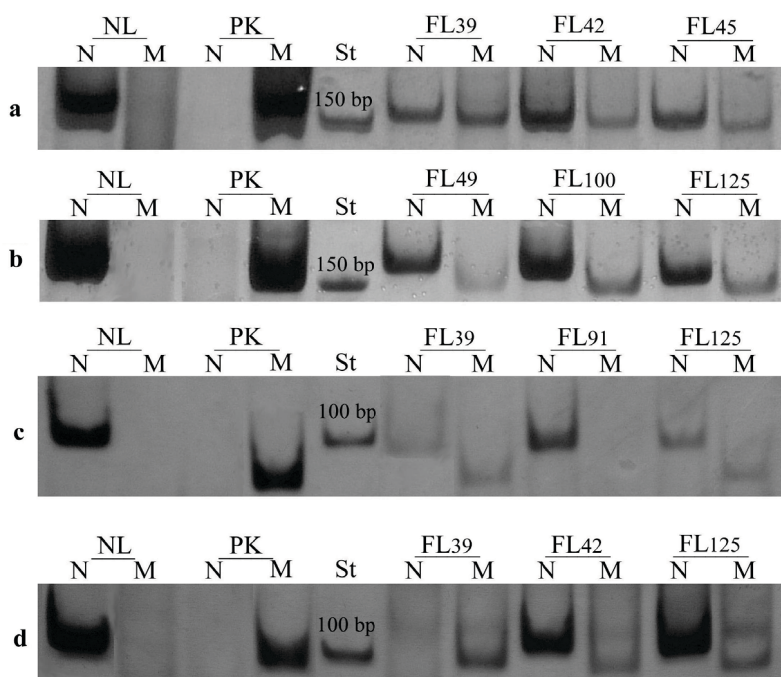


**Slika 4.6.** Metilacioni profil uzoraka FL

Metilacija ni jednog od četiri analizirana gena nije detektovana u kontrolnoj DNK iz limfocita periferne krvi zdravih osoba. Trake koje odgovaraju nemetilovanom *p16*, *p15*, *MGMT* i *DAPK* genu su detektovane u skoro svim ispitivanim uzorcima tkiva FL, ali su različitog intenziteta, što ukazuje na prisustvo veće ili manje proporcije nemetilovanih alela u tumorskim uzorcima kod kojih je detektovana i metilacija odgovarajućih gena. Na Slici 4.7. su prikazani reprezentativni uzoci razdvojeni elektroforezom na 6 % PAA gelu. Dužina dobijenih produkata je određena na osnovu



molekularnog markera sa umnošcima DNK od 50 bp (O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder, ready-to-use, Thermo Scientific, SAD).



**Slika 4.7. Rezultati MSP za (a) *p16*, (b) *p15*, (c) *MGMT* i (d) *DAPK* gen za uzorke FL.** Traka u koloni N ukazuje na prisustvo nemetilovanog (151, 154, 93, odnosno, 106 bp), a traka u koloni M na prisustvo metilovanog alela (150, 148, 81, odnosno, 98 bp) za odgovarajuće gene; NL, normalni limfociti kao pozitivna kontrola za nemetilovane alele svih analiziranih gena; PK, DNK iz normalnih limfocita metilovana in vitro, kao pozitivna kontrola za metilovane alele sva četiri gena; St, molekularni marker (50 bp).

#### **4.2.2. Ispitivanje povezanosti metilacionog statusa *p16*, *p15*, *MGMT* i *DAPK* gena sa kliničko-patološkim karakteristikama obolelih od FL**

Rezultati ispitivanja povezanosti metilacionog statusa *p16*, *p15*, *MGMT* i *DAPK* gena sa kliničko-patološkim karakteristikama obolelih su prikazani u Tabeli 4.3. Metilacija *p15* gena je statistički značajno bila češća kod obolelih sa sniženim vrednostima Hb ( $p = 0.020$ ). Osim toga, nije uočena nijedna druga korelacija metilacije bilo kog od četiri analizirana gena sa odgovarajućim kliničko-patološkim karakteristikama, ali su zabeležene pojedine tendencije.

**Tabela 4.3. Metilacioni status p16, p15, MGMT i DAPK gena u korelaciji sa kliničko-patološkim karakteristikama obolelih od FL**

<b>karakteristike</b>	<b>p16m</b>	<b>p15m</b>	<b>MGMTm</b>	<b>DAPKm</b>	<b>p</b>
<b>ukupno</b>	16/32 (50%)	11/32 (34%)	19/32 (59%)	25/32 (78%)	
<b>godine (x ± SD)</b>					
metilovani	59.3 ± 12.7	58.0 ± 10.7	60.9 ± 14.1	59.0 ± 12.5	
nemetilovani	59.9 ± 12.5	61.0 ± 13.3	58.7 ± 11.3	62.0 ± 12.6	NS
<b>pol</b>					
muški	9/21 (42.8%)	7/21 (33.3%)	12/21 (57.1%)	16/21 (76.2%)	
ženski	7/11 (63.6%)	4/11 (36.4%)	7/11 (63.6%)	9/11 (81.8%)	NS
<b>starost</b>					
≤ 60	8/16 (50%)	6/16 (37.5%)	11/16 (68.7%)	13/16 (81.2%)	
>60	8/16 (50%)	5/16 (31.2%)	8/16 (50%)	12/16 (75%)	NS
<b>histo-patološki tip</b>					
gradus I	10/19(52.6%)	8/19 (42.1%)	11/19 (57.9%)	15/19 (78.9%)	
gradus II	4/8 (50%)	3/8 (37.5%)	5/8 (62.5%)	7/8 (87.5%)	
gradus III	2/5 (40%)	0/5 (0%)	3/5 (60%)	3/5 (60%)	NS
<b>klinički stadijum</b>					
I/II	2/4 (50%)	3/4 (75%)	3/4 (75%)	3/4 (75%)	
III/IV	14/28 (50%)	8/28 (28.6%)	16/28 (57.1%)	22/28 (78.6%)	NS
<b>Hb</b>					
referentan	11/21 (52.4%)	4/21 (19%)	11/21 (52.4%)	15/21 (71.4%)	
snižen (< 120 g/l)	5/11 (45.4%)	7/11(63.6%)*	8/11 (72.7%)	10/11 (90.9%)	0.020*
<b>LDH</b>					
referentan	11/21 (52.4%)	7/21 (33.3%)	11/21 (52.4%)	15/21 (71.4%)	
uvećan (> 320 j/l)	5/11 (45.4%)	4/11 (36.4%)	8/11 (72.7%)	10/11 (90.9%)	NS
<b>ECOG performans status</b>					
< 2	11/22 (50%)	7/22 (31.8%)	13/22 (59.1%)	16/22 (72.7%)	
≥ 2	5/10 (50%)	4/10 (40%)	6/10 (60%)	9/10 (90%)	NS
<b>FLIPI</b>					
nizak	4/6 (66.7%)	3/6 (50%)	2/6 (33.3%)	4/6 (66.7%)	
umeren	7/13 (53.8%)	3/13 (23.1%)	8/13 (61.5%)	10/13 (76.9%)	
visok	5/13 (38.5%)	5/13 (38.5%)	9/13 (69.2%)	11/13 (84.6%)	NS
<b>B simptomi</b>					
odsutni	7/16 (43.7%)	6/16 (37.5%)	9/16 (56.2%)	12/16 (75%)	
prisutni	9/16 (56.2%)	5/16 (31.2%)	10/16 (62.5%)	13/16 (81.25%)	NS
<b>infiltracija KS</b>					
odsutna	4/8 (50%)	4/8 (50%)	5/8 (62.5%)	7/8 (87.5%)	
prisutna	12/24 (50%)	7/24 (29.2%)	14/24 (58.3%)	18/24 (75%)	NS
<b>VTM (≥ 10 cm)</b>					
odsutna	10/22 (45.4%)	8/22 (36.4%)	13/22 (59.1%)	16/22 (72.7%)	
prisutna	6/10 (60%)	3/10 (30%)	6/10 (60%)	9/10 (90%)	NS
<b>t(14;18)</b>					
odsutna	3/7 (42.9%)	2/7 (22.2%)	5/7 (71.4%)	6/7 (85.7%)	
prisutna	13/25 (52%)	9/25 (36%)	14/25 (56%)	19/25 (76%)	NS
<b>ekspresija Bcl2</b>					
slaba	7/13 (53.8%)	6/13 (46.1%)	7/13 (53.8%)	11/13 (84.6%)	
umerena	0/2 (0%)	1/2 (50%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	
jaka	3/5 (60%)	2/5 (40%)	4/5 (80%)	4/5 (80%)	NS
<b>odgovor na terapiju</b>					
KR/PR	11/24 (45.8%)	8/24 (33.3%)	15/24 (62.5%)	18/24 (75%)	
SB/PB	5/8 (62.5%)	3/8 (37.5%)	4/8 (50%)	7/8 (87.5%)	NS
<b>pojava recidiva</b>					
ne	15/26 (57.7%)	9/26 (34.6%)	13/26 (50%)	19/26 (73.1%)	
da	1/6 (16.7%)	2/6 (33.3%)	6/6 (100%)*	6/6 (100%)	0.059*
<b>smrtni ishod u toku 5 god.</b>					
ne	11/22 (50%)	7/22 (31.8)	13/22 (59.1%)	16/22 (72.7%)	
da	5/10 (50%)	4/10 (40%)	6/10 (60%)	9/10 (90%)	NS

Hb, hemoglobin; LDH, laktat dehidrogenaza; FLIPI, internacionalni prognostički indeks za FL; KS, kostna srž; KR, kompletna remisija; PR, parcijalna remisija; SB, stabilna bolest; PB, progresija bolesti; NS, statistički nesignifikantne razlike; p, verovatnoća statističke značajnosti je ispitivana Fišerovim egzaktnim testom i Studentovim t-testom.

Metilacija *p16* gena je bila zastupljenija kod ispitanika kod kojih nije došlo do recidiva bolesti ( $p = 0.172$ ), dok je metilacija *p15* gena sa većom učestalošću detektovana kod ispitanika nižih stadijuma bolesti ( $p = 0.106$ ) i sa smanjenjem gradusa tumora ( $p = 0.138$ ). Metilacija *MGMT* gena je detektovana sa nešto većom učestalošću kod ispitanika sa sniženim vrednostima Hb ( $p = 0.141$ ), a zapažen je trend ka češćoj pojavi metilacije *MGMT* sa recidivom bolesti ( $p = 0.059$ ). U slučaju metilacije *DAPK* gena nije uočena tendencija ka korelaciji ni sa jednom ispitivanom kliničko-patološkom karakteristikom FL, kao ni sa tokom i ishodom bolesti, iako je metilacija *DAPK* bila češća kod ispitanika sa pojavom recidiva bolesti ( $p = 0.296$ ). Metilacija nijednog analiziranog gena nije bila povezana sa prisustvom t(14;18), kao ni sa ekspresijom Bel-2 proteina.

#### **4.2.3. Molekularne i kliničko-patološke karakteristike grupe sa istovremenom metilacijom *MGMT* i *DAPK* gena (*MGMTm/DAPKm*)**

Kod 50 % ispitanika sa FL iz naše studije je detektovana istovremena metilacija *MGMT* i *DAPK* gena (*MGMTm/DAPKm*). Rezultati poređenja sa grupom ispitanika bez ove kometilacije su prikazani u Tabeli 4.4. Učestalost metilacije *p16* gena je bila podjednaka u obe grupe, dok se metilacija *p15* gena javljala značajno češće u kombinaciji sa kometilacijom *MGMTm/DAPKm* nego zaseban događaj ( $p = 0.022$ ). Uočena je i statistički značajna korelacija *MGMTm/DAPKm* sa sniženim vrednostima Hb ( $p = 0.022$ ), kao i sa recidivom bolesti ( $p = 0.018$ ). Dve ispitivane grupe se nisu razlikovale u odnosu na odgovor na indukcionu terapiju. Finalni ishod je bio neznatno bolji u grupi bez istovremene metilacije *MGMT* i *DAPK* gena, pošto je tokom petogodišnjeg praćenja smrtni ishod zabeležen kod 36.4 % ispitanika iz ove grupe, nasuprot 63.6 % ispitanika iz *MGMTm/DAPKm* grupe. Ova razlika nije bila statistički značajna ( $p = 0.263$ ).

**Tabela 4.4. Molekularne i kliničko-patološke karakteristike ispitanika obolelih od FL sa istovremenom metilacijom MGMT i DAPK gena**

<b>karakteristike</b>	<b>MGMTm/DAPKm</b>	<b>ostali</b>	<b>p</b>
<b>ukupno</b>	16/32 (50 %)	16/32 (50 %)	
<b>godine (x ± SD)</b>	57.4 ± 11.0	61.9 ± 13.6	0.311
<b>p16</b>			
metilovan	7/16 (43.7 %)	9/16 (56.3 %)	
nemetilovan	9/16 (56.3 %)	7/16 (43.7 %)	0.724
<b>p15</b>			
metilovan	8/16 (50 %)	2/16 (12.5 %)	
nemetilovan	8/16 (50 %)	14/16 (87.5 %)	0.022
<b>Hb</b>			
referentan	8/16 (50 %)	14/16 (87.5 %)	
snižen (< 120 g/l)	8/16 (50 %)	2/16 (12.5 %)	0.022
<b>recidiv bolesti</b>			
ne	10/26 (38.5 %)	16/26 (61.5 %)	
da	6/6 (100 %)	0/6 (0 %)	0.018
<b>odgovor na terapiju</b>			
KR/PR	12/24 (50 %)	12/24 (50%)	
SB/PB	4/8 (50 %)	4/8 (50%)	1.000
<b>smrtni ishod u toku 5 god.</b>			
ne	9/21 (42.8 %)	12/21 (57.1%)	
da	7/11 (63.6 %)	4/11 (36.4%)	0.263

Hb, hemoglobin; KR, kompletna remisija; PR, parcijalna remisija; SB, stabilna bolest; PB, progresija bolesti; p, verovatnoća statističke značajnosti je ispitivana Fišerovim egzaktnim testom i Studentovim t-testom.

#### **4.2.4. Poređenje grupa ispitanika sa recidivom i bez recidiva bolesti kod obolelih od FL**

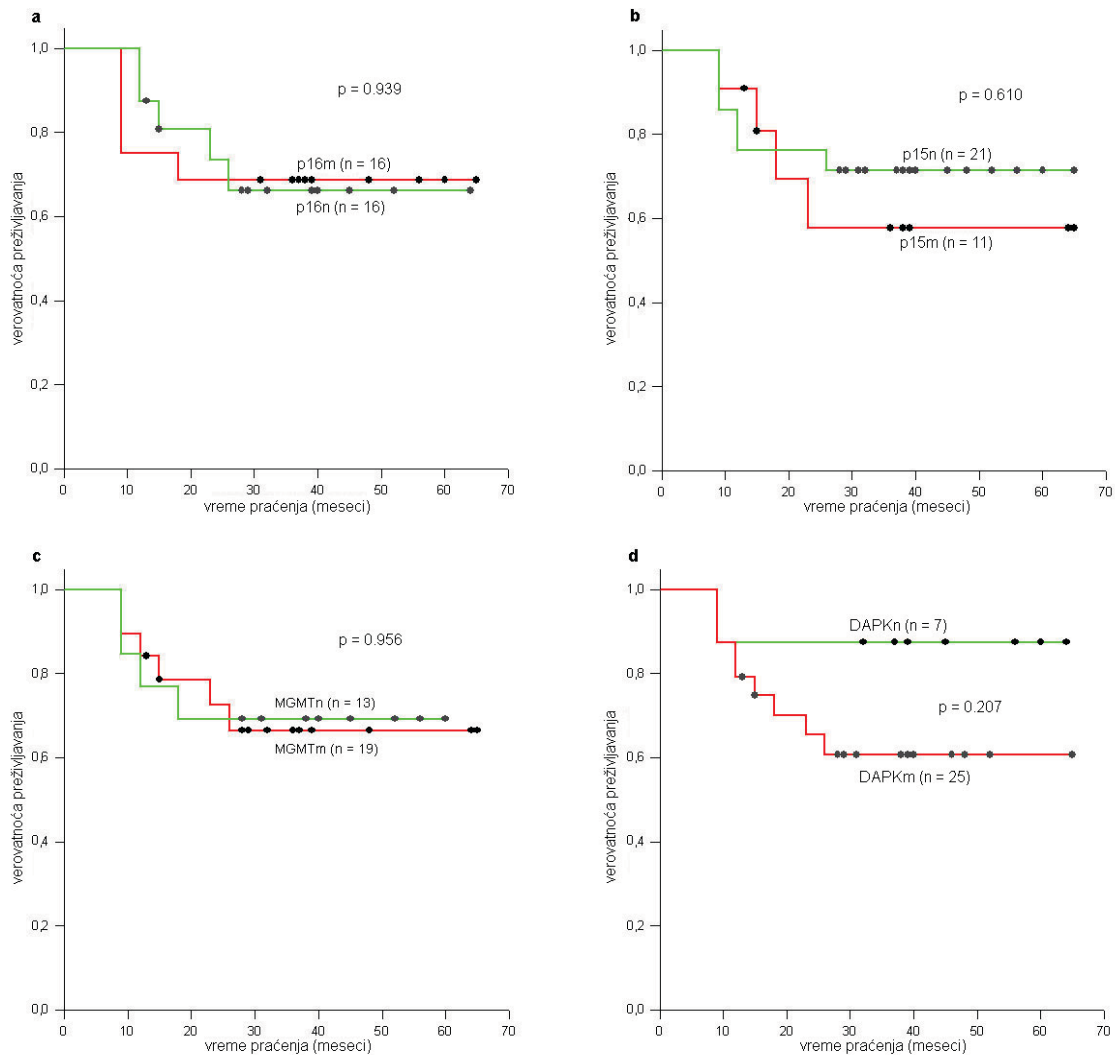
U našoj grupi ispitanika recidiv bolesti je utvrđen kod 18.7 % (6/32) i kod svih (6/6) je detektovana kometilacija *MGMTm/DAPKm* (100%), dok je kod preostalih obolelih bez pojave recidiva, istovremena metilacija ova dva gena bila prisutna kod svega 38.5 % (10/26). Ova razlika je i statistički značajna ( $p = 0.018$ , Tabela 4.4.). Metilacija *p16* gena je detektovana kod svega 16.7 % (1/6) obolelih sa pojavom recidiva i kod 57.7 % (15/26) slučajeva bez recidiva bolesti, međutim, ova razlika nije dostigla statističku značajnost ( $p = 0.172$ , Tabela 4.3.). Metilacija *p15* gena je bila podjednako zastupljena u obe grupe obolelih ( $p = 1.000$ , Tabela 4.3.). Svi ispitanici kod kojih je kasnije došlo do recidiva su postigli kompletnu remisiju nakon indukciono terapije, dok je to bio slučaj sa 38.5 % obolelih iz grupe bez pojave recidiva, što je i statistički značajna razlika ( $p = 0.018$ ). Pojava recidiva nije imala uticaj na krajnji ishod bolesti, s

obzirom da je približno 1/3 pacijenata iz obe grupe umrlo tokom trajanja studije ( $p = 1.000$ ).

#### **4.2.5. Analiza preživljavanja kod obolelih od FL**

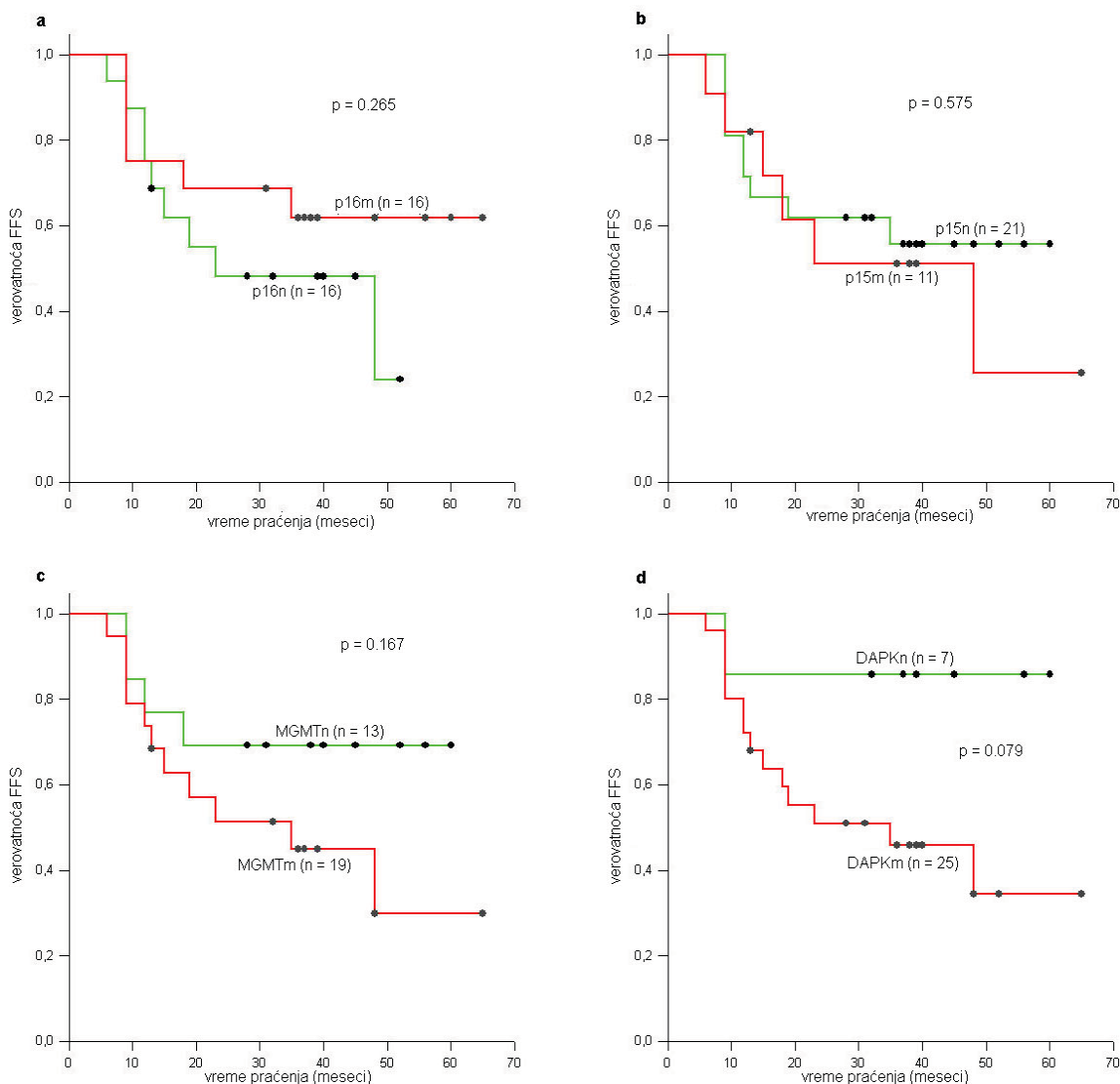
Podaci o preživljavanju su bili dostupni za sve ispitanike obolele od FL. Medijana praćenja je bila 31.5 meseci (opseg 9-65). Ukupno preživljavanje je bilo značajno kraće kod obolelih koji su pripadali jednoj od sledećih kategorija: visok FLIPI ( $p < 0.001$ ), starost  $> 60$  godina ( $p = 0.021$ ), gradus tumora III ( $p = 0.010$ ), snižen nivo Hb ( $p = 0.001$ ), uvećan nivo serumske LDH ( $p < 0.001$ ), ECOG performans status  $\geq 2$  ( $p < 0.001$ ), veličina tumorske mase  $\geq 10$  cm ( $p < 0.001$ ) i prisustvo B simptoma ( $p < 0.001$ ). Petogodišnje preživljavanje u celoj grupi je iznosilo 68.3 % (95 %, CI 49.40-82.89). FFS je bilo značajno kraće kod ispitanika sa tumorom gradusa III ( $p = 0.038$ ), sniženim vrednostima Hb ( $p = 0.004$ ), uvećanim nivoom serumske LDH ( $p < 0.001$ ), skorom ECOG performans statusa  $\geq 2$  ( $p < 0.001$ ), visokim FLIPI stepenom rizika ( $p < 0.001$ ), prisutnim B simptomima bolesti ( $p = 0.002$ ), tumorskom masom  $\geq 10$  cm, bez odgovora na indukcionu terapiju ( $p < 0.001$ ), kao i sa pojavom recidiva bolesti ( $p = 0.006$ ).

Na osnovu analize preživljavanja svih ispitanika, nije uočena značajna razlika u ukupnom preživljavanju u odnosu na metilacioni status bilo kog od analiziranih gena. Rezultati su prikazani na Grafiku 4.4.



**Grafik 4.4. Ukupno preživljavanje obolelih od FL u odnosu na metilacioni status (a) p16, (b) p15, (c) MGMT i (d) DAPK gena.** Kaplan-Majerove krive preživljavanja pokazuju da metilacioni status analiziranih gena ne utiče značajno na ukupno preživljavanje. Najveća razlika je zabeležena u odnosu na metilacioni status DAPK gena, gde je ukupno preživljavanje bilo nešto kraće kod ispitanika sa metilovanim u odnosu na nemetilovani DAPK gen ( $p = 0.207$ ).  $p$ , verovatnoća statističke značajnosti ispitivane je Log-Rank testom.

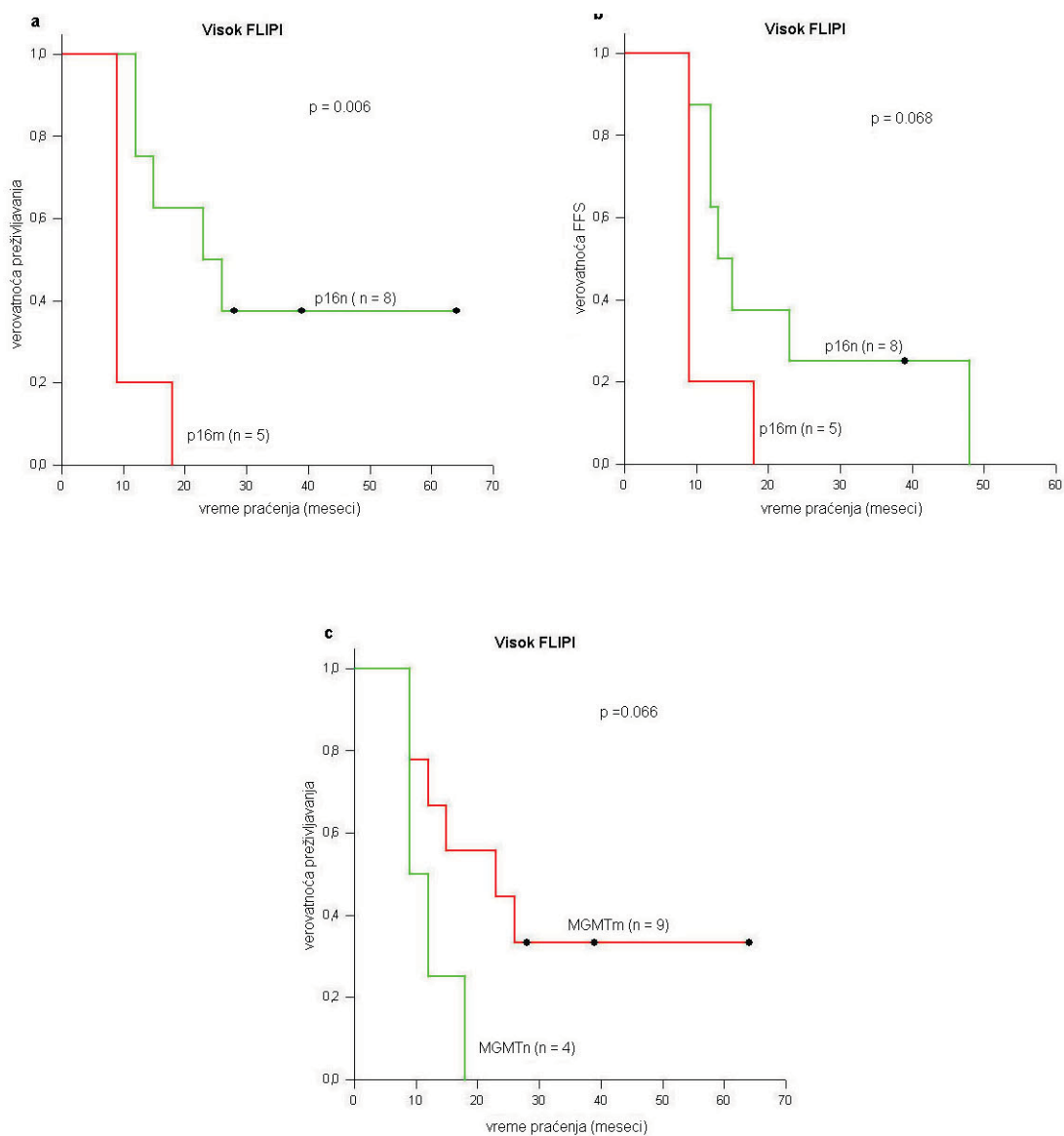
Na osnovu analize FFS u celoj grupi, kod obolelih sa metilacijom DAPK gena je primećen trend ka kraćem FFS u odnosu na obolele sa nemetilovanim DAPK genom (53 vs. 36 meseci,  $p = 0.079$ ), dok metilacioni status preostala tri gena nije imao značajan uticaj na FFS (Grafik 4.5.).



**Grafik 4.5. FFS kod obolelih od FL u odnosu na metilacioni status (a) p16, (b) p15, (c) MGMT i (d) DAPK gena.** Kaplan-Majerove krive preživljavanja pokazuju da je FFS nešto duže kod ispitanika sa metilovanim p16 genom, a kraće kod ispitanika sa metilovanim p15, MGMT, odnosno DAPK genom, pri čemu je najveća razlika u FFS zabeležena u slučaju DAPK gena ( $p = 0.079$ ).  $p$ , verovatnoća statističke značajnosti ispitivana je Log-Rank testom.

U daljoj analizi smo ispitivali uticaj metilacije na ukupno preživljavanje i FFS u grupama različitog stepena FLIPI rizika. U grupi visokog rizika, oboleli sa metilacijom p16 gena su imali značajno kraće ukupno preživljavanje u odnosu na one sa nemetilovanim p16 genom (11 vs. 35 meseci,  $p = 0.006$ ), a uočen je i trend ka kraćem FFS (11 vs. 22 meseci,  $p = 0.068$ , Grafik 4.6. a i b). U istoj grupi rizika, oboleli sa metilovanim MGMT genom su pokazivali trend ka dužem ukupnom preživljavanju, u

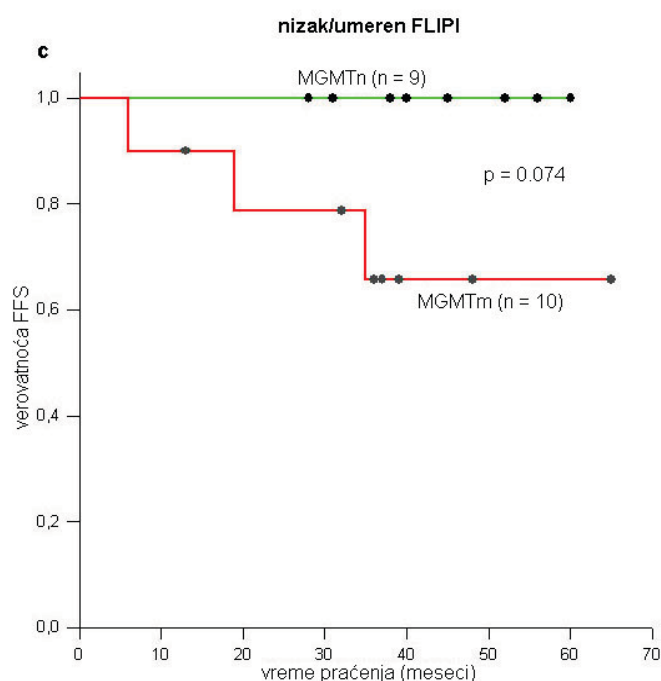
poređenju sa grupom sa nemetilovanim *MGMT* genom (32 vs. 12 meseci,  $p = 0.066$ , Grafik 4.6.c). Uticaj metilacije *MGMT* gena na FFS u istoj grupi nije zapažen ( $p = 0.275$ ). Metilacioni status *p15* i *DAPK* gena nije imao uticaj na ukupno preživljavanje, kao ni na FFS u grupi visokog FLIPI rizika (rezultati nisu prikazani).



**Grafik 4.6. Ukupno i FFS preživljavanje kod obolelih od FL, u odnosu na metilacioni status *p16*, odnosno, *MGMT* gena kod ispitanika sa visokim FLIPI rizikom. Kaplan-Majerove krive preživljavanja pokazuju da je ukupno (a) i FFS preživljavanje (b) kraće kod ispitanika sa metilovanim *p16* genom ( $p = 0.006$ , odnosno,  $0.068$ ). (c) Ukupno preživljavanje je duže u grupi sa metilovanim *MGMT* genom ( $p = 0.066$ ).  $p$ , verovatnoća statističke značajnosti ispitivana je Log-Rank testom.**



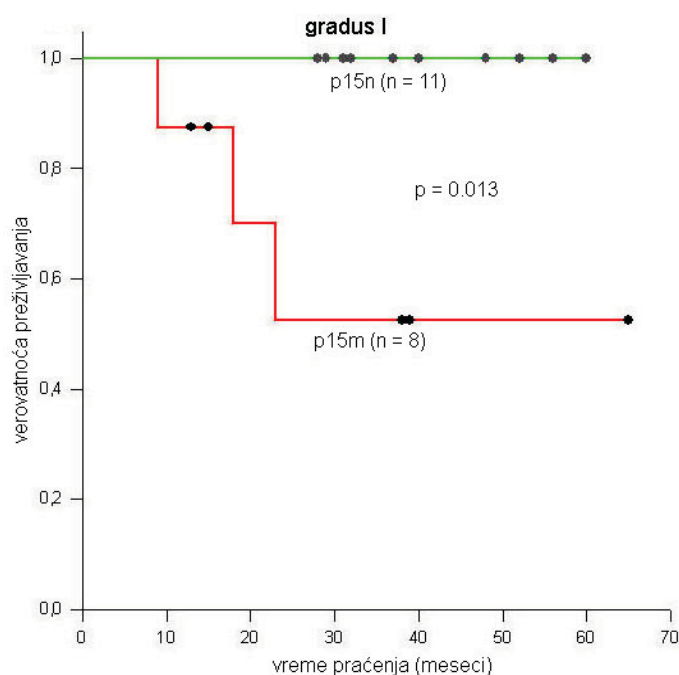
U grupi niskog/umerenog FLIPI rizika ni kod jednog pacijenta tokom trajanja studije nije došlo do smrtnog ishoda, pa analiza ukupnog preživljavanja nije bila moguća. U istoj grupi je zabeležen trend ka kraćem FFS kod ispitanika sa metilovanim *MGMT* genom ( $p = 0.074$ , Grafik 4.7.). Tokom perioda praćenja bolesti, ni kod jednog ispitanika iz grupe niskog/umerenog stepena FLIPI rizika sa nemetilovanim *MGMT* genom nije došlo do recidiva i/ili smrtnog ishoda, za razliku od ispitanika sa metilovanim *MGMT* genom, kod kojih je prosečna dužina FFS iznosila 50 meseci. Metilacioni status preostala tri gena nije imao značajan uticaj na FFS (rezultati nisu prikazani).



**Grafik 4.7.** FFS u grupi FL niskog/umerenog FLIPI rizika u odnosu na metilacioni status *MGMT* gena. Kaplan-Majerove krive preživljavanja pokazuju da je FFS kraće kod ispitanika sa metilovanim *MGMT* genom ( $p = 0.074$ ).  $p$ , verovatnoća statističke značajnosti ispitivana je Log-Rank testom.

Metilacioni status *p15* gena nije imao uticaj kako na ukupno tako ni na FFS preživljavanje ni u jednoj grupi rizika. Međutim, u grupi uzoraka sa histo-patološkim gradusom I, metilacija *p15* gena je bila značajno povezana sa kraćim ukupnim preživljavanjem (42 meseci,  $p = 0.013$ , Grafik 4.8.), dok u grupi ispitanika sa nemetilovanim *p15* genom nije zabeležen nijedan smrtni slučaj tokom perioda

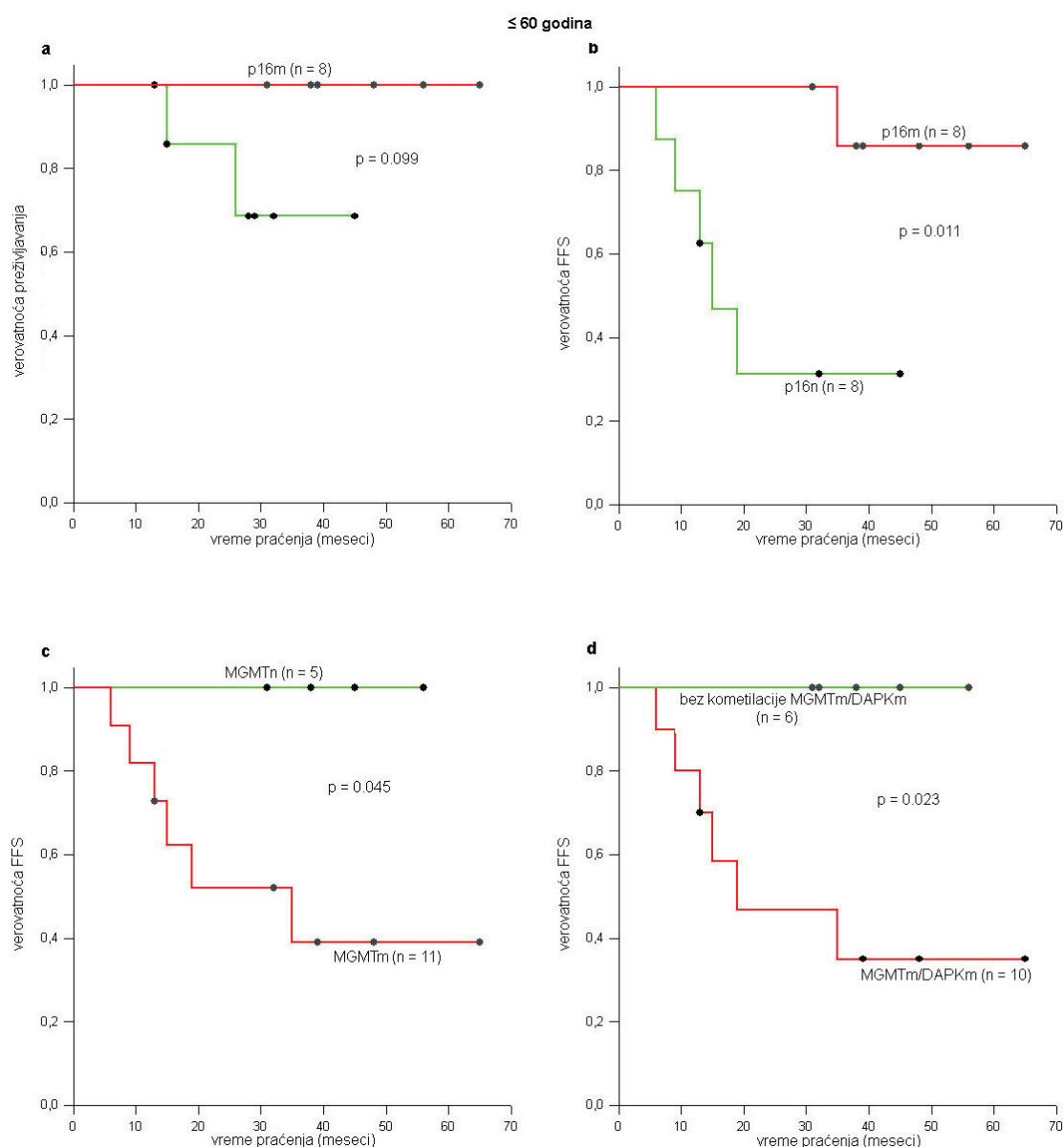
praćenja. Preostala tri gena nisu imala nikakav uticaj kako na ukupno, tako ni na FFS preživljavanje u ovoj grupi. Nije zapažen uticaj metilacionog statusa bilo kog ispitivanog gena na ukupno preživljavanje ili FFS u grupi obolelih sa gradusom tumora II, dok je u grupi sa gradusom III bilo svega 5 ispitanika, pa analiza preživljavanja u ovom slučaju nije bila moguća.



**Grafik 4.8.** Ukupno preživljavanje ispitanika obolelih od FL sa tumorom gradusa I u odnosu na metilacioni status *p15* gena. Kaplan-Majerove krive preživljavanja pokazuju da je ukupno preživljavanje kraće kod ispitanika sa metilovanim *p15* genom ( $p = 0.013$ ). U grupi ispitanika sa nemetilovanim *p15* genom u toku petogodišnjeg perioda praćenja nije zabeležen nijedan smrtni ishod.  $p$ , verovatnoća statističke značajnosti ispitivana je Log-Rank testom.

Rezultati analize preživljavanja u različitim starosnim grupama su pokazali da u grupi obolelih od FL  $\leq 60$  godina starosti postoji trend ka dužem ukupnom preživljavanju kod ispitanika kod kojih je detektovana metilacija *p16* gena. Kod ovih ispitanika tokom perioda praćenja nije zabeležen nijedan smrtni ishod, za razliku od ispitanika sa nemetilovanim *p16* genom, kod kojih je prosečna dužina preživljavanja iznosila 37 meseci, ( $p = 0.099$ .) Uočena je i statistički značajna korelacija metilacije *p16* gena sa dužim FFS (61 vs. 23 meseci,  $p = 0.011$ ). Rezultati su prikazani na Grafiku 4.9. U istoj grupi ispitanika, metilacija *MGMT* gena je bila značajno povezana sa kraćim

FFS (36 meseci,  $p = 0.045$ , Grafik 4.9), dok na ukupno preživljavanje nije imala uticaj ( $p = 0.260$ , rezultati nisu prikazani). Istovremena metilacija *MGMT* i *DAPK* gena je takođe bila povezana sa kraćim FFS kod mlađih ispitanika (34 meseci,  $p = 0.023$ ), bez značajnog uticaja na ukupno preživljavanje ( $p = 0.218$ ). U grupi ispitanika sa nemetilovanim *MGMT*, kao i bez istovremene metilacije *MGMT* i *DAPK* gena, tokom perioda praćenja nije zabeležen nijedan slučaj recidiva bolesti kao ni smrtni ishod. Rezultati su prikazani na Grafiku 4.9.

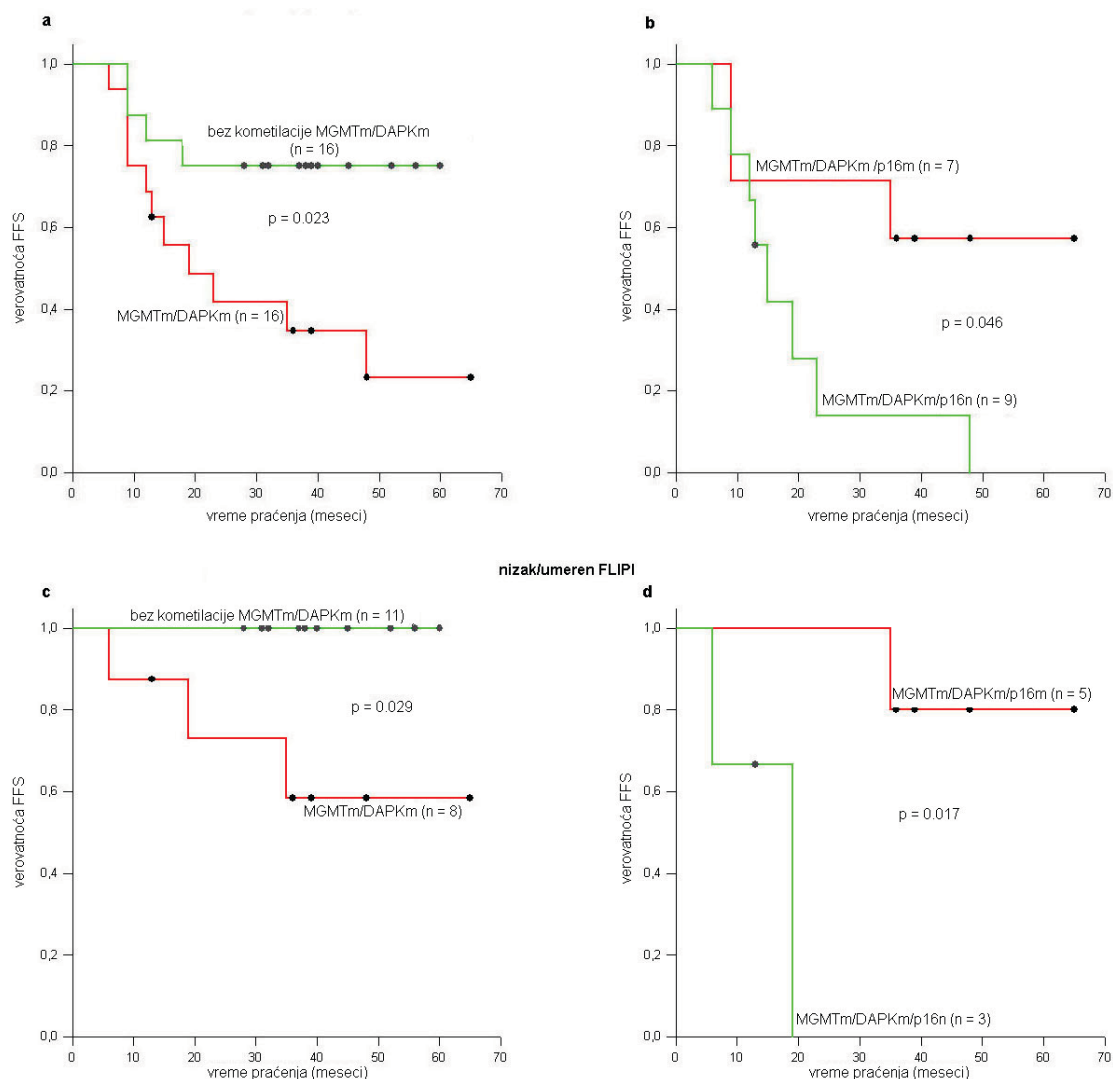


**Grafik 4.9.** Ukupno preživljavanje i FFS u grupi ispitanika sa  $FL \leq 60$  godina starosti. Kaplan-Majerove krive preživljavanja pokazuju da je ukupno (a) i FFS preživljavanje (b) duže

kod ispitanika sa metilovanim *p16* genom ( $p = 0.099$ , odnosno,  $0.011$ ). FFS je kraće kod ispitanika sa metilovanim *MGMT* genom (*c*) ( $p = 0.045$ ), kao i sa kometilacijom *MGMTm/DAPKm* (*d*) ( $p = 0.023$ ).  $p$ , verovatnoća statističke značajnosti ispitivana je Log-Rank testom.

Metilacija *p15* gena nije imala uticaj na ukupno ( $p = 0.491$ ) i FFS ( $p = 0.968$ ) preživljavanje kod ispitanika ispod 60 godina starosti. U grupi ispitanika preko 60 godina starosti, metilacija nijednog od analiziranih gena nije imala uticaj ni na ukupno ni na FFS preživljavanje (rezultati nisu prikazani). Iako je FFS bilo nešto kraće kod starijih ispitanika sa istovremenom metilacijom *MGMT* i *DAPK* gena, ova razlika u odnosu na grupu bez kometilacije ova dva gena nije bila statistički značajna (25 vs. 41 mesec,  $p = 0.165$ ).

Analiza preživljavanja kod ispitanika sa istovremenom metilacijom *MGMT* i *DAPK* gena je pokazala da je kometilacija *MGMTm/DAPKm* bila povezana i sa kraćim FFS (31 vs. 48 meseci,  $p = 0.023$ ) u celoj grupi. Kada je i *p16* gen uključen u analizu, oboleli sa istovremenom metilacijom *MGMTm/DAPKm/p16m* su imali značajno duže FFS u odnosu na one bez metilacije *p16* gena (45 vs. 19 meseci,  $p = 0.046$ ). Rezultati su prikazani na Grafiku 4.10. U isto vreme, metilacioni status *p16* gena u grupi FL koji su imali metilovan samo *MGMT* ili *DAPK* gen ili oba gena nemetilovana, nije imao uticaj na FFS (rezultat nije prikazan). Prisustvo kometilacije *MGMTm/DAPKm* je značajno uticalo i na kraće FFS u grupi ispitanika niskog/umerenog FLIPI rizika (46 meseci,  $p = 0.029$ ), u poređenju sa ispitanicima bez ove kometilacije, kod kojih nije zabeležen nijedan slučaj recidiva i/ili smrtni ishod tokom perioda praćenja. Kao i u celoj ispitivanoj grupi, i kod ispitanika niskog/umerenog FLIPI rizika, istovremena metilacija *MGMTm/DAPKm/p16m* gena je statistički značajno bila povezana sa dužim FFS (59 vs. 15 meseci,  $p = 0.017$ , Grafik 4.10.). Uticaj kometilacije *MGMTm/DAPKm* na FFS u grupi visokog FLIPI rizika nije zabeležen ( $p = 0.869$ ). Kometilacija *MGMTm/DAPKm* nije imala uticaj na ukupno preživljavanje kako u celoj grupi od 32 ispitanika, tako ni u grupama različitog stepena rizika i starosti (rezultati nisu prikazani).



**Grafik 4.10. FFS kod obolelih od FL u odnosu na istovremeni metilacioni status MGMT, DAPK i p16 gena.** Krive preživljavanja pokazuju da je FFS kraće kod ispitanika sa istovremenom metilacijom MGMT i DAPK gena, kako u celoj grupi (a) ( $p = 0.023$ ), tako i u grupi niskog/umerenog FLIPI rizika (c) ( $p = 0.029$ ). FFS je duže kod ispitanika sa istovremenom metilacijom MGMT/DAPK i p16 gena u odnosu na grupu sa MGMTm/DAPKm, ali nemetilovanim p16 genom i u celoj ispitivanoj grupi (b) ( $p = 0.046$ ) i u grupi niskog/umerenog FLIPI rizika (d) ( $p = 0.017$ ).  $p$ , verovatnoća statističke značajnosti ispitivana je Log-Rank testom.

## 5. DISKUSIJA

Difuzni B-krupnoćelijski limfom (DBKL) i folikularni limfom (FL), predstavljaju najučestalije entitete nehoćkinovih limfoma i zajedno čine oko 50 % svih B-ćelijskih neoplazija. To su klinički i biološki heterogena oboljenja, sa visoko varijabilnim odgovorom na terapiju, čestim pojavom recidiva, i uprkos značajnom napretku u terapiji, u velikom broju slučajeva ostaju neizlečiva. Aktuelni terapijski pristupi su praćeni brojnim neželjenim efektima i dovode do dugotrajne remisije i preživljavanja kod svega 40-50 % bolesnika, dok kod ostalih dolazi do progresije bolesti (Staudt i Dave, 2005). Najznačajniji klinički prediktor ishoda bolesti do danas je internacionalni prognostički indeks (IPI za DBKL, odnosno FLIPI za FL), koji obuhvata odgovarajuće nezavisne kliničke prognostičke parametre. Uprkos tome, oboleli koji pripadaju istim IPI/FLIPI kategorijama, ispoljavaju značajne razlike u odgovoru na terapiju i preživljavanju, što ukazuje na postojanje značajne biološke heterogenosti u okviru svake IPI/FLIPI kategorije (Armitage i Weisenburger, 1998, Sehn i sar., 2012). Zbog toga su poslednjih godina brojna istraživanja usmerena na pronalaženje novih prognostičkih molekularnih parametara, koji bi omogućili precizniju podelu obolelih u grupe različitog stepena rizika, unapređivanje prognoze i poboljšanje efekata primenjene terapije. Za pojedine molekularne karakteristike se smatra da bi mogle da budu relevantnije od standardnih prognostičkih parametara u predviđanju ponašanja tumora, kliničkog toka i ishoda bolesti (Lossos i Morgensztern, 2006, Amara i sar., 2008). Zahvaljujući ubrzanom rasvetljavanju patogeneze B-NHL, čine se pokušaji da se dizajnira terapija koja bi se zasnivala na identifikaciji specifičnih molekularnih poremećaja u DBKL i FL, a specifični genetički i epigenetički profil kod svakog pacijenta bi omogućio individualni pristup.

Limfomageneza predstavlja višestepeni proces u kome progresivna akumulacija genetičkih i epigenetičkih događaja dovodi do maligne transformacije ćelije i nastanka limfoma (Esteller, 2003). Od ranije je poznato da su genetički događaji, pre svega, hromozomske translokacije, uključeni u patogenezu B-NHL (Ong i Le Beau, 1998). Od nedavno se zna da je i aberantna metilacija CpG ostrvaca u okviru promotorskih regiona odgovarajućih gena takođe veoma čest događaj kod ovih limfoma i da može da utiče na

biološke karakteristike tumora i njegovo kliničko ponašanje (Esteller, 2003). Među različitim genima koji podležu procesu hipermetilacije u DBKL i FL, posebnu pažnju privlače oni koji regulišu ključne ćelijske puteve, uključujući: *p16* i *p15*, regulatore ćelijskog ciklusa, *MGMT* gen, čiji produkt učestvuje u korekciji grešaka na DNK, kao i *DAPK* gen koji je važan u regulaciji programirane ćelijske smrti, apoptoze.

Cilj naše studije je bio utvrđivanje biološkog i prognostičkog značaja metilacionog statusa četiri navedena tumor-supresor gena u grupi od 51 obolelog od DBKL i 32 obolelih od FL.

Metilacija sva četiri analizirana gena je u većem procentu bila zastupljena kod obolelih od FL u odnosu na DBKL, ali uočene razlike između dve grupe limfoma nisu bile statistički značajne. Metilacioni profil je u obe grupe obolelih bio isti: najmanji procenat metilacije je bio zabeležen u slučaju *p15* gena (23.5 % kod DBKL i 34 % kod FL), nešto veći kod *p16* (37.2 % i 50 %), još veći kod *MGMT* gena (39.2 % i 59 %), a najčešće metilovani gen je kod oba tipa limfoma bio *DAPK* (54.9 %, kod DBKL odnosno, 78 % kod FL). U grupi obolelih od FL kod svih osim jednog ispitanika je detektovana metilacija najmanje jednog gena, dok je kod obolelih od DBKL to bio slučaj sa 74 % (38/51) ispitanika. Naši rezultati sugerišu da su epigenetičke promene čest događaj kod DBKL i FL i da mogu da budu važne za patogenezu ove dve grupe B-NHL.

Metilacioni status četiri tumor-supresor gena je ispitivan primenom PCR metode specifične za metilaciju. Trake koje odgovaraju nemetilovanim alelima sva četiri analizirana gena su detektovane u skoro svim ispitivanim uzorcima, ali su različitog intenziteta, što ukazuje na prisustvo manje ili veće proporcije nemetilovanih alela u tumorskim uzorcima kod kojih je detektovana metilacija odgovarajućih gena. Jedno od mogućih objašnjenja za ovakve rezultate bi moglo da bude postojanje nemalighnih ćelija krvnog i imunog sistema u tumorskom tkivu. S druge strane, moguće je da su tumorske ćelije u jednom uzorku zapravo mešavina onih koji sadrže metilovanu i nemetilovanu DNK, odnosno da postoji ćelijska heterogenost. Doprinos ovakvoj slici usled prisustva homozigotnih mutacija je malo verovatan, s obzirom da je ovaj vid inaktivacije *p16*, *p15*, *MGMT* i *DAPK* gena redak događaj kod DBKL i FL. Inaktivacija navedenih gena se u ovim limfomima, pored aberantne metilacije, dešava još i putem heterozigotnih i homozigotnih delecija (Pinyol i sar., 1998, Herman i Baylin., 2003, Michie i sar., 2010).

U svakom slučaju, s obzirom da je MSP kvalitativna metoda, na osnovu dobijenih rezultata ne može da se govori o procentualnoj zastupljenosti metilovanih i nemetilovanih alela.

Inaktivacija *p16* gena putem aberantne hipermetilacije promotorskih CpG ostrvaca je čest događaj u različitim humanim malignim tumorima, uključujući NHL (Herman i sar., 1995, Garcia i sar., 2002). Inaktivacija ovog tumor-supresor gena omogućava ćeliji da izbegne ključne tačke kontrole ćelijskog ciklusa i da uđe u stanje neprekidnih deoba (Baur i sar., 1999). U našoj grupi uzoraka metilacija *p16* gena je detektovana kod 37.2 % uzoraka DBKL i kod 50% uzoraka FL, što je u skladu sa postojećim literaturnim podacima, prema kojim se ovaj događaj sreće u 27-46 % slučajeva DBKL (Sanchez-Beato i sar., 2001, Shiozawa i sar., 2006, Amara i sar., 2008), kao i u 31-60 % slučajeva FL (Baur i sar., 1999, Garcia i sar., 2002, Chim i sar., 2007). Kod obolelih od DBKL iz naše studije, metilacija *p16* gena je statistički značajno bila češća kod ispitanika sa referentnim vrednostima serumske LDH ( $p = 0.035$ ), kao i kod ispitanika sa niskim/umereno-niskim stepenom IPI rizika ( $p = 0.034$ ). Ova dva parametra se u brojnim studijama povezuju sa povoljnijom prognozom (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993, Shiozawa i sar., 2006, Amara i sar., 2008, Peruničić Jovanović i sar., 2009, Sretenović i sar., 2012), što je u slučaju IPI potvrđeno i u našoj studiji. Podaci o asocijaciji metilacije *p16* gena sa kliničko-patološkim karakteristikama kod obolelih od DBKL su kontroverzni. U studiji koju su sproveli Amara i sar., (2008) metilacija *p16* gena je bila značajno češća kod ispitanika sa visokim IPI rizikom, a pokazana je povezanost i sa drugim karakteristikama DBKL koje se vezuju za lošiju prognozu, uključujući uznapredovali klinički stadijum, skor ECOG performans statusa  $\geq 2$ , i prisustvo B simptoma. U drugoj studiji koju su sproveli Shiozawa i sar., (2006), nije utvrđena korelacija metilacije *p16* gena sa kliničko-patološkim karakteristikama, ali je, kao i kod nas, ovaj gen u dvostruko većem procentu bio zastupljen kod ispitanika nižeg stepena IPI rizika. S druge strane, Zainuddin i sar., (2011) su utvrdili značajno veću učestalost metilacije *p16* gena kod obolelih sa nižim stadijumima bolesti. I u našoj grupi obolelih od DBKL metilacija *p16* gena je u nešto većem procentu detektovana kod ispitanika sa nižim kliničkim stadijumom bolesti (50 % vs. 34.9 %), mada ova razlika nije bila statistički značajna ( $p = 0.450$ ). Ni u jednoj od pomenutih studija nije detektovana asocijacija metilacije *p16* sa



nivoom serumske LDH, tako da značaj naših rezultata treba uzeti sa rezervom i ispitati na većem broju uzoraka.

U grupi ispitanika sa FL metilacija *p16* gena nije korelirala ni sa jednom ispitivanom kliničko-patološkom karakteristikom obolelih, što je u saglasnosti sa studijom koju su sproveli Chim i sar., (2007). Međutim, zapazili smo da učestalost metilacije *p16* opada sa porastom kategorije FLIPI rizika (66.7 % vs. 53.8 % vs. 38.5 %). Iako uočene razlike nisu bile statistički značajne, ovaj rezultat sugerise da se u FL visokog stepena rizika dešavaju dodatne, drugačije genetičke i/ili epigenetičke promene, koje su povezane sa agresivnijim ponašanjem tumora. Isto objašnjenje bi moglo da važi i za tumore iz grupe umereno-visokog/visokog IPI rizika kod DBKL, kod kojih je metilovani *p16* gen detektovan u manjem procentu u odnosu na grupu niskog/umereno-niskog stepena rizika.

Analiza preživljavanja kod ispitanika sa DBKL je pokazala da metilacioni status *p16* gena nema nikakav uticaj na ukupno preživljavanje kako u celoj grupi, tako ni u grupama različitog IPI rizika, pola ili starosti, što je u saglasnosti sa studijom koju su sproveli Lee i sar., (2009). Međutim, u grupi obolelih od FL, kod ispitanika koji su pripadali grupi visokog FLIPI rizika, metilacija *p16* je značajno korelirala sa kraćim ukupnim preživljavanjem ( $p = 0.006$ ), a uočen je i trend ka kraćem FFS ( $p = 0.068$ ). Iako je uticaj metilacije *p16* gena na klinički tok i ishod bolesti prethodno pokazan na širokom spektru humanih epitelijalnih i hematoloških tumora (Pinyol i sar., 1998, Villuendas i sar., 1998, Baur i sar., 1999, Sanchez-Beato i sar., 2001, Wang i sar., 2004, Lee i sar., 2006, Shiozawa i sar., 2006, Amara i sar., 2008), prognostički značaj ovog epigenetičkog događaja kod DBKL i FL još uvek nije razjašnjen. U studiji koju su sproveli Shiozawa i sar., (2006), metilacija *p16* je bila u značajnoj asocijaciji sa lošijim ishodom kod obolelih od DBKL umereno-visokog/visokog IPI rizika, dok su Amara i sar., (2008) utvrdili vezu između metilacije *p16* gena i kraćeg ukupnog preživljavanja kod obolelih niskog/umereno-niskog IPI rizika. S druge strane, u skorašnjoj studiji koju su sproveli Zainuddin i sar., (2011), stepen metilacije *p16* gena veći od 25 %, utvrđen tehnikom pirosekvenciranja, je kod ispitanika obolelih od DBKL mlađih od 65 godina bio u vezi sa boljim FFS, dok na ukupno preživljavanje nije imao uticaj. Ovo je u saglasnosti sa našim rezultatima koji su pokazali da je kod ispitanika sa FL mlađih od 60 godina metilacija *p16* gena i statistički značajno povezana sa dužim FFS ( $p = 0.011$ ).

Pored toga, u studijama koje su sproveli Sanchez-Beato i sar., (2001), kao i Gronbaek i sar., (2000) je pokazano da je metilacija *p16* gena negativan prognostički parametar kod obolelih od DBKL samo u slučajevima kada su istovremeno inaktivirani i drugi geni, uključujući *p53*, *p14* i *p27*. Rezultati još nekih studija su pokazali da je sinergističko delovanje *p16* i *p53* gena, tj. njihova istovremena inaktivacija povezana sa agresivnijim ponašanjem različitih tipova tumora (Gorgoulis i sar., 1998, Pinyol i sar., 2000).

Naši rezultati, dobijeni za grupu ispitanika sa FL, još jednom ukazuju na mogućnost da kod tumora visokog FLIPI stepena rizika postoje dodatne genetičke i/ili epigenetičke promene koje utiču na agresivnije ponašanje tumora. Istovremena pojava metilacije *p16* gena u ovoj grupi ispitanika bi zahvaćenim ćelijama donela dodatnu selektivnu prednost, što može da bude povezano sa agresivnijim ponašanjem tumora. Ipak, za jasnije sagledavanje uloge koju inaktivacija *p16* gena ima u patogenezi DBKL i FL potrebno je ispitati i druge molekularne puteve sa kojima je ovaj gen povezan, kao i alternativne mehanizme njegove inaktivacije, kao što su homozigotne i heterozigotne delecije, koje se, prema literaturnim podacima javljaju kod oko trećine DBKL i u oko 70% slučajeva FL (Elenitoba-Johnson i sar., 1998, Jardin i sar., 2010). S obzirom da nemamo podatke o delecijama *p16* kod naših uzoraka, moguće je da su neki slučajevi u našoj studiji interpretirani kao nemetilovani, ustvari oni kod kojih postoje delecije *p16* gena, a nemetilovani produkt u MSP reakciji se javlja kao posledica prisustva normalnih, nemalignih, ćelija imunog i krvnog sistema u uzorcima tumora. Zbog toga je za dobijanje preciznije slike neophodno uraditi i analizu ekspresije P16 proteina. Ipak, na osnovu svega navedenog, naši rezultati, uporedo sa rezultatima prethodnih studija, sugerišu da bi metilacioni status *p16* gena u kombinaciji sa FLIPI mogao da posluži u predviđanju ishoda bolesti kod obolelih od FL.

Metilacija *p15* gena je zabeležena kod različitih hematoloških malignih tumora, uključujući DBKL i FL (Herman i sar., 1997, Martinez-Delgado i sar., 1998, Baur i sar., 1999, Shiozawa i sar., 2006, Kraguljac i sar., 2010, Kraguljac i sar., 2012). U našoj studiji, metilacija *p15* gena je detektovana kod 23 % uzoraka DBKL, što je nešto manje u odnosu na do sada objavljene rezultate drugih studija, prema kojima se metilacija *p15* sreće u 47-77 % slučajeva DBKL (Baur i sar., 1999, Garcia i sar., 2002, Shiozawa i sar., 2006). Metilacija *p15* gena je detektovana kod 34 % uzoraka FL, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih studija, u kojima se metilacija ovog gena sreće u oko 30 % slučajeva

FL (Martinez-Delgado i sar., 1998, Baur i sar., 1999, Guo i sar., 2005, Chim i sar., 2007).

U našem uzorku obolelih od DBKL zabeležen je trend ka češćoj pojavi metilovanog *p15* gena kod ispitanika mlađih od 60 godina ( $p = 0.091$ ), referentnih vrednosti serumske LDH ( $p = 0.090$ ), kod obolelih sa skorom ECOG performans statusa  $< 2$  ( $p = 0.095$ ), kao i kod onih sa niskim/umereno-niskim stepenom rizika ( $p = 0.076$ ). Svi ovi parametri se vezuju za povoljniji tok bolesti (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993, Shiozawa i sar., 2006, Amara i sar., 2008, Peruničić Jovanović i sar., 2009, Sretenović i sar., 2012), što je u našoj studiji potvrđeno za IPI i ECOG performans status, a zapažen je i trend ka dužem preživljavanju kod ispitanika mlađih od 60 godina. Rezultati praćenja toka i ishoda bolesti su pokazali da je metilacija *p15* gena statistički značajno bila češća kod ispitanika kod kojih nije došlo do recidiva ( $p = 0.019$ ), a zabeležen je i trend ka češćoj pojavi metilacije ovog gena kod obolelih kod kojih u toku petogodišnjeg perioda nije došlo do smrtnog ishoda ( $p = 0.086$ ). Na osnovu dobijenih rezultata se izvodi zaključak da je metilacija *p15* u uzorcima DBKL povezana sa manje agresivnim ponašanjem tumora. U do sada sprovedenim studijama na DBKL, samo je u jednom slučaju pronađena asocijacija metilacije *p15* gena sa muškim polom (Shoizawa i sar., 2006), dok veza sa drugim kliničko-patološkim parametrima nije utvrđena (Shiozawa i sar., 2006, Amara i sar., 2008).

Metilacija *p15* gena je u našoj grupi uzoraka FL bila u značajnoj korelaciji sa sniženim vrednostima Hb ( $p = 0.020$ ). Snižene vrednosti Hb su, s druge strane, bile u značajnoj korelaciji sa kraćim ukupnim preživljavanjem ( $p = 0.001$ ). Interesantno zapažanje je i da metilacija *p15* opada sa porastom gradusa tumora (42.1 % vs. 37.5 % vs. 0 %), kao i sa porastom stadijuma (75 % vs 28.6 %), mada ove razlike nisu statistički značajne. Prema našem saznanju, samo jedna studija do sada se bavile ispitivanjem korelacije metilacionog statusa *p15* gena sa kliničko-patološkim karakteristikama kod obolelih od FL, ali nikakve veze nisu uočene (Chim i sar., 2007).

U analizi preživljavanja, kod obolelih od DBKL ispitanici sa metilovanim *p15* genom su imali nešto duže ukupno preživljavanje u odnosu na one sa nemetilovanim *p15* genom, mada ova razlika nije bila i statistički značajna (91 vs. 63 meseci,  $p = 0.155$ ). U drugim studijama nije uočen uticaj metilacionog statusa *p15* gena na

preživljavanje kod obolelih od DBKL (Shiozawa i sar., 2006, Amara i sar., 2008). Ipak, svi dobijeni rezultati kod ispitanika sa DBKL u našoj studiji, ukazuju na to da je metilacija *p15* gena povezana sa manje agresivnim ponašanjem tumora. U grupi obolelih od FL, metilacioni status *p15* gena nije uticao na ukupno preživljavanje, kao ni na FFS u celoj analiziranoj grupi, kao ni u grupama različitih stepena rizika. Međutim, metilacija *p15* gena je statistički značajno bila povezana sa kraćim ukupnim preživljavanjem u grupi ispitanika sa tumorom gradusa I ( $p = 0.013$ ). S obzirom, da tumori gradusa I spadaju u FL najmanjeg stepena agresivnosti, pojava aberantne metilacije *p15* gena, očigledno, doprinosi agresivnijem ponašanju tumora sa ovim epigenetičkim događajem. Podaci o prognostičkom značaju metilacije *p15* gena u različitim tipovima tumora su kontroverzni (Wemmert i sar., 2009, Deneberg i sar., 2010, Kim i sar., 2010), a prema našem saznanju, prognostički značaj ove epigenetičke aberacije kod FL do sada nije utvrđen. Suprotni rezultati dobijeni u našoj studiji, koji se odnose na uticaj metilacionog statusa *p15* gena kod DBKL, odnosno FL su verovatno odraz različite biologije ova dva entiteta B-NHL. Da bi se rasvetlio značaj *p15* gena u patogenezi DBKL potrebno je ispitivanje dodatnog broja molekularnih markera povezanih sa *p15* putem kontrole ćelijskog ciklusa i uključivanje većeg broja uzoraka u istraživanje.

Visoka učestalost istovremene metilacije *p15* i *p16* gena koja je zabeležena u pojedinim studijama, predstavlja teškoću za utvrđivanje nezavisnog uticaja svakog gena ponaosob (Baur i sar., 1999, Martinez-Delgado i sar., 2008). Moguće je da postoji kooperacija između *p15* i *p16* gena i da njihova istovremena metilacija i, shodno tome, inaktivacija, može da bude važna u patogenezi limfoma, kao što su sugerisali Martinez-Delgado i sar., (1998). U našoj grupi obolelih od DBKL istovremena metilacija *p15* i *p16* gena je bila prisutna kod 16 % (8/51) ispitanika. Međutim, za razliku od grupe FL, metilacija *p15* se javljala statistički značajno češće u kombinaciji sa istovremenom metilacijom *p16* gena, nego kao samostalan događaj (66.7 % vs. 33.3 %,  $p = 0.037$ ). Iako istovremena metilacija ova dva gena nije bila značajno povezana ni sa jednom kliničko-patološkom karakteristikom obolelih od DBKL, primećena je akumulacija kometilacije *p15m/p16m* kod ispitanika sa kliničko-patološkim parametrima koji se vezuju za manje agresivan tok bolesti, uključujući pripadnost ženskom polu ( $p = 0.140$ ), starost  $\leq 60$  godina, ( $p = 0.119$ ), nizak/umereno-nizak IPI ( $p = 0.099$ ), referentne

vrednosti LDH ( $p = 0.100$ ), skor ECOG performans statusa  $< 2$  ( $p = 0.127$ ), kao i odsustvo recidiva bolesti ( $p = 0.086$ ). Uticaj kometilacije *p15m/p16m* na ukupno preživljavanje kod obolelih od DBKL nije zabeležen. U grupi obolelih od FL istovremena metilacija *p15m/p16m* je utvrđena kod 18.7 % (6/32) ispitanika i nije bila povezana ni sa jednom kliničko-patološkom karakteristikom obolelih. Međutim, svi osim jednog slučaja kometilacije (83.3 %) su zabeleženi kod ispitanika sa tumorom gradusa I. U isto vreme, učestalost metilacije *p16* i *p15* gena opada sa porastom gradusa tumora, i u oba slučaja je najveća u tumorima gradusa I. Moguće je da se inaktivacija ova dva gena u tumorima višeg gradusa postiže nekim drugim mehanizmima, uključujući delecije, kao što je predloženo u radu autora Elenitoba-Johnson i sar., (1998). U ovoj studiji je zapaženo da je prisustvo homozigotnih delecija *p16* i *p15* gena povezano sa histološkom progresijom i transformacijom FL u agresivniji DBKL. Rezultati studije Sanchez-Beato i sar., (2001) koja je sprovedena na agresivnim limfomima, uključujući i DBKL, sugerišu da je inaktivacija *p15* i/ili *p16* gena putem aberantne metilacije rani događaj u nastanku ovih limfoma i da može da utiče na njihovo agresivno ponašanje. S druge strane, ova grupa autora, na osnovu dobijenih rezultata, sugeriše da inaktivacija *p15* gena može da ima važnu ulogu kod agresivnih limfoma i da gubitak njegove funkcije ne mora da ima veze samo sa tim što je lociran u blizini *p16* gena. Iako su ova istraživanja sprovedena na agresivnim limfomima, navedene pretpostavke bi mogle da važe i za indolentne limfome kao što je FL. Tome u prilog idu i naši rezultati, prema kojima je i istovremena metilacija *p15* i *p16* gena kod FL gradusa I takođe povezana sa kraćim ukupnim preživljavanjem ( $p = 0.014$ , rezultati nisu prikazani), dok metilacija samo *p16* gena u istoj grupi ispitanika nema uticaj na ishod bolesti ( $p = 0.661$ , rezultati nisu prikazani). Iako su potrebna dodatna istraživanja, naši rezultati sugerišu da bi metilacija *p15* gena u kombinaciji sa gradusom tumora, mogla da bude interesantan molekularni marker koji bi ukazivao na agresivnije ponašanje tumora kod obolelih od FL. Negativni efekti metilacije *p15* i *p16* gena na ishod bolesti mogu da se objasne činjenicom da inaktivacija ovih gena regulatora ćelijskog ciklusa vodi nekontrolisanoj ćelijskoj deobi, što daje selektivnu prednost zahvaćenim ćelijama (Herman i sar., 1995, Herman i sar., 1996a). Deregulacija ćelijskog ciklusa može da dovede do sticanja i održavanja dodatnih genetičkih i epigenetičkih poremećaja, doprinoseći tako još većem malignom potencijalu tumorskih ćelija. S druge strane, povezanost metilacije *p15* gena

sa karakteristikama koje se vezuju za manje agresivno ponašanje DBKL, ne mora da znači da inaktivacija ovog gena sama za sebe doprinosi takvom fenotipu, nego da definiše podgrupu DBKL sa povoljnijom prognozom.

Inaktivacija *MGMT* gena usled hipermetilacije promotorskog regiona se javlja u čitavom spektru B-ćelijskih neoplazija (Esteller i sar., 2002, Rossi i sar., 2004, Lee i sar., 2009, Kraguljac i sar., 2010). *MGMT* je gen iz sistema za korekciju DNK, koji štiti ćeliju od mutagenih i citotoksičnih efekata alkilirajućih agenasa, koji reaguju sa O<sup>6</sup> pozicijom guanina. *MGMT* enzim sprečava formiranje adukata na O<sup>6</sup> poziciji guanina tako što prebacuje alkil grupu na cisteinski ostatak u samom proteinu, onemogućavajući na taj način formiranje letalnih veza između naspramnih lanaca DNK i nastanak tačkastih mutacija tipa G u A u genima kao što su *K-ras* i *p53* (Ericson i sar., 1980, Pegg, 2000, Esteller i Herman, 2004). Inaktivacija *MGMT* gena uvećava senzitivnost ćelija na genotoksične efekte alkilirajućih agenasa, *in vitro* i *in vivo* (Esteller i Herman, 2004). Prethodne studije su pokazale da je metilacija *MGMT* gena povoljan prognostički parameter kod obolelih od glioma i DBKL koji su u okviru hemoterapije primali i alkilirajuće agense (Esteller i sar., 2000a, Esteller i sar., 2002, Lee i sar., 2009). Međutim, prognostički značaj metilacije *MGMT* nije ispitivan kod drugih B-ćelijskih limfoma. U našoj studiji aberantna metilacija *MGMT* gena je detektovana kod 39 % ispitanika sa DBKL i 59 % ispitanika sa FL, što je u skladu sa postojećim literaturnim podacima (Esteller i sar., 1999, Rossi i sar., 2004, Kim i sar., 2009). Nismo utvrdili korelaciju metilacije *MGMT* gena ni sa jednim kliničko-patološkim parametrom, kako kod DBKL, tako ni kod FL, što je u skladu sa rezultatima ostalih studija (Esteller i sar., 2002, Lee SM i sar., 2009). Pored toga metilacioni status *MGMT* gena nije imao uticaj ni na preživljavanje, ni na pojavu recidiva kod obolelih od DBKL, mada je metilacija *MGMT* u nešto većem procentu detektovana kod ispitanika sa recidivom u odnosu na one bez recidiva bolesti (54 % vs. 32 %). Ovo je u skladu sa rezultatima studije Lee GW i sar., (2009) koji su pokazali da metilacioni status *MGMT* gena nema uticaj na ukupno preživljavanje, kao ni na odgovor na terapiju u koju je pored standardnog CHOP protokola bio uključen i rituksimab. U nekoliko velikih, randomizovanih studija je pokazano da uvođenje imunoterapije tj. rituksimaba uz standardnu hemoterapiju, značajno poboljšava ishod bolesti kod obolelih od DBKL, bez obzira na status pojedinih kliničkih prognostičkih parametara, kao što su IPI i starost obolelih, ekspresija Bcl-2

proteina i nezavisno od toga na kom stupnju diferencijacije B-limfocita je došlo do maligne transformacije, tj. da li se radi o DBKL poreklom od B-ćelija germinativnog centra (GC-DBKL) ili aktiviranih B-ćelija (ABC-DBKL) (Coiffier i sar., 2002, Sehn i sar., 2005, Habermann i sar., 2006, Pfreundschuh i sar., 2006, Fu i sar., 2008). Smatra se da rituksimab ima ulogu u prevazilaženju hemorezistencije na ciklofosfamid, sastavni deo CHOP terapije, posebno kod tumora sa nemetilovanim *MGMT* genom, što dalje može da bude razlog odsustva značajnih razlika u preživljavanju s obzirom na metilacioni status *MGMT* gena (Lee GW i sar., 2009). Većina ispitanika sa DBKL iz naše studije je u okviru standardne terapije primala i rituksimab (R-CHOP protokol) i njihovo ukupno preživljavanje u poređenju sa grupom koja nije primala rituksimab je bilo nešto duže, mada ne i statistički značajno (82 vs. 53 meseci,  $p = 0.139$ , rezultati nisu prikazani). S obzirom na mali broj ispitanika (7/51) koji nije bio na terapiji rituksimabom, poređenje između dve grupe u odnosu na metilacioni status *MGMT* gena nije bilo moguće.

Do danas, postoje samo dve studije koje su se bavile analizom aberantne metilacije *MGMT* gena kod FL, ali bez ispitivanja njenog prognostičkog značaja (Rossi i sar., 2004, Kim i sar., 2009). Prema tome, naša studija je prva koja se bavila određivanjem prognostičkog i prediktivnog značaja metilacije *MGMT* gena kod FL. U našoj grupi uzoraka, metilacija *MGMT* gena je detektovana kod 59 % ispitanika, što ukazuje na važnu ulogu ovog događaja u patogenezi FL. Ovako visok procenat metilacije *MGMT* gena u FL su zabeležili i Kim i sar., (2009), dok je u studiji koju su sproveli Rossi i sar., (2004), metilacija *MGMT* gena zabeležena kod 25 % ispitanika sa FL. Al-Kuray i sar., (2007) su ukazali na mogućnost da različiti etiološki faktori, kao što su virusne infekcije ili genetička predispozicija, mogu da objasne značajne varijacije u molekularnim karakteristikama istog tipa tumora kod različitih etničkih grupa. Ova grupa autora je detektovala metilaciju *MGMT* gena u populaciji ispitanika sa DBKL iz Saudijske Arabije u dvostruko većem procentu (76 %) nego što je to uobičajeno u zapadnim zemljama (Esteller i sar., 2002, Rossi i sar., 2004).

Rezultati našeg istraživanja ukazuju da bi metilacije *MGMT* gena mogla da ima ulogu u predviđanju preživljavanja obolelih od FL. Iako nismo uspeli da pokažemo direktnu vezu između odgovora na terapiju i metilacije *MGMT*, postoje neka interesantna zapažanja. Zabeležen je trend ka dužem ukupnom preživljavanju kod

obolelih sa metilovanim *MGMT* genom, koji pripadaju kategoriji visokog FLIPI rizika ( $p = 0.066$ ). Ovo bi moglo da se objasni povećanom senzitivnošću malignih ćelija na genotoksične efekte alkilirajućih agenasa, konkretno, na ciklofosamid koji je sastavni deo hemoterapije u tretmanu FL, kao što je pokazano u slučaju glioma (Esteller i sar., 2000a) i DBKL (Esteller i sar., 2002, Hiraga i sar., 2006, Lee SM i sar., 2009). Pored toga, moguće je i da je metilacija *MGMT* gena povezana sa drugim genetičkim i/ili epigenetičkim promenama, što za posledicu ima veću osetljivost na hemoterapiju, pri čemu bi metilacija *MGMT* gena predstavljala prognostički parametar sam po sebi, koji definiše specifičan patogenetski podtip FL sa povoljnijim ishodom, kao što su pretpostavili Esteller i sar., (2002) u slučaju DBKL. Za razliku od grupe obolelih sa DBKL, samo jedan ispitanik sa FL iz naše studije je lečen rituksimabom, što bi donekle moglo da objasni uočene razlike u uticaju metilacionog statusa *MGMT* gena kod dve grupe ispitanika.

Pored toga, zapazili smo trend ka asocijaciji metilacije *MGMT* gena sa recidivom bolesti ( $p = 0.059$ ) u celoj ispitivanoj grupi obolelih od FL, a kod ispitanika koji su bili mlađi od 60 godina, kao i kod onih sa niskim FLIPI rizikom metilacija *MGMT* gena je bila povezana sa kraćim FFS ( $p = 0.045$ , odnosno,  $0.074$ ). Slični rezultati dobijeni u ove dve grupe obolelih bi mogli da se objasne time što je 18.7 % (3/16) mlađih ispitanika pripadalo kategoriji niskog FLIPI rizika. Pored toga, svi osim jednog (83.3 %) ispitanika sa pojavom recidiva su bili mlađi od 60 godina. Iako se u našoj studiji recidiv javljao u većem procentu kod mlađih nego kod starijih ispitanika sa FL (31.2 % vs. 6.25 %,  $p = 0.172$ ), kao i u nešto manjoj meri kod ispitanika sa DBKL (33.3 % vs. 23.5 %,  $p = 0.735$ ), ove razlike nisu bile statistički značajne. Uzrok češće pojave recidiva među mlađim ispitanicima iz naše studije je nepoznat i dobijene rezultate je potrebno proveriti na većem uzorku. U pojedinim studijama na uzorcima DBKL je pokazano da su ispitanici sa kasnom pojavom recidiva često imali povoljne kliničko-patološke karakteristike u trenutku dijagnoze, uključujući nizak IPI i indolentnu histologiju (Ghesquieres i sar., 2006, Larouche i sar., 2010).

Kod naših ispitanika sa FL metilacija *MGMT* gena je detektovana kod svih šest ispitanika sa pojavom recidiva, ali su svi oni postigli kompletnu remisiju nakon indukcionu terapije. Moguće objašnjenje za ove, naizgled oprečne rezultate, je da bi ćelije tumora sa metilovanim *MGMT* genom mogle da postanu podložnije



genotoksičnim efektima alkilirajućih agenasa, kao što je prethodno spomenuto, što bi uticalo na brzo postizanje kompletne remisije. Pretpostavljamo da bi naknadna pojava recidiva mogla da nastane usled akumulacije dodatnih genetičkih alteracija i sticanja genetičke nestabilnosti, kao posledice metilacije *MGMT* gena. Pored navedenog, kod svih šest ispitanika sa FL kod kojih je došlo do recidiva bolesti je detektovana metilacija *DAPK* gena. *DAPK* protein je pro-apoptotska serin-treonin kinaza uključena u višestruke puteve programirane ćelijske smrti, apoptoze. Inaktivacija ovog gena može da bude ključni faktor u modulaciji odgovora na hemoterapiju kod humanih kancera (Cohen i Kimchi, 2001, Ng, 2002). S obzirom na to, dodatno objašnjenje za pojavu recidiva kod naših ispitanika obolelih od FL bi moglo da bude to, da inaktivacija *DAPK* gena putem metilacije promotora dovodi do rezistencije tumorskih ćelija na hemoterapiju. Ovo je u saglasnosti sa prethodnim nalazima da inaktivacija *DAPK* gena, putem metilacije promotora, može da bude marker progresije tumora i postojane, uporne bolesti (Cohen i Kimchi, 2001, Ng, 2002, Voso i sar., 2006). Prethodne studije su pokazale da metilacija *DAPK* ima važnu ulogu u najmanje dva različita stadijuma kancerogeneze, rano, tokom ćelijske transformacije, i kasnije, tokom progresije kancera, tokom recidiva bolesti ili metastaze (Inbal i sar., 1997, Kim i sar., 2001). Inaktivacija *DAPK* gena putem metilacije promotora je čest događaj kod B-ćelijskih neoplazmi, naročito kod FL, gde se sreće sa učestalošću oko 80 %, dok se kod DBKL sreće u oko 60 % slučajeva (Katzenellenbogen i sar., 1999, Rossi i sar., 2004, Voso i sar., 2006, Amara i sar., 2008, Kim i sar., 2009). Naši rezultati se uklapaju u ove nalaze, s obzirom da je kod 78 % ispitanika sa FL i 55 % ispitanika sa DBKL iz naše studije detektovana metilacija *DAPK* gena. Metilacija *DAPK* gena se vezuje za nepovoljnu prognozu kod nekoliko različitih tipova humanih kancera, uključujući i limfome (Tozawa i sar., 2004, Fischer i sar., 2006, Amara i sar., 2008). Ipak, prognostički značaj ovog događaja kod DBKL i FL je malo ispitivan. Kod naših ispitanika sa DBKL i FL metilacija *DAPK* nije bila u korelaciji ni sa jednom kliničko-patološkom karakteristikom. Amara i sar., (2008) su uočili korelaciju metilacije *DAPK* gena sa lošijim odgovorom na terapiju kod obolelih od DBKL, kao i sa kraćim ukupnim preživljavanjem i periodom vremena do progresije bolesti. S druge strane, u studiji grupe autora Voso i sar., (2006), metilacija *DAPK* je korelirala sa sniženim vrednostima hemoglobina, a zapažen je i trend ka kraćem FFS. U našoj grupi ispitanika sa DBKL metilacija *DAPK* gena nije imala uticaj

na ukupno preživljavanje, dok je kod FL postojao trend ka kraćem FFS kod ispitanika sa metilovanim *DAPK* genom ( $p = 0.079$ ), što je u saglasnosti sa rezultatima Voso i sar., (2006). Važno je napomenuti da su svi osim jednog ispitanika sa FL iz naše studije koji su umrli tokom perioda praćenja imali metilovan *DAPK* gen. Ovi rezultati, još jednom, naglašavaju važnu ulogu inaktivacije *DAPK* gena putem metilacije promotora u sticanju hemorezistencije. Ipak, potencijalni prognostički značaj metilacije *DAPK* gena kod FL je potrebno istražiti na većem broju uzoraka.

Dok je metilacija *DAPK* gena najčešći epigenetički događaj kod FL, što potvrđuje i naša studija, translokacija t(14;18) je najčešća genetička alteracija u ovom tipu malignih limfoma (Ngan i sar., 1989). Ova translokacija je u našoj grupi uzoraka FL bila prisutna kod 78 % ispitanika (Radojković, 2004). Međutim, nije detektovana korelacija između metilacije *DAPK* gena i prisustva t(14;18), što ukazuje na to da se ova dva događaja koja dovode do deregulacije apoptoze, iako česti, javljaju nezavisno u patogenezi FL. Do istih rezultata su došli i Voso i sar., (2006). Kod čak 97 % (31/32) ispitanika iz naše studije postojala je deregulacija jednog od ova dva puta, što samo dalje potvrđuje važnu ulogu koju narušavanje normalnog funkcionisanja apoptoze ima u patogenezi FL. Ovi rezultati su konzistentni sa hipotezom da je deregulacija apoptoze rani događaj u kancerogenezi koji omogućava ćelijama limfoma da izbegnu programiranu ćelijsku smrt i krenu u dalju transformaciju (Hayslip i Montero, 2006). Ipak, potencijalni prognostički značaj metilacije *DAPK* gena kod FL treba ispitati na većem broju uzoraka. Treba naglasiti, da kada se interpretiraju dobijeni rezultati, postoji mogućnost da odsustvo značajne razlike u inicijalnom odgovoru na terapiju s obzirom na metilacioni status *MGMT* i *DAPK* gena može da bude posledica primene drugih efikasnih antitumorskih agenasa koji se koriste kao deo standardne terapije limfoma, što može da maskira veće razlike u odgovoru između metilovane i nemetilovane grupe.

Literaturni podaci ukazuju na to da se metilacija pojedinih gena u kancerogenezi, uključujući i limfome, ne dešava kao slučajan događaj, već zahvata specifične grupe gene, što omogućava utvrđivanja specifičnog profila metilacije, tj. „metilotipa“ za svaki tip tumora (Baur i sar., 1999, Esteller i sar., 2001b, Esteller, 2003). Istovremena metilacija određenih grupa gena omogućava kooperaciju epigenetičkih alteracija u genomu maligne ćelije i istovremenu deregulaciju najvažnijih ćelijskih procesa. Zbog toga bi odgovarajuće kombinacije istovremeno metilovanih

gena mogle da posluže kao molekularni marker za detekciju i praćenje ponašanja tumora, kao i odgovora na terapiju.

U našoj grupi ispitanika sa DBKL, utvrdili smo statistički značajne korelacije između metilacije *p15* i *p16* gena ( $p = 0.037$ ), *p16* i *DAPK* gena ( $p = 0.047$ ), kao i između *MGMT* i *DAPK* gena ( $p = 0.025$ ). Kao što je već spomenuto, kometilacija *p15m/p16m* se češće, mada ne i statistički značajno, sretala kod ispitanika sa parametrima koji se vezuju za manje agresivan tok bolesti, uključujući mlađe starosno doba, ženski pol, nizak/umereno-nizak IPI, referentne vrednosti LDH, skor ECOG performans statusa  $< 2$  i odsustvo recidiva ( $p = 0.086$ ). Istovremena metilacija *p16* i *DAPK* gena je statistički značajno bila zastupljenija kod ispitanika niskog/umereno-niskog IPI rizika ( $p = 0.045$ ), a bila je i češća kod ispitanika sa referentnim vrednostima LDH ( $p = 0.100$ ), kao i kod onih koji su odgovorili na indukcionu terapiju kompletnom ili parcijalnom remisijom ( $p = 0.183$ ). Kod ispitanika sa istovremenom metilacijom *MGMT* i *DAPK* gena pojava recidiva je detektovana u dvostruko većem procentu u poređenju sa grupom bez istovremene metilacije ova dva gena. ( $p = 0.155$ ). Uočen je i trend ka češćoj pojavi *MGMTm/DAPKm* kod ispitanika mlađeg starosnog doba ( $p = 0.064$ ). Istovremena metilacija različitih gena kod DBKL i FL, je malo ispitivana, tako da značaj dobijenih rezultata treba proveriti u budućim studijama. U našoj prethodnoj studiji (Kraguljac i sar., 2010), je pokazano da je istovremena metilacija *p15* i *MGMT* povezana sa kraćim preživljavanjem kod obolelih od akutne mijeloblastne leukemije. S druge strane, rezultati naše druge studije (Krtolica i sar., 2007) su pokazali da je istovremena metilacija *p16* i *MGMT* gena povezana sa manje agresivnim ponašanjem tumora i dužim preživljavanjem kod obolelih od kolorektalnog karcinoma.

Najčešće metilovani geni kod naših uzoraka FL su *MGMT* (59 %) i *DAPK* (78 %), a u 50 % slučajeva njihova metilacija se javlja istovremeno (*MGMTm/DAPKm*). Na osnovu toga smo pretpostavili da su ova dva događaja važna u patogenezi FL i da mogu da utiču na biološke karakteristike i kliničko ponašanje tumora. Rezultati našeg ispitivanja su pokazali da je kometilacija *MGMTm/DAPKm* povezana sa recidivom bolesti ( $p = 0.018$ ), i sa kraćim FFS, kako u celoj ispitivanoj grupi ( $p = 0.023$ ), tako i kod ispitanika mlađih od 60 godina ( $p = 0.023$ ) i niskog/umereno-niskog IPI rizika ( $p = 0.029$ ). Uočena razlika između mlađih i starijih ispitanika sa FL u našoj grupi sugeriraju mogućnost postojanja biološke različitosti tumora kod različitih starosnih grupa, kao što

je pretpostavljeno za DBKL (Rosolen i sar., 2007). Malo studija se do sada bavilo komparativnim analizama molekularno-genetičkih i bioloških karakteristika mlađih i starijih bolesnika, tako da konačne zaključke još uvek nije moguće izvesti. U našoj studiji, u grupi ispitanika sa DBKL metilacija sva četiri analizirana gena je u nešto većem procentu bila detektovana kod ispitanika mlađih od 60 godina, kao i prisustvo makar jednog metilacionog događaja, mada uočene razlike nisu bile statistički značajne. U grupi obolelih od FL ove razlike, mada prisutne, osim u slučaju metilacije *p16* gena koja je u podjednakom procentu bila zastupljena u obe starosne kategorije, bile su manje izražene. Dobijeni rezultati, mada idu u prilog pretpostavci o genetičkoj, odnosno, epigenetičkoj razlici između tumora kod različitih starosnih grupa, zahtevaju dodatna istraživanja.

U našem uzoraku FL, kada je analizirana cela grupa, kod ispitanika sa istovremenom metilacijom *MGMTm/DAPKm*, oni koji su imali metilovan i *p16* gen, FFS je bilo značajno duže u odnosu na one kod kojih je *p16* bio nemetilovan ( $p = 0.046$ ). U grupi bez kometilacije *MGMTm/DAPKm*, metilacioni status *p16* gena nije imao uticaj na FFS. Prema našem saznanju, ne postoje podaci o sličnim studijama i ovi rezultati su prvi put publikovani (Krajnović i sar., 2013). Na osnovu dobijenih rezultata, pretpostavljamo da FL ne nastaju samo jednim nizom molekularnih događaja, nego evoluiraju različitim genetičkim i/ili epigenetičkim putevima, od kojih svaki ima različite biološke, kliničke i patološke karakteristike. Jedno od mogućih objašnjenja za naše rezultate bi moglo da bude da FL sa kometilacijom *MGMTm/DAPKm*, ali sa nemetilovanim *p16* genom mogu da nastanu mehanizmom koji uključuje neke druge genske aranžmane, kao što su mutacije u *p53* genu. Prethodne studije na FL su pokazale da je prisustvo *p53* mutacija obično povezano sa histološkom transformacijom ovog tipa limfoma i lošijim ishodom (Sander i sar., 1993, O' Shea i sar., 2008). Takvi dodatni i/ili alternativni genetički događaji bi mogli da stvore molekularnu osnovu koja će dati grupu FL skloniju recidivima bolesti i razvijanju hemorezistencije. U svakom slučaju, potrebne su dodatne studije na većem broju uzoraka i gena da bi se precizno odredile molekularne promene odgovorne za patogenezu FL.

U cilju utvrđivanja eventualnog značaja stepena metilacije na ponašanje tumora i ishod bolesti, ispitivali smo i broj metilovanih gena u analiziranim uzorcima. Tako je kod DBKL kod 74.5 % (38/51) ispitanika detektovana metilacija najmanje jednog gena,

dok je to bio slučaj sa čak 97 % (31/32) ispitanika sa FL. Sva četiri gena su bila metilovana kod 6 % (3/51) uzoraka DBKL i 13 % (4/32) uzoraka FL. Iako su uzorci FL pokazali nešto veći stepen metilacije u odnosu na DBKL, ove razlike nisu bile statistički značajne. U grupi obolelih od DBKL poredili smo ispitanike sa najmanje jednim metilovanim genom i one sa sva četiri gena nemetilovana. Iako prisustvo metilacije najmanje jednog gena nije značajno koreliralo ni sa jednom kliničko-patološkom karakteristikom obolelih, metilacija najmanje jednog gena je bila nešto češća kod mladih ispitanika (83.3% vs. 61.9 %), niskog stepena IPI rizika (88.2 % vs. 67.6 %), sa referentnim vrednostima LDH (85 % vs. 66.7 %) i bez infiltracije kostne srži (81.2 % vs. 63.14 %). U analizi preživljavanja, prosečna dužina preživljavanja je bila nešto veća u grupi ispitanika sa metilacijom najmanje jednog analiziranog gena u odnosu na grupu sa sva četiri nemetilovana gena, mada ova razlika nije bila statistički značajna (76 vs. 47 meseci,  $p = 0.221$ ). U grupi uzoraka sa FL, sva četiri gena su bila nemetilovana samo kod jednog ispitanika, pa ovakvo poređenje nije bilo moguće.

Literaturni podaci ukazuju na to da metilacija *MGMT* i *DAPK* gena može da se uvećava tokom starenja (Toyota i Issa, 1999, Hayslip i Montero, 2006), što takođe treba uzeti u obzir prilikom tumačenja rezultata. U našoj grupi uzoraka, i kod DBKL i kod FL, metilacija ova dva gena je bila češća, mada ne i statistički značajno, kod mlađih ispitanika. Moguće je da su uočene epigenetičke promene kod starijih samo sporedni efekat koji nastaje kao posledica opšte deregulacije različitih ćelijskih mehanizama u kancerogenezi, uključujući i poremećaj metilacione mašinerije, što ne mora da ima direktan uticaj na nastanak tumora, ali može da doprinese njegovom agresivnijem ponašanju.

Još uvek ne postoji precizan odgovor na pitanje kako dolazi do metilacije konkretnih gena u humanim limfomima. Malo je verovatno da su epigenetički događaji detektovani kod DBKL i FL indukovani globalnom deregulacijom metilacione mašinerije, pre svega, metiltransferaza. Umesto toga, Shi i sar., (2006) su sugerisali da deregulacija odgovarajućih transkripcionih regulatora ili signalnih puteva može selektivno da dovede do aberantne metilacije grupe nizvodno postavljenih gena. Rezultati skorašnjih studija sugerišu da bi uvećana ekspresija Bcl-6 proteina koja se zapaža u DBKL i FL (Capello i sar., 2000), mogla da bude povezana sa *de novo* metilacijom odgovarajućih gena u ovim limfomima. Bcl-6 je za sekvencu-specifičan

inhibitor transkripcije, koji funkcioniše analogno grupi proteina sa KRAB domenom (eng. *Kruppel-associated box protein*). Pokazano je da je transkripciono utišavanje gena putem ovih proteina praćeno regionalnom hipermetilacijom promotora odgovarajućih ciljnih gena (Zelent i sar., 2005) Ovi nalazi sugerišu potencijalnu vezu između ekspresije Bcl-6 i metilacije DNK. U našoj grupi ispitanika sa DBKL, jedino je metilacija *p15* gena u većem procentu bila zastupljena kod obolelih sa uvećanom ekspresijom Bcl-6, mada ova razlika nije bila statistički značajna (21.7 % vs. 8.3 %,  $p = 0.207$ ). U isto vreme, zabeležen je trend ka dužem ukupnom preživljavanju kod ispitanika sa uvećanom ekspresijom Bcl-6 proteina ( $p = 0.086$ ). S obzirom da je podatak o ekspresiji Bcl-6 postojao za 35 od ukupno 51 ispitanika, značaj njegove ekspresije i eventualna povezanost sa metilacijom odgovarajućih gena kod DBKL bi trebalo da se ispita na dodatnom broju uzoraka.

U našoj studiji nije uočena korelacija metilacije nijednog analiziranog gena sa nekim od imunohistohemijskih markera. Pri tome treba uzeti u obzir da su imunohemijski podaci nedostajali za značajan broj ispitanika. U studiji koju su sproveli Al-Kuraya i sar., (2006) na uzorcima tkiva DBKL, nije uočena veza između metilacije *MGMT* gena i ekspresije Bcl-6 i CD10 proteina. Prema našem saznanju, nema drugih studija koje su se bavile ovakvim istraživanjima kod obolelih od DBKL i FL.

U poslednjih 10 godina, na osnovu istraživanja u oblasti molekularne genetike i razvoja novih tehnologija, napravljen je veliki napredak u razumevanju molekularnih promena koje se odvijaju u DBKL i FL, što je omogućilo klasifikaciju ovih limfoma u klinički relevantne podgrupe. Pored četiri gena koje smo ispitivali u našoj studiji, u drugim istraživanjima je, primenom MSP tehnike utvrđen i čitav niz drugih gena koji podležu aberantnoj metilaciji kod DBKL i FL, u manjem ili većem procentu. Prema podacima iz literature u ove gene spadaju: *VHL*, *GSTP1*, *APC*, *p14*, *p33*, *TIMP3*, *RB1*, *BLU*, *RASSFA1*, *hMLH1*, *CDH1*, *SHP1*, *HIC1*, gen za androgeni receptor, *p57* (Rossi i sar., 2004, Hayslip i Montero 2006, Amara i sar., 2008, Kim i sar., 2009). Shi i sar., (2006) su metodom „mikročipova za CpG ostrvca“ (eng. *CpG island DNA microarray*), analizirali ekspresiju velikog broja gena, kojom su utvrdili da su i *DLC-1*, *PCDHGB7*, *CYP27B1*, *EFNA5*, *CCND1* i *RARβ2* geni često metilovani u različitim tipovima NHL, uključujući i DBKL i FL. Pored toga, nedavnom primenom metode mikročipova, kojom je analizirana ekspresija velikog broja gena, utvrđeno je da postoje dve grupe DBKL, 1)

DBKL poreklom od B ćelija germinativnog centra (GC-DBKL) i 2) DBKL poreklom od aktiviranih B ćelija (ABC-DBKL). Osim što se razlikuju po profilu genske ekspresije, GC-DBKL imaju i znatno bolju prognozu (Alizadeh i sar., 2000, Rosenwald i sar., 2002). Dve navedene grupe DBKL mogu da se razlikuju i imunofenotipski, prema ekspresiji markera CD10, Bcl-6 i MUM-1/IRF4 (Hans i sar., 2004). Nažalost, u našem istraživanju nismo raspolagali sa dovoljnim brojem podataka koji bi nam omogućili razvrstavanje uzoraka DBKL u dva navedena podtipa. Primenom iste tehnologije, moguće je razlikovanje i dve glavne grupe FL, koje se međusobno razlikuju po profilu ekspresije gena, na osnovu čega je moguće odrediti odgovor na terapiju (Bohen i sar., 2003). Najnovija istraživanja De i sar., (2013) su pokazala postojanje heterogenosti metilacionog statusa velikog broja CpG dinukleotida širom genoma, kako između različitih ispitanika, tako i unutar tumorskog uzorka jednog istog ispitanika sa FL i DBKL, što je povezano sa agresivnijim ponašanjem tumora i lošijom prognozom. Autori su pretpostavili da uočena metilaciona heterogenost može da doprinese preživljavanju subpopulacije malignih ćelija nakon izloženosti citotoksičnim hemoterapijskim agensima, uvećavajući, na taj način, mogućnost za pojavu recidiva. Ovakva heterogenost na pojedinim CpG dinukleotidima ne isključuju istovremeno postojanje stabilno metilovanih specifičnih gena koji kontrolišu ključne ćelijske puteve, što još jednom naglašava složenost epigenetičkih promena u limfomagenezi.

Na osnovu do sada prikupljenih podataka jasno je da su genetičke i epigenetičke promene u patogenezi DBKL i FL vrlo kompleksne i uključuju veliki broj gena. Da bi se precizno utvrdile molekularne promene kod ovih tipova NHL, potrebne su dodatne studije na većem broju uzoraka i gena, kako bi se prevazišao rizik od pojednostavljenog tumačenja uloge pojedinačnih genetičkih i epigenetičkih događaja u kancerogenezi.

## 6. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata mogu da se izvedu sledeći zaključci:

1. Aberantna *de novo* metilacija *p16*, *p15*, *MGMT* i *DAPK* gena je detektovana u značajnom broju ispitanika obolelih od DBKL i FL, što sugeriše da epigenetički mehanizmi regulacije genske ekspresije imaju važnu ulogu u patogenezi ova dva tipa B-NHL.
2. Kod obolelih od DBKL, metilacija *p16* gena je statistički značajno korelirala sa referentnim vrednostima serumske LDH i niskim/umereno-niskim stepenom IPI rizika, a metilacija *p15* gena sa odsustvom recidiva bolesti.
3. Kod obolelih od DBKL, metilacija nijednog gena nije pokazala prognostički značaj, mada je uočena tendencija ka akumulaciji metilacije *p15* gena kod ispitanika sa povoljnijim kliničko-patološkim karakteristikama, uključujući starost ispod 60 godina, referentne vrednosti serumske LDH, skor ECOG performans statusa < 2, nizak/umereno-nizak IPI, kao i kod obolelih kod kojih u toku petogodišnjeg perioda nije došlo do smrtnog ishoda.
4. Kod obolelih od FL, metilacija *p15* gena je statistički značajno korelirala sa sniženim vrednostima Hb.
5. Kod obolelih od FL, metilacija *p16* gena je statistički značajno korelirala sa kraćim ukupnim preživljavanjem kod ispitanika visokog FLIPI stepena rizika, i sa dužim FFS kod ispitanika ispod 60 godina starosti.
6. Metilacija *p15* gena je statistički značajno korelirala sa kraćim ukupnim preživljavanjem kod ispitanika sa FL gradusa I, a metilacija *MGMT* gena sa kraćim FFS kod ispitanika ispod 60 godina starosti.
7. Kod obolelih od FL, metilacija *p16* i *MGMT* gena bi mogla da ima određeni prognostički značaj, ukoliko se kombinuje sa FLIPI, odnosno, starošću obolelih, a metilacija *p15* gena sa gradusom tumora.
8. Kod obolelih od FL, istovremena metilacija *MGMT* i *DAPK* gena je statistički značajno bila povezana sa recidivom bolesti i kraćim FFS, pa bi određivanje istovremenog metilacionog statusa ova dva gena moglo da ukaže na grupu



obolelih od FL potencijalno hemorezistentnih na primenjenu hemoterapiju i sklonu recidivima bolesti.

9. Kometilacija *MGMTm/DAPKm/p16m* je statistički značajno bila povezana sa dužim FFS u celoj ispitivanoj grupi FL, kao i kod ispitanika niskog/umerenog FLIPI rizika, u odnosu na ispitanike sa kometilacijom *MGMTm/DAPKm* kod kojih je *p16* gen bio nemetilovan.
10. Dobijeni rezultati sugerišu da FL mogu da nastanu različitim genetičkim i/ili epigenetičkim putevima, od kojih svaki ima različite biološke, kliničke i patološke karakteristike.

## 7. LITERATURA

Agrelo R, Cheng W, Satien F, Ropero S, Espada J, et al. Epigenetic inactivation of the premature aging Werner syndrome gene in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 8822-8827.

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503-511.

Al-Kuraya K, Narayanappa R, Siraj AK, Al-Dayel F, Ezzat A, et al. High frequency and strong prognostic relevance of O6-methylguanine DNA methyltransferase silencing in diffuse large B-cell lymphomas from the Middle East. *Hum Pathol* 2006; 37: 742-748.

Amara K, Trimeche M, Ziadi S, Laatiri A, Hachana M, Korbi S. Prognostic significance of aberrant promoter hypermethylation of CpG islands in patients with diffuse large B-cell lymphomas. *Ann Oncol* 2008; 19: 1774-1786.

Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11995-11999.

Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphoma: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2780-2795.

Artiga MJ, Saez AI, Romero C, Sanchez-Beato, Mateo MS, et al. A short mutational hot spot in the first intron of BCL-6 is associated with increased BCL-6 expression and with longer overall survival in large B-cell lymphomas. *Am J Pathol* 2002; 160: 1371-1380.

Ausubel FM. In: Wiley J and sons, editors. *Current Protocols in Molecular Biology* (New York) 1987; 211-223.

Baars JW, de Jong D, Willemsse EM, Gras L, Dalesio O, et al. Diffuse large B-cell non Hodgkin lymphomas: the clinical relevance of histological subclassification. *Br J Cancer* 1999; 79: 1770-1776.

Bagg A, Kallakury BVS. Molecular pathology of leukemia and lymphoma. *Am J Clin Pathol* 1999; 112: S76-S92.

Bai M, Agnantis N, Skyrilas A, Tsanou E, Kamina S, et al. Increased expression of the bcl-6 and CD10 proteins is associated with increased apoptosis and proliferation in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 2003; 16: 471-480.

Barrans SL, Evans PAS, O'Connor SJM, Kendall SJ, Owen RG, et al. The t(14;18) is associated with germinal center-derived diffuse large B-cell lymphoma and is a strong predictor of outcome. *Clin Cancre Res* 2003; 9: 2133-2139.

Bastion Y, Sebban C, Berger F, Felman P, Salles G, et al. Incidence, predictive factors and outcome of lymphoma transformation in follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1587-1594.

Baur AS, Shaw P, Burri N, Delacrétaz F, Bosman FT, Chaubert P. Frequent methylation silencing of p15 INK4b (MTS2) and p16 INK4a (MTS1) in B-cell and T-cell lymphomas. *Blood* 1999; 94: 1773-1781.

Baylin SB, Fearon ER, Vogelstein B, de Bustros A, Sharkis SJ, et al. Hypermethylation of the 5' region of the calcitonin gene is property of human lymphoid and acute myeloid malignances. *Blood* 1987; 70: 412-417.

Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Abberant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 687-692.

Bea S, Colomo L, Lopez-Guillermo A, Salaverria I, Puig X, et al. Clinicopathologic significance and prognostic value of chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphomas. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3498-3506.

Bende RJ, Smit LA, van Noesel CJM. Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia* 2007; 21: 18-29.

Bennett LB, Schnabel JL, Kelchen JM, Taylor KH, Guo J, et al. DNA hypermethylation accompanied by transcriptional repression in follicular lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2009; 48: 828-841.

Berglund M, Enblad G, Flordal E, Lui WO, Backlin C, et al. Chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Mod Pathol* 2002; 15: 807-816.

Bestor TH. DNA methylation: evolution of a bacterial immune function into a regulator of gene expression and genome structure in higher eukaryotes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1990; 326: 179-187.

Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986; 321: 209-213.

Bird AP. The relationship of DNA methylation to cancer. *Cancer Surv* 1996; 28: 87-101.

Bird AP, Wolffe AP. Methylation induced repression-belts, braces, and chromatin. *Cell* 1999; 99: 451-454.

Bohen SP, Troyanskaya OG, Alter O, Warnke R, Botstein D, et al. Variation of gene expression patterns in follicular lymphoma and the response to rituximab. *PNAS* 2003; 100: 1926-1930.

Bonfanti M, Brogгинi M, Prontera C, D'Incalci M. O<sup>6</sup>-methylguanine inhibits the binding of transcription factors to DNA. *Nucleic Acid Res* 1991; 19: 5739-5742.

Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21: 77, suppl. 97.

Bringold F, Serrano M. Tumor suppressor and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* 2000; 35: 317-329.

Broudy VC, Berliner N, Larson RA, Leung LE, eds. *Hematology 2004*. American Society of Hematology Education Program Book. Washington: American Society of Hematology 2004; 518.

Capello D, Vitolo U, Pasqualucci S, Quattrone S, Migliaretti G, et al. Distribution and pattern of BCL-6 mutations through the spectrum of B cell neoplasms. *Blood* 2000; 95: 651-659.

Ceccotti S, Dogliotti E, Gannon J, Karran P, Bignami M. O6-Methylguanine in DNA inhibits replication *in vitro* by human cell extracts. *Biochemistry* 1993; 32: 13664-13672.

Chau I, Jones R, Cunningham D, Wotherspoon A, Maisey N, et al. Outcome of follicular lymphoma grade 3: is anthracycline necessary as front-line therapy? *Br J Cancer* 2003; 89: 36-42.

Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, et al. Report of an International Workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1244-1253.

Chim CS, Wong SY, Kwong YL. Aberrant gene promoter methylation in acute promyelocytic leukaemia: profile and prognostic significance. *Br J Haematol* 2003; 122: 571-578.

Chim CS, Wong KY, Loong F, Lam WW, Srivastava G. Frequent epigenetic inactivation of Rb1 in addition to p15 and p16 in mantle cell and follicular lymphoma. *Hum Pathol.* 2007; 38: 1849-1857.

Choi JH, Li Y, Guo J, Pei L, Rauch TA, et al. Genome-wide DNA methylation maps in follicular lymphoma cells determined by methylation-enriched bisulfite sequencing. *PLoS One* 2010; 29; 5:pII: e13020.

Chuang JC, Jones PA. Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res* 2007; 61: 24R-29R.

Cohen O, Kimchi A. DAP-kinase: from functional gene cloning to establishment of its role in apoptosis and cancer. *Cell Death Differ.* 2001; 8: 6-15.

Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. *N Eng J Med* 2002; 346: 235-242.

Colomo L, Lopez-Guillermo A, Parales M, Rives S, Martinez A, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003; 101: 78-84.

Coulondre C, Miller JH. Genetic studies of the lac repressor: IV. Mutagenic specificity in the lacI gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 1977; 117: 577-606.

Cross SH, Bird AP. CpG islands and genes. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5: 309-314.

Dalla-Favera R, Ye BH, Lo Coco F, Gaidano G, Lista F, et al. Identification of genetic lesions associated with diffuse large cell lymphoma. *Ann Oncol* 1994; 5: 55-60.

Danam RP, Quian XC, Howell SR, Brent TP. Methylation of selected CpGs in the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter region as a marker of gene silencing. *Mol Carcinog* 1999; 24: 85-89.

Dave BJ, Nelson M, Pickering DL, Chan WC, Greiner TC, et al. Cytogenetic characterization of diffuse large cell lymphoma using multi-color fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 132: 125-132.

De S, Shaknovich R, Riester M, Elemento O, Geng H, et al. Aberration in DNA methylation in B-cell lymphomas has a complex origin and increases with disease severity. *PLOS Genetics* 2013; 9: e1003137.

Deneberg S, Grovdal M, Karimi M, Jansson M, Nahi H, et al. Gene-specific and global methylation patterns predict outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2010; 24: 932-941.

Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, et al. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* 2002; 295: 1079-1082.

Diebold J, Anderson JR, Armitage JO, Connors JM, MacLennan KA, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic analysis of 444 cases classified according to the updated Kiel classification. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 97-104.

Dogan A, Bagdi E, Munson P, Isaacson P. CD10 and bcl-6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 846-852.

Elenitoba-Johnson KSJ, Gascoyne RD, Lim MS, Chhanabai M, Jaffe ES, Raffeld M. Homozygous deletions at chromosome 9p21 involving p16 and p15 are associated with histologic progression in follicle center lymphoma. *Blood* 1998; 91: 4677-4685.

Ericson LC, Laurent G, Sharkey NA, Kohn KW. DNA cross-linking and monoadduct repair in nitrosourea-treated human tumour cells. *Nature* 1980; 288: 727-729.

Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 1999; 59: 793-797.

Esteller M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur J Cancer* 2000; 36: 2294-2300.

Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000a; 343: 1350-1354.

Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, et al. Inactivation of the DNA repair gene O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2000b; 60: 2368-2371.

Esteller M, Gonzales S, Risques RA, Marcuello E, Manges R, et al. K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2001a; 19: 299-304.

Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001b; 61: 3225-3229.

Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a bright future. *Oncogene* 2002; 21: 5427-5440.

Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumors. *J Pathol* 2002; 196: 1-7.

Esteller M, Gaidano G, Goodman SN, Zagonel V, Capello D, et al. Hypermethylation of the DNA repair gene O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 26-31.

Esteller M. Profiling aberrant methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg. *Clin Immunol* 2003; 109: 80-88.

Esteller M, Herman JG. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene* 2004; 23: 1-8.

Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 15805-15810.

Fabiani B, Delmer A, Lepage E, et al. Prognostic significance and morphological features of diffuse large B-cell lymphomas expressing CD10. *J Clin Pathol* 2002; 55S1: A14.

Falls JG, Pulford DJ, Wylie AA, Jirtle RL. Genomic imprinting: implications for human disease. *Am J Pathol* 1999; 154: 635-647.

Fanidi A, Harrington EA, Evan GI. Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature* 1992; 359: 554-556.

Feinberg AP. Cancer epigenetics takes center stage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 392-394.

Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983; 301: 89-91.

Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 21-33.



Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, Solal-Celigny P, Bouabdallah R, et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'étude des lymphomes de l'adulte. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4117-4126.

Fischer JR, Ohnmacht U, Riegerb N, Zemaitis M, Stoffregen C, et al. Promoter methylation of RASSF1A, RAR and DAPK predict poor prognosis of patients with malignant mesotheliomas. *Lung Cancer* 2006; 54: 109-116.

Fisher RI, Gaynor ER, Dahlber S, Oken MM, Grogan TM, et al. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2005; 328: 1002-1006.

Fournel M, Sapielha P, Beaulieu N, Besterman JM, MacLeod AR.. Down-regulation of human DNA-(cytosine-5) methyltransferase induces cell cycle regulators p16 (ink4A) and p21 (WAF/Cip1) by distinct mechanisms. *J Biol Chem* 1999; 274: 24250-24256.

Friedman JM, Liang G, Liu CC, Wolff EM, Tsai YC, et al. The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2. *Cancer Res* 2009; 69: 2623-2629.

Frigola J, Song J, Stirzaker C, Hinshelwood R, Peinado M, Clark SJ.. Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat Genet* 2006; 38: 540-549.

Fruhwald MC, Plass C. Global and gene-specific methylation patterns in cancer: aspects of tumor biology and clinical potential. *Mol Genet Metab* 2002; 75: 1-16.

Fu K, Weisenburger DD, Choi WW, Perry KD, Smith LM, et al. Addition of rituximab to standard chemotherapy improves the survival of both the germinal center B-cell-like and non-germinal center B-cell-like subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4587-4594.

Gaidano G, Pastore C, Volpe G. Molecular pathogenesis of Non-Hodgkin lymphoma: a clinical perspective. *Haematologica* 1995; 80: 454-472.

Gaidano G, Pastore C, Capello D, Cilli V, Saglio G. Molecular pathways in low-grade B-cell lymphoma. *Leuk Lymph* 1997; 26: 107-113.

Galluzzi L, Morselli E, Vicencio JM, Kepp O, Joza N, et al. Life, death and burial: multifaceted impact of autophagy. *Biochem Soc Trans* 2008; 36: 786-790.

Garcia MJ, Martinez-Delgado B, Cebrian A, Martinez A, Benitez J, Rivas C. Different incidence and pattern of p15INK4b and p16INK4a promoter region hypermethylation in Hodgkin's lymphoma and CD30-positive non-Hodgkin lymphomas. *Am J Pathol* 2002; 161: 1007-1013.

Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, Krajewska M, Horsman DE, et al. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90: 244-251.

Gatter KC, Warnke RA. Diffuse large B-cell lymphoma. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. *World Health Organization classification of tumours; pathology and genetics of tumours of haematopoietic lymphoid tissues*. Lyon: IARC Press 2001; 171-174.

Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, et al: Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991; 138: 867-873.

Gerson SL. Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. *J Clin Oncol* 2002; 9: 2388-2399.

Ghesquieres H, Berger F, Felman P, Callet-Bauchu E, Bryon PA, et al. Clinicopathologic characteristics and outcome of diffuse large B-cell lymphomas presenting with an associated low-grade component at diagnosis. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5234-5241.

Gifford G, Paul J, Vasey PA, Kaye SB, Brown R. The acquisition of MLH1 methylation in plasma DNA after chemotherapy predicts poor survival for ovarian cancer patients. *Clin Cancrer Res* 2004; 10: 4420-4426.

Go J, Yang W, Ree H. CD10 expression in primary intestinal large B-cell lymphomas. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 956-960.

Gorgoulis V, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Nyrouti A, et al. Alterations of the locus p16-Rb pathway and the chromosome locus 9p21-22 in non-small-cell lung carcinomas. Relationship with p53 and MDM2 protein expression. *Am J Pathol* 1998; 153: 1749-1765.

Gronbaek K, de Nully Brown P, Moller MB, Nedergaard T, Ralfkiaer E, et al. Cocurrent disruption of p16INK4a and the ARF-p53 pathway predicts poor prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 2000; 14: 1727-1735.

Groshal K, Bai S. DNA methyltransferases as targets for cancer therapy. *Drugs Today (Barc)* 2007; 43: 395-422.

Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acid Res* 2001; 29: E65-5.

Guo J, Burger M, Nimmrich I, Maier S, Becker E, et al. Differential DNA methylation of gene promoters in small B-cell lymphomas. *Am J Clin Pathol* 2005; 124 :430-439.

Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, Gascoyne RD, Cassileth PA, et al. Rituximab-CHOP *versus* CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3121-3127.

Haioun C, Lepage E, Gisselbrecht C, Salles G, Coiffier B, et al. Survival benefit of high-dose therapy in poor-risk aggressive non-Hodgkin's lymphoma: final analysis of the prospective LNH87-2 protocol-a groupe d'Etude des lymphomes de l' Adulte study. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3025-3030.

Hannon GJ, Beach D. p15<sup>INK4B</sup> is a potential effector of TGF- $\beta$ -induced cell cycle arrest. *Nature* 1994; 371: 257-261.

Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; 103: 275-282.

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink H, et al. World health Organization Classification of neoplastic diseases of the hematopoietic tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3835-3849.

Hayslip J, Montero A. Tumor suppressor gene methylation in follicular lymphoma: a comprehensive review. *Mol Cancer* 2006; 5: 44.

He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 522-531.

Hepburn PA, Margison GP, Tisdale MJ. Enzymatic methylation of cytosine in DNA is prevented by adjacent O<sup>6</sup>-methylguanine residues. *J Biol Chem* 1991; 266: 7985-7987.

Herfarth KK, Brent TP, Danam RP, Remack JS, Kodner IJ, et al. Specific CpG methylation pattern of MGMT promoter region associated with reduced MGMT expression in primary colorectal cancers. *Mol Carcinogen* 1999; 24: 90-98.

Herman JG, Merlo A, Mao LO, Lapidus RG, Issa JP, et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995; 55: 4525-4530.

Herman JG, Jen J, Merlo A, Baylin SB. Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15<sup>INK4B</sup>. *Cancer Res* 1996a, 56: 722-727.

Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996b; 93: 9821-9826.

Herman JG, Civin CI, Issa JP, Collector MI, Sharkis SJ, Baylin SB. Distinct patterns of inactivation of p15<sup>INK4B</sup> and p16<sup>INKA</sup> characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res* 1997; 57: 837-841.

Herman JG. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Semin Cancer Biol* 1999; 9: 359-367.

Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349: 2042–2054.

Hermine O, Haioun C, Lepage E, d'Agay MF, Briere J, et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood* 1996; 87: 265-272.

Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, Vaughan Hudson B, Burke M, et al. Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood* 1996; 88: 1046-1051.

Hiort O, Wodtke A, Struve D, Zollner A, Sinnecker GH. Detection of point mutations in the androgen receptor gene using non-isotopic single strand conformation polymorphism analysis. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1163-1166.

Hiraga J, Kinoshita T, Ohno T, Mori N, Ohashi H, et al. Promoter hypermethylation of the DNA-repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase and p53 mutation in diffuse large B-cell lymphoma. *Int J Hematol* 2006; 84: 248-255.

Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348: 334-336.

Hoglund M, Shen L, Connors JM, Gascoyne RD, Siebert R, et al. Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways of clonal evolution in follicular lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 39: 195-204.

Horning SJ, Rosenberg SA. The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1984; 311: 1471-1475.

Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 277-288.

Inbal B, Cohen O, Polak-Charcon S, Kopolovic J, Vadai E, et al. DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature* 1997; 390: 180-184.

Inbal B, Bialik S, Sabanay I, Shani G, Kimchi A. DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J Cell Biol* 2002; 157: 455-468.

Iqbal J, Jenner MJ, Summers KE, Davies AJ, Matthews J, et al. Reliable detection of clonal IgH/Bcl-2 MBR rearrangement in follicular lymphoma: methodology and clinical significance. *Br J Haematol* 2004; 124: 325-328.

Issa JP. CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 249: 101-118.

Jacinto FV, Esteller M. MGMT hypermethylation: A prognostic foe, a predictive friend. *DNA Repair*, 2007; 6: 1155-1160.

Jacobson JO, Wilkes BM, Kwaiatkowski DJ, Medeiros LJ, Aisenbetg AC, Harris NL. bcl-2 rearrangements in *de novo* diffuse large cell lymphoma. Association with distinctive clinical features. *Cancer (Phila)* 1993; 72: 231-236.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2001; 351.

Jardin F, Jais JP, Molina TJ, Parmentier F, Picquenot JM, et al. Diffuse large B-cell lymphomas with CDKN2A deletion have a distinct gene expression signature and poor prognosis under R-CHOP treatment: a GELA study. *Blood* 2010; 116: 1092-1104.

Jerkeman M, Johansson B, Akerman M, Cavallin-Stahl E, Kristoffersson U, Mitelman F. Prognostic implications of cytogenetic aberrations in diffuse large B-cell lymphomas. *Eur J Haematol* 1999; 62: 184-190.

Jerkeman M, Anderson H, Dictor M, Kvaloy S, Akerman M, Cavallin-Stahl E. Nordic Lymphoma Group study. Assessment of biological prognostic factors provides clinically relevant information in patients with diffuse large B-cell lymphoma-a Nordic Lymphoma Group study. *Ann Hematol* 2004; 83: 414-419.

Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, Oliveira J, Lopes J, et al. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1747-1752.

Jiang C, Pugh F. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 161-172.

Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998; 19: 187-191.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature* 2002; 3: 415-428.

Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128: 683-692.

Kaelin WG Jr. Functions of the retinoblastoma protein. *Bioessays* 1999; 21: 950-958.

Kafri T, Ariel M, Mrandeis M, Shemer R, Urven L, et al. Developmental patterns of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev* 1992; 6: 705-714.

Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, Liu Q, Gruis N, et al. Analysis of the p16 gene (CDKN2A) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat Genet* 1994; 8: 22-26.

Kang C, You YJ, Avery L. Dual roles of autophagy in the survival of *Caenorhabditis elegans* during starvation. *Genes Dev* 2007; 21: 2161-2171.

Kang C, Avery L. Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: fine-tuning of autophagy in *Caenorhabditis elegans* homeostasis. *FEBS J* 2009; 276: doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07413.x.

Kass SU, Pruss D, Wolffe AP. How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet* 2007; 12: 444-449.

Katzenellenbogen RA, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation of the DAP-kinase CpG island is a common alteration in B-cell malignancies. *Blood* 1999; 93: 4347-4353.

Kautiainen TL, Jones PA. DNA methyltransferases levels in tumorigenic and nontumorigenic cells in culture. *J Biol Chem* 1986; 261: 1594-1598.

Kim DH, Nelson HH, Wiencke JK, Christiani DC, Wain JC, et al. Promoter methylation of DAP-kinase: association with advanced stage in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 2001; 20: 1765-1770.

Kim SS, Choi YH, Han CW, Choi YD, Park Y, et al. DNA methylation profiles of MGMT, DAPK1, hMLH1, CDH1, SHP1, and HIC1 in B-cell lymphomas. *Kor J Pathol* 2009; 43: 420-427.

Kim M, Oh B, Kim SY, Park HK, Hwang SM, et al. p15INK4b methylation correlates with thrombocytopenia, blast percentage, and survival in myelodysplastic syndrome in a dose dependent manner: Quantitation using pyrosequencing study. *Leuk Res* 2010 34: 718-722.

King B, Chen C, Locker J, Kant J, Okyama K, et al. Immunophenotypic and genotypic markers of follicular center cell neoplasia in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 2000; 13: 1219-1231.

Kopnin BP. Mehanizmy deistviya onkogenov i opuholevyh supressorov. <http://nature.web.ru>.

Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: Regulators of cell death. *Blood* 1992; 80: 879-886.

Koscielny S, Dahse R, Ernst G, von Eggeling F. The prognostic relevance of p16 inactivation in head and neck cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2007; 69: 30-36.

Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007; 128: 693-705.

Kraguljac N, Krajnović M, Dimitrijević B, Mihaljević B, Gotić M, Krtolica K. Frequency of aberrant promoter methylation of p15INK4B and O6-methylguanine-DNA methyltransferase genes in B-cell non-Hodgkin lymphoma: a pilot study. *Arch Biol Sci* 2010; 62: 211-221.



Kraguljac KN, Krajnović M, Bogdanović A, Suvajdžić N, Jovanović J, et al. Concomitant aberrant methylation of p15 and MGMT genes in acute myeloid leukemia: association with a particular immunophenotype of blast cells. *Med Oncol* 2012; 29: 3547-3556.

Krajnović M, Radojković M, Davidović R, Dimitrijević B, Krtolica K. Prognostic significance of epigenetic inactivation of *p16*, *p15*, *MGMT* and *DAPK* genes in follicular lymphoma. *Med Oncol* 2013; 30: 441.

Kramer MH, Hermans J, Parker J, Krol AD, Kluin-Nalemans JC, et al. Clinical significance of bcl2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: A population-based study. *J Clin Oncol* 1986; 14: 2131-3138.

Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, Philippo K, Geelen E, et al. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998; 92: 3152-3162.

Krtolica K, Krajnović M, Ušaj-Knežević S, Babić D, Jovanović D, Dimitrijević B. Comethylation of p16 and MGMT genes in colorectal carcinoma: correlation with clinicopathological features and prognostic value. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1187-1194.

Kuo JC, Wang WJ, Yao CC, Wu PR, Chen RH. The tumor suppressor DAPK inhibits cell motility by blocking the integrin-mediated polarity pathway. *J Cell Biol* 2006; 172: 619-631.

Larouche JF, Berger F, Chassagne-Clement C, Ffrench M, Callet-Bauchu E, et al. Lymphoma recurrence 5 years or later following diffuse large B-cell lymphoma: clinical characteristics and outcome. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2094-2100.

LeBien TW, McCormack RT. The common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10)-emancipation from a functional enigma. *Blood* 1989; 73: 625-635.

Lee M, Han WS, Kim OK, Sung SH, Cho MS, et al. Prognostic value of p16INK4a and p14ARF gene hypermethylation in human colon cancer. *Pathol Res Pract*. 2006; 202: 415-424.

Lee SM, Lee EJ, Ko YH, Lee SH, Maeng L, Kim KM. Prognostic significance of O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase and p57 methylation in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *APMIS* 2009; 117: 87-94.

Lee GW, Kang JH, Kim IS, Kim HG, Ko GH, et al. Is inactivation of O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase still a favorable prognostic factor of patients with diffuse large B-cell lymphoma in the era of R-CHOP chemotherapy? *Leuk Lymphoma* 2009; 50: 1992-1998.

Leich E, Salaverria I, Bea S, Zettl A, Wright G, et al. Follicular lymphomas with and without translocation t(14;18) differ in gene expression profiles and genetic alterations. *Blood* 2009; 114: 826-834.

Lestou VS, Gascoyne RD, Sehn L, Ludkovski O, Chhanabhai M, et al. Multicolour fluorescence *in situ* hybridization analysis of t(14;18)-positive follicular lymphoma and correlation with gene expression data and clinical outcome. *Br J Haematol* 2003; 122: 745-759.

Li E, Beard C, Jaenich R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 1993; 366: 362-365.

Lin Y, Hupp TR, Stevens C. Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: additional roles beyond cell death. *FEBS J* 2009; 276: doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07411.x.

Lo Coco F, Ye BH, Lista F, Corradini P, Offit K, et al. Rearrangements of the BCL6 gene in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1994; 83: 1757-1759.

Logsdon MD, Meyn RE Jr, Besa PC, Pugh WC, Stephens LC, et al. Apoptosis and the Bcl-2 gene family-patterns of expression and prognostic value in stage I and II follicular center lymphoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 44: 19-29.

Lossos I, Jones C, Warnke R, Natkunam Y, Kaizer H, et al. Expression of a single gene, BCL-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2001; 98: 945-951.

Lossos IS. Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6351-6357.

Lossos IS, Morgensztern D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 995-1007.

Lu Y, Xiao J, Lin H, Bai Y, Luo X, et al. A single anti-microRNA antisense oligodeoxyribonucleotide (AMO) targeting multiple microRNAs offers an improved approaches for microRNA interference. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: e24.

Mann RB, Berard CW. Criteria for the cytologic subclassification of follicular lymphomas: a proposed alternative method. *Hematol Oncol* 1983; 1: 187-192.

Margueron R, Trojer P, Reinberg D. The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Gen Dev* 2005; 15: 163-176.

Martinez-Delgado B, Robledo M, Arranz E, Osorio A, Garcia MJ, et al. Hypermethylation of p15/ink4b/MTS2 gene is differentially implicated among non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 1998; 12: 937-941.

Martoriati A, Doumont G, Alcalay M, Bellefroid E, Pelicci PG, Marine JC. DAPK1, encoding an activator of a p19ARF-p53-mediated apoptotic check-point, is a transcription target of p53. *Oncogene* 2005; 24: 1461-1466.

Mason DY, Harris NL, eds. *Human Lymphoma: Clinical Implications of the REAL Classification*. London: Springer-Verlag; 2001.

McIntosh GG, Lodge AJ, Watson P, Hall AG, Wood K, et al. NCL-CD10-270: a new monoclonal antibody recognizing CD10 in paraffin-embedded tissue. *Am J Pathol* 1999; 154: 77-82.

Michie AM, McCaig AM, Nakagawa R, Vukovic M. Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: regulation in cancer. *FEBS J* 2010; 277: 74-80.

Miller TP, Grogan TM, Dahlberg S, Spier CM, Brazier RM, et al. Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's

lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group trial. *Blood* 1994; 83: 1460-1466.

Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 1993; 81: 151-157.

Moggs JG, Goodman JI, Trosko JE, Roberts RA. Epigenetic and cancer: implications for drug discovery and safety assesment. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 196: 422-430.

Monk M. Epigenetic programming of differential gene expression in development and evolution. *Dev Genet* 1995; 17: 188-197.

Montoto S, Lopez-Guillermo A, Colomer D, Esteve J, Bosch J, et al. Incidence and clinical significance of bcl-2/IgH rearrangements in follicular lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2003; 44: 71-76.

Natarajan AT, Vermeulen S, Darroudi F, Valentine MB, Brent TP, et al. Chromosomal localization of human O (6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene by *in situ* hibridization. *Mutagenesis* 1992; 7: 83-85.

Ng MH. Death associated protein kinase: from regulation of apoptosis to tumor suppressive function and B cell malignancies. *Apoptosis* 2002; 7 :261-270.

Ngan BY, Nourse J, Cleary ML. Detection of chromosomal translocation t(14;18) within the minor cluster region of bcl-2 by polymerase chain reaction and direct genomic sequencing of the enzymatically amplified DNA in follicular lymphomas. *Blood* 1989; 73: 1759-1762.

Ohm JE, McGarvey KM, Yu X, Cheng L, Schuebel KE, et al. A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet* 2007; 39: 237-242.

Ohshima K, Kawasaki C, Muta H, Muta K, Deyev V, et al. CD10 and Bcl10 expression in diffuse large B-cell lymphoma: CD10 is a marker of improved prognosis. *Histopathology* 2001; 39: 156-162.

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases DNMT3a and DNMT3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99: 247-257.

Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 1982; 5: 649-655.

Ong ST, Le Beau MM. Chromosomal abnormalities and molecular genetics of non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol* 1998; 25: 447-460.

O'Shea D, O'Riain C, Taylor C, Waters R, Carlotti E, et al. The presence of TP53 mutation at diagnosis of follicular lymphoma identifies a high-risk group of patients with shortened time to disease progression and poorer overall survival. *Blood* 2008; 112: 3126-3129.

Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res* 2000; 60: 5954-5958.

Panning B, Jaenisch R. RNA and the epigenetic regulation of X chromosome inactivation. *Cell* 1998; 93: 305-308.

Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, Ma J, Rossi D, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet* 2011; 43: 830-837.

Pegg AE. Mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res* 1990; 50: 6119-6129.

Pegg AE. Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res* 2000; 462: 83-100.

Peruničić Jovanović M, Jaković Lj, Bogdanović A, Marković O, Čemerikić V, Mihaljević B. Poor outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma is associated with high percentage of bcl-2 and Ki 67-positive tumor cells. *Vojnosanit Pregl* 2009; 66: 538-743.

Pezzella F, Jones M, Ralfkiaer E, Ersboll J, Gatter KC, Mason DY. Evaluation of bcl-2 protein expression and 14;18 translocation as prognostic markers in follicular lymphoma. *Br J Cancer* 1992; 65: 87-89.

Pfreundschuh M, Trumper L, Osterborg A, Pettengell R, Trneny M, et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomized controlled trial by the MabThera International Trial (MinT) Group. *Lancet Oncol* 2006; 7: 379-391.

Pileri SA, Dirnhofer S, Went PH, Ascani S, Sabattini E, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: one or more entities? Present controversies and possible tools for its subclassification. *Histopathology* 2002; 41: 482-509.

Pinyol M, Cobo F, Bea S, Jares P, Nayach I, et al. p16(INK4A) gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1998; 91: 2977-2984.

Pinyol M, Hernandez L, Martinez A, Cobo F, Hernandez S, et al. INK4a/ARF locus alterations in human non Hodgkin's lymphomas mainly occur in tumors with wild type p53 gene. *Am J Pathol* 2000; 153: 1987-1996.

Plancarte F, Lopez-Guillermo A, Arenillas L, Montoto S, Gine E, et al. Follicular lymphoma in early stages: high risk of relapse and usefulness of the Follicular Lymphoma International Prognostic Index to predict the outcome of patients. *Eur J Haematol* 2006; 76: 58-63.

Quian XC, Brent TP. methylation hot spots in the 5' flanking region denote silencing of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Res* 1997; 57: 3672-3677.

Radojković M. Analiza BCL-2/IgH genskog rearanžmana u folikularnim limfomima metodom lanačanog umnožavanja DNK: korelacija sa kliničkim karakteristikama bolesti. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, 2004.

Radojković M, Ristić S, Čolović M, Čemerikić-Martinović V, Radojković D, Krtolica K. Molecular characteristics and prognostic significance of Bcl-2/IgH gene rearrangement in Serbian follicular lymphoma patients. *Neoplasma* 2008; 55: 421-427.

Ramchandani S, MacLeod AR, Pinard M, von Hofe E, Szyf M. Inhibition of tumorigenesis by a cytosine-DNA, methyltransferase, antisense oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 684-689.

Rantanen S, Monni O, Joensuu H, Franssila K, Knuutila S. Causes and consequences of bcl2 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2001; 42: 1089-1098.

Rao PH, Houldsworth J, Dyomina K, Parsa NZ, Cigudosa JC, et al. Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998; 92: 234-240.

Raveh T, Droguett G, Horwitz MS, DePinho RA, Kimchi A. DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic check-point to suppress oncogenic transformation. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 1-7.

Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 2001; 1536-1538.

Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone A, Massague J. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev* 1995; 9: 1831-1845.

Rigs AD, Pfeifer GP. X-chromosome inactivation and cell memory. *Trends Genet* 1992; 8: 169-173.

Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Reviews Genet* 2000; 1: 11-19.

Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 2001; 20: 3139-3155.

Rohatiner AZS, Lister TA. The clinical course of follicular lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005;18:1-10.

Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002, 346: 1937-1947.

Rosolen A, Mussolin L, Bonvini P, Pillon M. Non Hodgkin lymphoma in adolescent and young adults. *Eur J Cancer suppl* 2007; b5: 217-225.

Rossi D, Capello D, Gloghini A, Franceschetti S, Paulli M, et al. Abberant promoter methylation of multiple genes throughout the clinico-pathologic spectrum of B-cell neoplasia. *Haematologica* 2004; 89: 154-164.

Rossi D, Capello D, Gaidano G. Pathogenetic mechanisms in B-cell lymphomagenesis. *Hematol Rep* 2005; 1: 1-3.

Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB. DNMT1 binds HDAC2 and new co-repressor, DMAP1, to form complex at replication foci. *Nat Genet* 2000; 25: 269-277.

Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD. Epigenetic mechanisms of gene regulation. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1996.

Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 2001; 20: 3139-3155.

Rottach A, Leonhardt H, Spada F. DNA methylation-mediated epigenetic control. *J Cell Biochem* 2009; 108: 43-51.

Ruas M, Peters G. The p16<sup>INK4A/CDKN2a</sup> tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1998; 14: 115-117.

Ryan JJ, Prochownik E, Gottlieb CA, Apel IJ, Merino R, et al. c-myc and bcl-2 modulate p53 function by altering p53 subcellular trafficking during the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 5878-5882.

Sanchez-Beato M, Saez AI, Navas IC, Algara P, Sol Mateo M, et al. Overall survival in aggressive B-cell lymphomas is dependent on the accumulation of alterations in p53, p16, and p27. *Am J Pathol* 2001; 159: 205-213.

Sander CA, Yano T, Clark HM, Harris C, Longo DL, et al. P53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. *Blood* 1993; 82: 1994-2004.

Saito Y, Jones PA. Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Cell Cycle* 2006; 5: 2220-2222.



Sangfelt O, Erickson S, Heiden CJ, Gustafsson A, Einhorn S, Grander D. Molecular mechanisms underlying interferon-alpha-induced G0/G1 arrest: CKI-mediated regulation of G1 Cdk-complexes and activation of pocket proteins. *Oncogene* 1999; 18: 2798-2810.

Schaefer BC, Strominger JL, Speck SH. Host-cell determined methylation of specific Epstein-Barr virus promoters regulates the choice between distinct viral latency programs. *Mol Cell Biol* 1997; 364-377.

Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, et al. Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. *J Clin Oncol* 2012; 23: 5027-5033.

Shen L, Toyota M, Kondo Y, Obata T, Daniel S, et al. Aberrant methylation of p57KIP2 identifies a cell-cycle regulatory pathway with prognostic impact in adult acute lymphocytic leukemia. *Blood* 2003; 101: 4131-4136.

Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999; 13: 1501-1512.

Shi H, Guo J, Duff DJ, Rahtmatpanah F, Chitima-Matsiga R, et al. Discovery of novel epigenetic markers in non-Hodgkin's lymphoma. *Carcinogenesis* 2007; 28: 60-70.

Shiozawa E, Takimoto M, Makino R, Adachi D, Saito B, et al. Hypermethylation of CpG islands in p16 as a prognostic factor for diffuse large B-cell lymphoma in a high-risk group. *Leuk Res* 2006; 30: 859-867.

Skinnider BF, Horsman DE, Dupuis B, Gascoyne RD. Bcl-6 and Bcl-2 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma: correlation with 3q27 and 18q21 chromosomal abnormalities. *Hum Pathol* 1999; 30: 803-808.

Smallwood A, Esteve PO, Pradhan S, Carey M. Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing. *Genes Dev* 2007; 21: 1169-1178.

Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, et al. Follicular Lymphoma International Prognostic Index. *Blood* 2004; 104: 1258-1265.

Solomon E, Borrow J, Goddard AD. Chromosome aberrations and cancer. *Science* 1991; 254: 1153-1160.

Sretenović S, Mihaljević B, Anđelković N, Anđelić B, Jaković Lj, i sar. Prognostički činioci kod obolelih od difuznog krupnoćelijskog B-limfoma. *Timočki Medicinski Glasnik* 2012; 37: 65-73.

Srivenugopal KS, Mullapudi SR, Shou J, Hazra TK, Ali-Osman F. Protein phosphorylation is a regulatory mechanism for O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase in human brain tumor cells. *Cancer Res* 2000; 60: 282-287.

Staudt LM, Dave S. The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Adv Immunol* 2005; 87: 163-208.

Strathdee G, Brown R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. <http://www.ermm.cbcu.cam.ac.uk>, 2002.

Tang X, Khuri FR, Lee JJ, Kemp BL, Liu D, et al. Hypermethylation of the death-associated protein (DAP) kinase promoter and aggressiveness in stage I non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1511-1516.

Tazi J, Bird A. Alternative chromatin structure at CpG islands. *Cell* 1990; 60: 909-920.

The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1993; 329: 987-994.

The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 1997 ; 89: 3909-3918.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462.

Tilly H, Rossi A, Stamatoullas A, Lenormand B, Bbigorgone C, et al. Prognostic value of chromosomal abnormalities in follicular lymphoma. *Blood* 1994; 84: 1043-1049.

Tollefsbol T (Ed). *Cancer Epigenetics*. CRC Press, 2009.

Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman J, Baylin S, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8681-8686.

Toyota M, Issa JP. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol* 1999; 9: 349-357.

Toyota M, Issa JP. The role of hypermethylation in human neoplasia. *Electrophoresis* 2000; 21: 329-333.

Tozawa T, Tamura G, Honda T, Nawata SI, Kimura W, et al. Promoter hypermethylation of DAP-kinase is associated with poor survival in primary biliary tract carcinoma patients. *Cancer Sci* 2004; 95: 736-740.

Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985; 228: 1440-1443.

Uherova P, Ross C, Schnitzer B, Singleton T, Finn W. The clinical significance of CD10 antigen expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Am J Clin Pathol* 2001; 115: 582-588.

Viardot A, Moller P, Hogel J, Werner K, Mechttersheimer G, et al. Clinicopathologic correlations of genomic gains and losses in follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4523-4530.

Villuendas R, Sanchez-Beato M, Koh JC, Saez AI, Martinez-Delgado B, et al. Loss of p16/INK4A protein expression in non-Hodgkin's lymphomas is a frequent finding associated with tumor progression. *Am J Pathol* 1998; 153: 887-897.

Voso MT, Gumiero D, D'Alo' F, Guidi F, Mansueto G, et al. DAP-kinase hypermethylation in the bone marrow of patients with follicular lymphoma. *Haematologica* 2006; 91: 1252-1256.

Wade PA, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 1999; 23: 62-66.

Wang X, Li Z, Naganuma A, Ye BH. Negative autoregulation of BCL-6 is bypassed by genetic alterations in diffuse large B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 15018-15023.

Wang J, Lee JJ, Wang L, Liu DD, Lu C, et al. Value of p16INK4a and RASSF1A promoter hypermethylation in prognosis of patients with resectable non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 6119-6125.

Wang J, Hevi S, Kurash JK, Lei H, Gay F, et al. The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat Genet* 2009; 41: 125-129.

Warnecke PM, Bestor TH. Cytosine methylation and human cancer. *Curr Opin Oncol* 2000; 12: 68-73.

Warner BJ, Blain SW, Seoane J, Massague J. Myc downregulation by transforming growth factor  $\beta$  required for activation of the p15<sup>INK4B</sup> G1 arrest pathway. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 5913-5922.

Weisenburger DD. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma: recent findings regarding an emerging epidemic. *Ann Oncol* 1994; 5: 19-24.

Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006; 38: 787-793.

Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, Cleary ML. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N Engl J Med* 1987; 317: 1185-1189.

Wemmert S, Bettscheider M, Alt S, Ketter R, Kammers K, et al. p15 promoter methylation-a novel prognostic marker in glioblastoma patients. *Int J Oncol* 2009; 34: 1743-1748.

Wendum D, Sebban C, Gaulard P, Coiffier B, Tilly H, et al. Follicular large-cell lymphoma treated with intensive chemotherapy: an analysis of 89 cases included in the

LNH87 trial and comparison with the outcome of diffuse large B-cell lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. J Clin Oncol 1997; 15: 1654-1663.

White GR, Ockey CH, Brennand J, Margison GP. Chinese hamster cells harbouring the Echerichia coli O6-alkylguanine alkyltransferase gene are less susceptible to sister chromatid exchange induction and chromosome damage by methylating agents. Carcinogenesis 1986; 7: 2077-2080.

Widschwendter M, Fiegl H, Egle D, Mueller-Holzner E, Spizzo G, et al. Epigenetic stem cell signature in cancer. Nat Genet 2007; 39: 157-158.

Worm J, Guldberg P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. J Oral Pathol Med 2002; 443-449.

Wyllie AH. The genetic regulation of apoptosis. Curr Opin Genet Dev 1995; 5: 97-104.

Xu Y, McKenna R, Molberg K, Kroft S. Clinicopathological analysis of CD10<sup>+</sup> and CD10<sup>-</sup> diffuse large B-cell lymphoma. Identification of a high-risk subset with coexpression of CD10 and bcl-2. Am J Clin Pathol 2001; 116: 183-190.

Ye BH, Lista F, Lo Coco F, Knowles DM, Offit K, et al. Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. Science 1993; 262: 747-750.

Yin D, Xie D, Hofmann WK, Zhang W, Asotra K, et al. DNA repair gene O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase: promoter hypermethylation associated with decreased expression and G:C to A:T mutations of *p53* in brain tumors. Mol Carcinogen 2003; 36: 23-31.

Yoder JA, Walsh C, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. Trends Genet 1997; 13: 335-340.

Zainuddin N, Kanduri M, Berglund M, Lindell M, Amini RM, et al. Quantitative evaluation of *p16<sup>INK4a</sup>* promoter methylation using pyrosequencing in *de novo* diffuse large B-cell lymphoma. Leuk Res 2011; 35: 438-443.

Zelent A, Petrie K, Chen Z, Lotan R, Lubbert M, et al. Molecular target-based treatment of human cancer: summary of the 10th international conference on differentiation therapy. *Cancer Res* 2005; 65: 1117-1123.

Zhao Q, Rank G, Tan YT, Li H, Moritz RL, et al. PRMT5-mediated methylation of histone H4R 3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16: 304-311.

## STRUČNA BIOGRAFIJA

Milena Krajnović je rođena 02.02.1972. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Diplomirala je 28.12.1998. godine, na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, (studijska grupa-Molekularna biologija i fiziologija), odbranom diplomskog rada pod naslovom „*Efekti tiazofurina na bioelektričnu aktivnost mozga pacova*“, pod mentorstvom dr Rosice Veskov, naučnog savetnika Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, u Beogradu.

Školske 1999/2000 godine upisala je poslediplomske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, smer-Genetika. Magistarski rad pod naslovom „*Epigenetska modulacija p16<sup>INK4A</sup> i MGMT gena u asocijaciji sa K-ras mutacijama u humanim kolorektalnim karcinomima*“ odbranila je 05.07.2004. godine na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom dr Koviljke Krtolica Žikić, naučnog savetnika Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, i dr Marine Stamenković Radak, vanrednog profesora Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Od 1999-2002. kao stipendista Ministarstva za nauku i tehnologiju, Republike Srbije, angažovana na poslovima istraživača u Zavodu za radiološku zdravstvenu zaštitu (1999-2000), a zatim u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, u Beogradu.

Od 01.04. 2002 je zaposlena u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, u Beogradu. U zvanje istraživač-saradnik je izabrana 2004. godine.

Do sada je publikovala 7 radova iz uže naučne oblasti i 9 saopštenja u zbornicima sa naučnih skupova. Trenutno je angažovana na projektu „Molekularne determinante za dizajn tumor markera“ (br. 173049), Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Милена Крајновић

број уписа \_\_\_\_\_

### Изјављујем

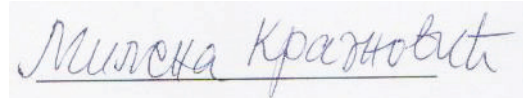
да је докторска дисертација под насловом

Прогностички значај аберантне метилације CpG острваца у фоликуларним и дифузним  
Б-крупноћелијским лимфомима човека

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, 15.05.2013.





Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милена Крајновић

Број уписа \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада Прогностички значај аберантне метилације CpG острваца у фоликуларним  
фоликуларним и дифузним Б-крупноћелијским лимфомима човека

Ментор др Ковиљка Кртолица Жикић, научни саветник Института за нуклеарне науке  
„Винча“

др Горан Брајушковић, доцент, Биолошког факултета,

Универзитета у Београду

Потписани Милена Крајновић

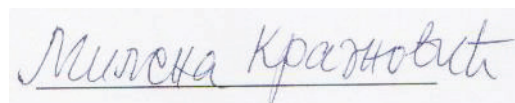
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској  
верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног  
репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског  
звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум  
одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне  
библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 15.05.2013.



### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Прогностички значај аберантне метилације CpG острваца у фоликуларним фоликуларним и дифузним Б-крупноћелијским лимфомима човека

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

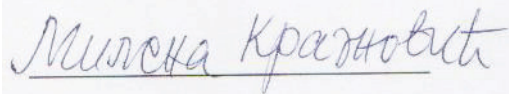
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, 15.05.2013.



Милоска Кразновић

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.