

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Радослав С. Давидовић

**Анализа мутационог статуса гена *p53* и
метилационог статуса промотора гена
p14 и *p16* у липосаркомима**

докторска дисертација

Београд, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Radoslav S. Davidović

**Analysis of the p53 gene mutation status and
methylation status of the promoters of p14
and p16 genes in liposarcoma**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Ментори

др Весна Мандушић, научни сарадник Института за нуклеарне науке “Винча”

др Горан Брајушковић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду

Чланови комисије

др Јелена Сопта, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду

Датум одбране:

Захвалница

Ова докторска дисертација је осмишљена и урађена у Лабораторији за радиобиологију и молекуларну генетику Института за нуклеарне науке “Винча”, у оквиру пројекта “Молекуларне детерминанте за дизајн тумор маркера”. Реализација овог рада не би била могућа без свестране подршке колега и пријатеља.

Овом приликом желео бих да изразим посебну захвалност, свом ментору, др Весни Мандушић на указаном поверењу и стрпљењу, као и на стручној помоћи и корисним саветима током израде ове тезе.

Др Горану Брајушковићу исказујем захвалност на доброј сарадњи и корисним сугестијама током израде тезе.

Др Јелени Сопти захваљујем на одличној дугогодишњој сарадњи и стручним саветима.

Руководиоцу пројекта, др Богомиру Димитријевићу, захваљујем што ми је омогућио да радим у области молекуларне генетике тумора.

Захваљујем се свим сарадницима Лабораторије за радиобиологију и молекуларну генетику на помоћи током израде тезе. Посебно истичем захвалност колегиницама др Милени Крајновић и др Снежани Јовановић-Ђупић на помоћи у кључним тренуцима.

Др Горану Тулићу захваљујем на пријатељској сарадњи.

Др Маји Станојевић и њеним сарадницама са Института за микробиологију захваљујем што су биле довољно љубазне да помогну када је било потребно.

На крају, исказујем огромну захвалност својој породици на пруженој љубави и подршци.

Анализа мутационог статуса гена p53 и метилационог статуса промотора гена p14 и p16 у липосаркомима

Резиме

Липосаркоми, тумори мезенхималног порекла, представљају најучесталији хистолошки тип саркома меких ткива. Групу карактерише велика разноликост како у погледу патохистолошке организације тумора тако и биологије понашања. Уобичајена подела липосаркома обухвата следећа три подтипа: а.) добро диферентовани / дедиферентовани, б.) миксоидни / округлоћелијски и в.) плеоморфни. С обзиром на значајне клиничко-патолошке разлике између три подтипа липосаркома, вероватно је да су различити механизми укључени у њихов настанак и развој. На основу студија које су се фокусирале на истраживање генетике саркома меких ткива и костију, може се закључити да сигнални путеви p53-p14 и Rb-p16 играју одређену улогу у свим типовима саркома. Разјашњавање улоге ових сигналних путева у патогенези липосаркома, може да буде допринос како дијагностици и прогностици липосаркома, тако и дефинисању потенцијалних терапеутских циљева. Студија је обухватила испитивање мутационог статуса гена p53 и метилационог статуса гена p14 и p16, на 33 узорка липосаркома, сва три подтипа. У циљу свеобухватније анализе испитивана је и експресија протеина p16, циклина D1 и фактора пролиферације Ki-67, применом имунохистохемијског бојења. Резултати експеримента су показали да промене у сигналним путевима p53-p14 и p16-Rb могу имати значаја у патогенези сва три подтипа липосаркома. Разлике се огледају у квалитету и квантитету промена.

Кључне речи: липосаркоми, мутације, метилација, експресија, p53, p14, p16.

Научна област: Молекуларна биологија

Ужа научна област: Молекуларна генетика канцера

Удк број: [575.224.2 + 577.218]: 616-006.3 (043.3)

Analysis of the *p53* gene mutation status and methylation status of the promoters of *p14* and *p16* genes in liposarcoma

Abstract

Liposarcoma, tumors of mesenchymal origin, represent the most frequent type of soft tissue sarcomas. The group is characterized by a great diversity regarding pathohistology and biological behavior. The group can be divided into three different subtypes: a.) well differentiated / dedifferentiated, b.) myxoid / round cell and c.) pleomorphic. Given the significant clinical and pathological differences between the three subtypes of liposarcoma, it is likely that different mechanisms are involved in their formation and development. Based on the studies that have been focused on genetic research of sarcoma of soft tissues and bones, conclusion can be drawn that the *p53*-*p14* and *Rb*-*p16* signaling pathways play a certain role in sarcomagenesis. Clarification of the role of these signaling pathways in the pathogenesis of liposarcoma, could be a contribution towards better diagnostic and prognostic criteria and the identification of potential therapeutic targets. The study included examination of the *p53* gene mutation status and assessment of the *p14/p16* gene methylation status in 33 liposarcoma samples of all three subtypes. For the purpose of more comprehensive analysis, protein expression of the *p16*, cyclin D1 and Ki-67 has been evaluated by immunohistochemical staining. The results of the study have showed that the alterations of the targeted signal pathways are important in the pathogenesis of all three subtypes of liposarcoma. The differences are reflected in the quality and quantity of the detected alterations.

Key words: liposarcoma, mutations, methylation, expression, *p14*, *p16*, *p53*.

Scientific field: Molecular biology

Special topic: Molecular genetics of cancer

UDC number: [575.224.2 + 577.218]: 616-006.3 (043.3)

Скраћенице

AIP, енгл. aryl-hydrocarbon receptor-interacting protein

Apaf-1, енгл. apoptotic peptidase activating factor 1

ARF, енгл. alternative reading frame

ASK1, енгл. apoptosis signal-regulating kinase 1

BAX, енгл. bcl2-associated X protein

Bcl-2, енгл. B-cell lymphoma 2

CDK, енгл. cyclin-dependent kinase

CDKN2A, енгл. cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

СНОР, енгл. ССААТ/enhancer-Binding Protein Homologous Protein

c-Jun, енгл. jun proto-oncogene

СЕВР α , енгл. ССААТ/Enhancer-binding protein alpha

DNMT, ДНК метилтрансфераза

ddH₂O, дејонизована и дестилована вода

dH₂O, дестилована вода

EWSR1, енгл. ewing sarcoma 1

E2F, фамилија регулаторних протеина транскрипције

FLI 1, енгл. friend leukemia integration 1

FUS, енгл. fused in sarcoma

GADD45, енгл. growth arrest and DNA-damage-inducible

GLI, енгл. GLI family zinc finger

HDAC, енгл. hystone deacetylase

HMGA-2, енгл. high-mobility group AT-hook 2

IL-2, енгл. interleukin 2

INK4, енгл. inhibitors of cyclin-dependent kinase CDK4

MBD, енгл. methyl-CpG-binding domain

MDM 2, енгл. mouse double minut

MeCP, енгл. methyl CpG binding protein

M.SssI, енгл. CpG Methyltransferase

Noxa, проапоптотски протеин члан фамилије протеина Bcl-2

OS1, енгл. osteosarcoma 1

OS9, енгл. osteosarcoma 9

PCNA, енгл. proliferating cell nuclear antigen

p53R2, енгл. p53-inducible ribonucleotide reductase

PML, енгл. promyelocytic leukemia protein

PPAR γ , енгл. peroxisome proliferator-activated receptor gamma

PTEN, енгл. phosphatase and tensin homolog

PTENP1, енгл. phosphatase and tensin homolog pseudogene 1

PUMA, енгл. p53 upregulated modulator of apoptosis

RARA, енгл. retinoic acid receptor alpha

SAM, енгл. S-аденозил-L-метионин

SAS, енгл. sarcoma amplified sequence

TET-2, енгл. ten-eleven translocation protein 2

WAF1, енгл. wild-type p53-activated fragment (p21)

XPC, енгл. xeroderma pigmentosum, complementation group C

14-3-3-s, фамилија регулаторних протеина

ДДЛПС, добродиферентовани липосарком

ДЛПС, дедиферентовани липосарком

ДМСО, диметил-сулфоксид

ЕДТА, етилендиаминотетрасирћетна киселина

ГСА, албумин говеђег серума

МЛПС, миксоидни липосаркоми

ММЂ, мезенхимална матична ћелија

МПТ, место почетка транскрипције

МСП, ланчана реакција полимеразе специфична за метиловани алел

ОЂЛПС, округлоћелијски липосарком

ПАА, полиакриламидни

ПЦР, реакција ланчане полимеразе

СДС, натријум додецил-сулфат

СЗО, Светска здравствена организација

Трис, трис хидроксиметил аминотетан

Садржај

1. Увод.....	3
1.1. Подела и опште карактеристике липосаркома.....	3
1.1.1. Добро диферентовани и дедиферентовани липосаркоми.....	3
1.1.2. Миксоидни и округлоћелијски липосаркоми.....	4
1.1.3. Плеоморфни липосаркоми.....	6
1.1.4. Стандардни прогностички параметри липосаркома.....	6
1.1.5. Етиологија и патогенеза липосаркома.....	8
1.2. Епигенетика.....	9
1.2.1. Метилација молекула ДНК.....	9
1.2.1.1. ДНК метилтрансферазе.....	11
1.2.1.2. Деметилација цитозинских остатака.....	12
1.2.2. Метилација молекула ДНК у туморима.....	13
1.2.3. Модификације хистона.....	14
1.2.4. Модификације хистона у туморима.....	15
1.2.5. Некодирајуће РНК.....	15
1.3. p53-p14 и p16-Rb сигнални путеви и њихов значај.....	16
1.3.1. Локус INK4a/ARF.....	17
1.3.2. p53.....	20
2. Циљеви.....	23
3. Материјал и методе.....	24
3.1. Материјал.....	24
3.1.1. Пацијенти и узорци ткива.....	24
3.2. Методе.....	26
3.2.1. Изолација ДНК.....	26
3.2.1.1. Изолација ДНК из парафинских исечака ткива.....	26
3.2.1.2. Изолација ДНК из лимфоцита периферне крви.....	28
3.2.2. Мерење концентрације изоловане ДНК.....	28
3.2.3. In vitro метилација молекула ДНК изолованих из лимфоцита периферне крви.....	28

3.2.4. Бисулфитна модификација изоловане ДНК.....	28
3.2.5. Биоинформатичка анализа прајмера специфичних за метиловани алел	31
3.2.6. Анализа метилационог статуса промотора гена методом МСП.....	32
3.2.7. Ланчана реакција полимеразе егзона 5-8 гена p53.....	33
3.2.8. Провера специфичности ланчане реакције полимеразе електрофорезом у агарозном и полиакриламидном гелу.....	34
3.2.9. Детекција мутација секвенцирањем фрагмената молекула ДНК који садрже егзоне 5-8 гена p53.....	35
3.2.10. Утврђивање нивоа експресије гена на протеинском нивоу имунохистохемијски.....	35
3.2.11. Статистичка обрада резултата.....	37
4. Резултати.....	39
4.1. Анализа мутационог статуса гена p53.....	39
4.2. Биоинформатичка анализа прајмера специфичних за метиловани алел.....	41
4.3. Анализа метилационог статуса гена p14 и p16.....	43
4.4. Имунохистохемија.....	44
4.5. Међузависност испитиваних параметара.....	45
5. Дискусија.....	49
6. Закључци.....	71
7. Литература.....	72

1. Увод

1.1. Подела и опште карактеристике липосаркома

Липосаркоми, тумори мезенхималног порекла, представљају најчесталији хистолошки тип саркома меких ткива (Kim и сар., 2009). Групу карактерише велика разноликост како у погледу патохистолошке организације тумора тако и биологије понашања. Уобичајена подела липосаркома обухвата следећа три подтипа: а.) добро диферентовани / дедиферентовани, б.) миксоидни / округлоћелијски и в.) плеоморфни (Conyers и сар., 2011). Развој метода молекуларне цитогенетике значајно је допринео класификацији и диференцијалној дијагностици липосаркома (Nishio, 2011). Ову тврдњу илуструје чињеница да миксоидни и округлоћелијски липосаркоми не представљају два засебна подтипа, како се раније мислило, већ се налазе на два краја истог морфолошког спектра. Такође, цитогенетичке методе омогућавају разликовање добро диферентованих липосаркома и липома (Sirvent и сар., 2007; Weaver и сар., 2008). Ове разлике је понекад тешко уочити применом имунохистохемијског бојења. Јасно је да молекуларна генетика и њене методе, осим што доприносе разумевању туморигенезе на фундаменталном нивоу, могу да имају велики значај и у клиничкој пракси.

1.1.1. Добро диферентовани и дедиферентовани липосаркоми

Добро диферентовани липосаркоми (ДДЛПС) чине 40-45% укупно дијагностикованих липосаркома (Nameed, 2007). Најчешћа места локализације су екстремитети и ретроперитонеум (Conyers и сар., 2011; Hoffman и сар., 2011). На плану хистолошке организације одликују се присуством диферентованих адипоцита, различитих величина, као и једарном атипичном ћелијом строме. То су тумори ниског градуса који, према појединим ауторима, не поседују метастатски потенцијал (Dei Tos, 2000), мада је у литератури описан случај ДДЛПС који је дао метастазу на плућима (Forus и сар., 2001). Међутим, ови тумори су локално агресивни и рецидивирају у око 10% случајева (Conyers и сар., 2011).

Са становишта цитогенетике главно обележје ДДЛПС је присуство прекобројног ринг и/или циновског маркер хромозома. Показано је да ови хромозоми садрже умножену секвенцу 12q13-15 (Dal Cin и сар., 1993). Унутар овог сегмента налази се низ онкогена, есенцијалних у патогенези различитих група тумора, као што су: *MDM2*, *CDK4*, *HMGI-C*, *SAS*, *GLI*, *CHOP*, *OS1* и *OS9*. Прекомерна експресија гена *MDM2* и *CDK4*, карактеристична како за ДДЛПС тако и за дедиферентоване липосаркоме (ДЛПС), може да послужи у сврхе диференцијалне дијагностике (Pilotti и сар., 2000; Shimada и сар., 2006; Thway и сар., 2012).

Феномен дедиференцијације је одговоран за појаву нелипогене (дедиферентоване) компоненте у оквиру добро диферентованог тумора. Граница између ове две компоненте у највећем броју случајева је оштра, мада ретко може бити и поступна. Тумори са дедиферентованом компонентом, дедиферентовани липосаркоми, имају висок градус и метастазирају у 15-20% случајева (Dei Tos, 2000). Иако појава дедиферентованих тумора може бити повезана са рецидивирањем добро диферентованог тумора, најчешће се појављују *de novo* (Coindre и сар., 2009). Нелипогена компонента показује на хистолошком нивоу, у највећем броју случајева, сличност са недиферентованим плеоморфним саркомом или миксофибросаркомом. У 5-10% тумора нелипогена компонента показује миоидну, остеоидну или хондроидну диференцијацију (Dei Tos, 2000).

ДЛПС, као и ДДЛПС, одликује присуство ринг и/или циновских маркер хромозома који садрже амплификовани сегмент 12q13-15. Поред тога, установљено је да дедиферентовани липосаркоми садрже и амплификоване сегменте 1p32 и 6q23, који нису присутни у ДДЛПС (Nishio, 2011). Претпоставља се да гени *c-Jun* и *ASK1*, који се налазе редом на 1p32 и 6q23, учествују у процесу дедиференцијације (Coindre и сар., 2009).

1.1.2. Миксоидни и округлоћелијски липосаркоми

Миксоидни липосаркоми (МЛПС) су други по учесталости подтип и представљају око једне трећине укупно дијагностикованих липосаркома (Dei Tos,

2000; Orvieto и сар., 2001). Најчешће се јављају у екстремитетима, док су у субкутаном ткивима веома ретко позиционирани. Инциденца обољевања је највећа између треће и пете деценије живота. Тумори се јављају са подједнаком учесталошћу код оба пола. Хистолошки посматрано, миксоидни липосаркоми садрже примитивне мезенхималне ћелије, округлог до овалног облика и липобласте чији број може да варира. Присуство карактеристичне васкуларне мреже је битна морфолошка одлика ових тумора (Orvieto и сар., 2001). Миксоидни липосаркоми су тумори ниског градуса са релативно добром прогнозом (Dei Tos, 2000; Hoffman и сар., 2013; ten Heuvel и сар., 2007). Међутим, појава хиперцелуларне/округлоћелијске компоненте (ОЋ) унутар миксоидног тумора води ка испољавању агресивнијег биолошког понашања (Dei Tos, 2000). С обзиром на клиничко-патолошки значај развоја округлоћелијске компоненте унутар миксоидног тумора, значајно је одговорити на питање колики део тумора би требало да заузима ОЋ компонента, а да то значајно утиче на његово понашање. Преовлађује мишљење да је 5% запремине тумора граница значајности. Миксоидни липосаркоми са > 5% ОЋ дела класификују се као МЛПС високог градуса, док се тумори који садрже више од 80 % ОЋ компоненте третирају као чисти округлоћелијски липосаркоми (врло ретки) (Oda и сар., 2005; Fiore и сар., 2007; Hoffman и сар., 2011).

Занимљива особина ових тумора јесте њихов образац метастазирања. Наиме, ови тумори пре метастазирају на костима и другим меким ткивима него у плућима. Разлог овоме није јасан, али изгледа да величина тумора и градус утичу на локализацију метастаза (Asano и сар., 2012).

Карактеристично обележје ове подгрупе на цитогенетичком нивоу јесте присуство транслокације $t(12;16)(q13;p11)$ која даје фузију гена *FUS-CHOP* (око 95% случајева). У ретким случајевима детектована је транслокација $t(12;22)(q13;q12)$, која доводи до фузије гена *EWSR1* и *CHOP*. До данас је описано дванаест *FUS-CHOP* и четири *EWSR1-CHOP* фузионе варијанте (Nishio и сар., 2011). Студије које су за тему имале однос типа транслокације и прогнозе нису установиле значајнију корелацију (Antonescu и сар., 2001; Bode-Lesniewska и сар.,

2007). Фузиони протеин *FUS-CHOP* спречава диференцијацију адипоцита, преко инхибиторног утицаја на експресију *CEBP α* и *PPAR- γ* , кључних фактора у адипогенези. Изгледа да је функција фузионог протеина битна у почетном стадијуму неопластичне трансформације (Riggi и сар., 2006) као и да једнозначно одређује фенотип тумора који ће се развити (Perez-Losada и сар., 2000). Присуство ове карактеристичне транслокације у округлоћелијским туморима довело је до закључка да ови тумори са миксоидним чине један морфолошки континуум (Nishio, 2011).

1.1.3. Плеоморфни липосаркоми

Плеоморфни липосаркоми (ПЛПС) су ретки тумори (око 5% дијагностикованих липосаркома) високог градуса и метастатског потенцијала. ПЛПС имају агресиван ток и метастазирају најчешће у плућа (Downes и сар., 2001). Превасходно су локализовани у екстремитетима, али јављају се и у ретроперитонеуму и трупу (Dei Tos, 2000). ПЛПС су хистолошки и генетички сличнији групи плеоморфних саркома него липосаркомима претходна два подтипа (Dei Tos, 2000). Хистолошки гледано, ПЛПС имају организацију која подсећа на недиферентовани плеоморфни сарком (Downes и сар., 2001) Дијагностички критеријум плеоморфног липосаркома је присуство плеоморфних липобласта, што често није једноставно утврдити. За разлику од претходна два подтипа, плеоморфни липосаркоми не поседују карактеристичну промену на нивоу генома. Слично осталим плеоморфним туморима, ПЛПС карактеришу кариотипи са бројним делецијама и инсерцијама (Ghadimi и сар., 2011; Nameed, 2007).

1.1.4. Стандардни прогностички параметри липосаркома

До данас је урађен довољан број клиничких студија на пацијентима оболелих од липосаркома, што омогућава дефинисање прогностичких параметара. Премда постоје извесна неслагања, параметри као што су: старосна доб, величина тумора, градус, његова локализација и статус хируршких маргина, значајно утичу на прогнозу болести (Fiore и сар., 2007; Ghadimi и сар., 2011; Haniball и сар., 2011). Градус тумора обично се поклапа са хистолошким подтипом липосаркома.

На пример, плеоморфни и округлоћелијски тумори увек имају висок градус. С друге стране, добро диферентовани липосаркоми су тумори ниског градуса (Dei Tos, 2000; Nameed, 2007).

У студији која је укључивала пацијенте оболеле од МЛПС/ОЋЛПС и ПЛПС утврђено је да је дијаметар тумора > 10 cm повезан са 3,5 пута већим ризиком од смртног исхода, док појава локалних рецидива увећава ризик за 2,8 пута (Fiore и сар., 2007). Резултати епидемиолошких студија показали су да стопа преживљавања, у десетогодишњем праћењу, износи 77 % и 81 % у популацијама оболелих редом од ОЋЛПС и ПЛПС (Fiore и сар., 2007). Међутим, према истраживању Далала и сар (Dalal и сар., 2006), стопе преживљавања су 55 % за ОЋЛПС и 53 % за ПЛПС у временском периоду од дванаест година. Једно друго истраживање, које је обухватило само ПЛПС, саопштава стопу преживљавања од само 53 % у петогодишњем праћењу (Ghadimi и сар., 2011). Ким и сар. завршавају своју студију закључком да су хистолошки подтип и статус хируршких маргина независни прогностички параметри стопе преживљавања (Kim и сар., 2009). Они су показали да тумори ниског градуса (ДДЛПС, МЛПС) имају знатно повољнију прогнозу од тумора високог градуса (ОЋЛПС, ДЛПС, ПЛПС). Такође, установљено је повољно деловање адјувантне радиотерапије на пацијенте код којих су дијагностиковани тумори ниског градуса. Јанг и сарадници, на основу резултата своје студије, износе закључак да радиотерапија смањује ризик од појаве локалних рецидива, како код тумора са ниским тако и код тумора са високим градусом (Yang и сар., 1998).

Локализација липосаркома знатно утиче на прогнозу. ДДЛПС локализовани на екстремитетима имају одличну прогнозу, док они позиционирани у ретроперитонеуму имају лошију прогнозу услед слабије локалне контроле и дедиференцијације тумора (Crago и Singer, 2011). ДДЛПС локализовани у ретроперитонеуму рецидивирају у 100 % случајева, док је стопа преживљавања око 20 % (Coindre и сар., 2009).

1.1.5. Етиологија и патогенеза липосаркома

Етиологија саркома, па следствено томе и липосаркома као подгрупе, је и даље углавном непозната. Зна се да су неки наследни синдроми, као што је *Li-Fraumeni* синдром, повезани са развојем саркома меких ткива и остеосаркома (Thomas и сар., 2012). Такође, позната је веза између јонизујућег зрачења и развоја саркома код изложених особа (Berrington de Gonzalez и сар., 2012). Постоје и индикације да је појава липосаркома, у неким случајевима, повезана са физичком траумом (<http://sarcomahelp.org/liposarcoma.html>).

Саркоми су тумори који воде порекло од мезенхималне матичне ћелије (ММЋ) (Bennani-Baiti, 2011). Експеримент у култури ћелија је показао да након трансфекције *EWS-FLI1* у мезенхималне матичне ћелије човека долази до формирања експресионог профила, који је веома сличан оном код Јуинговог саркома (Riggi и сар., 2008). Слично томе, трансфекција FUS-CHOP, SS18-SSX1 редом је одговорна за иницијацију обрасца експресије гена сличних онима у миксоидним липосаркомима и синовијалним саркомима (Riggi и сар., 2006; Cironi и сар., 2009). До данас је описан 41 фузиони протеин у седамнаест типова саркома (Mitelman и сар., 2007). Поменути фузиони протеини делују као регулаторни протеини транскрипције. С обзиром на то, претходни примери указују на постојање специфичних образаца експресије у различитим групама саркома (Baird и сар., 2005; Nielsen и сар., 2002). Осим специфичних генетичких обележја, у развоју саркома веома је важан временски оквир током диференцијације ММЋ када се те промене дешавају. У том погледу занимљиви су резултати експеримента који су спровели Матушански и сар. (Matushansky и сар., 2008). Они су показали просторно-временску зависност промена током диференцијације ММЋ, која за последицу има развој различитих подгрупа липосаркома. Упоредивани су експресиони профили различитих подгрупа липосаркома са експресијом ММЋ у различитим фазама током диференцијације. Резултати су показали да што је тумор диферентованији, то је његов експресиони образац сличнији ћелији која је ближе крају своје диференцијације у зрели адипоцит.

Досадашње анализе, како на нивоу појединачних гена, тако и на геномском нивоу, сугеришу да су, поред свих разлика у погледу генетике, алтерације p53-p14 и p16-Rb сигналних путева заједнички именоване патогенетике свих подтипова липосаркома (Dei Tos и сар., 1997b; Ghadimi и сар., 2011; Oda и сар., 2005; Singer и сар., 2007). Међутим, не постоји довољно података да се изведу дефинитивни закључци о улози појединачних гена ова два пута у патогенези липосаркома. Оно што је свакако јасно је то да се промене одвијају на два нивоа: генетичком и епигенетичком (Bennani-Baiti, 2011; Conyers и сар., 2011).

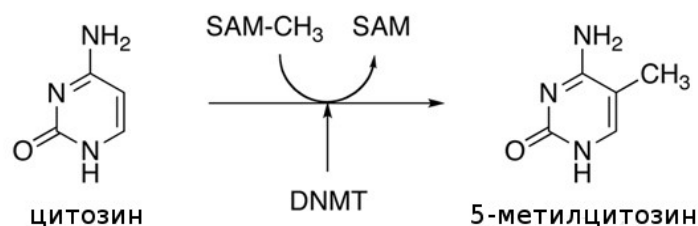
1.2. Епигенетика

Епигенетички процеси подразумевају промене у обрасцу експресије гена, које нису последица промена у секвенци молекула ДНК (Delcuve и сар., 2009). Кључна карактеристика епигенетичких промена, која их суштински разликује од генетичких, је реверзибилност. Управо реверзибилна природа епигенетичких процеса иницирала је знатне промене у приступу како у фундаменталним тако и у фармаколошким испитивањима малигнух тумора (Peedicayil, 2006; Szyf, 2009). Под епигенетичким механизмима регулације генске активности подразумевају се: а.) метилација молекула ДНК, б.) модификације хистона и ц.) мале некодирајуће РНК укључене у посттранскрипциону регулацију експресије гена (Brait и Sidransky, 2011).

1.2.1. Метилација молекула ДНК

Метилација молекула ДНК је од есенцијалног значаја у процесима везаним за ембрионални развој, диференцијацију ћелија као и одржавању хомеостазе у диференцираним ћелијама (Bernstein и сар., 2007; Bergman, 2009). Ови процеси се одвијају преко регулације експресије гена и одржавања стабилности генома. Позната је улога метилације молекула ДНК у инактивацији X хромозома код жена, формирању генетичког утискивања и укључивању/искључивању појединих група гена током развоја организма (Bernstein и сар., 2007). Метилација цитозинских остатака у оквиру понављајућих и ендопаразитских секвенци кључна је за

одржавање стабилне структуре и функције генома (Ehrlich, 2002).



Слика 1.1. Метилација цитозина на позицији 5 пиримидинског прстена. SAM, S-аденозил-L-метионин. Преузето са http://www-medchem.ch.cam.ac.uk/lab_rotations/murrell.php.

Процес метилације молекула ДНК подразумева додавање метил групе на угљеников атом на позицији 5 пиримидинског прстена цитозина у оквиру 5'-CpG-3' динуклеотида (Слика 1.1). У овој реакцији S-аденозил-L-метионин је донор метил групе, а за сам процес одговорни су ензими ДНК метилтрансферазе. Процењује се да је 70-80% цитозина, у оквиру поменутих динуклеотида, метиловано у геному човека (Ehrlich и сар., 1982). Остатак CpG динуклеотида налази се у оквиру тзв. CpG острваца (Wan и сар., 2013). Класична дефиниција острвца каже да је то секвенца ДНК дужа од 200 базних парова, са садржајем G+C изнад 50 % и односом уочене и статистички очекиване учесталости CpG динуклеотида од најмање 60% (Gardiner-Garden и Frommer, 1987). Међутим, овако дефинисана CpG острвца укључују и многе *Alu* поновке. У том погледу, дефиниција коју су дали Такаи и Џонс је много стриктнија (Takai и Jones, 2002). Према овим ауторима, CpG острвца би требало дефинисати као секвенце дуже од 500 базних парова, са садржајем G+C \geq 55 % и односом уочене и статистички очекиване фреквенције CpG динуклеотида од најмање 65 %. Ипак, класична дефиниција је и даље у употреби (Portela и Esteller, 2010).

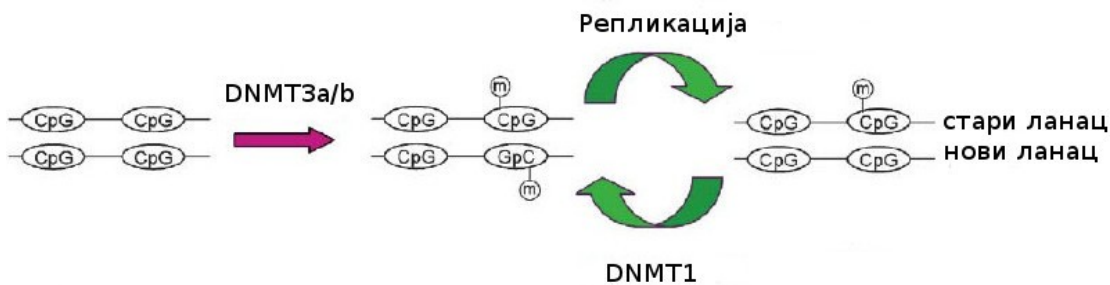
Приближно 60 % гена у геному човека садржи острвца у оквиру промотора или првог егзона (Santos и сар., 2005). Промотори ових гена су углавном неметиловани у већини ткива. Промена метилационог статуса може бити повезана са физиолошким процесима, као што је диференцијација, али и са патогенезом различитих обољења (Egger и сар., 2004).

Поставља се питање начина на који метилација CpG острвца онемогућава транскрипцију одговарајућег гена. Један од начина је да метилација цитозина у оквиру CpG динуклеотида спречава везивање транскрипционих фактора или регулаторних протеина транскрипције (Wade и сар., 1999). Међутим, утврђено је да метиловане CpG динуклеотиде препознају и за њих се везују протеини из групе метил-цитозин везујућих протеина (MBD1, MBD2, MBD3, MBD4, MeCP1, MeCP2). Ови протеини регрутују ензиме хистон-деацетилазе (HDAC), које уклањају ацетил групе са хистона и стварају предуслове за формирање затворене структуре хроматина (Jones и сар., 1998).

1.2.1.1. ДНК метилтрансферазе

Формирање и касније одржавање метилационог обрасца молекула ДНК у ћелији захтева постојање механизма, путем којих ћелија може активно да утиче на метилациони статус CpG динуклеотида. До данас је идентификовано пет ензима ДНК метилтрансфераза : DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b, DNMT3L (Portela и Esteller, 2010). DNMT1 метилтрансфераза одговорна је за одржавање метилационог обрасца молекула ДНК . Овај ензим поседује 30-40 пута већи афинитет за хемиметилувани молекул ДНК него за неметиловани и најзаступљенији је ензим своје класе у ћелији (Portela и Esteller, 2010). Транскрипција гена који кодира протеин DNMT1 повећана је током (Слика 1.2) репликативне фазе ћелијског циклуса. Током репликације ДНК, DNMT1 врши метилацију цитозина у новосинтетисаном ланцу молекула ДНК, користећи матрични ланац као матрицу. Битну улогу током овог процеса игра интеракција DNMT1 са протеином клизећом клемом (енг. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*, PCNA), који омогућава позиционирање ензима на репликациону виљушку (Chuang и сар., 1997). DNMT3a и DNMT3b спадају у групу *de novo* ДНК метилтрансфераза (Слика 1.2). Ови ензими учествују у формирању метилационог обрасца генома у току ембрионалног развоја. С тим у вези је и њихова појачана синтеза у ембрионалним матичним ћелијама (Esteller, 2007). С друге стране, DNMT3L не поседује каталитичку активност. Упркос томе овај ензим је активно укључен у формирање обрасца генетичког утискивања током гаметогенезе

(Bourg'his и сар., 2001). Ова функција се остварује преко утицаја на C-терминални каталитички домен ензима DNMT3a и DNMT3b (Chen и сар., 2005).



Слика 1.2. Схематски приказ стварања и одржавања метилационог обрасца молекула ДНК. Преузето из (GRØNBÆK и сар., 2007).

1.2.1.2. Деметилација цитозинских остатака

Насупрот ензимима који катализују метилацију цитозинских остатака, који су добро окарактерисани, мало се зна о ензимима који учествују у процесу деметилације молекула ДНК (Chen и Riggs, 2005; Wu и Zhang, 2010). Пасивна деметилација је добро познат процес, који може бити последица инактивације ензима DNMT1 или неколико узастопних репликација молекула ДНК (Wu и Zhang, 2010). Познато је да се први талас деметилације молекула ДНК дешава одмах након фертилизације. Том приликом геном сперматозоида пролази кроз процес глобалне деметилације без претходне репликације молекула ДНК (Wu и Zhang, 2010). За то време геном јајне ћелије је на неки начин заштићен од губитка 5-метилцитозина. Даље, утврђено је да током активације Т-лимфоцита долази до деметилације CpG динуклеотида у промоторском региону гена *IL-2* (Bruniquel и Schwartz, 2003). Упркос томе, није недвосмислено утврђено који ензими су укључени у активну деметилацију. Показано је да су ензими ДНК гликозилазе одговорне за деметилацију цитозинских остатака код биљке *Arabidopsis thaliana* (Zhu, 2009). Резултати студије Клуга и сарадника показали су да је протеин TET2 (енгл. *Ten-Eleven Translocation protein 2*) одговоран за деметилацију 5-

метилцитозина у геному моноцита код човека (Klug и сар., 2013).

1.2.2. Метилација молекула ДНК у туморима

Почевши од пионирских радова који су се бавили феноменом метилације ДНК у туморским ћелијама, постајало је јасно да се образац метилације током туморигенезе мења на два начина: а.) смањење глобалног нивоа метилације и б.) повећање метилације специфичних секвенци (Das и Singal, 2004). Смањење глобалног нивоа метилације је битна карактеристика неопластичне трансформације. Показано је да ниво метилације геномске ДНК опада током прогресије тумора (Ehrlich, 2002). До овог феномена долази због деметилације репетитивних секвенци као и кодирајућих и интронских секвенци гена. Последице овог феномена могу бити: а.) геномска нестабилност, б.) активација мобилних елемената, в.) губитак генетичког утискивања и г.) активација онкогена (Ehrlich, 2002; GRØNBÆK и сар., 2007). У случају деметилације, мобилни генетички елементи (транспозони) бивају активирани. Као последица транспозиције генеришу се структурне промене у геному по типу делеција, транслокација и комплекснијих хромозомских реаранжмана (Solyom и Kazazian, 2012).

Генетичко утискивање је појава експресије само једног алела гена и то зависно од његовог порекла. У основи генетичког утискивања је метилација, најчешће, промотора једног од родитељских гена (Bartolomei и Ferguson-Smith, 2011). Губитак обрасца генетичког утискивања повезан је са већим ризиком појаве малигних тумора. Карактеристичан пример губитка генетичког утискивања је хипометилација алела гена *IGF2* (енгл. *Insulin-like growth factor 2*), која је забележена у туморима дојке, плућа, простате и дебелог црева (Cui, 2007). Као последица деметилације долази и до активације појединих онкогена као што су: *RAS*, *MAGE1* и *PAX2* (De Smet и сар., 1996; Chilukamatti и сар., 2007).

Метилација промоторског региона тумор супресорних гена доводи до инхибиције њихове експресије. Сматра се да је овакав начин инактивације гена рани догађај у процесу неопластичне трансформације (Das и Singal, 2004; Kanai и Hirohashi, 2007). Код тумора честа је појава хиперметилације промотора гена чији

су протеински производи укључени у репарацију молекула ДНК, као што су: *hMLH1*, *MGMT*, *BRCA1* (Esteller, 2008). Важно је нагласити да сваки тип тумора има свој карактеристични „хиперметилом“, т.ј. одређене групе гена чији су промотори хиперметиловани. Свеобухватни механизам који стоји иза формирања карактеристичног „хиперметилома“ за сада није познат (Esteller, 2008). Сасвим је оправдано претпоставити да је метилација појединих гена условљена типом микросредине у којој се туморске ћелије налазе. На овај начин вршила би се селекција епигенетичких промена на основу адаптивне вредности саме промене . Друго објашњење је да одређени фузиони протеини, као што је PML-RARA, делују као медијатори метилације тако што регрутују ДНК метилтрансферазе и хистон деацетилазе на промотор циљног гена (Di Croce и сар., 2002). Резултати студије урађене на узорцима колоректалног тумора показују да у туморским ћелијама долази до хиперметилације великих региона хромозома (4 Mb), пре него циљане метилације промотора појединих гена (Frigola и сар., 2006).

1.2.3. Модификације хистона

Хистони су мали базни протеини који чине главну протеинску компоненту хроматина. Постоје четири врсте нуклеозомских хистона, H2A, H2B, H3, H4. Нуклеозоми су перласте структуре које се састоје од октамера хистона око којег се обавија молекул ДНК. Позиционирање и густина на овај начин формираних нуклеозома, на одређеном сегменту молекула ДНК, повезана је са активношћу гена (Kanwal и Gupta, 2012). Неструктуриран крај хистона, тзв. хистонски реп, је слободан и „вири“ из нуклеозома. Услед овакве организације хистонски репови су доступни различитим класама ензима који врше постраслационе модификације хистона малим молекулима. Познато је више десетина различитих ковалентних модификација хистона, међу којима су: ацетилација, метилација, фосфорилација, АДП рибозилација, деиминација и убиквитинација (Kouzarides, 2007). Најпроучаваније модификације хистона су ацетилација и метилација. Ацетилација лизина у оквиру аминок терминалног дела хистонског молекула повезана је са отвореном, т.ј. транскрипционо активном конформацијом хроматина. Ензими хистонске деацетилазе катализују уклањање ацетил група и на тај начин

доприносе стварању затворене хроматинске структуре. Утврђено је да протеини који препознају метиловане CpG динуклеотиде у оквиру промоторског региона гена, као и регулаторни протеини транскрипције регрутују ове ензиме (Portela и Esteller, 2010). Метилација хистона може да буде маркер и транскрипционо активне и транскрипционо неактивне конформације хроматина (Sharma и сар., 2010). Крајњи ефекат метилације зависи од аминокиселине (лизин или аргинин) која је метилована као и њене позиције у протеину. H3K4me3 повезан је са отвореном док су H3K9me3 и H3K27me3 повезани са затвореном структуром хроматина. Истраживања су показала да је метилација H3 хистона на позицијама K4 и K9 блиско повезана са метилационим статусом секвенце молекула ДНК (Cheng и Blumenthal, 2010). Присуство H3K4me3 штити промотерске секвенце гена од процеса *de novo* метилације. Студије на нивоу генома су показале инверзну корелацију између метилације молекула ДНК и H3K4. Насупрот томе, метилација молекула ДНК је у директној корелацији са метилацијом H3K9 (Cheng и Blumenthal, 2010).

1.2.4. Модификације хистона у туморима

Истраживања спроведена на малигним туморима показала су да током неопластичне трансформације долази до глобалне деацетилација на позицији H4K16ac (Fraga и сар., 2005). Повећана експресија хистонских деацетилаза у малигној ћелији одговорна је за овај феномен (Zhu и сар., 2004). Поред тога у ћелијама тумора долази до губитка метилације на позицији H3K4, док је метилација на позицији H3K9 повећана. Ове промене су повезане са абератном експресијом како хистонских метилаза тако и деметилаза (Portela и Esteller, 2010). С обзиром на улогу хистонских деацетилаза и деметилаза савремена фармаколошка испитивања усмерена су и на развој инхибитора ових ензима (Minucci и Pelicci, 2006).

1.2.5. Некодирајуће РНК

Процењује се да је око 70 % генома транскрипционо активно, али да само око 2% садржи информације о протеинима који се синтетишу у ћелији (Gutschner

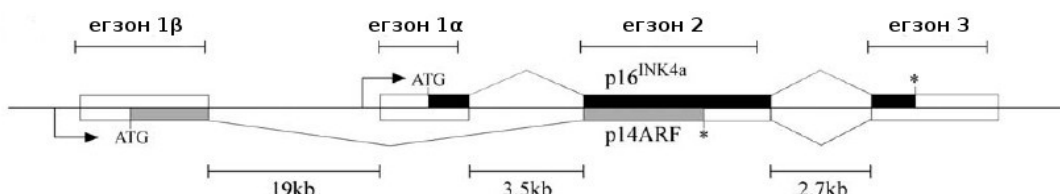
и Diederichs, 2012). Заправо, то значи да велика већина молекула РНК не кодира протеине, те се и називају општим именом некодирајуће РНК. Оне се могу на основу величине поделити у две групе: а.) мале некодирајуће РНК, дужине мање од 200 нуклеотида и б.) дуге некодирајуће РНК, величине веће од 200 нуклеотида (Gutschner и Diederichs, 2012). У прву групу спадају микро РНК (ми-РНК), чија се улога у патогенези тумора данас интензивно истражује. Ове мале РНК дугачке су око 20 нуклеотида и учествују у регулацији експресије гена. Механизам деловања ових молекула заснива се на комплементарности са циљном информационом РНК. 5' крај ми-РНК везује се за 3' крај комплементарне информационе РНК и доводи до њене деградације или онемогућава процес њене транслације (Kala и сар., 2013). За успешно блокирање транслације није потребно да је цела циљна секвенца комплементарна ми-РНК, него само првих 2-8 нуклеотида са 5' краја (енгл. *seed sequence*) (Nicoloso и сар., 2009). Према својој улози у процесу неопластичне трансформације, ми-РНК деле се на тумор супресорне или онкогене (Nicoloso и сар., 2009). Пример прве функције је *miR-21*, која у хепатоцелуларним туморима јетре остварује свој онкогени потенцијал преко репресије тумор супресора РТЕН-а (Nicoloso и сар., 2009). С друге стране, припадници *miR-15a–miR-16-1* групе инхибирају експресију Bcl-2 и циклина D1 у хематолошким малигнитетима (Nicoloso и сар., 2009) . Експресија гена који кодирају за микро РНК може бити регулисана метилацијом. Са друге стране, микро РНК могу учествовати у регулацији метилације промотора других гена (Fabbri и Calin, 2010; Suh и сар., 2011).

1.3. p53-p14 и p16-Rb сигнални путеви и њихов значај

Ова два сигнална пута заузимају централно место у регулацији ћелијског циклуса, пролиферације и апоптозе. Активност протеина ових сигналних путева представља и значајан механизам за спречавање процеса неопластичне трансформације (Bai и Zhu, 2006; Kim и Sharpless, 2006).

1.3.1. Локус INK4a/ARF

Локус INK4a/ARF на хромозому 9p21, је често делетиран или метилован у различитим типовима тумора (Россо, 2001), а ове промене дешавају се рано током туморигенезе (Esteller и сар., 2001, 2000; Nuovo и сар., 1999). Ово је у складу са

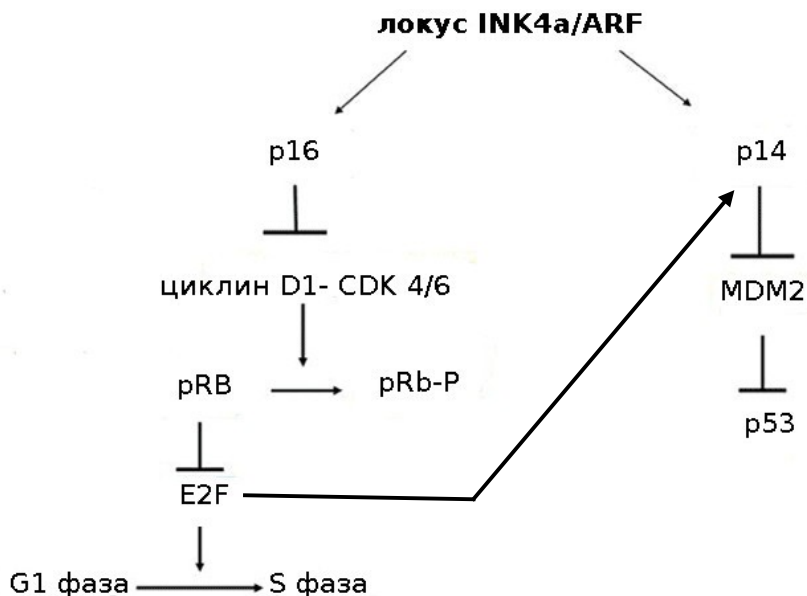


Слика 1.3. Организациона схема локуса INK4a/ARF. Црном бојом означени су егзони (делови егзона) који припадају гену *p16*, док су сивом означени егзони који улазе у састав гена *p14*. Растојања између егзона дата су у килобазима (1 kb = 1000 базних парова). Преузето из (Gallagher и сар., 2006).

чињеницом да протеини који су кодирани генима у овом локусу имају веома важну улогу у контроли ћелијске пролиферације (Chin и сар., 1998). Специфичност овог локуса огледа се у томе што садржи два гена, који деле два егзона, док имају алтернативне прве егзоне (Слика 1.3). Алтернативни егзон 1β налази се 13-20 kb узводно од егзона 1α (Dominguez-Brauer и сар., 2010). Током процеса искрајања интрона, егзон 1β спаја се са егзоном 2 на истом месту као и егзон 1α (Quelle и сар., 1995). С обзиром на различит оквир читања протеински производи ових гена, *p14* и *p16*, нису хомолози. Међутим, ови протеини имају једну заједничку карактеристику, а то је да не поседују лизин у својој примарној структури (Kobayashi и сар., 2013). Транскрипцију ова два гена регулишу два независна промотора (von Keyserling и сар., 2011).

Будући да су делеције локуса INK4a/ARF доста честе у туморима, тумор супресорна улога *p14* дуго је била маскирана улогом коју има *p16* (Россо, 2001). Касније је постало јасно да оба гена играју улогу тумор супресора и према класичној схеми делују у оквиру два комплементарна сигнална пута (Слика 1.4) (Россо, 2001). Ова два пута, *p14*-*p53* и *p16*-*pRb*, су најчешће дерегулисани путеви

у туморима (Sherr и сар., 2005). Протеин p14 остварује своју тумор супресорну функцију преко интеракције са протеином MDM2 (Chin и сар., 1998). Протеин



Слика 1.4. Линије деловања протеина p16 и p14 у оквиру p16-Rb, односно p53-p14 сигналних путева. За објашњење погледати главни текст. →активација; —|инхибиција.

MDM2, делујући као E3-убиквитин лигаза, обележава p53 за деградацију у протеазому (Stott и сар., 1998). С друге стране, p16 делује као инхибитор циклин зависних киназа 4 и 6 (Sharpless, 2004; Shapiro, 2006). Везивање p16 за поменуте ензиме доводи до алостеричних промена у структури киназа, које онемогућавају везивање циклина D. Смисао ове интеракције је да се спречи фосфорилација протеина pRb. У хипофосфорилисаном стању pRb има улогу протеина који маскира регулаторни протеин E2F и тиме блокира његову улогу у активирању експресије гене чији су протенски производи битни за прелазак ћелије из G1 у S фазу ћелијског циклуса (Sharpless, 2004). Студије, које су се бавиле p16-pRb путем у различитим малигним туморима, показале су да се алтерације p16 и pRb међусобно искључују код појединих класа малигнитета (Reis и сар., 2000; Krämer и сар., 2002). Ово није случај са променама на генима p14 и p53, што указује на функције протеина p14, независне од активности протеина p53 (Sherr и сар., 2005). Експерименти на ћелијским линијама показали су да је протеин p14 у стању да

заустави ћелијски циклус у S фази и/или да активира апоптозу у одсуству протеина p53 (Nemmati и сар., 2002; Yarbrough и сар., 2002). Такође, p14 је у стању да заустави раст малигнућ ћелија човека, у одсуству протеина p53, заустављајући ћелијски циклус у G_2 фази (Ozenne и сар., 2010). Поред тога, протеин p14 има улогу и у активацији система за поправку оштећења на молекулу ДНК, тако што активира експресију гена XPC, чији је протеински продукт битан део репарационог система (Dominguez-Brauer и сар., 2010). Дуго времена није било доказа за постојање међусобне регулације протеина p14 и p16. Међутим, студија коју су спровели Kobayashi и сар. показала је да p14 утиче на стабилност p16. Наиме, они су установили да p14 подстиче деградацију p16 у протеазому (Kobayashi и сар., 2013). С обзиром да p16 не поседује лизинске остатке, који би били обележени убиквитином, деградација се остварује интеракцијом p14 са подјединицом протеазома REGγ. Овакав начин регулације стабилности протеина p16 могао би да објасни зашто тумори са експримираним p14, али не и протеином p16 имају агресивнији раст и лошију прогнозу (Kobayashi и сар., 2013).

Познато је да p16 игра битне улоге у процесима као што су: ћелијско старење, аноикис и ангиогенеза. Ћелијско старење представља феномен перманентне блокаде ћелијског раста, којом се заправо лимитира број деоба кроз које ћелија може да прође. Огледи са ћелијама у култури показали су да је експресија протеина p16 значајно повећана у ћелијама које подлежу старењу (Россо, 2001; Sharpless, 2004). Блокирање експресије p16 омогућава избегавање ћелијског старења и имортализацију ћелија (Sharpless, 2004). Међутим, изгледа да код човека p14 не игра битну улогу у овим процесима (Kim и Sharpless, 2006).

Важан аспект у развоју тумора је ангиогенеза (Nishida и сар., 2006). У студији која се бавила ангиогенезом у глиобластомима, поновно успостављање експресије p16 у ћелијама тумора, код којих је p16 делетиран, доводи до смањења експресије васкуларног ендотелног фактора и инхибиције ангиогенезе (енгл. *Vascular endothelial growth factor*) (Harada и сар., 1999).

Протеин p16 укључен је и у процесе који активирају апоптозу након

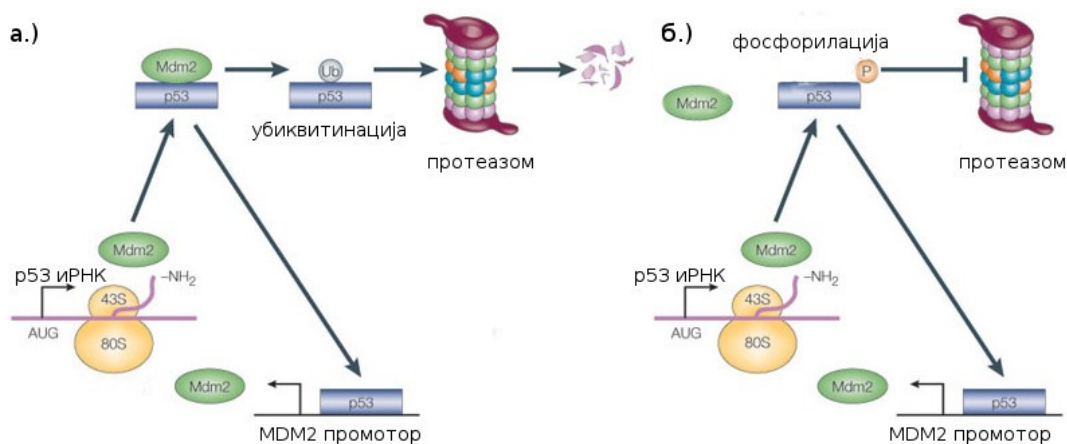
губитка контакта ћелије са ванћелијским матриксом (аноикис) (Plath и сар., 2000). Ова функција остварује се преко активације експресије $\alpha 5$ субјединице $\alpha 5\beta 1$ фибронектинског рецептора. Претпоставља се да је ова функција независна од $p14$ -MDM2- $p53$ пута (Plath и сар., 2000).

Претходно описане улоге $p14$ и $p16$ у контроли ћелијског циклуса, као и функције које нису везане за главне путеве деловања, у потпуној су сагласности са великим селективним притиском на локус INK4a/ARF у туморигенези. Алтерације овог локуса значајне су како у патогенези спорадичних тако и наследних малигнитета (Chin и сар., 1998; Росо, 2001). Делеције локуса INK4a/ARF детектоване су код различитих типова тумора, између осталих: меланомима, аденокарциномима панкреаса, одређеним врстама леукемија, глиобластомима, туморима плућа и липосаркомима (Kim и Sharpless, 2006). Истраживања која су се бавила проучавањем метилационог статуса гена $p14$ и $p16$ у малигним туморима утврдила су да је ова епигенетичка алтерација честа појава код различитих група тумора. Метилација $p16$ детектована је у колоректалним туморима, туморима плућа, дојке, бешике, цервикса и глиомима (Esteller и сар., 2001). С друге стране, метилација промотора гена $p14$ честа је у гастроинтестиналним туморима (Esteller и сар., 2001), мада је битна и у прогресији остеосаркома (Нои и сар., 2006) и миксоидних липосаркома (Davidović и сар., 2013; Oda и сар., 2005).

1.3.2. $p53$

Ген $p53$ је лоциран на хромозому 17 $p13$ (McBride и сар., 1986) и кодира тумор супресорни протеин који садржи 393 аминокиселине (Kato и сар., 2003). Улога овог протеина је есенцијална у регулацији ћелијског циклуса, апоптозе и репарације оштећеног молекула ДНК (Kato и сар., 2003). Наведене функције остварују се преко регулације експресије бројних протеина укључених у различите сигналне путеве у ћелији. Захваљујући присуству домена који је одговоран за специфично везивање за молекуле ДНК, протеин $p53$ је способан да активира експресију циљних гена или у неким случајевима да је инхибира (Riley и сар., 2008).

У нормалним, физиолошким, условима p53 има кратак животни век (Слика 1.5). Међутим, у случају стреса, долази до стабилизације протеина и формирања тетрамера, који су функционално компететни. Значајну улогу у стабилизацији p53 имају различите киназе, које фосфорилишу серинске и треонинске остатке у оквиру аминокраја протеина. На овај начин p53 је заштићен од убиквитинације од стране MDM2 (Moll и Petrenko, 2003). p53 као транскрипциони активатор учествује у регулацији експресије гена чији су протеински производи укључени у механизме контроле ћелијског циклуса (*p21*, *Gadd45*, *14-3-3s*), репарације



Слика 1.5. а.) У физиолошким условима животни век протеина p53 је кратак. Његов ниво је контролисан од стране MDM2 (негативна повратна спрега), који се везује за аминокрај p53 и врши његову убиквитинацију. Последица је разградња p53 у протеазому. **б.)** За време ћелијског стреса долази до фосфорилације p53 и његове стабилизације. Фосфорилација спречава интеракцију између MDM2 и p53. Преузето и прилагођено из (Fåhræus, 2005).

оштећеног молекула ДНК (*p53R2*) и апоптозе (*Bax*, *Araf-1*, *PUMA*, *NoxA*) (Baі и Zhu, 2006). Протеински производ гена *p21* има улогу у заустављању ћелијског циклуса у *G1* фази, као одговор на оштећење молекула ДНК. Ово се остварује спречавањем фосфорилације pRb од стране комплекса, који формирају циклин *E* и киназа CDK-2 (Payton и Coats, 2002).

Резултати бројних епидемиолошко-генетичких студија показују да је ген *p53* мутиран у преко 50 % малигнух тумора (Hollstein и сар., 1991). Занимљиво је да већину познатих мутација *p53*, око 75 %, чине тачкасте мутације измењеног смисла (енгл. *missense*) у оквиру региона одговорног за кодирање ДНК везујућег

домена (Petitjean и сар., 2007). Од укупног броја ових мутација, око 30 % је детектовано у оквиру CpG динуклеотида (Hainaut и Hollstein, 2000). Све ово указује на селекцију мутација током еволуције тумора. Наиме, нуклеотидне измене ове врсте знатно утичу на способност везивања p53 за регулаторне елементе на молекулу ДНК, као и на могућност трансактивације. Не мање важно, познато је да је већина CpG динуклеотида у оквиру p53 секвенце, који су често мутирани у канцеру, метилована (Grønbaek и сар., 2007).

Функционалне студије, које су испитивале ефекат мутација на функционалност протеина p53, утврдиле су да се фаворизују мутације које утичу на трансактивацију или доводе до доминатно негативног ефекта (Petitjean и сар., 2007). С друге стране, оваква селекција још није потврђена за мутације које доводе до настанка нове функције (енгл. *gain-of-function mutation*) (Petitjean и сар., 2007).

До данас је урађен велики број студија чији је фокус био на клиничком значају мутација гена p53. Резултати ових студија указују на повезаност присуства мутација и лошије прогнозе. Ипак, доста студија није нашло такву корелацију или је чак у ретким случајевима мутирани p53 био повезан са добром прогнозом (Brosh и Rotter, 2009).

2. Циљеви

Циљеви истраживања били су дефинисани на следећи начин:

1. Установити учесталост мутација гена p53 и хиперметилације промотора гена p14 и p16 у популацији узорака липосаркома.

2. Утврдити да ли постоје разлике, у квалитативном и квантитативном смислу, у алтерацијама које захватају p53-p14 и p16-Rb сигналне путеве, између различитих подтипова липосаркома.

3. Корелисати ове алтерације са клиничким и патолошким параметрима липосаркома (пол, старосна доб, величина и градус тумора).

4. Демонстрирати *in silico* протокол за процену подесности прајмера у реакцији ланчане полимеразе специфичне за метиловани алел.

3. Материјал и методе

3.1. Материјал

3.1.1. Пацијенти и узорци ткива

Наша студија је укључила 33 узорка липосаркома, као и узорке одговарајућег нормалног ткива тамо где је то било могуће (укупно 4). Сви тумори су дијагностиковани у Институту за патологију, Медицинског факултета Универзитета у Београду. За потребе истраживања прибављене су сагласности Етичких комитета Медицинског факултета Универзитета у Београду и Института за нуклеарне науке “Винча”.

Узорци су достављени као оперативни материјал фиксиран у 10% пуферованом формалдехиду, рН=7, у односу ткиво:формалин (1:10). Макроскопски је обрађен биопсијски материјал и узорковани су репрезентативни исечци, искуствено, по 1 исечак на 1 cm удаљености трансферзалних резова кроз ресековани сегмент. Издвојени материјал је обрађен стандардизованом процедуром у ткивном процесору за аутоматску обраду хуманог ткива Лајка (нем. Leica) ТП1020 и потом укалупљен у парафинске блокове. У циљу рутинске дијагностике серијски је сечено по 3 пресека, дебљине 5 μ m и бојено основним бојењем хематоксилин-еозин.

Оптичком микроскопијом су на, стандардном бојењу, постављене дијагнозе тумора у складу са последњом модификацијом класификације СЗО, за туморе костију и меких ткива, из 2013. године.

Код шест пацијената дијагностикован је ДДЛПС, код седамнаест МЛПС, код девет ПЛПС и код једног ОЂЛПС.

Тумори су на основу хистолошког градуса класификовани у две групе: тумори са ниским и тумори са високим градусом. Сви релеватни клинички и патолошки подаци о пацијентима налазе се у Табели 3.1.

Табела 3.1. Клиничко-патолошке карактеристике пацијената укључених у студију

Узорак	Пол	Године	Локализација тумора	Пречник (cm)	Хистолошки тип	Градус тумора
ЛПС 1			<i>reg. femoris</i>	9	МЛПС	низак
ЛПС 1 ^{P1}	ж	64	<i>reg. femoris</i>	9	МЛПС	низак
ЛПС 1 ^{P2}			<i>reg. femoris</i>	16	МЛПС	низак
ЛПС 1 ^{P3}			<i>reg. femoris</i>	20	МЛПС, ОЋ<5%	низак
ЛПС 2			<i>reg. femoris</i>	10	МЛПС	низак
ЛПС 2 ^{P1}	м	65	<i>reg. cruris</i>	3	МЛПС	низак
ЛПС 2 ^{P2}			<i>reg. femoris</i>	7	МЛПС	низак
ЛПС 2 ^{P3}			<i>reg.poplitealis</i>	4	МЛПС	низак
ЛПС 3			<i>reg. cruris</i>	10	ПЛС	висок
ЛПС 3 ^{P1}	м	65	<i>reg. cruris</i>	12	ПЛС	висок
ЛПС 3 ^{P2}			<i>reg. cruris</i>	17	ПЛС	висок
ЛПС 4	м	54	<i>reg. brachii</i>	5.5	ПЛС	висок
ЛПС 5	м	58	<i>reg. femoris</i>	17	МЛПС	низак
ЛПС 6	м	54	<i>reg. brachii</i>	20	ПЛС	висок
ЛПС 7	ж	52	<i>reg. cruris</i>	6	ПЛС	висок
ЛПС 8	ж	59	<i>reg. cruris</i>	5	МЛПС	низак
ЛПС 9	ж	55	<i>reg. femoris</i>	7	МЛПС	низак
ЛПС 10	ж	61	<i>reg. cruris</i>	7	МЛПС	низак
ЛПС 11	м	64	<i>reg. femoris</i>	15	МЛПС	низак
ЛПС 12	ж	58	<i>reg. inguinalis</i>	7	МЛПС, ОЋ<5%	низак
ЛПС 13	ж	65	<i>reg. femoris</i>	7	ДДЛПС	низак
ЛПС 14	ж	55	<i>reg. femoris</i>	15	МЛПС	низак
ЛПС 15	м	68	<i>reg. femoris</i>	11	ДДЛПС	низак
ЛПС 16	ж	63	<i>retroperitoneum</i>	15	ДДЛПС	низак
ЛПС 17	м	69	<i>reg. cruris</i>	12	ПЛС	висок
ЛПС 18	ж	68	<i>reg. femoris</i>	10	МЛПС	низак
ЛПС 19	ж	69	<i>reg. femoris</i>	6	МЛПС	низак
ЛПС 20	м	39	<i>reg. colli poster</i>	6	ДДЛПС	низак
ЛПС 21 ^P	ж	64	<i>reg. brachii</i>		ПЛС	висок
ЛПС 22	ж	58	<i>reg. femoris</i>	23.5	ПЛС	висок
ЛПС 23	м	74	<i>sacrum</i>	11	ОЋЛПС	висок
ЛПС 24	ж	73	<i>retroperitoneum</i>	10	ДДЛПС	низак
ЛПС 25	ж	62	<i>reg. femoris</i>	15	ДДЛПС	низак

Рn н-ти локални рецидив.

3.2. Методе

У циљу анализе метилационог и мутационог статуса изабраних гена, као и њихове експресије на протеинском нивоу, коришћене су следеће методе:

- изолација молекула ДНК из исечака ткива и лимфоцита из периферне крви здравих особа;
- *in vitro* метилација молекула ДНК, добијене екстракцијом из лимфоцита периферне крви здравих особа;
- бисулфитна модификација изоловане ДНК;
- биоинформатичка анализа прајмера специфичних за метиловани алел;
- анализа метилационог статуса промотора гена *p14* и *p16*, методом ланчане реакције полимеразе специфичне за умножавање метилованог алела, МСП, (енгл. *Methylation specific PCR*);
- ланчана реакција умножавања фрагмента молекула ДНК који садржи егзоне 5-8 гена *p53*;
- провера резултата ланчане реакције полимеразе (енг. *Polymerase Chain Reaction*, ПЦР) електрофорезом у агарозном и полиакриламидном гелу;
- детекција мутација секвенцирањем умножака егзона 5-8 гена *p53*;
- утврђивање нивоа експресије гена на протеинском нивоу имунохистохемијским методама;
- статистичка обрада добијених резултата.

3.2.1. Изолација ДНК

ДНК је изолована класичном фенол-хлороформском методом уз претходно ослобађање узорака из парафинских калупа.

3.2.1.1. Изолација ДНК из парафинских исечака ткива

- сваком узорку је додато по 1 ml ксилола, како би се уклонио парафин, па је лагано мућкано ручно 30 минута, центрифугирано 5 мин/15300 *g*, након чега је пажљиво уклоњен кслилол наставком;

- поступак са додавањем ксилола је поновљен, након мућкања 15 мин и центрифугирања 5 мин/17900 *g* ксилол је уклоњен;
- додато је по 500 μ l апсолутног етанола, лагано мућкано 5 мин, центрифугирано 5 мин/17900 *g*, након чега је етанол, пажљиво, уклоњен наставком;
- поступак са додавањем апсолутног етанола је поновљен;
- након центрифугирања 5 мин/17900 *g*, етанол је пажљиво уклоњен наставком;
- исечци ткива су осушени у отвореним епруветама поред пламеника, током 20 до 30 мин;
- у сваки узорак је додато по 500 μ l дигестионог пуфера који у финалној концентрацији садржи 25 mM ЕДТА, рН 8,0; 100 mM NaCl; 10 mM Трис-НСl, рН 8,0; 0,5 % СДС и 100 μ g (19, 6 mg/ml) протеиназе К (*МБИ, Fermentas*, Литванија);
- узорци су инкубирани преко ноћи на температури 50-55°C, уз повремено мућкање. Већи комади ткива су захтевали дуже време инкубације (до два дана), и додатне количине дигестионог пуфера и протеиназе К;
- у сваки узорак (500 μ l) је додата иста количина смеше која садржи фенол/хлороформ/изоамил-алкохол (Ф/Х/И) у односу 25:24:1, након чега је мућкано ручно 10 мин, узорци су затим центрифугирани 5 мин/10600*g*, па је издвојена водена фаза наставком са одсеченим врхом, и пребачена у нову епрувету;
- поступак са фенолом је поновљен још 1-2 х;
- воденој фази је додата иста запремина смеше Х/И (24:1), након чега је мућкано ручно 10 мин и центрифугирамо 5 мин/10600 *g*;
- водена фаза је издвојена у нову епрувету;
- сваком узорку у воденој фази је додато по 1/2 запремине 7.5 М амонијум ацетата (*Serva 39751*, Немачка) и 2 запремине изопропил-алкохола, након чега су узорци остављени на -20°C да се ДНК таложи преко ноћи;
- узорци су центрифугирани 20 мин/12000 *g*/4°C, одливен је супернатант и додато је 1/2 запремине хладног 70 % етанола;
- узорци су центрифугирани 15 мин/12000 *g*/4°C, одливен је супернатант,

епрувете су остављене отворене поред пламеника 15-30 мин. док сав етанол не упари;

- ДНК је растворена у одговарајућој запремини (50-100 μ l) ddH₂O, након чега је одложена на 4°C.

3.2.1.2. Изолација ДНК из лимфоцита периферне крви

- Након фенолске екстракције молекула ДНК из талоба лимфоцита периферне крви, претходно добијеног према протоколу који је описаног у (Воуп, 1968), воденој фази је додата 1/10 запремине 3 М натријум ацетата, рН 5,2 и 2 запремине хладног апсолутног етанола, након чега је, уз ручно мућкање, дошло до преципитације молекула ДНК у виду кончића;

- макроскопски видљиви кончићи молекула ДНК су затим намотани на стаклену Пастерову пипету, затопљеног и закривљеног врха;

- ДНК је испрана урањањем Пастерове пипете у 70 % етанол, а затим је сушена на ваздуху 15 мин, растворена у 100-200 μ l ddH₂O и одложена на 4°C.

3.2.2. Мерење концентрације изоловане ДНК

Концентрације растворене ДНК мерене су на апарату Биоспек-нано (*Shimadzu corporation*, Јапан) према упутству произвођача.

3.2.3. *In vitro* метилација молекула ДНК изолованих из лимфоцита периферне крви

У циљу добијања контролне ДНК, која би била метилована на свим CpG позицијама, ДНК изолована из лимфоцита периферне крви здраве особе третирана је ензимом CpG метилтрансферазом M.SssI (*New England Biolabs M0226M*).

Метиловање молекула ДНК је изведено према протоколу произвођача.

3.2.4. Бисулфитна модификација изоловане ДНК

Бисулфитна модификација је поступак којом се конзервира метилациони статус молекула ДНК. Третирање молекула ДНК натријум-бисулфитом доводи до

конверзије неметилованих цитозина у урацил, док метиловани цитозини не подлежу таквој промени. Цео поступак је изведен према протоколу Хермана и сар (Herman и сар., 1996) , уз мање измене у појединим корацима (Grunau и сар., 2001).

- 2 μg молекула ДНК у запремини од 50 μl је денатурирано додавањем 3 М NaOH (фин. 0,3 М) и инкубирањем 30 мин/42°C;

- претходно денатурираној ДНК додато је 550 μl свеже припремљеног раствора натријум бисулфита (5,20-5,69 М HSO₃); пошто је комерцијално доступни натријум бисулфит мешавина натријум бисулфита и метабисулфита, процењује се да је финална концентрација HSO₃ у направљеном раствору (5,20-5,69 М), рН 5,0, са 10 mM хидрохиноном, након чега је уследила инкубација 18h/55°C.

Раствори за бисулфитну модификацију ДНК:

- 0,2 М хидрохинон (1 ml)

- 0,22 g хидрохинона (*Sigma H – 9003*, САД) је растворено у 1 ml ddH₂O

- NaHSO₃ рН 5,0 (10 ml)

- 5,41 g NaHSO₃ (*Sigma S-8890*, САД) је растворено у 8 ml ddH₂O и додавањем 10 М NaOH, рН вредност је подешена на 5,0. Затим је бисулфитном раствору додато 500 μl свеже припремљеног раствора хидрохинона. Након комплетног растварања NaHSO₃, додавањем ddH₂O запремина раствора је подешена на 10 ml.

- Након бисулфитног третмана, модификована ДНК је пречишћена употребом комплета за екстракцију ДНК (*MBI Fermentas K0512*, Литванија). Поступак пречишћавања се заснивао на следећем принципу: у присуству халотропних соли, 6 М раствора натријум јодида (у даљем тексту РВ-раствор за везивање), молекула ДНК се прво везује за специјално дизајниране стаклене честице, а затим се, да би се добили пречишћени молекули ДНК, ове соли и заостале нечистоће уклањају испирањем у одговарајућем пуферу који садржи у једнаком односу супстанце Трис, NaCl, ЕДТА и 95% етанол (РИ-раствор за испирање). Након испирања, молекули ДНК се елуирају са стаклених честица

помоћу ddH₂O или одговарајућег пуфера.

- након бисулфитне модификације садржај сваке епрувете подељен је на два једнака дела и додато је по три запремине РВ раствора и одговарајућа запремина ресуспендоване суспензије силицијум-диоксида која садржи стаклене честице за везивање ДНК;
- узорци су инкубирани 5-15 мин на 55°C да би се молекул ДНК везао за честице SiO₂-пудера, уз вортексовање свака 2 мин како би се SiO₂-пудер одржао у суспензији;
- након центрифугирања 5 секунди/13000 *g* и одливања супернатанта, епрувете су центрифугиране још једном 2-3 секунде и преостали РВ је уклоњен наставком;
- додато је по 500 µl хладног РИ, након чега је талог ресуспендован наставком и узорци су центрифугирани 5 секунди/13000 *g*;
- након одливања супернатанта поступак са РИ је поновљен још 2 х;
- након последњег испирања и одливања супернатанта, епрувете са SiO₂-пудер суспензијом су центрифугиране још 1 х и преостали РИ је уклоњен наставком; епрувете су остављене отворене 10-15 мин на ваздуху да се талог осуши;
- ДНК је елуирана са стаклених честица додавањем 40 µl 1 mM Трис-НСl, рН 8,0, талог је ресуспендован наставком, након чега је уследило инкубирање 5 мин/55°C;
- након центрифугирања 30 секунди/13000 *g* супернатант је пренесен у нову епрувету, избегавајући стаклене честице; поступак је поновљен још 2 х са истом количином 1 mM Трис-НСl, рН 8,0; да би се уклониле евентуално заостале стаклене честице, епрувете са елуираном ДНК су центрифугиране 30 секунди/13000 *g* и супернатант је пажљиво пренет у нове епрувете;
- узорцима је додата одговарајућа запремина свеже припремљеног 3 M NaOH (фин. 0,3 M) и узорци су стављени на инкубацију 20 минута на температури од 37°C;
- десулфонованој ДНК је додато 1/2 запремине 7,5 M амонијум ацетата (*Serva*, Немачка), рН 7,0, 2,5 запремине хладног апсолутног етанола и 1 µg тРНК

(тРНК квасца, 1 mg/μl, Gibco BRL, САД) као носача, након чега је уследило таложење на -20°C преко ноћи;

- након центрифугирања од 20 мин/13000 g/4°C, декантован је супернатант и додата је 1/2 запремине 70 % етанола;
- након центрифугирања 10 мин/13000 g/4°C, декантован је супернатант и епрувете су остављене отворене 15-30 мин док сав етанол није упарио;
- ДНК је растворена у 40 μl 1 mM Трис-НСl, рН 8,0 и одложена на -20°C. Овако модификована и пречишћена ДНК је представљала узорак за амплификацију МСП техником.

3.2.5. Биоинформатичка анализа прајмера специфичних за метиловани алел

У сврху демонстрације *in silico* протокола за тестирање подесности прајмера за МСП (Davidović и сар., 2014), анализирали смо прајмере које смо користили у овој студији, а као контроле послужили су нам прајмери за оцену метилационог статуса промотора гена *p14* и *p16*, као и промотора гена *PTEN*-а. Секвенце прајмера биле су идентичне секвенцама прајмера који су коришћени у сличним студијама (Burgi и сар., 2001; Zysman и сар., 2002). Протокол подразумева следеће кораке:

- одређивање позиције прајмера у односу на место почетка транскрипције
- одређивање броја и позиције цитозина у оквиру динуклеотида CpG, као и конвертованих цитозина који се не налазе у оквиру динуклеотида CpG
- предикција формирања секундарних структура, попут укосница, као и димера прајмера (хомодимери, хетеродимери)
- провера специфичности прајмера претрагом по сличности у оквиру бисулфитно модификованог генома

Позиција прајмерског пара је дефинисана као удаљеност првог нуклеотида са 5' краја сенс прајмера од места почетка транскрипције (МПТ). Позиције МПТ, у оквиру промотора анализираних гена, пронађене су претрагом база података

ДБТСС (енгл. *Database of Transcriptional Start Sites*) и ЕПД (енгл. *Eukaryotic Promoter Database*) које се налазе на следећим везама: <http://dbtss.hgc.jp/> и <http://epd.vital-it.ch/>, редом.

Број и позиција конвертованих цитозина у оквиру секвенце прајмера одређивана је поређењем бисулфитно модификоване и неизмењене секвенце ДНК.

Интернет апликација Нетпрајмер (енгл. *NetPrimer*, <http://www.premierbiosoft.com/>) коришћена је за предикцију формирања секундарних структура као и термодинамичких параметара прајмера (стабилност 3' и 5' краја). Програм израчунава рејтинг прајмера, који је зависан од стабилности хомодимера прајмера и укосница, према следећој формули:

$$P = 100 + (dG \text{ (хомодимер)} \times 1,8 + dG \text{ (укосница)} \times 1,4),$$

где је Р рејтинг прајмера, а dG промена слободне Џибсове енергије. Под условом да је dG (хомодимер) = dG (укосница) = 0, P = 100. Вредност P = 80 коришћена је за границу значајности. Прајмери који имају мање вредности нису погодни за употребу у ланчаној реакцији умножавања.

Провера специфичности везивања прајмера у оквиру бисулфитно модификованог генома урађена је уз помоћ програма Бисерч (енгл. *BiSerch*), опција електронска ланчана реакција умножавања (*ePCR*), коме се може приступити преко следеће везе: <http://bisearch.enzim.hu/>. Овај програм омогућава претрагу по сличности у оквиру генома који је: а.) неизмењен, б.) бисулфитно модификован и метилован и в.) бисулфитно модификован и неметилован. На располагању су геноми следећих врста: *Homo sapiens*, *Mus musculus* и *Pan troglodytes*.

3.2.6. Анализа метилационог статуса промотора гена методом МСП

Метилациони статус промотора гена *p14* и *p16* испитиван је методом МСП. Метода се заснива на употреби два пара прајмера; један пар умножава неметиловани, док је други пар специфичан за метиловани алел. Метода је

осетљива и може да детектује један метиловани алел у присуству хиљаду неметилованих. У табели 3.4. налазе се секвенце прајмера коришћених у овој студији.

Приликом извођења ланчане реакције полимеразе коришћен је *Hot start* протокол. Он подразумева коришћење ДНК полимеразе, која је хемијски модификована, тако да је неактивна на собној температури. Ензим се активира током фазе иницијалне денатурације (95°C/10 минута). Бенефити коришћења овог протокола огледају се у смањењу неспецифичних амплификација (Paul и сар., 2010).

МСП реакција је извођена у финалном волумену од 25 μ l, при чему је реакциона смеша припремљена на следећи начин:

1. 1 x пуфер (16,6 mM амонијум-сулфат/6,7 mM Трис, pH 8,8/6,7 mM MgCl₂/10 mM 2-меркаптоетанол)
2. динуклеотид-три-фосфати (1,25 mM сваки)
3. прајмери у финалној концентрацији од 0,6 μ M
4. ДМСО у финалној концентрацији од 5 %
5. ГСА у финалној концентрацији од 0,4 mg/ml
6. 1 јединица *HotStart* Так полимеразе (*Qiagen*, САД).
7. 2,5 μ l узорка

Ланчана реакција полимеразе је извођена у апарату Аплајд Биосистемс 2720 (*Applied Biosystems, Foster City, CA, САД*) у трајању од 40 циклуса. Сваки циклус се састојао од три корака: денатурације ДНК (45s на 95°C), хибридизације прајмера (45s на температури приказаној у Табели 3.2) и елонгације прајмера (1 минут на 72°C). Реакција је започета иницијалном денатурацијом на 95°C у трајању од 15 минута, а завршена је финалном елонгацијом на 72°C у трајању од 7 минута.

3.2.7. Ланчана реакција полимеразе егзона 5-8 гена p53

У циљу припреме изоловане ДНК за секвенцирање, урађена је реакција ланчаног умножавања егзона 5-8 гена p53. Секвенце прајмера, који су кориштени за сваки од егзона, приказане су у Табели 3.4. Прајмери су дизајнирани на начин да обухватају и интронске делове гена, тако да се секвенце егзона могу целе анализирати у оба смера.

Реакција је извођена на апарату Аплајд Биосистемс 2720 у трајању од 40 циклуса. Сваки циклус се састојао од три корака: денатурација ДНК (45s на 95°C), хибридизације прајмера (45s на температури приказаној у Табели 2.2) и елонгације прајмера (1 минут на 72°C). Реакција је започета иницијалном денатурацијом на 95°C у трајању од 10 минута, а завршена је финалном елонгацијом на 72°C у трајању од 7 минута.

Ланчана реакција полимеразе је рађена у финалној запремини од 25 µl, а према следећој рецептури:

1. 1 x *Gold* пуфер (*Applied Biosystems, Foster city, CA, САД*)
2. магнезијум-хлорид у финалној концентрацији 1,5 mM
3. динуклеотид-три-фосфати (0,2 mM сваки)
4. прајмери у финалној концентрацији 0,4 µM
5. ДМСО у финалној концентрацији од 5 %
6. ГСА у финалној концентрацији од 0,4 mg/ml
7. 1,5 јединица *Gold* Так полимеразе (*Applied Biosystems, Foster City, CA, САД*)
8. 125 ng ДНК (2,5 µl).

Табела 3.2. Рецептатура за припрему 100 ml 2 % агарозног гела.

Састојак	10ХТБЕ*	Агароза	Етидијум-бромид	Дест. вода
Количина	10 ml	2 g	5 µl	90 ml

* 10 x ТБЕ *pufer*, pH 8,3 (108 g Трис, 55 g H₃BO₃, 40 ml 0,5 M ЕДТА, pH 8,0, dH₂O до 1000 ml).

3.2.8. Провера специфичности ланчане реакције полимеразе електрофорезом у агарозном и полиакриламидном гелу

Провера специфичности ланчане реакције полимеразе урађена је електрофорезом у 2 % агарозном, односно 6 % полиакриламидном гелу, бојених етидијум-бромидом. Гелови су припремљени према упутству датом у Табелама 3.2 и 3.3.

Табела 3.3. Рецептатура за припрему 6 % полиакриламидног гела (25 ml).

Састојак	ПАА шток*	10 X ТБЕ	10 % амонијум персулфат	Темед	ddH ₂ O
Количина	5 ml	2,5 ml	210 µl	16 µl	17,5 ml

* акриламид:бис-акриламид=19:1.

3.2.9. Детекција мутација секвенцирањем фрагмената молекула ДНК који садрже егzone 5-8 гена *p53*

Секвенцирање фрагмената молекула ДНК који садржи егzone 5-8 гена *p53* урађена је у Институту за микробиологију, Медицинског факултета Универзитета у Београду.

Табела 3.4. Секвенце прајмера који су коришћени у студији

Парови прајмера	Прајмерске секвенце (5'-3')	T _x (°C)	Дужина ампл. (бп)	Реф.
p53 егзон 5	C TGTTCACCTTGTGCCCTGACT A CAGCCCTGTCTCTCTCCAG	61.5	269	(Futreal и cap., 1991)
p53 егзон 6	C GCCTCTGATTCCTCACTGAT A TTAACCCCTCCTCCAGAGA	60.0	181	(Futreal и cap., 1991)
p53 егзон 7	C ACTGGCCTCATCTTGGGCCT A TGTGCAGGGTGGCAAGTGGC	61.5	171	(Futreal и cap., 1991)
p53 егзон 8	C TAAATGGGACAGGTAGGACC A TCCACCGCTTCTTGTCCCTGC	60.0	229	(Futreal и cap., 1991)
p14 н	C TTTTGGGTGTTAAAGGGTGGTGTAGT A CACA AAAACCCCTCACTCACAACAA	60.0	132	(Esteller и cap., 2000)
p14 м	C GTGT TAAAGGGCGGCGTAGC A AAAACCCCTCACTCGCGACGA	62.0	122	(Esteller и cap., 2000)
p16 н	C TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT A CAACCCCAAACCACAACCATAA	60.0	151	(Herman и cap., 1996)
p16 м	C TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC A GACCCCGAACCGCGACCGTAA	65.0	150	(Herman и cap., 1996)

м прајмерски пар специфичан за метиловани алел; н, прајмерски пар специфичан за неметиловани алел; С, сенс; А, антисенс; T_x, температура хибридизације; бп, базни пар.

3.2.10. Утврђивање нивоа експресије гена на протеинском нивоу имунохистохемијски

Ниво експресије анализираних протеина вршен је имунохистохемијски применом стрептавидин-биотин индиректне методе са коришћењем ЛСАБ + комплета (*LSAB + kit*), уз примену диаминобензидина као хромогена и Мајеровог хематоксилина за контрастирање.

У овој студији коришћена су комерцијална примарна антитела за:

1. p53, клон DO7 анти-p53 антитело (*Dako Cytomation, Carpinteria, CA, САД*), разблажење 1:250.
2. Циклин D1, клон EP12 анти-циклин D1 антитело (*Dako Cytomation, Carpinteria, CA, САД*), разблажење 1:50.
3. Ki-67, клон ТЕС-3 анти-Ki-67 антитело (*Dako Cytomation, Carpinteria, CA, САД*), разблажење 1:300.
4. p16, клон JC8 анти-p16 антитело (*Santa Cruz Biotechnology, САД*), разблажење 1:200.

Као позитивна спољашња контрола коришћена су следећа ткива: за имунохистогемичку детекцију протеина Ki-67 ткиво Буркитовог лимфома, протеина p53 ткиво карцинома дојке, протеина циклин D1 ткиво тонзиле и за протеин p16 ткиво планоцелуларног карцинома цервикса.

Експресија свих наведених протеина је једарна и анализирана је оптичком микроскопијом на микроскопу Олимпус БХ50Ф4, на увећању 200x.

Индекс обележавања је урађен на дигиталним фотографијама снимљеним камером Олимпус ДП70, 12 мегапиксела, по следећим критеријумима:

1. за протеине циклин D1 и p16 квалитативно: присутна експресија (+) и није присутна експресија (-)
2. за протеине p53 и Ki-67 семиквантитативно. На сваком узорку је анализирано по 5 изабраних поља („*hot-spots*“) и одређивана је средња вредност експресије.

Добијени резултати су класификовани у 4 категорије и то за експресију p53 на следећи начин :

- негативно (0): мање од 10 % туморских ћелија је позитивно.
- негативно (1): позитивно је између 11 и 25 % туморских ћелија.
- позитивно (2): позитивно је између 26 и 50 % туморских ћелија.
- позитивно (3): позитивно је више од 50 % туморских ћелија.

Имунохистохемијска анализа експресије протеина Ki-67 била је класификована на следећи начин:

- негативно (-): мање од 1 % позитивних туморских ћелија
- лака позитивност (+): 1-5% позитивних туморских ћелија
- умерена позитивност (++) : 6-25% позитивних туморских ћелија
- јака позитивност (+++): више од 25% позитивних туморских ћелија.

3.2.11. Статистичка обрада резултата

Статистичка анализа добијених резултата подразумевала је примену следећих статистичких тестова:

- Фишеров тест тачне вероватноће (*Fisher exact test*)
- МекНемаров χ квадратни тест (*McNemar's test*)
- Ман-Витнијев тест (*Mann-Whitney test*)
- Данов тест (*Dunn's test*)

Међусобна повезаност алтерација испитиваних гена и/или протеина као и њихова повезаност са клиничким карактеристикама пацијената и хистопатолошким карактеристикама тумора испитивана је коришћењем Фишеровог теста тачне вероватноће.

Међузависност експресије протеина p16 и метилације промотора његовог гена испитивана је помоћу МекНемар χ квадратног теста. Разлика у експресији

протеина Ки-67 у селектованим подгрупама пацијената анализирана је помоћу непараметријског теста суме рангова. Данов тест је коришћен у случају поређења више група у односу на испитивани параметар. За обраду података коришћен је лиценцирани програм за статистичку обраду Сигма плот 10.0 (*Sigma plot 10.0*).

У свим примењеним аналитичким методама прихваћени ниво статистичке значајности био је $P \leq 0,05$.

4. Резултати

Ова студија је укључила 33 туморска и 4 околна неизмењена ткива, узетих после ексцизије из 25 пацијената. Просечна старост испитаника била је 61,36 година (опсег 39-74). Особа мушког пола било је 11, док је 14 било женског. Преко 60 година, у тренутку одвијања студије, имало је 15 пацијента, док је млађе од 60 година било 10 испитаника.

Величина тумора била је ≥ 10 cm код 18 пацијената, док је код 15 случајева била мања од 10 cm. У односу на хистолошки градус, узорци туморског ткива су били подељени на две групе: група са ниским градусом (23/33) и група са високим градусом (10/33). Према хистолошком подтипу липосаркома пацијенти су били подељени на следећи начин: група код које је дијагностикован ДДЛПС (6/33), група са дијагностикованим МПЛС/ОЋПЛС (18/33) и група код које је установљен ПЛПС (9/33).

У другој групи 15 од 18 испитаника имало је чисти миксоидни липосарком, два пацијента миксоидни липосарком са ОЋ компонентом испод 5 % и један испитаник је имао округлоћелијски липосарком. Тумори су у највећем броју случајева били локализовани у екстремитетима (29/33), два тумора су била смештена у ретроперитонеуму и по један у пределу врата и слабинског дела. Од укупног броја тумора 22 од 33 била су примарна, у 10 случајева установљени су локални рецидиви и у једном случају метастаза на костима (1/33).

4.1. Анализа мутационог статуса гена *p53*

Укупно је детектовано седам тачкастих мутација и један полиморфизам (Табела 4.1). Четири мутације су биле измењеног смисла, док су преостале три биле тихе мутације. Четири мутације, две измењеног смисла и две тихе, детектоване су у два узорка плеоморфног подтипа (2/9, 22,22 %), док су три мутације установљене код миксоидног подтипа (3/18, 16,67 %). Код добродиферентованих липосаркома није детектована ниједна мутација. Полиморфизам, R213R, детектован је у узорку миксоидног подтипа.

Табела 4.1. Детектоване мутације у узорцима липосаркома

Узорак	Хист. подтип	Егзон	Кодон	Аминокиселинска замена	ИХЦ
ЛПС 1	Миксоидни	8	286	GAA (Glu)>>GAG (Glu)	-
ЛПС 1 ^{P2}	Миксоидни	7	244	GGC (Gly)>>TGC (Cys)	+
ЛПС 6	Плеоморфн и	8	270, 273	TTT(Phe)>>TAT(Tyr), CGT(Arg)>>CGA(Arg)	+
ЛПС 7	Плеоморфн и	5,8	168, 283	CAC(His)>>CGC(Arg), CGC(Arg)>>CGG(Arg)	+
ЛПС 9	Миксоидни	6	213	CGA (Arg)>>CGG (Arg)*	+
ЛПС 10	Миксоидни	8	286	GAA (Arg)>>GGA (Gly)	+

* Полиморфизам; ИХЦ имунохистохемија.

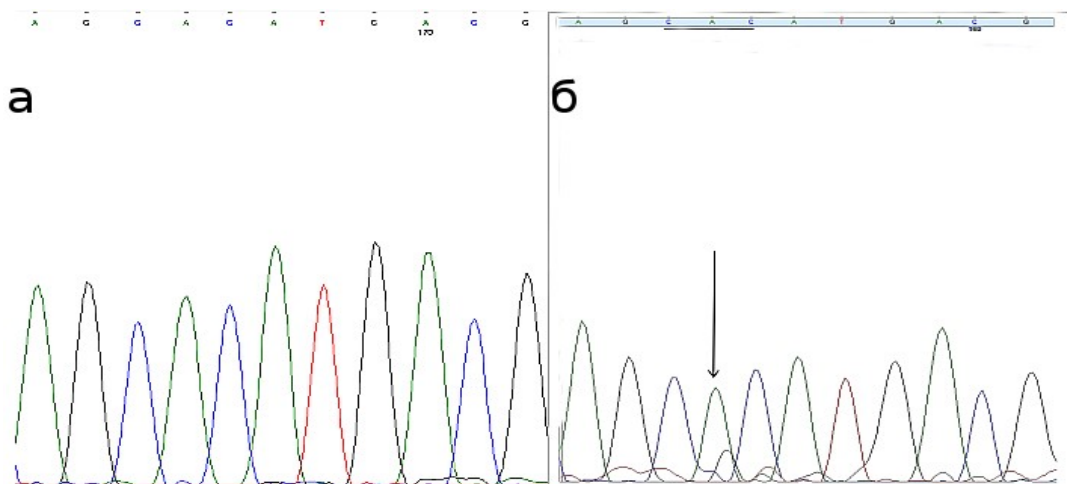
Информације у вези са ефектима, детектованих мутација, на функционалност протеина p53, добијене су претрагом базе података мутација гена p53 (www.p53.fr/TP53Mutload/TP53Mutload.html). Резултати претраге су показали да мутације H168R (слика 4.1) и G244C у потпуности укидају способност протеина p53 да као регулаторни протеин активира експресију циљних гена (Табела 4.2), као и да су ове мутације повезане са повећаном отпорношћу ћелија на јонизујуће зрачење.

Табела 4.2. Подаци о активности измењених протеина p53 у регулацији експресије циљних гена

Мутација	WAF1	MDM2	BAX	AIP	GADD45	NOXA	P53R2	14-3-3-s
G244C	0	0	0	0	0	0	0	0
E286G	0,09	0	3,27	0	1,01	0	1,63	0
H168R	16,41	17,74	13,62	16,21	13,02	22,82	17,94	15,33
F270Y	62,73	29,96	140,70	156,64	98,72	209,91	105,99	139,18

Подаци се базирају на експериментима изведеним на ћелијама квасца и на температури од 37°C. Бројне вредности су дате у процентима, где је активност неизмењеног протеина 100 %. Граница значајности је 20 %.

Мутација E286G, као и претходне две мутације, онемогућава способност p53 као регулаторног протеина транскрипције, али нема података о радиосензитивности. Мутација F270Y умањује способност протеина p53 да активира транскрипцију гена p21 и MDM2. Међутим, измењени протеин показује већи афинитет од неизмењеног p53 за промоторе гена, који су укључени у процес апоптозе (BAX, NOXA) (Табела 4.2).



Слика 4.1. Део секвенце егзона 5 гена *p53*. а.) нормално ткиво, б.) узорка ЛПС 7 у коме је детектована мутације Н168R (приказана стрелицом).

4.2. Биоинформатичка анализа прајмера специфичних за метиловани алел

Биоинформатичка анализа је показала да су сви испитивани прајмери позиционирани у близину одговарајућих МПТ (Табела 4.3). Прајмери се значајно разликују у односу на температуре хибридизације. Разлика у температурама хибридизација између р16Х-р16Б и р14Е-р14Б износи 14°C, у оба случаја. Парови прајмера р14Б и р16Б укупно садрже 2, односно 3 цитозина у оквиру динуклеотида CG. Број динуклеотида CG по пару прајмера р14Е и р16Х, износио је 6 и 7, редом. У свим случајевим, осим антисенс прајмера р16Б, бар један цитозин, у оквиру динуклеотида CG, био је позициониран на 3' крају. Број цитозина који су ван динуклеотида CG кретао се од 5 до 11 по пару прајмера. У свим прајмерима, осим оних специфичних за промотор *PTEN*-а, бар један конвертовани цитозин је био присутан на 3' крају. Највише конвертованих цитозина на 3' крају имао је антисенс прајмер р14Б, укупно четири. Прајмери нису показали велике разлике у погледу способности за формирање секундарних структура и у том смислу сви су били погодни за коришћење у ланчаној реакцији полимеразе. Провера специфичности везивања прајмера, показала је да пар прајмера дизајнираних да се везују унутар секвенце гена *PTEN* на хромозому 10, везује и унутар региона хромозома 9, где се налази псеудоген *PTENP1* (Слика 4.2).

Остали прајмери нису показали афинитет за алтернативна места везивања унутар метилованог генома.

Табела 4.3. Подаци добијени *in silico* анализом прајмера

Прајмер	Секвенца	Рејтинг	Стабилност хетеродимера	Позиција прајмера	Tx (°C)
p16Б c	GGGGAGtAGtATGGAGtC	100	-2,58	+262	51
p16Б a	AATCGAAaCGCTACCTaA	90	-2,58		51
p14Б c	tAGGTTtTTGGTGAttTtC	100	-7,51	+284	48
p14Б a	ACCTaaTCTTCTAaaAAaCG	100	-7,51		48
p16X c	TtAttAGAGGGTGGGGCGGAtCGC	90	-6,27	+192	65
p16X a	GACCCCGaaCCGCGaCCGTaa	88	-6,27		65
p14E c	GTGttAAAGGGCGGCGtAGC	95	-5,00	+223	62
p14E a	AAAACCCTCACTCGCGaCGa	81	-5,00		62
PTEN c	TGttTttAAaACGGCGGCGGC	95	-5,67	+640	62
PTEN a	AaACGAATAATCCTCCGAACG	100	-5,67		62

Стабилност хетеродимера изражена је у kcal/mol; малим словима у секвенци прајмера означене су позиције које се разликују од оних у неизмењеној секвенци ДНК; масним словима означени су динуклеотиди CG; Б, Буријева; Х, Херман; Е, Естелер.

Results of your search

- PCR product(s) on the bisulfite transformed sense chain
- PCR product(s) on the bisulfite transformed antisense chain

Search result(s) on the bisulfite transformed sense chain

- PCR product(s) on the bisulfite transformed sense chain
- Matches of forward primer on bisulfite transformed sense chain
- Matches of revers primer on bisulfite transformed sense chain

PCR product(s) on the bisulfite transformed sense chain

Forward primer: TGT**TTTTAATA**CGGGCGGGC
Reverse primer: AAACGAATAATCCTCCGAACG

1. Chromosome 10 (len: 144)
89623833 TCG TTTAATACG CGGGCGGG CGGTTCGTAT
ATTAGGAT TCGGTCGGT TTTAAATTT TCGTCGTCG TCGTCGTAT
TTTCGTGTT CGGGTTTCGG AGTTCGTCGG CGGAGTAGT CGTTCGGAGG 89623977
ATTATTCGTT T

Search result(s) on the bisulfite transformed antisense chain

- PCR product(s) on the bisulfite transformed antisense chain
- Matches of forward primer on bisulfite transformed antisense chain
- Matches of revers primer on bisulfite transformed antisense chain

PCR product(s) on the bisulfite transformed antisense chain

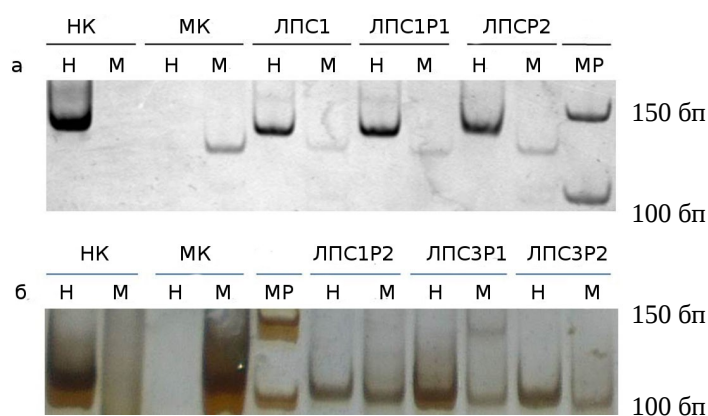
Forward primer: TGT**TTTTAATA**CGGGCGGGC
Reverse primer: AAACGAATAATCCTCCGAACG

1. Chromosome 9 (len: 152)
33676894 AAACG AATAATCCTC CGAAGACTA CCTCCTCAA CGACCTCCGA
AACCCGAACC ACGAAAAATA CGACGACGAC GAACGAAAAA TTTAAACCG
ACCCGAATCC CTCCATATAC CGCCGCCGCC GCCGCCCGG CGCCCGTATT
AAAAAC 33677046

Слика 4.2. Претрага по сличности показала је да се прајмери преузети из (Zysman и сар., 2002) везују како за промотор *PTEN*-а, тако и за регион у коме се налази псеудоген *PTENP1*.

4.3. Анализа метилационог статуса гена *p14* и *p16*

Анализа метилационог статуса промотора гена *p14* показала је присуство метилованог алела у двадесет и једном узорку (21/33, 63,64%). Такође, метилација промотора је детектована и у 4 узорка одговарајућих неизмењених ткива (100%). У три од четири случаја урађена је маргинална ресекција тумора, док је у једном случају ресекција била широка (≥ 5 cm).



Слика 4.3. Метилациона анализа промотора гена: а.) ген *p14* и б.) ген *p16*. Н, неметировани алел; М, метировани алел; НК, неметирована контрола; МК, метирована контрола; МР, маркер; бп, базни пар.

Метилација промотора овог гена била је начешћи догађај у групи МЛПС/ОЋЛПС (14/18, 77,78%), док је у плеоморфним и добродиферентованим липосаркомима детектована редом у 55,56% (5/9) и 33,33% (2/6) случајева. Код примарних тумора метилација је детектована у 59,09% (13/22), док је код рецидива учесталост износила 80 % (8/10). Међутим, разлика није била статистички значајна. Метилациона анализа промотора гена *p16*, показала је присуство метилованог алела у само 4 случаја (4/33, 12,12%). У три случаја у питању су били плеоморфни (3/9, 33,33%) и у једном случају миксоидни липосарком (1/18, 5,56%). У свим случајевима ради се о рецидивима болести (4/10, 40%), што се показало као статистички значајно ($P = 0,0058$; Фишеров егзактни тест). Истовремена метилација промотора гена *p14* и *p16* била је детектована у три случаја (два плеоморфна и један миксоидни липосарком). На слици 4.3 приказана је провера резултата МСП-а у полиакриламидном гелу.

4.4. Имунохистохемија

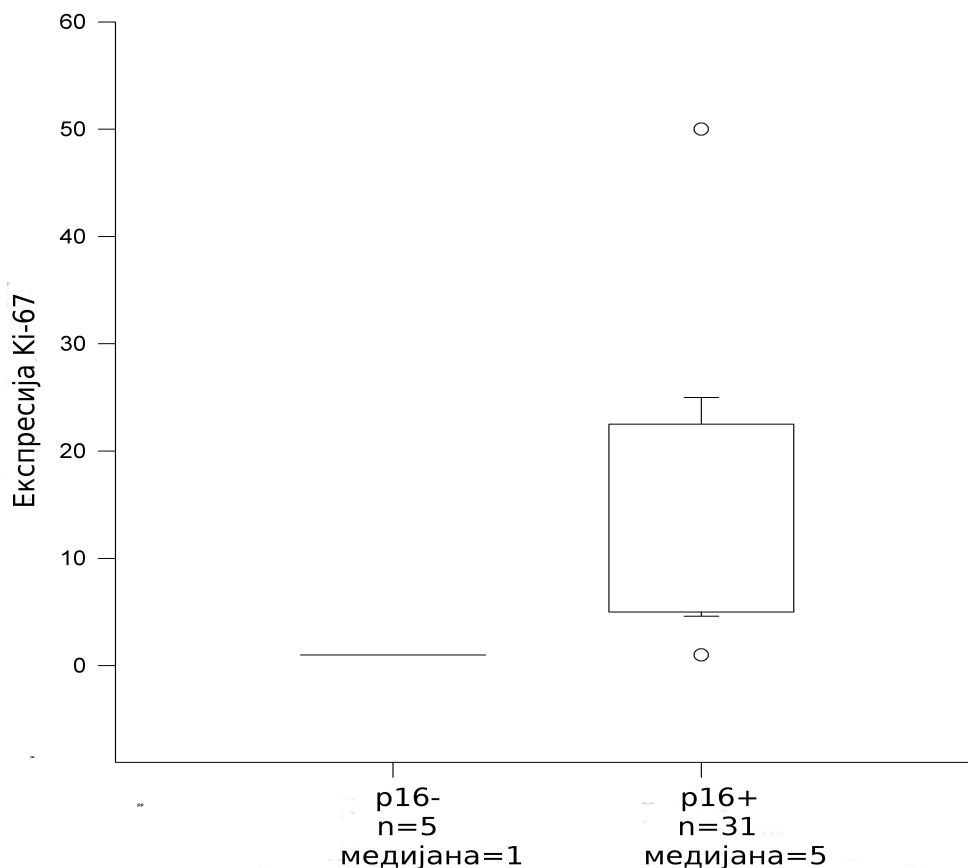
Протеин p53 био је експримиран у свим испитиваним узорцима плеоморфног подтипа (9/9), једној трећини испитиваних МЛПС/ОЋЛПС (6/18, 33,33%) и ни у једном добродиферентованом тумору (0/6). Корелација између експресије p53 и градуса тумора показала се као статистички значајна ($P < 0,0001$; Фишеров егзактни тест).

Имунохистохемијским бојењем установљена је експресија протеина p16 у 84,49% (28/33) узорака липосаркома. Експресија према хистолошком подтипу била је следећа: плеоморфни липосаркоми 100% (9/9), миксоидни/округлоћелијски липосаркоми 88,89 % (16/18) и добродиферентовани тумори 50% (3/6). Тумори ниског градуса били су позитивни на присуство протеина p16 у 78,26% (18/23), док су сви тумори високог градуса показали експресију p16 (10/10). Разлика није показала статистичку значајност.

Позитивно бојење на циклин D1 показало је 61,29% (19/31) узорака. Протеин је био највише експримиран у плеоморфном подтипу, 66,67% (6/9) случајева, док је код добродиферентованих и миксоидних тумора позитивно бојење на циклин D1 било присутно, редом, у 40% (2/5) и 62,5% (10/16) узорака. Липосаркоми ниског и високог градуса показали су сличну експресију циклина D1, 57,14% (12/21) и 60% (6/10), редом. Истовремена експресија циклина D1 и протеина p16 утврђена је у 51,52% (17/33) узорака липосаркома, док је одсуство оба протеина било забележено само у два случаја (један добродиферентован и један миксоидни липосарком).

4.5. Међузависност испитиваних параметара

Посматрано на нивоу целе групе ни један од испитиваних параметара није



Слика 4.4. Корелација експресије Ki-67 и имунореактивног статуса p16 у липосаркомима као групи. Компоненте ниског и високог градуса, унутар истог тумора, приликом рачунања третиране су као посебни узорци. Правоугаоници представљају интервал вредности између 25 % медијане и 75 % медијане; граничници представљају максималну и минималну вредност, док кругови означавају екстремне вредности.

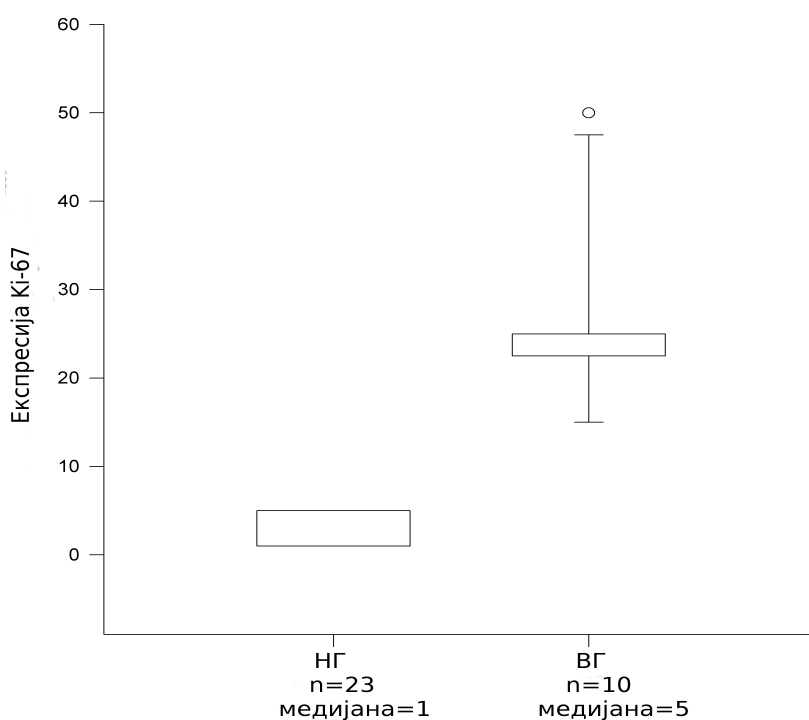
показао статистички значајну корелацију са величином тумора, полом и старосном доби.

У групи добродиферентованих липосаркома примећено је да тумори који експримирају p16 не прелазе дијаметар од 10 cm, док тумори који су показали

негативно имунохистохемијско бојење нису били мањи од 15 cm. Међутим, број узорака (шест) није био довољан да би се разлика показала као статистички значајна.

Експресија циклина D1 је, у оквиру миксоидне подгрупе, била присутна у девет узорака са повишеним нивоом протеина p16 и само у једном случају где није забележена експресија протеина p16. Међутим, није утврђена статистички значајна веза између експресије ова два протеина. Утврђена је статистички значајна корелација између метилације промотора гена p16 и експресије протеина, на нивоу целе групе узорака ($P < 0,001$; МекНемаров χ квадратни тест). Показана је статистички значајна веза између експресије p16 и p53 ($P = 0,03$; Фишеров егзактни тест).

Мутациони статус гена p53 није корелисао са експресионим нивоом



Слика 4.5. Корелација експресионог статуса Ki-67 и градуса липосаркома.

протеина p53, као ни са метилационим статусом гена p14.

Утврђено је да постоји статистички значајна разлика, у погледу експресије протеина Ki-67, између тумора код којих је одсутна експресија протеина p16 и тумора код којих је она повишена ($P < 0,001$; Ман-Витнијев тест; Слика 4.4). Слично томе, експресија протеина Ki-67 показала је повезаност са градусом липосаркома ($P < 0,001$; Ман-Витнијев тест; Слика 4.5).

Код тумора ниског градуса ни у једном случају број ћелија позитивних на присуство Ki-67 није био већи од 5 %. Ситуација је била обрнута код тумора високог градуса, где је Ki-67 био експримиран у 6-25 % ћелија у осам тумора, док је у два случаја удео позитивних ћелија био између 25-50 %. Код миксоидних тумора са ОЋ компонентом, бојење је било интензивније у дедиферентованом делу тумора. Такође, показана је статистички значајна разлика у односу на експресију протеина Ki-67 код тумора са позитивним и негативним имунохистохемијским бојењем на протеин p53 ($P = 0,0001$; Ман-Витнијев тест).

Од укупног броја испитиваних узорка само у два није пронађена промена ни у једном од испитиваних параметара. Оба узорка су класификована као добродиферентовани липосаркоми. Број промена на нивоу гена и/или протеина испитиваних чланова два сигнална пута у ДДЛПС никад није већи од два, док је код плеоморфних липосаркома у седам случајева четири, а у два три. У миксоидним липосаркомима број измењених параметара се креће од 1 до 6. Применом Дановог теста показано је да између подтипова липосаркома постоји значајна статистичка разлика у погледу броја алтерација у испитиваним сигналним путевима ($P < 0,001$). Сви експериментални подаци налазе се у Табели 4.4.

Табела 4.4. Преглед резултата добијених анализа на узорцима липосаркома

Узорак	Ген p53	p53 ИХЦ	p16 мет.	P16 ИХЦ	D1 ИХЦ	p14 мет.	Ki-67
ЛПС 1	мутиран*	-	-	+	-	+	до 5 %
ЛПС 1 ^{P1}	ндм	-	-	+	+	+	до 5 %; ОЋ до 10 %
ЛПС 1 ^{P2}	мутиран	+	+	+	+	+	до 5 %
ЛПС 1 ^{P3}	ндм	-	-	+	-	+	до 5 %
ЛПС 2	ндм	-	-	+	-	-	до 5 %
ЛПС 2 ^{P1}	ндм	-	-	-	-	+	до 1 %
ЛПС 2 ^{P2}	ндм	-	-	+	-	+	до 5 %
ЛПС 2 ^{P3}	ндм	-	-	+	+	+	до 5 %
ЛПС 3	ндм	+	-	+	+	+	до 25 %
ЛПС 3 ^{P1}	ндм	+	+	+	+	-	до 25 %
ЛПС 3 ^{P2}	ндм	+	+	+	-	+	до 25 %
ЛПС 4	ндм	+	-	+	+	+	до 25 %
ЛПС 5	ндм	-	-	+	-	+	до 5 %
ЛПС 6	мутиран	+	-	+	-	-	до 15 %
ЛПС 7	мутиран	+	-	+	+	-	до 25 %
ЛПС 8	ндм	-	-	+	+	-	до 5 %
ЛПС 9	Полимор.	+	-	+	+	+	до 5 %
ЛПС 10	мутиран	+	-	+	+	+	до 5 %
ЛПС 11	ндм	-	-	-	+	+	до 1 %
ЛПС 12	ндм	+	-	+	+	-	до 5 %
ЛПС 13	ндм	-	-	+	-	+	до 1 %
ЛПС 14	ндм	-	-	+	нп	+	до 5 %; ОЋ до 10 %
ЛПС 15	ндм	-	-	-	нп	-	до 1 %
ЛПС 16	ндм	-	-	-	-	-	до 1 %
ЛПС 17	ндм	+	-	+	+	-	до 15 %
ЛПС 18	ндм	+	-	+	+	+	до 5 %
ЛПС 19	ндм	-	-	+	+	+	до 5 %
ЛПС 20	ндм	-	-	+	+	-	до 1 %
ЛПС 21	ндм	+	+	+	-	+	до 25 %
ЛПС 22	ндм	+	-	+	+	+	до 50 %
ЛПС 23	ндм	+	-	+	+	-	до 5 %; ОЋ до 50 %
ЛПС 24	ндм	-	-	+	-	+	до 5 %
ЛПС 25	ндм	-	-	-	+	-	до 1 %

* тиха мутација; ндм није детектована мутација; Р_n n-ти локални рецидив; ИХЦ имунохистохемија; мет. метилациони статус; нп нема података; ОЋ округлоћелијска компонента.

5. Дискусија

Липосаркоми су ретки тумори мезенхималног порекла и недовољно разјашњене патогенезе. С обзиром на значајне клиничко-патолошке разлике између три подтипа липосаркома, вероватно је да су различити механизми укључени у њихов настанак и развој. На основу студија које су се фокусирали на истраживање генетике саркома меких ткива и костију, може се закључити да сигнални путеви p53-p14 и Rb-p16 играју одређену улогу у свим типовима саркома (Baird и сар., 2005; Bennani-Baiti, 2011; Osuna и de Álava, 2009; Pérot и сар., 2010). Разјашњавање улоге ових сигналних путева у патогенези липосаркома, може да буде допринос како дијагностици и прогностици липосаркома, тако и дефинисању потенцијалних терапеутских циљева.

Пре него што кренемо у анализу резултата ове студије, осврнућемо се на потенцијалне проблеме у вези са истраживањем липосаркома. Уопште посматрано, постоји неколико потешкоћа у вези интерпретације резултата студија, које су анализирале мутациони / метилациони статус појединачних гена у липосаркомима. Ови проблеми могу да буду проузроковани: а.) малим бројем узорака; б.) променом класификације саркома меких ткива; в.) недовољно прецизним класификовањем саркома меких ткива.

Први проблем није специфичан само за генетичка испитивања липосаркома, већ је присутан у добром делу студија које за предмет истраживања имају ћелије и ткива човека. У случају липосаркома проблем је још више изражен ниском учесталошћу малигнитета у општој популацији. С тим у вези је и број публикација, које се тичу улоге одређеног гена у патогенези липосаркома, а који је углавном недовољан за доношење дефинитивних закључака. Друга два проблема тичу се класификације саркома. Подела саркома по групама, које би се међусобно јасно разликовале, готово да је немогућа. Неколико деценија вођена је расправа да ли малигни фиброзни хистиоцитом (МФХ), постоји као засебан ентитет или представља прогресију других класа саркома (Randall и сар., 2004). Једна врста

тумора првобитно класификованих као МФХ, касније су окарактерисани као дедиферентовани липосаркоми (Matushansky и сар., 2009).

Према најновијој класификацији Светске здравствене организације (СЗО) малигни фиброзни хистиоцитоме су укинута као тип и воде се као недиферентовани плеоморфни саркоми (<http://sarcomahelp.org/reviews/who-classification-sarcomas.html>). Такође, молекуларно генетичком анализом утврђено је да су тумори, који су били класификовани као мешовити (један део ДДЛПС, други МЛПС), уствари добро диферентовани тумори (de Vreeze и сар., 2008). Недовољно прецизна класификација је присутна у појединим студијама, поготово онда када се анализирају алтерације гена у саркомима као групи (решава се проблем малог броја узорака). У таквим студијама, уобичајено је да се не наводе подгрупе липосаркома, него се све воде под општим именом (Das и сар., 2007; Orlow и сар., 1999; Seidel и сар., 2005). С обзиром на велике генетичке разлике које постоје унутар липосаркома као групе, овакви подаци нису довољно информативни.

Експресија протеина p53 у ткивима ДДЛПС/ДЛПС, често се истражује у контексту испитивања молекуларне основе процеса дедиференцијације. Истраживања Голдблум и сар. показала су да је повећан ниво експресије протеина p53 детектован у 6 % испитиваних ДДЛПС, док је код ДЛПС скоро половина узорака (47 %) била позитивна на присуство протеина p53 (Goldblum и сар., 1995). На основу добијених резултата ови аутори закључују да је протеин p53 укључен у процес хистолошке прогресије у овом типу тумора. Слична студија, коју су спровели Адачи и сар., показала је да је аберадна експресија протеина p53 знатно чешћа у дедиферентованој компоненти тумора (57 % у односу на 14 %) (Adachi и сар., 2001). Ово истраживање није показало значајну разлику у стопи преживљавања између ДДЛПС и ДЛПС група, ако се груписање врши према локализацији тумора (ретроперитонеум/екстремитети). На основу ове опсервације, аутори су закључили да је протеин p53 укључен у процесе који воде ка морфолошким променама тумора, а не утиче на агресивност неоплазије. Деи Тос и сар. искључују могућност да алтерације на нивоу гена p53 и/или протеина могу

имати есенцијалну улогу током дедиференцијације (Dei Tos и сар., 1997а). Они констатују да је повећана експресија p53 у релативно малом броју туморских ћелија (5-20 %) у испитиваним узорцима ДДЛПС, компатибилна са присуством неизмењеног гена p53.

Након имунохистохемијског бојења, свих шест узорака ДДЛПС, испитиваних у овој студији, је класификовано као негативно на протеинску експресију p53. Овакав резултат оставља могућност да је промена експресије гена p53, касни догађај у току прогресије ДДЛПС/ДЛПС. Нажалост, наша студија није укључила дедиферентоване липосаркоме, тако да нисмо у могућности да дискутујемо о могућој улози p53 током прогресије ДДЛПС/ДЛПС.

Веза између прогресије миксоидних липосаркома и промена у експресији протеина p53 није најјаснија. Резултати претходних студија, значајно се разликују и у квантитативном и у квалитативном погледу. Деи Тос и сар. су испитивали експресију протеина на 21 узорку МЛПС/ОЋЛПС (Dei Tos и сар., 1997). Сви узорци, независно од градуса, показали су позитивну реакцију на имунохистохемијско бојење. Супротно налазима ове групе, Антонеску и сар. закључују да је експресија протеина p53 повезана са округлоћелијском компонентом тумора (Antonescu и сар., 2001). Позитивно бојење показало је само 17 % узорака. У складу са овим резултатима су и подаци које су објавили Ода и сар. (Oda и сар., 2005). Они су добили значајно већу експресију протеина p53 у ОЋ (13,8 %) него у миксоидној компоненти (6,2 %). Најзад, Смит и сар. су детектовали повећану експресију у само 2 од 30 узорака (6,7 %). У оба случаја у питању је била ОЋ компонента тумора (Smith и Goldblum, 1996).

Испитивање експресије протеина p53 у овој студији није утврдило да је позитивно ИХЦ бојење карактеристично само за ОЋ компоненту. С обзиром на то, наши резултати подржавају налазе Деи Тосове групе. Као последица тога, ближи смо ставу да су алтерације повезане са експресијом p53 рани догађај у туморигенези миксоидних липосаркома.

Међустудијске разлике које се тичу експресије протеина p53 делом су

последица употребе различитих антитела и граница значајности. Међутим, тешко је објаснити у потпуности таква велика варирања. Можда један од параметара који треба узети у обзир је и популациона структура пацијената. Даље, будући да је етиологија липосаркома углавном нејасна, не можемо одбацити могућност да потенцијални етиолошки фактори могу различито утицати на статус *p53* и његову експресију у миксоидној и округлоћелијској компоненти тумора. Требало би имати у виду да су велике разлике у погледу експерименталних резултата делом последица и малог броја студија.

Плеоморфни липосаркоми су показали повећану експресију протеина *p53* у свим анализираним случајевима. Овакав резултат је у складу са подацима из литературе (Ghadimi и сар., 2011), где је показана висока учесталост алтерација гена *p53* и/или експресије протеина *p53*. Показано је да је експресија *p53* повезана са лошом прогнозом у липосаркомима (Schneider-Stock и сар., 1999), као и саркомима других типова (Kim и сар., 2006; Medina-Franco и сар., 2003). С обзиром на добијене резултате, изгледа да је аберантан ниво протеина *p53* конститутивна одлика плеоморфног подтипа. Могуће објашњење је повезано са значајем протеина *p53* у одржавању геномске стабилности (Talos и Moll, 2010).

Експресија протеина *p53*, на нивоу целе групе, није корелисала са мутационим статусом гена *p53*. Обично се позитивно имунохистохемијско бојење повезује са мутацијом измењеног смисла у секвенци *p53*. Овакав став се базира на две премисе: а.) протеин *p53* има кратак животни век и не долази до његовог нагомилавања у ћелији и б) мутирани протеин *p53* има већу стабилност, много дужи животни век и због тога долази до његовог накупљања у једру. Међутим, негативна имунохистохемијска реакција може да буде последица и делеције гена *p53* (Lassus и Butzow, 2007). Слично томе, до повећане експресије протеина *p53* може доћи и услед хипоксичних услова у којима се ћелија налази, а да ген није мутиран (Koumenis и сар., 2001). То значи да се имунохистохемија не може користити као маркер мутационог статуса гена *p53*.

Студије које су се бавиле мутационим статусом гена *p53* у липосаркомима

су малобројне и укључују мали број узорака. Ситуација је најјаснија код добродиферентованих и дедиферентованих липосаркома. Услед повећане експресије протеина MDM2 у овом подтипу адипозних тумора, мутације су врло ретке и детектоване су само у дедиферентованом делу тумора (Dei Tos и сар., 1997).

Сматра се да мутације гена *p53* имају улогу током процеса дедиференцијације (Goldblum и сар., 1995). Питање је каква је селективна предност мутације, с обзиром да је *p53* претходно онемогућен у обављању своје функције тумор супресора прекомерном експресијом MDM2. Једно од објашњења је да поједине мутације доводе до настанка функција које не постоје код неизмењених протеина (енгл. *gain of function*) (Petitjean и сар., 2007). Нова функција могла би да омогући контролу транскрипције гена чији протеински производи могу да покрену каскаду догађаја, који воде до дедиференцијације тумора. Међутим, ово објашњење може бити релеватно само за мали проценат дедиферентованих липосаркома. Вероватно је да су и други гени укључени у овај процес. Директно секвенцирање егзона 5-8 није показало присуство мутираног гена *p53* ни у једном од испитиваних ДДЛПС.

У погледу учесталости мутација гена *p53*, ситуација је нејасна код миксоидних и округлоћелијских липосаркома. Досадашње студије су показале да се стопа мутација креће од 2,8 % до 28,5 % (Taubert и сар., 1995; Dei Tos и сар., 1997; Oda и сар., 2005). Не само да се резултати разликују у односу на учесталост мутација, него и у погледу њихове дистрибуције. Поједини аутори наводе да су алтерације *p53* чешће у ОЋ компоненти тумора, док резултати других тимова указују да су мутације подједнако вероватне и у миксоидној компоненти. Деи Тос наводи да је стопа мутација 28,5 % и да њихова присутност није у вези са градусом тумора (Dei Tos и сар., 1997). Насупрот томе, други аутори указују да су мутације карактеристичне за ОЋ компоненту (Oda и сар., 2005). На основу претходно изнетог, могуће су две дијаметралне претпоставке: 1) мутација *p53* је рани догађај током развоја миксоидних липосаркома и 2) мутација *p53* је касни догађај током еволуције тумора и повезана је са појавом округлоћелијске

компоненте. Спровели смо директно секвенцирање узорака МЛПС да бисмо утврдили која од две претпоставке боље описује улогу p53 у патогенези МЛПС.

Мутациона анализа је показала присуство укупно три мутације у три узорка (16,67 %). Једна од мутација била је тиха (E286E), док је мутација G244C детектована у другом рецидиву истог тумора. Занимљиво је да се код трећег рецидива појавила ОЋ компонента, али мутација p53 није детектована. Овај пример нам показује да је настанак локалног рецидива липосаркома у корелацији са испољавањем микроскопских карактеристика агресивнијег хистолошког подтипа.

У једном од узорака детектован је полиморфизам R213R. Присуство овог полиморфизма детектовано је и у неколико претходних студија које су за тему имале мутациону анализу гена p53 у липосаркомима (Dei Tos и сар., 1997b; Schneider-Stock и сар., 1999; Taubert и сар., 1995). С обзиром на релативно мали број узорака у свакој од студија овај податак може да наведе на размишљање о могућем значају овог полиморфизма у патогенези адипозних тумора. Постоје индиције да је овај полиморфизам одговоран за повећан ниво експресије p53 на нивоу иРНК у туморима главе и врата (Ganci и сар., 2011). Истовремено, није показано да је присуство овог полиморфизма значајно за прогресију малигног тумора једњака (Pilger и сар., 2007).

Наша студија је показала да су мутације гена p53 присутне само у чистим миксоидним туморима. Међутим, мора се имати у виду да од укупног броја узорака МЛПС, само два тумора су имала мање од 5 % ОЋ компоненте, док је само један узорак окарактерисан као округлоћелијски липосарком. Резултати сугеришу да је мутација гена p53 релативно редак догађај, који је повезан са раним стадијумима патогенезе миксоидних липосаркома. Могуће је да алтерације гена p53 играју важну улогу током туморигенезе код мањег броја ових малигнитета. Експресија транслокационог продукта FUS-CHOP у мезенхималним матичним ћелијама пореклом из адипозног ткива код мишева са генотипом p53^{-/-} доводи до развоја миксоидног липосаркома, док код хуманих ћелија овакав

резултат изостаје (Rodriguez и сар., 2011). То указује да су потребне алтерације и других гена да би дошло до формирања фенотипа МЛПС.

Плеоморфни липосаркоми су ретки тумори високог градуса. Постоји свега неколико студија коју су испитивале учесталост мутација *p53* у овом подтипу липосаркома. Према доступним подацима стопа мутација се креће између 17-60 % (Schneider-Stock и сар., 1998; Fiore и сар., 2007; Barretina и сар., 2010). Резултати експеримента спроведеног на 143 узорка саркома (лејомиосаркоми, недиферентовани плеоморфни саркоми) показали су високу стопу мутација гена *p53* у овим туморима (Pérot и сар., 2010). Такође, анализе су показале да је *p53* сигнални пут измењен у свим испитиваним туморима, било присуством мутираног *p53* било генетским алтерацијама других чланова овог пута, попут *p14*. Ови налази указују да је мутација *p53* у саркомима са комплексном генетиком чест догађај. Ово је у супротности са налазима код саркома са специфичним транслокацијама, код којих је овај догађај релативно редак (Oda и сар., 2005). У нашој студији два од девет узорака (22,22%) ПЛПС су имали мутације на гену *p53*. У оба узорка су детектоване по две мутације, једна измењеног смисла и једна тиха мутација и повишена експресија самог протеина.

На основу података који се налазе у бази мутација *p53*, закључено је да мутација H168R укида способност регулисања експресије циљних гена од стране протеина *p53* (http://p53.fr/TP53Mutload/database_access/biochemical.php). Такође, на основу експеримената са ћелијама *Saos-2* у култури, закључено је да ова мутација може бити одговорна за отпорност ћелија на јонизујуће зрачење (http://p53.fr/TP53Mutload/database_access/gain.php). Мутација F270Y смањује способност протеина *p53* да иницира експресију *p21*, али не у значајнијој мери. Занимљиво је да измењени протеин показује већу активност у погледу регулације експресије гена, као што су *BAX* и *NOXA*, који кодирају протеине, чија функција је проапоптотска (OuYang и сар., 1998; Oda и сар., 2000). Није јасно какву улогу би могла имати мутација овог типа у развоју тумора. Могуће је да је она последица прогресије тумора и да се налази у мањој субпопулацији туморских ћелија. Постоји и могућност да је ово *passenger* мутација, а да се *driver* мутација налази у

региону гена који није секвенциран.

Релативно мала учесталост мутација забележена у плеоморфном подтипу, у овој студији, могла би да се објасни променама које захватају друге гене истог пута, поготово *p14*.

Познато је да алтерације гена *p14* имају сличне функционалне последице као и мутације гена *p53* (Pérot и сар., 2010). Стога је битно утврдити учесталост и значај метилације промотора *p14*, као једног од главних механизма инактивације овог гена (Chin и сар., 1998; Ozenne и сар., 2010). Студија на лејомиосаркомима и недиферентованим плеоморфним саркомима показала је одсуство метилације промотора *p14* у ова два типа саркома (Perot и сар., 2010). Кавагучи и сар. су показали ниску учесталост метилације *p14* (3%) у истраживању које је укључивало 65 узорака саркома различитих типова (Kawaguchi и сар., 2006). Међутим, показано је да је метилација *p14* чест догађај у остеосаркомима (47%) као и да је повезана са лошом прогнозом (Oh и сар., 2006). У ангиосаркомима забележена је стопа метилације од 26% и утврђено је да метилација промотора *p14* корелише са експресијом иРНК, као и да је независна од мутационог статуса *p53* (Weihrauch и сар., 2002). С друге стране, *p14* не игра значајну улогу у патогенези хондросаркома, где ни у једном случају није забележена метилација промотора овог гена (Asp и сар., 2001).

До данас је урађена само једна студија која се бавила значајем *p14* у патогенези липосаркома и то миксоидног подтипа. Истраживање је показало да је метилација промотора гена *p14* значајан механизам током прогресије миксоидних липосаркома (Oda и сар., 2005). У складу са тим аутори су установили да је метилација приметно учесталија у случајевима где ОЋ компонента заузима више од 5% запремине тумора (35,3% наспрам 4,7%). Резултати наше студије показују да је метилација *p14* чест догађај у миксоидном подтипу (77,78%) и да није повезана са ОЋ компонентом. Овакву разлику у резултатима могуће је објаснити разликом у величини узорка, као и клиничко-патолошким параметрима пацијената који су били укључени у ова два истраживања. У студији коју су спровели Ода и

сар. око 70% испитаника било је млађе од 40 година (просек 46,4 године). Поред тога, 75% тумора имало је пречник мањи од 5 см. У нашој студији није било испитаника млађег од 50 година (просек 62,5 година), док је око 75% тумора имало пречник већи од 5 см. Постоје индикације да се експресија *p14* повећава током старења, бар у неким ткивима (von Keyserling и сар., 2011). С обзиром на то, могуће је да висока учесталост метилације представља додатни механизам којим малигна ћелија инхибира експресију *p14*. Резултати појединих студија иду у прилог наведеној хипотези (Zheng и сар., 2000; Herath и сар., 2002). На основу свега изнетог, може се закључити да је метилација *p14* рани догађај у патогенези миксоидног подтипа липосаркома.

У литератури не постоје подаци о учесталости метилације *p14* у плеоморфним и добродиферентованим липосаркомима. Метилациона анализа је показала високу учесталост метилације *p14* у плеоморфном подтипу (55,56%; 5/9). Није утврђена разлика у погледу фреквенције између примарних тумора и локалних рецидива. Два узорка, плеоморфног подтипа, код којих је детектована мутација *p53* нису имали метилован промотор *p14*. Занимљиво је да је у два узорка миксоидног подтипа у којима су детектоване мутације *p53* установљена и метилација *p14*. Ово указује на могуће другачије улоге *p14* у плеоморфним и миксоидним липосаркомима.

Најзад у групи добродиферентованих липосаркома промотор *p14* био је метилован у два од шест случајева. Слично као и код миксоидних липосаркома, вероватно је да се метилацијом онемогућавају функције *p14*, које нису у склопу *p53-p14* сигналног пута, а које су битне за патогенезу тумора. Међутим, мали број узорака не дозвољава доношење дефинитивних закључака.

Rb-p16 сигнални пут представља један од најчешће измењених путева сигнала у малигним туморима (Kubo и Кауе, 2001). Чест механизам инактивације овог пута представљају делеција или метилација *p16* (Esteller и сар., 2001; Kim and Sharpless, 2006). Смањена експресија протеина *p16* повезана је са прогресијом и смањеном стопом преживљавања код различитих типова малигних болести

(Kawaguchi и сар., 2003). Исто тако, смањена експресија повезана је са лошом прогнозом остеосаркома код деце (Maitra и сар., 2001). Резултати више студија су показали да је *p16* делетиран у 5-26% саркома меких ткива (Maelandsmo и сар., 1995; Miller и сар., 1996; Nielsen и сар., 1998). Утврђено је да је метилација *p16* релативно чест догађај у лејомиосаркомима (Kawaguchi и сар., 2003), док код хондросаркома корелише са високим градусом тумора (Asp и сар., 2001). Бенаси и сар. на основу резултата истраживања закључују да је метилација промотора *p16* битан елемент у патогенези остеосаркома (Benassi и сар., 2001). Висока учесталост метилације гена *p16* нађена је и у ангиосаркомима јетре (63%) (Weihrauch и сар., 2002). Међутим, иста студија је показала да промене на локусу INK4a-ARF нису независан прогностички фактор у овој групи саркома меких ткива.

Улога метилације *p16*, у патогенези липосаркома, је испитивана у неколико студија. Ниједна није утврђивала учесталост и потенцијални значај овог феномена у плеоморфним липосаркомима. Хе и сар. испитивали су улогу метилације промотора *p16* у процесу дедиференцијације у групи добродиферентованих тумора (He и сар., 2009). Експериментални дизајн је подразумевао поређење метилационог статуса *p16* између добродиферентоване и дедиферентоване компоненте у оквиру истог тумора. Испитиван је и метилациони статус у оквиру локалних рецидива добродиферентованих тумора. Метилација је забележена само у дедиферентованим деловима липосаркома. То је било довољно да аутори закључе да је епигенетичка алтерација *p16* важан догађај у процесу дедиференцијације. Насупрот томе, метилација *p16* није одговорна за патогенезу МЛПС/ОЋЛПС (Oda и сар., 2005).

Наша студија је показала ниску учесталост метилације *p16* у липосаркомима као групи (4/33, 12,12%). Важан резултат метилационе анализе је налаз да је промотор *p16* био метилован у једној трећини узорака плеоморфног подтипа. Интересатно, метилација је била присутна у локалним рецидивима, али не и у примарним туморима. Закључавање промотора гена *p16* могло би да утиче на повећање геномске нестабилности што за последицу има нове добитке и

губитке генетског материјала (енгл. *gains and losses*) (McDermott и сар., 2006). Крајњи резултат би био прогресија тумора. Индикативно је да је појава локалних рецидива предиктор лоше прогнозе код испитаника оболелих од плеоморфног липосаркома (Ghadimi и сар., 2011). Експресија протеина p16 није корелисала са метилацијом промотора гена у оквиру плеоморфног подтипа. Непостојање везе може да се објасни на више начина. Један од фактора, који се мора имати у виду, је разлика у осетљивости између ланчане реакције полимеразе и имунохистохемијске методе. Употреба различитих антитела, као и различито дефинисане скале за оцену експресије протеина, могу да доведу до значајно различитих резултата. Уз све то оцена имунохистохемијског бојења зависи донекле и од “ока посматрача” (Quillien и сар., 2012), односно представља субјективну интерпретацију налаза што корелира са искуством патолога. У сваком случају, непостојање корелације између степена метилације промотора гена у туморском ткиву и експресије протеина одређене имунохистохемијском методом, не значи нужно непостојање биолошких ефеката метилације промотора.

p16 је био метилован само у једном од осамнаест миксоидних/округлоћелијских тумора. Метилација p16 може да се појави током прогресије миксоидних тумора као резултат деловања различитих селективних притисака, али овај догађај је редак и не игра важну улогу у еволуцији овог подтипа. Закључак кореспондира са налазима Одине групе (Oda и сар., 2005).

Ниједан добродиферентован липосарком није имао метилован промотор гена p16. Наша група узорака није обухватила туморе са дедиферентованом компонентом, тако да нисмо у стању да потврдимо или оповргнемо тезу о улози метилације p16 у процесу дедиференцијације (He и сар., 2009). Међутим, истраживање које је спроведено у циљу испитивања алтерација гена укључених у контролу ћелијског циклуса у подгрупи ДДЛПС/ДЛПС која не експримира CDK4, није показало метилацију p16 ни у једном од шест испитиваних узорака дедиферентованих липосаркома (Louis-Brennetot и сар., 2011). Могуће је да је метилација коју су утврдили Хе и сар. само последица, а не један од узрока, еволуције тумора и да није чест догађај.

Експресија протеина p16 испитивана је у различитим типовима саркома. Резултати се разликују зависно од испитиване групе тумора. Недавно објављено истраживање Кнесела и сар. показало је да постоји инверзна корелација између експресије p16 и преживљавања код саркома са специфичним транслокацијама (Knösel и сар., 2014). Такође, експресија је повезана са феноменом ћелијског старења. То значи да туморска ћелија мора да нађе начин да прекине експресију p16. Један од начина је метилација промотора гена *p16* (Esteller и сар., 2001).

Ода и сар. регистровали су знатно већу експресију p16 у округлоћелијској него у миксоидној компоненти липосаркома (Oda и сар., 2005). Овај налаз сугерише да је p16 укључен у прогресију ове групе тумора. Међутим, у сличној студији Олофсон и сар. нису приметили разлике у експресији између компоненти ниског и високог градуса (Olofsson и сар., 2004). Непостојање корелације између p16 и хистолошког градуса забележено је и у истраживању које је обухватило 59 узорака саркома различитих диференцијација (Cohen и Geradts, 1997). Повишена експресија протеина p16 је констатована у 28% случајева. Студија је обухватила и 5 липосаркома, од којих је само један показао промену у експресији протеина p16. Међутим, аутори нису навели о којем подтипу или подтипovima липосаркома је реч. Сличне резултате добили су и Шим и сар. (Shim и сар., 2010). Они су испитивали промену експресије pRb, p16 и циклина D1 у 66 узорака саркома меких ткива. Прекомерна експресија протеина p16 детектована је у 36% узорака. Ова промена није била повезана са градусом тумора као ни са стопом преживљавања. У анализу је било укључено и шест липосаркома за које није наведен подтип; имунореактивност на протеин p16 није забележена ни у једном случају. Нилсен и сар. су показали да је експресија p16 измењена у узорцима остеосаркома код којих је ген *Rb* интактан (Nielsen и сар., 1998). Занимљиво је да је експресија p16 повезана са одговором на хемотерапију код пацијената оболелих од овог типа саркома (Wong и сар., 2012). Студија на узорцима недиферентованог плеоморфног саркома (малигни фиброзни хистиоцитом према класификацији СЗО из 2002. године) показала је корелацију између експресије протеина p16 и прогнозе, као и да је метилација промотора гена *p16* једним делом одговорна за

инхибицију експресије (Brinck и сар., 2006).

Анализа експресије протеина p16, у нашој студији, показала је повећане нивое протеина у 84,49% узорак липосаркома. Добродиферентовани липосаркоми су показали позитивно бојење на p16 у 50% случајева (3/6). Могло би се претпоставити да је појачана експресија p16 рани догађај током туморигенезе ДДЛПС и да представља одговор на алтерације у p53-p14 и Rb-p16 сигналним путевима. Овај тип тумора у великом броју случајева (око 90%) експримира циклин зависну киназу 4 (CDK4), која врши фосфорилацију pRb, што за последицу има активацију регулаторног протеина E2F и последичну стимулацију ћелијске пролиферације. С обзиром на то, повећана експресија протеина p16 би могла бити покушај ћелије да се поново успостави равнотежа. Друго објашњење је да *HMGA2*, који је умножен заједно са *MDM2* у ДДЛПС/ДЛПС (Italiano и сар., 2008), подстиче експресију p16 и на тај начин игра улогу у процесу ћелијског старења (Narita и сар., 2006). Током еволуције тумора селективну предност имале би ћелије, које би на неки начин успеле да анулирају ефекте протеина p16. Као што је већ поменуто, ген *p16* је често делетиран или метилован у туморима (Россо, 2001). Будући да није показана метилација промотора гена ни у једном случају ДДЛПС, делеција остаје као једна од могућности. Ипак, делеције *CDKN2A* локуса у ДДЛПС/ДЛПС подтипу су ретка појава (Italiano и сар., 2009; Louis-Brennetot и сар., 2011). Постоји још једна опција у којој би туморске ћелије анулирале утицај протеина p16, а да није дошло до генетичке или епигенетичке алтерације одговарајућег гена. Наиме, од шест анализираних ДДЛПС у три узорка није забележена експресија протеина p16 као ни метилација промотора гена *p14*, док је у два случаја у којима је утврђена повећана експресија p16, детектована и метилација промотора гена *p14*. Могуће је да је, као што су показали Кобајаши и сар. (Kobayashi и сар., 2013), протеин p14 укључен у регулацију нивоа протеина p16, тако што стимулише његову разградњу у протеазому. Ипак, ово објашњење није у складу са опсервацијом Луј-Бреноа и сар. да већина ДДЛПС са ниском експресијом протеина p16 показује и низак ниво експресије протеина p14 (Louis-Brennetot и сар., 2011). Међутим, непостојање експресије протеина p16 у три

узорка ДДЛПС, може да се сагледа и са другог становишта. Показано је да ниво протеина p53 у ћелији утиче на експресију протеина p16. Мишеви са генотипом *p53^{-/-}* или са измењеним геном *p53* појачано експримирају p16 у односу на мишеве са неизмењеним *p53* (Leong и сар., 2009). Наша анализа је показала да узорци код којих није забележена имунореактивност на p16, имају између 11 и 25% ћелија које експримирају p53, док је удео позитивних ћелија 5-10 % када је p16 експримиран. У сваком случају потребне су даље анализе експресије p16 да би се добила јаснија представа о његовој улози у ДДЛПС.

МЛПС/ОЋЛПС су показали прекомерну експресију протеина p16 у 16 од 18 узорака (88,89%). ОЋ компонента је показала већу експресију у односу на одговарајућу миксоидну компоненту, што указује на могућност да је протеин p16 на неки начин повезан са прогресијом МЛПС/ОЋЛПС. Повећана експресија протеина p16 у ОЋ компоненти могла би да буде последица већег броја поремећаја не само у оквиру пута Rb-p16, него и у другим сигналним путевима у ћелији. Оправдано је претпоставити да је појачана експресија протеина p16 у вези са процесом ћелијског старења (Knösel и сар., 2014). Претпоставка је подржана налазом да је у групи МЛПС/ОЋЛПС експресија протеина циклина D1 повишена у свим узорцима, осим једног, где је експримиран протеин p16. У складу са претпоставком је и налаз да су циклин зависне киназе 4 и 6 експримиране у великом броју МЛПС (Dei Tos и сар., 1997). Познато је да постоји директна веза између Rb-p16 и p53-p14 путева. Регулаторни протеин E2F, осим што врши активацију транскрипције гена значајних за пролиферацију, индукује и транскрипцију гена *p14* (Bates и сар., 1998). Ово је сигурносни механизам, који спречава неконтролисану деобу ћелије. Наша студија је показала да је овај механизам вероватно инактивиран у великом броју испитиваних МЛПС, метилацијом промотора гена *p14*. Премошћавањем антипролиферативне функције p16 (прекомерна експресија циклина D1) и инактивирањем гена *p14* (метилација промотора), туморске ћелије би уклониле две велике препреке на путу даље малигне еволуције.

Плеоморфни липосаркоми показали су позитивно бојење на p16 у свим

испитиваним случајевима. Овај налаз је у складу са резултатима студије Гадими и сарадника (Ghadimi и сар., 2011). Повишена експресија циклина p16 у свим испитиваним туморима плеоморфног подтипа могла би да буде у вези са његовом улогом у процесу ћелијског старења. Међутим, поједини аутори сматрају ову претпоставку мало вероватном услед природе биохемијских процеса у плеоморфним липосаркомима (Knösel и сар., 2014). Стога је вероватније да је добијени резултат последица узнатредовале малигне трансформације ћелија. Ова претпоставка делује контрадикторно, али је показано да повећан ниво протеина p16 може бити компатибилан са малигном прогресијом (Pérot и сар., 2010).

Циклин D1 је важна компонента система регулације ћелијског циклуса. Везивање циклина D1 за циклин зависне киназе 4 и 6 доводи до фосфорилације протеина Rb. Прекомерна експресија овог молекула присутна је у различитим групама тумора, као што су малигни тумори дојке, плућа, дебелог црева и једњака (Kim и сар., 2001). Испитивање улоге циклина у саркомима меких ткива повезује експресију циклина D1 са лошом прогнозом, мада у неким студијама таква веза није утврђена (Kim и сар, 2001; Shim и сар., 2010). Противречни резултати су у великој мери последица хистопатолошке разноликости узорака који се испитују у појединачним истраживањима. Ким и сар. су утврдили да је повећана експресија циклина D1 повезана са хистолошким градусом тумора, као и са лошом прогнозом код саркома меких ткива који су лоцирани у екстремитетима (Kim и сар., 1998). Слична студија на саркомима који су дијагностиковани у ретроперитонеуму није показала корелацију са градусом тумора (Kim и сар., 2001). Студија је укључила и 43 узорка липосаркома од којих је 25 (58%) показало експресију циклина D1. Показано је да тумори са високим градусом и повећаном експресијом циклина D1 имају нарочито лошу прогнозу. Масела и сар. на узорку од 62 саркома различитих типова, који су били лоцирани у ретроперитонеуму или екстремитетима, показали су да осим са градусом, експресија циклина D1 корелише са појавом локалних рецидива и статусом хируршких маргина (Musella и сар., 2005). Насупрот резултатима наведених истраживања, Шим и сар. нису утврдили везу између хистолошког градуса и стопе преживљавања, с једне, и експресије циклина D1, са

друге стране (Shim и сар., 2010). Претходне две студије нису показале повећање нивоа циклина D1 код липосаркома. Разлог може бити мали број узорака. Истраживање које су извршили Деи Тос и сар. сугерише да је улога циклина D1 у патогенези миксоидних липосаркома врло ограничена (Dei Tos и сар., 1997). Анализа експресије протеина укључених у регулацију ћелијског циклуса показала је имунореактивност на циклин D1 у 1/3 узорака плеоморфних липосаркома (Ghadimi и сар., 2011). Узорци дедиферентованих липосаркома, који су служили као контрола, показали су прекомерну експресију у 100 % случајева.

Имунохистохемијском методом утврдили смо позитивно бојење на циклин D1 у 61,29 % узорака (19/31). Експресија циклина није била у вези са градусом, као ни са величином тумора. ПЛПС су показали прекомерну експресију у 66,67 % узорака. Овај резултат је знатно другачији у односу на онај који су добили Гадими и сар. Разлика је вероватно последица знатно мањег броја плеоморфних тумора у нашој студији (9 према 155). Међутим, на овај начин не може да се објасни разлика између Деи Тосове и ове студије у погледу експресије циклина D1 у миксоидном подтипу липосаркома. Наше истраживање је показало знатан број МЛПС који експримирају циклин D1 (62,5 %), док је у претходно поменутој студији повећан ниво циклина D1 установљен само у 9,5 % случајева. Велика међустудијска варирања попут овог су честа у истраживању липосаркома. Углавном их је тешко објаснити. Могуће је да алтерације у експресији других чланова пута, као што су циклин зависне киназе 4 и 6, имају сличне последице као и повећан ниво циклина D1. Деи Тос и сар. су утврдили абератну експресију циклин зависних киназа 4 и 6 у 86% случајева МЛПС/ОЋЛПС (Dei Tos и сар., 1997).

Измењена експресија циклина D1 детектована је у 2 од 5 узорака ДДЛПС. Италијано и сар. су испитивали експресију циклина D1 на нивоу иРНК и протеина и констатовали су повећану експресију у 14 од 20 и 15 од 19 ДДЛПС, редом (Italiano и сар., 2009). Подаци указују на могућу улогу циклина D1 у раним стадијумима туморигенезе ДДЛПС.

Одређивање експресије Ki-67 је веома важно у процени пролиферативног капацитета тумора (Dziegiel и сар., 2005). У принципу показано је да експресија овог фактора корелише са градусом код саркома меких ткива и костију, укључујући и липосаркоме (Dziegiel и сар., 2005; Heslin и сар., 1998; Lonardo и сар., 1997; Schneider-Stock и сар., 1999), као и да је биолошки маркер лоше прогнозе (Heslin и сар., 1998). Ситуација је другачија када је у питању корелација између експресије протеина p53 и Ki-67. Кавагучи саопштава позитивну корелацију између експресија ова два протеина у остеосаркомима (Kawaguchi и сар., 2002), док Лонардо и сар. нису утврдили везу између ова два параметра (Lonardo и сар., 1997). Туна и сар. у студији, која је укључила липоме и липосаркоме, нису пронашли да имунорективност на протеин p53 корелише са пролиферативним статусом туморских ћелија (Tuna и сар., 2004). Наши резултати су потврдили позитивну корелацију између Ki-67 и градуса тумора у оквиру липосаркома као групе. Показано је и да експресије протеина p53 и p16 корелишу са експресијом протеина Ki-67. Занимљиво је осврнути се на последње поменуто корелацију. Као што је већ поменуто, могуће је да је повишена експресија протеина p16 у плеоморфним липосаркомима последица прогресије тумора. Корелација између нивоа протеина p16 и Ki-67 ишла би у прилог овој претпоставци. Резултати ове студије сугеришу да је експресија протеина Ki-67 добар показатељ малигног потенцијала у оквиру липосаркома као групе.

Метилациони статус промотора гена *p14* и *p16* у овој студији одређен је методом МСП. Метода је економична, лака за извођење у лабораторији и веома осетљива (Herman и сар., 1996). Међутим, МСП детектује само потпуно метиловане или неметиловане алеле. Поред тога, метода је квалитативна, тако да не постоји дефинисана граница која би одређивала када се испитивани узорак класификује као метилован, а када као неметилован. Ипак, главни проблем у експлоатацији је могућност да се добију лажно позитивни резултати (Hernández и сар., 2013). Они могу бити последица непотпуне бисулфитне модификације геномске ДНК, као и немогућности прајмера да разликује метиловани од неметилованог алела (Brandes и сар., 2007; Kristensen и сар., 2012). Постоји више

публикација у којима су проверавани резултати добијени коришћењем МСП методе. Показано је да су резултати, извесног броја истраживања, лажно позитивни. До и сар. након опсежне провере резултата претходних студија употребом методе ТВР-ОМ (топљење високе резолуције осетљиво на метилацију), закључују да је учесталост метилације промотора гена: *ATM*, *MLH1*, *BRCA1* и *XPC* прецењена у случају малигнух тумора плућа (Do и сар., 2014). Закључак проширују констатацијом да је у метилационим студијама неопходно користити поузданије методе него што је МСП. У претходној студији Брандс и сар. такође су показали да је учесталост метилације тумор супресора *ATM* прецењен у туморима плућа, услед употребе неадекватних прајмера за умножавање метилованог алела (Brandes и сар., 2007). Кристенсен и његов тим предлажу употребу методе, која комбинује квантитативни МСП и методу ТВР-ОМ (Kristensen и сар., 2012). Оваква метода је у могућности да открије лажно позитивне резултате. Све ово може да доведе у питање поузданост саме методе, па тако и резултате нашег истраживања. Анализом студија у којима су добијени лажно позитивни резултати утврдили смо да је у великом броју случајева у питању лош дизајн прајмера. Коришћени прајмери су дизајнирани без придржавања два основна правила, а то су: а.) у циљу избегавања умножавања геномске ДНК, прајмери би требало да на 3' крајевима садрже неколико цитозина, који нису у склопу динуклеотида CG, б.) да би прајмери могли да праве разлику између метиловане и неметиловане секвенце ДНК, 3' крај мора да садржи бар један CG (Brandes и сар., 2007; Kristensen и сар., 2012).

С обзиром на велики значај и широку примену методе, а у циљу повећања квалитета дизајнираних прајмера, предложили смо једноставан *in silico* протокол. Он подразумева следећа четири корака: а.) проналажење секвенце промотора гена од интереса, б.) дефинисање дела промотора који ће служити као матрица за дизајн прајмера, в.) одабир одговарајућег програма за дизајн прајмера и г.) селекција пара прајмера на основу *in silico* анализе (Davidović и сар., 2014).

Проблему добијања информације о секвенци промотора посвећено је мало пажње у литератури. Срећом, имплементација напредних технологија, у области

молекуларне генетике, омогућила је карактеризацију промоторских региона гена на нивоу генома (Dreos и сар., 2013; Tsuchihara и сар., 2009). Ово је омогућило настанак база података, које садрже информације о позицији места почетака транскрипције и секвенци промотора циљног гена. ДБТСС (енгл. *Database of Transcriptional Start Sites*) и ЕПД (енгл. *Eucaryotic Promoter Database*) су управо две такве базе, које имају добро покривање и поузданост. Базама се може приступити преко следећих веза: <http://dbtss.hgc.jp/> и <http://epd.vital-it.ch/>.

Дефинисање дела промотора у којем ће прајмери хибридизовати је кључан за успех метилационе студије. Наш предлог је да се пре одлуке, дефинишу тзв. стратешке и рестриктивне тачке. Прве указују на места, у оквиру промотора, где би хибридизација прајмера била сврсисходна. Место почетка транскрипције (МПТ) као и места везивања регулаторних протеина представљају стратешке тачке, које умногоме одређују позиције прајмера. Чест је случај да се прајмери смештају у близину МПТ. Разлог је претпоставка да метилација у околини МПТ има велики утицај на транскрипцију. Такође, дизајнирање прајмера на начин да покрију места везивања регулаторних протеина, битних у регулацији генске активности, је друга могућа стратегија (Zhu и сар., 2004). Супротно овоме, рестрикционе тачке дају информацију о местима у промотору, која нису погодна као матрица за дизајн прајмера. Делови секвенце промотора који имају високу хомологију са одговарајућим псеудогеном, као и сегменти која садрже полиморфизме, морају бити идентификовани и искључени из процеса одлучивања. У супротном резултати могу бити лажно позитивни, као што је био случај са одређивањем метилационог статуса гена *PTEN* или гена *BRCA1* (Do и сар., 2014; Zysman и сар., 2002). Овакви случајеви могу бити елиминисани провером специфичности прајмера помоћу програма БиСерч (енгл. *BiSearch*), опција *ePCR*, који је доступан на интернет адреси <http://bisearch.enzim.hu/>.

Постоји доста програма, који су развијени са циљем да дизајнирају прајмере за МСП. Програми као што су Метпрајмер (енгл. *Methprimer*) и Метилпрајмер експрес (енгл. *Methylprimer express*) пружају сасвим солидну основу за успешан дизајн прајмера.

На основу *in silico* анализе, која је укључила пет промоторских региона одабраних гена, закључено је да се прајмери задовољавајућег квалитета могу добити ако се параметри задају на следећи начин: а) број CpG од 2 до 4 по прајмеру, б.) број цитозина ван CpG четири и више, с тим да је пожељно да су у близини 3' краја и ц.) температура топљења између 60°C и 70°C (Davidović и сар., 2014).

Добијени прајмери се даље испитују на способност формирања секундарних структура (димери прајмера, стварање укосница). Специфичност везивања, у оквиру бисулфитно модификованог генома, проверава се уз помоћ БиСерча.

Предложени протокол требало би да омогући како дизајнирање прајмера задовољавајуће специфичности, тако и проверу прајмера из литературе. *In silico* анализа показала је да парови прајмера дизајнирани да специфично амплификују метиловане алеле p14 и p16 (Bugti и сар., 2001), нису успели да задовоље горе наведене критеријуме. Као прво, температуре хибридизације су доста ниске, што поспешује неспецифична везивања прајмера (Rand и сар., 2002). Ниске температуре хибридизације парова прајмера, који су коришћени у студији Буријеве и сар. је последица њихове дужине (18 и 20 базних парова). Даље, прајмери специфични за p16 имају укупно три динуклеотида CG, с тим да су два која се налазе у оквиру антисенс прајмера постављени ближе 5' крају. Ситуација је слична са прајмерима за p14, где сваки од прајмера има само по један динуклеотид CG. Ако и ставимо по страни питање способности оваквих прајмера да разликују метиловани од неметилованог алела, остаје питање да ли су два или три динуклеотида CG довољна да се да поуздана оцена метилационог статуса гена.

Прајмери које смо користили у овој студији, за процену метилационог статуса гена p14 и p16 (Herzian и сар., 1996), имају довољан број динуклеотида CG, који су добро позиционирани. Сваки од прајмера поседује бар два динуклеотида CG на 3' крају. Ситуација је унеколико другачија у погледу позиционирања конвертованих цитозина унутар секвенце прајмера. Наиме, сенс

прајмери за р14 и р16 имају три односно четири конвертована цитозина, али само по један на 3' крају. Међутим, добар распоред цитозина у антисенс прајмерима надокнађује овај недостатак.

6. Закључци

Резултати наше студије су показали следеће:

1. Промене у сигналним путевима p53-p14 и p16-Rb могу имати значаја у патогенези сва три подтипа липосаркома. Разлике се огледају у квалитету и квантитету промена.

2. Метилација промотора гена *p14* чест је догађај у миксоидном и плеоморфном подтипу. Ова промена се јавља рано током развоја тумора.

3. Мутације гена *p53* нису детектоване у добродиферентованим липосаркомима, док су у остала два подтипа релативно редак догађај. Алтерације гена *p53* нису ограничене само на ОЋ компоненту у МЛПС/ОЋЛПС.

4. Метилација промотора гена *p16* потенцијално је значајна за касније фазе еволуције плеоморфних тумора, док у остала два подтипа није од значаја за туморигенезу.

5. Промене на нивоу експресије протеина p16 и циклина D1 рани су догађаји током развоја сва три подтипа липосаркома.

6. Експресија пролиферативног фактора Ki-67 корелише са градусом испитиваних тумора и добар је показатељ њиховог малигног потенцијала.

7. Ниједан испитивани параметар није показао корелацију са полом, старосном доби и величином тумора.

8. Предложени *in silico* протокол може да помогне да се препознају прајмери ниског квалитета и избегну лажно позитивни резултати у метилационој студији.

7. Литература

- Antonescu, C.R., Tschernyavsky, S.J., Decuseara, R., Leung, D.H., Woodruff, J.M., Brennan, M.F., Bridge, J.A., Neff, J.R., Goldblum, J.R., Ladanyi, M., 2001. Prognostic impact of P53 status, TLS-CHOP fusion transcript structure, and histological grade in myxoid liposarcoma: a molecular and clinicopathologic study of 82 cases. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 7, 3977–3987.
- Asano, N., Susa, M., Hosaka, S., Nakayama, R., Kobayashi, E., Takeuchi, K., Horiuchi, K., Suzuki, Y., Anazawa, U., Mukai, M., Toyama, Y., Yabe, H., Morioka, H., 2012. Metastatic Patterns of Myxoid/Round Cell Liposarcoma: A Review of a 25-Year Experience. *Sarcoma* 2012, 1–6. doi:10.1155/2012/345161
- Asp, J., Brantsing, C., Benassi, M.S., Inerot, S., Sangiorgi, L., Picci, P., Lindahl, A., 2001. Changes in p14(ARF) do not play a primary role in human chondrosarcoma tissues. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 93, 703–705.
- Bai, L., Zhu, W.-G., 2006. p53: structure, function and therapeutic applications. *J. Cancer Mol* 2, 141–153.
- Baird, K., Davis, S., Antonescu, C.R., Harper, U.L., Walker, R.L., Chen, Y., Glatfelter, A.A., Duray, P.H., Meltzer, P.S., 2005. Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology. *Cancer Res.* 65, 9226–9235. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1699
- Barretina, J., Taylor, B.S., Banerji, S., Ramos, A.H., Lagos-Quintana, M., DeCarolis, P.L., Shah, K., Socci, N.D., Weir, B.A., Ho, A., Chiang, D.Y., Reva, B., Mermel, C., Getz, G., Antipin, Y., Beroukhi, R., Major, J.E., Hatton, C., Nicoletti, R., Hanna, M., Sharpe, T., Fennell, T., Cibulskis, K., Onofrio, R.C., Saito, T., Shukla, N., Lau, C., Nelander, S., Silver, S., Sougnez, C., Viale, A., Winckler, W., Maki, R.G., Garraway, L.A., Lash, A., Greulich, H., Root, D., Sellers, W.R., Schwartz, G.K., Antonescu, C.R., Lander, E.S., Varmus, H.E., Ladanyi, M., Sander, C., Meyerson, M., Singer, S., 2010. Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft tissue sarcoma therapy. *Nat. Genet.* 42, 715–721. doi:10.1038/ng.619
- Bartolomei, M.S., Ferguson-Smith, A.C., 2011. Mammalian Genomic Imprinting. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a002592. doi:10.1101/cshperspect.a002592
- Bates, S., Phillips, A.C., Clark, P.A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R.L., Vousden, K.H., 1998. p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 395, 124–125. doi:10.1038/25867
- Benassi, M.S., Molendini, L., Gamberi, G., Magagnoli, G., Ragazzini, P., Gobbi, G.A., Sangiorgi, L., Pazzaglia, L., Asp, J., Brantsing, C., 2001. Involvement of INK4A gene products in the pathogenesis and development of human osteosarcoma. *Cancer* 92, 3062–3067.
- Bennani-Baiti, I.M., 2011. Epigenetic and epigenomic mechanisms shape sarcoma and other mesenchymal tumor pathogenesis. *Epigenomics* 3, 715–732. doi:10.2217/epi.11.93
- Bergman, 2009. Epigenetic silencing during early lineage commitment. *StemBook*. doi:10.3824/stembook.1.42.1

- Bernstein, B.E., Meissner, A., Lander, E.S., 2007. The Mammalian Epigenome. *Cell* 128, 669–681. doi:10.1016/j.cell.2007.01.033
- Berrington de Gonzalez, A., Kutsenko, A., Rajaraman, P., 2012. Sarcoma risk after radiation exposure. *Clin. Sarcoma Res.* 2, 18. doi:10.1186/2045-3329-2-18
- Bode-Lesniewska, B., Frigerio, S., Exner, U., Abdou, M.T., Moch, H., Zimmermann, D.R., 2007. Relevance of translocation type in myxoid liposarcoma and identification of a novel EWSR1-DDIT3 fusion. *Genes. Chromosomes Cancer* 46, 961–971. doi:10.1002/gcc.20478
- Borys, D., Canter, R.J., Hoch, B., Martinez, S.R., Tamurian, R.M., Murphy, B., Bishop, J.W., Horvai, A., 2012. P16 expression predicts necrotic response among patients with osteosarcoma receiving neoadjuvant chemotherapy. *Hum. Pathol.* 43, 1948–1954. doi:10.1016/j.humpath.2012.02.003
- Bourc'his, D., Xu, G.L., Lin, C.S., Bollman, B., Bestor, T.H., 2001. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 294, 2536–2539. doi:10.1126/science.1065848
- Boyum, A., 1968. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. *Scan J Clin Lab Invest* 21, 77, suppl. 97.
- Brait, M., Sidransky, D., 2011. Cancer epigenetics: above and beyond. *Toxicol. Mech. Methods* 21, 275–288. doi:10.3109/15376516.2011.562671
- Brandes, J.C., Carraway, H., Herman, J.G., 2007. Optimal primer design using the novel primer design program: MSPprimer provides accurate methylation analysis of the ATM promoter. *Oncogene* 26, 6229–6237. doi:10.1038/sj.onc.1210433
- Brinck, U., Schlott, T., Störber, S., Stachura, J., Bortkiewicz, P., Nagel, W.-D., Hasse, F.M., Cordon-Cardo, C., Fischer, G., Korabiowska, M., 2006. Alterations of the retinoblastoma and p16 pathway correlate with promoter methylation in malignant fibrous histiocytomas. *Anticancer Res.* 26, 3461–3465.
- Bruniquel, D., Schwartz, R.H., 2003. Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. *Nat. Immunol.* 4, 235–240. doi:10.1038/ni887
- Burri, N., Shaw, P., Bouzourene, H., Sordat, I., Sordat, B., Gillet, M., Schorderet, D., Bosman, F.T., Chaubert, P., 2001. Methylation Silencing and Mutations of the p14ARF and p16INK4a Genes in Colon Cancer. *Lab. Invest.* 81, 217–229. doi:10.1038/labinvest.3780230
- Cheng, X., Blumenthal, R.M., 2010. Coordinated Chromatin Control: Structural and Functional Linkage of DNA and Histone Methylation. *Biochemistry (Mosc.)* 49, 2999–3008. doi:10.1021/bi100213t
- Chen, Z., Riggs, A.D., 2005. Maintenance and regulation of DNA methylation patterns in mammals. *Biochem. Cell Biol.* 83, 438–448. doi:10.1139/o05-138
- Chen, Z.-X., Mann, J.R., Hsieh, C.-L., Riggs, A.D., Chédin, F., 2005. Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family. *J. Cell. Biochem.* 95, 902–917. doi:10.1002/jcb.20447
- Chilukamarri, L., Hancock, A.L., Malik, S., Zabkiewicz, J., Baker, J.A., Greenhough, A., Dallosso, A.R., Huang, T.H.-M., Royer-Pokora, B., Brown, K.W., Malik, K., 2007. Hypomethylation and Aberrant Expression of the Glioma Pathogenesis-Related 1 Gene in Wilms Tumors. *Neoplasia N. Y.* N 9, 970–978.

- Chin, L., Pomerantz, J., DePinho, R.A., 1998. The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene—two products—two pathways. *Trends Biochem. Sci.* 23, 291–296. doi:10.1016/S0968-0004(98)01236-5
- Chuang, L.S., Ian, H.I., Koh, T.W., Ng, H.H., Xu, G., Li, B.F., 1997. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* 277, 1996–2000.
- Cironi, L., Provero, P., Riggi, N., Janiszewska, M., Suva, D., Suva, M.-L., Kindler, V., Stamenkovic, I., 2009. Epigenetic Features of Human Mesenchymal Stem Cells Determine Their Permissiveness for Induction of Relevant Transcriptional Changes by SYT-SSX1. *PLoS ONE* 4, e7904. doi:10.1371/journal.pone.0007904
- Cohen, J.A., Geradts, J., 1997. Loss of RB and MTS1/CDKN2 (p16) expression in human sarcomas. *Hum. Pathol.* 28, 893–898.
- Coindre, J.-M., Pédeutour, F., Aurias, A., 2009. Well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas. *Virchows Arch.* 456, 167–179. doi:10.1007/s00428-009-0815-x
- Conyers, R., Young, S., Thomas, D.M., 2011. Liposarcoma: Molecular Genetics and Therapeutics. *Sarcoma* 2011, 1–13. doi:10.1155/2011/483154
- Crago, A.M., Singer, S., 2011. Clinical and Molecular Approaches to Well-differentiated and Dedifferentiated Liposarcoma. *Curr. Opin. Oncol.* 23, 373–378. doi:10.1097/CCO.0b013e32834796e6
- Cui, H., 2007. Loss of imprinting of IGF2 as an epigenetic marker for the risk of human cancer. *Dis. Markers* 23, 105–112.
- Dalal, K.M., Kattan, M.W., Antonescu, C.R., Brennan, M.F., Singer, S., 2006. Subtype specific prognostic nomogram for patients with primary liposarcoma of the retroperitoneum, extremity, or trunk. *Ann. Surg.* 244, 381–391. doi:10.1097/01.sla.0000234795.98607.00
- Dal Cin, P., Kools, P., Sciot, R., De Wever, I., Van Damme, B., Van de Ven, W., Van Den Berghe, H., 1993. Cytogenetic and fluorescence in situ hybridization investigation of ring chromosomes characterizing a specific pathologic subgroup of adipose tissue tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.* 68, 85–90. doi:10.1016/0165-4608(93)90001-3
- Das, P., Kotilingam, D., Korchin, B., Liu, J., Yu, D., Lazar, A.J., Pollock, R.E., Lev, D., 2007. High prevalence of p53 exon 4 mutations in soft tissue sarcoma. *Cancer* 109, 2323–2333. doi:10.1002/cncr.22680
- Das, P.M., Singal, R., 2004. DNA methylation and cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 22, 4632–4642. doi:10.1200/JCO.2004.07.151
- Davidović, R., Božović, A., Mandušić, V., Krajnović, M., 2014. Methylation-specific PCR: four steps in primer design. *Cent. Eur. J. Biol.* doi:10.2478/s11535-014-0324-z
- Davidović, R., Sopta, J., Mandušić, V., Krajnović, M., Stanojević, M., Tulić, G., Dimitrijević, B., 2013. p14(ARF) methylation is a common event in the pathogenesis and progression of myxoid and pleomorphic liposarcoma. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 30, 682. doi:10.1007/s12032-013-0682-9
- Dei Tos, A., 2000. Liposarcoma: New entities and evolving concepts. *Ann. Diagn. Pathol.* 4, 252–266. doi:10.1053/adpa.2000.8133
- Dei Tos, A.P., Doglioni, C., Piccinin, S., Maestro, R., Mentzel, T., Barbareschi, M.,

- Boiocchi, M., Fletcher, C.D., 1997a. Molecular abnormalities of the p53 pathway in dedifferentiated liposarcoma. *J. Pathol.* 181, 8–13. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199701)181:1
- Dei Tos, A.P., Piccinin, S., Doglioni, C., Vukosavljevic, T., Mentzel, T., Boiocchi, M., Fletcher, C.D., 1997. Molecular aberrations of the G1-S checkpoint in myxoid and round cell liposarcoma. *Am. J. Pathol.* 151, 1531–1539.
- Delcuve, G.P., Rastegar, M., Davie, J.R., 2009. Epigenetic control. *J. Cell. Physiol.* 219, 243–250. doi:10.1002/jcp.21678
- De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F., Boon, T., 1996. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 7149–7153.
- Di Croce, L., Raker, V.A., Corsaro, M., Fazi, F., Fanelli, M., Faretta, M., Fuks, F., Lo Coco, F., Kouzarides, T., Nervi, C., Minucci, S., Pelicci, P.G., 2002. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* 295, 1079–1082. doi:10.1126/science.1065173
- Do, H., Wong, N.C., Murone, C., John, T., Solomon, B., Mitchell, P.L., Dobrovic, A., 2014. A critical re-assessment of DNA repair gene promoter methylation in non-small cell lung carcinoma. *Sci. Rep.* 4. doi:10.1038/srep04186
- Dominguez-Brauer, C., Brauer, P.M., Chen, Y.-J., Pimkina, J., Raychaudhuri, P., 2010. Tumor suppression by ARF: gatekeeper and caretaker. *Cell Cycle* 9, 86–89.
- Downes, K.A., Goldblum, J.R., Montgomery, E.A., Fisher, C., 2001. Pleomorphic Liposarcoma: A Clinicopathologic Analysis Of 19 Cases. *Mod. Pathol.* 14, 179–184. doi:10.1038/modpathol.3880280
- Dreos, R., Ambrosini, G., Cavin Périer, R., Bucher, P., 2013. EPD and EPDnew, high-quality promoter resources in the next-generation sequencing era. *Nucleic Acids Res.* 41, D157–164. doi:10.1093/nar/gks1233
- Dziegiel, P., Salwa-Zurawska, W., Zurawski, J., Wojnar, A., Zabel, M., 2005. Prognostic significance of augmented metallothionein (MT) expression correlated with Ki-67 antigen expression in selected soft tissue sarcomas. *Histol. Histopathol.* 20, 83–89.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., Jones, P.A., 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429, 457–463. doi:10.1038/nature02625
- Ehrlich, M., 2002. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 21, 5400–5413. doi:10.1038/sj.onc.1205651
- Ehrlich, M., Gama-Sosa, M.A., Huang, L.H., Midgett, R.M., Kuo, K.C., McCune, R.A., Gehrke, C., 1982. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res.* 10, 2709–2721.
- Esteller, M., 2007. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum. Mol. Genet.* 16 Spec No 1, R50–59. doi:10.1093/hmg/ddm018
- Esteller, M., 2008. Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.* 358, 1148–1159.
- Esteller, M., Corn, P.G., Baylin, S.B., Herman, J.G., 2001. A Gene Hypermethylation Profile of Human Cancer. *Cancer Res.* 61, 3225–3229.
- Esteller, M., Tortola, S., Toyota, M., Capella, G., Peinado, M.A., Baylin, S.B., Herman, J.G., 2000. Hypermethylation-associated Inactivation of p14ARF Is Independent of p16INK4a Methylation and p53 Mutational Status. *Cancer Res.* 60, 129–133.

- Fabbri, M., Calin, G.A., 2010. Epigenetics and miRNAs in human cancer. *Adv. Genet.* 70, 87–99. doi:10.1016/B978-0-12-380866-0.60004-6
- Fiore, M., Grosso, F., Lo Vullo, S., Pennacchioli, E., Stacchiotti, S., Ferrari, A., Collini, P., Lozza, L., Mariani, L., Casali, P.G., Gronchi, A., 2007. Myxoid/round cell and pleomorphic liposarcomas: Prognostic factors and survival in a series of patients treated at a single institution. *Cancer* 109, 2522–2531. doi:10.1002/cncr.22720
- Fraga, M.F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Ropero, S., Petrie, K., Iyer, N.G., Pérez-Rosado, A., Calvo, E., Lopez, J.A., Cano, A., Calasanz, M.J., Colomer, D., Piris, M.A., Ahn, N., Imhof, A., Caldas, C., Jenuwein, T., Esteller, M., 2005. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat. Genet.* 37, 391–400. doi:10.1038/ng1531
- Forus, A., Larramendy, M.L., Meza-Zepeda, L.A., Bjerkehagen, B., Godager, L.H., Dahlberg, A.B., Saeter, G., Knuutila, S., Myklebost, O., 2001. Dedifferentiation of a well-differentiated liposarcoma to a highly malignant metastatic osteosarcoma: amplification of 12q14 at all stages and gain of 1q22-q24 associated with metastases. *Cancer Genet. Cytogenet.* 125, 100–111.
- Frigola, J., Song, J., Stirzaker, C., Hinshelwood, R.A., Peinado, M.A., Clark, S.J., 2006. Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat. Genet.* 38, 540–549. doi:10.1038/ng1781
- Futreal, P.A., Barrett, J.C., Wiseman, R.W., 1991. An Alu polymorphism intragenic to the TP53 gene. *Nucleic Acids Res.* 19, 6977.
- Ganci, F., Conti, S., Fontemaggi, G., Manciocco, V., Donzelli, S., Covello, R., Muti, P., Strano, S., Blandino, G., Spriano, G., 2011. Allelic expression imbalance of TP53 mutated and polymorphic alleles in head and neck tumors. *Omics J. Integr. Biol.* 15, 375–381. doi:10.1089/omi.2010.0142
- Gardiner-Garden, M., Frommer, M., 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* 196, 261–282.
- Ghadimi, M.P., Liu, P., Peng, T., Bolshakov, S., Young, E.D., Torres, K.E., Colombo, C., Hoffman, A., Broccoli, D., Hornick, J.L., Lazar, A.J., Pisters, P., Pollock, R.E., Lev, D., 2011. Pleomorphic liposarcoma: clinical observations and molecular variables. *Cancer* 117, 5359–5369. doi:10.1002/cncr.26195
- Goldblum, J.R., Frank, T.S., Poy, E.L., Weiss, S.W., 1995. p53 Mutations and Tumor Progression in Well-differentiated Liposarcoma and Dermatofibrosarcoma Protuberans. *Int. J. Surg. Pathol.* 3, 35–41. doi:10.1177/106689699500300106
- GRØNBÆK, K., Hother, C., Jones, P.A., 2007. Epigenetic changes in cancer. *Apmis* 115, 1039–1059.
- Grunau, C., Clark, S.J., Rosenthal, A., 2001. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res.* 29, e65.
- Gutschner, T., Diederichs, S., 2012. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA Biol.* 9, 703–719. doi:10.4161/rna.20481
- Hainaut, P., Hollstein, M., 2000. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv. Cancer Res.* 77, 81–137.
- Hameed, M., 2007. Pathology and genetics of adipocytic tumors. *Cytogenet. Genome*

- Res. 118, 138–147. doi:10.1159/000108294
- Haniball, J., Sumathi, V.P., Kindblom, L.-G., Abudu, A., Carter, S.R., Tillman, R.M., Jeys, L., Spooner, D., Peake, D., Grimer, R.J., 2011. Prognostic factors and metastatic patterns in primary myxoid/round-cell liposarcoma. *Sarcoma* 2011, 538085. doi:10.1155/2011/538085
- Harada, H., Nakagawa, K., Iwata, S., Saito, M., Kumon, Y., Sakaki, S., Sato, K., Hamada, K., 1999. Restoration of Wild-Type p16 Down-Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Inhibits Angiogenesis in Human Gliomas. *Cancer Res.* 59, 3783–3789.
- He, M., Aisner, S., Benevenia, J., Patterson, F., Harrison, L.E., Hameed, M., 2009. Epigenetic alteration of p16INK4a gene in dedifferentiation of liposarcoma. *Pathol. - Res. Pract.* 205, 386–394. doi:10.1016/j.prp.2008.12.009
- Hemmati, P.G., Gillissen, B., von Haefen, C., Wendt, J., Stärck, L., Güner, D., Dörken, B., Daniel, P.T., 2002. Adenovirus-mediated overexpression of p14(ARF) induces p53 and Bax-independent apoptosis. *Oncogene* 21, 3149–3161. doi:10.1038/sj.onc.1205458
- Herath, N.I., Kew, M.C., Walsh, M.D., Young, J., Powell, L.W., Leggett, B.A., MacDonald, G.A., 2002. Reciprocal relationship between methylation status and loss of heterozygosity at the p14(ARF) locus in Australian and South African hepatocellular carcinomas. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 17, 301–307.
- Herman, J.G., Graff, J.R., Myohanen, S., Nelkin, B.D., Baylin, S.B., 1996. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9821–9826.
- Hernández, H.G., Tse, M.Y., Pang, S.C., Arboleda, H., Forero, D.A., 2013. Optimizing methodologies for PCR-based DNA methylation analysis. *BioTechniques* 55, 181–197. doi:10.2144/000114087
- Heslin, M.J., Cordon-Cardo, C., Lewis, J.J., Woodruff, J.M., Brennan, M.F., 1998. Ki-67 detected by MIB-1 predicts distant metastasis and tumor mortality in primary, high grade extremity soft tissue sarcoma. *Cancer* 83, 490–497.
- Hoffman, A., Ghadimi, M.P.H., Demicco, E.G., Creighton, C.J., Torres, K., Colombo, C., Peng, T., Lusby, K., Ingram, D., Hornick, J.L., Wang, W.-L., Ravi, V., Lazar, A.J., Lev, D., Pollock, R.E., 2013. Localized and metastatic myxoid/round cell liposarcoma: Clinical and molecular observations. *Cancer* 119, 1868–1877. doi:10.1002/cncr.27847
- Hoffman, A., Lazar, A.J., Pollock, R.E., Lev, D., 2011. New frontiers in the treatment of liposarcoma, a therapeutically resistant malignant cohort. *Drug Resist. Updat.* 14, 52–66. doi:10.1016/j.drup.2010.11.001
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C.C., 1991. p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49–53. doi:10.1126/science.1905840
- Hou, P., Ji, M., Yang, B., Chen, Z., Qiu, J., Shi, X., Lu, Z., 2006. Quantitative analysis of promoter hypermethylation in multiple genes in osteosarcoma. *Cancer* 106, 1602–1609. doi:10.1002/cncr.21762
- Italiano, A., Bianchini, L., Gjernes, E., Keslair, F., Ranchere-Vince, D., Dumollard, J.-M., Haudebourg, J., Leroux, A., Mainguéné, C., Terrier, P., Chibon, F., Coindre, J.-M., Pedeutour, F., 2009. Clinical and Biological Significance of CDK4 Amplification in Well-Differentiated and Dedifferentiated Liposarcomas. *Clin.*

- Cancer Res. 15, 5696–5703. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-3185
- Italiano, A., Bianchini, L., Keslair, F., Bonnafous, S., Cardot-Leccia, N., Coindre, J.-M., Dumollard, J.-M., Hofman, P., Leroux, A., Mainguené, C., Peyrottes, I., Ranchere-Vince, D., Terrier, P., Tran, A., Gual, P., Pedeutour, F., 2008. HMG2 is the partner of MDM2 in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas whereas CDK4 belongs to a distinct inconsistent amplicon. *Int. J. Cancer* 122, 2233–2241. doi:10.1002/ijc.23380
- Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J., Wolffe, A.P., 1998. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* 19, 187–191. doi:10.1038/561
- Kala, R., Peek, G.W., Hardy, T.M., Tollefsbol, T.O., 2013. MicroRNAs: an emerging science in cancer epigenetics. *J. Clin. Bioinforma.* 3, 6. doi:10.1186/2043-9113-3-6
- Kanai, Y., Hirohashi, S., 2007. Alterations of DNA methylation associated with abnormalities of DNA methyltransferases in human cancers during transition from a precancerous to a malignant state. *Carcinogenesis* 28, 2434–2442. doi:10.1093/carcin/bgm206
- Kanwal, R., Gupta, S., 2012. Epigenetic modifications in cancer. *Clin. Genet.* 81, 303–311. doi:10.1111/j.1399-0004.2011.01809.x
- Kato, S., Han, S.-Y., Liu, W., Otsuka, K., Shibata, H., Kanamaru, R., Ishioka, C., 2003. Understanding the function–structure and function–mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 8424–8429. doi:10.1073/pnas.1431692100
- Kawaguchi, K., Oda, Y., Saito, T., Yamamoto, H., Takahira, T., Kobayashi, C., Tamiya, S., Tateishi, N., Iwamoto, Y., Tsuneyoshi, M., 2006. DNA hypermethylation status of multiple genes in soft tissue sarcomas. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 19, 106–114. doi:10.1038/modpathol.3800502
- Kawaguchi, K., Oda, Y., Saito, T., Yamamoto, H., Tamiya, S., Takahira, T., Miyajima, K., Iwamoto, Y., Tsuneyoshi, M., 2003. Mechanisms of inactivation of the p16INK4a gene in leiomyosarcoma of soft tissue: decreased p16 expression correlates with promoter methylation and poor prognosis. *J. Pathol.* 201, 487–495. doi:10.1002/path.1419
- Kawaguchi, K., Oda, Y., Sakamoto, A., Saito, T., Tamiya, S., Iwamoto, Y., Tsuneyoshi, M., 2002. Molecular Analysis of p53, MDM2, and H-ras Genes in Osteosarcoma and Malignant Fibrous Histiocytoma of Bone in Patients Older than 40 Years. *Mod. Pathol.* 15, 878–888. doi:10.1097/01.MP.0000024264.48690.EA
- Kim, H., Lee, J., Yi, S., Jun, H., Choi, Y.-L., Ahn, G., Seo, S., Lim, D., Ahn, Y., Park, J., Kim, S., 2009. Liposarcoma: exploration of clinical prognostic factors for risk based stratification of therapy. *BMC Cancer* 9, 205. doi:10.1186/1471-2407-9-205
- Kim, S.H., Cho, N.H., Tallini, G., Dudas, M., Lewis, J.J., Cordon-Cardo, C., 2001. Prognostic role of cyclin D1 in retroperitoneal sarcomas. *Cancer* 91, 428–434.
- Kim, S.H., Kim, J.W., Kim, Y.T., Kim, J.H., Yoon, B.S., Ryu, H.S., 2006. Prognostic factors and expression of p53 and mdm-2 in uterine sarcomas. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 95, 272–277. doi:10.1016/j.ijgo.2006.03.031
- Kim, S.H., Lewis, J.J., Brennan, M.F., Woodruff, J.M., Dudas, M., Cordon-Cardo, C.,

1998. Overexpression of cyclin D1 is associated with poor prognosis in extremity soft-tissue sarcomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 4, 2377–2382.
- Kim, W.Y., Sharpless, N.E., 2006. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* 127, 265–275. doi:10.1016/j.cell.2006.10.003
- Klug, M., Schmidhofer, S., Gebhard, C., Andreesen, R., Rehli, M., 2013. 5-Hydroxymethylcytosine is an essential intermediate of active DNA demethylation processes in primary human monocytes. *Genome Biol.* 14, R46. doi:10.1186/gb-2013-14-5-r46
- Knösel, T., Altendorf-Hofmann, A., Lindner, L., Issels, R., Hermeking, H., Schuebbe, G., Gibis, S., Siemens, H., Kampmann, E., Kirchner, T., 2014. Loss of p16(INK4a) is associated with reduced patient survival in soft tissue tumours, and indicates a senescence barrier. *J. Clin. Pathol.* doi:10.1136/jclinpath-2013-202106
- Kobayashi, T., Wang, J., Al-Ahmadie, H., Abate-Shen, C., 2013. ARF Regulates the Stability of p16 Protein Via REG -Dependent Proteasome Degradation. *Mol. Cancer Res.* 11, 828–833. doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0207
- Koumenis, C., Alarcon, R., Hammond, E., Sutphin, P., Hoffman, W., Murphy, M., Derr, J., Taya, Y., Lowe, S.W., Kastan, M., Giaccia, A., 2001. Regulation of p53 by Hypoxia: Dissociation of Transcriptional Repression and Apoptosis from p53-Dependent Transactivation. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1297–1310. doi:10.1128/MCB.21.4.1297-1310.2001
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128, 693–705. doi:10.1016/j.cell.2007.02.005
- Krämer, A., Schultheis, B., Bergmann, J., Willer, A., Hegenbart, U., Ho, A.D., Goldschmidt, H., Hehlmann, R., 2002. Alterations of the cyclin D1/pRb/p16INK4A pathway in multiple myeloma. *Leukemia* 16, 1844–1851. doi:10.1038/sj.leu.2402609
- Kristensen, L.S., Raynor, M.P., Candiloro, I., Dobrovic, A., 2012. Methylation profiling of normal individuals reveals mosaic promoter methylation of cancer-associated genes. *Oncotarget* 3, 450–461.
- Kubo, A., Kaye, F.J., 2001. Searching for Selective Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors to Target the Retinoblastoma/p16 Cancer Gene Pathway. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 415–417. doi:10.1093/jnci/93.6.415
- Lassus, H., Butzow, R., 2007. The classification of p53 immunohistochemical staining results and patient outcome in ovarian cancer. *Br. J. Cancer* 96, 1621–1622. doi:10.1038/sj.bjc.6603741
- Lonardo, F., Ueda, T., Huvos, A.G., Healey, J., Ladanyi, M., 1997. p53 and MDM2 alterations in osteosarcomas: correlation with clinicopathologic features and proliferative rate. *Cancer* 79, 1541–1547.
- Louis-Brennetot, C., Coindre, J.-M., Ferreira, C., Pérot, G., Terrier, P., Aurias, A., 2011. The CDKN2A/CDKN2B/CDK4/CCND1 pathway is pivotal in well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma oncogenesis. An analysis of 104 tumors. *Genes. Chromosomes Cancer* 50, 896–907. doi:10.1002/gcc.20909
- Maelandsmo, G.M., Berner, J.M., Flørenes, V.A., Forus, A., Hovig, E., Fodstad, O., Myklebost, O., 1995. Homozygous deletion frequency and expression levels of

- the CDKN2 gene in human sarcomas--relationship to amplification and mRNA levels of CDK4 and CCND1. *Br. J. Cancer* 72, 393–398.
- Maitra, A., Roberts, H., Weinberg, A.G., Geradts, J., 2001. Loss of p16(INK4a) expression correlates with decreased survival in pediatric osteosarcomas. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 95, 34–38.
- Matushansky, I., Hernando, E., Socci, N.D., Matos, T., Mills, J., Edgar, M.A., Schwartz, G.K., Singer, S., Cordon-Cardo, C., Maki, R.G., 2008. A Developmental Model of Sarcomagenesis Defines a Differentiation-Based Classification for Liposarcomas. *Am. J. Pathol.* 172, 1069–1080. doi:10.2353/ajpath.2008.070284
- McBride, O.W., Merry, D., Givol, D., 1986. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 130–134.
- McDermott, K.M., Zhang, J., Holst, C.R., Kozakiewicz, B.K., Singla, V., Tlsty, T.D., 2006. p16(INK4a) prevents centrosome dysfunction and genomic instability in primary cells. *PLoS Biol.* 4, e51. doi:10.1371/journal.pbio.0040051
- Medina-Franco, H., Medina, A.R.-D. la, Cortes-Gonzalez, R., Baquera, J., Angeles-Angeles, A., Urist, M.M., Eltoun, I.E., Heslin, M.J., 2003. Expression of p53 and Proliferation Index as Prognostic Factors in Gastrointestinal Sarcomas. *Ann. Surg. Oncol.* 10, 190–195. doi:10.1245/ASO.2003.03.033
- Miller, C.W., Aslo, A., Campbell, M.J., Kawamata, N., Lampkin, B.C., Koeffler, H.P., 1996. Alterations of the p15, p16, and p18 genes in osteosarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 86, 136–142.
- Minucci, S., Pelicci, P.G., 2006. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 38–51. doi:10.1038/nrc1779
- Mitelman, F., Johansson, B., Mertens, F., 2007. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat. Rev. Cancer* 7, 233–245. doi:10.1038/nrc2091
- Moll, U.M., Petrenko, O., 2003. The MDM2-p53 Interaction. *Mol. Cancer Res.* 1, 1001–1008.
- Musella, M., Fazioli, F., Lombardi, S., Servodio, C.I., De Martino, C., Iacono, V., Cigala, F., Jovino, R., 2005. Assessment of cyclin D1 overexpression as a prognostic factor in soft tissue sarcomas: role of laparoscopy and core needle biopsy. *Surg. Endosc.* 19, 1120–1124. doi:10.1007/s00464-004-2094-6
- Narita, M., Narita, M., Krizhanovsky, V., Nuñez, S., Chicas, A., Hearn, S.A., Myers, M.P., Lowe, S.W., 2006. A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell* 126, 503–514. doi:10.1016/j.cell.2006.05.052
- Nicoloso, M.S., Spizzo, R., Shimizu, M., Rossi, S., Calin, G.A., 2009. MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases. *Nat. Rev. Cancer* 9, 293–302. doi:10.1038/nrc2619
- Nielsen, G.P., Burns, K.L., Rosenberg, A.E., Louis, D.N., 1998. CDKN2A gene deletions and loss of p16 expression occur in osteosarcomas that lack RB alterations. *Am. J. Pathol.* 153, 159–163. doi:10.1016/S0002-9440(10)65556-3
- Nielsen, T.O., West, R.B., Linn, S.C., Alter, O., Knowling, M.A., O'Connell, J.X., Zhu, S., Fero, M., Sherlock, G., Pollack, J.R., Brown, P.O., Botstein, D., van de Rijn, M., 2002. Molecular characterisation of soft tissue tumours: a gene expression

- study. *Lancet* 359, 1301–1307. doi:10.1016/S0140-6736(02)08270-3
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., Kojiro, M., 2006. Angiogenesis in Cancer. *Vasc. Health Risk Manag.* 2, 213–219.
- Nishio, J., 2011. Contributions of Cytogenetics and Molecular Cytogenetics to the Diagnosis of Adipocytic Tumors. *J. Biomed. Biotechnol.* doi:10.1155/2011/524067
- Nishio, J., Iwasaki, H., Nabeshima, K., Naito, M., 2011. Cytogenetics and molecular genetics of myxoid soft-tissue sarcomas. *Genet. Res. Int.*
- Nuovo, G.J., Plaia, T.W., Belinsky, S.A., Baylin, S.B., Herman, J.G., 1999. In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 12754–12759. doi:10.1073/pnas.96.22.12754
- Oda, E., Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N., 2000. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053-1058.
- Oda, Y., Yamamoto, H., Takahira, T., Kobayashi, C., Kawaguchi, K., Tateishi, N., Nozuka, Y., Tamiya, S., Tanaka, K., Matsuda, S., Yokoyama, R., Iwamoto, Y., Tsuneyoshi, M., 2005. Frequent alteration of p16(INK4a)/p14(ARF) and p53 pathways in the round cell component of myxoid/round cell liposarcoma: p53 gene alterations and reduced p14(ARF) expression both correlate with poor prognosis. *J. Pathol.* 207, 410–421. doi:10.1002/path.1848
- Oh, J.H., Kim, H.-S., Kim, H.-H., Kim, W.H., Lee, S.H., 2006. Aberrant methylation of p14ARF gene correlates with poor survival in osteosarcoma. *Clin. Orthop.* 442, 216–222.
- Olofsson, A., Willén, H., Göransson, M., Engström, K., Meis-Kindblom, J.M., Stenman, G., Kindblom, L.-G., Aman, P., 2004. Abnormal expression of cell cycle regulators in FUS-CHOP carrying liposarcomas. *Int. J. Oncol.* 25, 1349–1355.
- Orlow, I., Drobnjak, M., Zhang, Z.-F., Lewis, J., Woodruff, J.M., Brennan, M.F., Cordon-Cardo, C., 1999. Alterations of INK4A and INK4B genes in adult soft tissue sarcomas: effect on survival. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 73–79.
- Orvieto, E., Furlanetto, A., Laurino, L., Dei Tos, A.P., 2001. Myxoid and round cell liposarcoma: a spectrum of myxoid adipocytic neoplasia. *Semin. Diagn. Pathol.* 18, 267–273.
- Osuna, D., de Álava, E., 2009. Molecular pathology of sarcomas. *Rev. Recent Clin. Trials* 4, 12–26.
- Ouyang, H., Furukawa, T., Abe, T., Kato, Y., Horii, A., 1998. The BAX gene, the promoter of apoptosis, is mutated in genetically unstable cancers of the colorectum, stomach, and endometrium. *Clin Cancer Res*, 4, 1071-1074.
- Ozenne, P., Eymin, B., Brambilla, E., Gazzeri, S., 2010. The ARF tumor suppressor: Structure, functions and status in cancer. *Int. J. Cancer* 127, 2239–2247. doi:10.1002/ijc.25511
- Paul, N., Shum, J., Le, T., 2010. Hot start PCR. *Methods Mol Biol* 630:301.
- Payton, M., Coats, S., 2002. Cyclin E2, the cycle continues. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 315–320. doi:10.1016/S1357-2725(01)00137-6
- Peedicayil, J., 2006. Epigenetic therapy-a new development in pharmacology. *Indian J. Med. Res.* 123, 17–24.

- Perez-Losada, J., Sanchez-Martin, M., Rodriguez-Garcia, M.A., Perez-Mancera, P.A., Pintado, B., Flores, T., Battaner, E., Sanchez-Garcia, I., 2000. Liposarcoma initiated by FUS/TLS-CHOP: the FUS/TLS domain plays a critical role in the pathogenesis of liposarcoma. *Oncogene* 19.
- Pérot, G., Chibon, F., Montero, A., Lagarde, P., de Thé, H., Terrier, P., Guillou, L., Ranchère, D., Coindre, J.-M., Aurias, A., 2010. Constant p53 Pathway Inactivation in a Large Series of Soft Tissue Sarcomas with Complex Genetics. *Am. J. Pathol.* 177, 2080–2090. doi:10.2353/ajpath.2010.100104
- Petitjean, A., Achatz, M.I.W., Borresen-Dale, A.L., Hainaut, P., Olivier, M., 2007. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 26, 2157–2165. doi:10.1038/sj.onc.1210302
- Pilger, D.A., Lopez, P.L. da C., Segal, F., Leistner-Segal, S., 2007. Analysis of R213R and 13494 g->a polymorphisms of the p53 gene in individuals with esophagitis, intestinal metaplasia of the cardia and Barrett's Esophagus compared with a control group. *Genomic Med.* 1, 57–63. doi:10.1007/s11568-007-9007-4
- Pilotti, S., Torre, G.D., Mezzelani, A., Tamborini, E., Azzarelli, A., Sozzi, G., Pierotti, M.A., 2000. The expression of MDM2/CDK4 gene product in the differential diagnosis of well differentiated liposarcoma and large deep-seated lipoma. *Br. J. Cancer* 82, 1271–1275. doi:10.1054/bjoc.1999.1090
- Plath, T., Detjen, K., Welzel, M., von Marschall, Z., Murphy, D., Schirner, M., Wiedenmann, B., Rosewicz, S., 2000. A Novel Function for the Tumor Suppressor p16INK4a Induction of Anoikis via Upregulation of the $\alpha 5\beta 1$ Fibronectin Receptor. *J. Cell Biol.* 150, 1467–1478.
- Portela, A., Esteller, M., 2010. Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.* 28, 1057–1068. doi:10.1038/nbt.1685
- Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A., Sherr, C.J., 1995. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83, 993–1000.
- Quillien, V., Lavenu, A., Karayan-Tapon, L., Carpentier, C., Labussière, M., Lesimple, T., Chinot, O., Wager, M., Honnorat, J., Saikali, S., Fina, F., Sanson, M., Figarella-Branger, D., 2012. Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, MethyLight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients. *Cancer* 118, 4201–4211. doi:10.1002/cncr.27392
- Burri, N., Shaw, P., Bouzourene, H., Sordat, I., Sordat, B., Gillet, M., Schorderet, D., Bosman, F.T., Chaubert, P., 2001. Methylation Silencing and Mutations of the p14ARF and p16INK4a Genes in Colon Cancer. *Lab. Invest.* 81, 217–229. doi:10.1038/labinvest.3780230
- Rand, K., Qu, W., Ho, T., Clark, S.J., Molloy, P., 2002. Conversion-specific detection of DNA methylation using real-time polymerase chain reaction (ConLight-MSP) to avoid false positives. *Methods San Diego Calif* 27, 114–120.
- Reis, R.M., Könu-Lebleblicioglu, D., Lopes, J.M., Kleihues, P., Ohgaki, H., 2000. Genetic Profile of Gliosarcomas. *Am. J. Pathol.* 156, 425–432. doi:10.1016/S0002-9440(10)64746-3
- Riggi, N., Cironi, L., Provero, P., Suvà, M.-L., Stehle, J.-C., Baumer, K., Guillou, L.,

- Stamenkovic, I., 2006. Expression of the FUS-CHOP Fusion Protein in Primary Mesenchymal Progenitor Cells Gives Rise to a Model of Myxoid Liposarcoma. *Cancer Res.* 66, 7016–7023. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3979
- Riggi, N., Suvà, M.-L., Suvà, D., Cironi, L., Provero, P., Tercier, S., Joseph, J.-M., Stehle, J.-C., Baumer, K., Kindler, V., Stamenkovic, I., 2008. EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res.* 68, 2176–2185. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1761
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P., Levine, A., 2008. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 402–412. doi:10.1038/nrm2395
- Rocco, J., 2001. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in Cancer Progression. *Exp. Cell Res.* 264, 42–55. doi:10.1006/excr.2000.5149
- Rodriguez, R., Rubio, R., Gutierrez-Aranda, I., Melen, G.J., Elosua, C., García-Castro, J., Menendez, P., 2011. FUS-CHOP Fusion Protein Expression Coupled to p53 Deficiency Induces Liposarcoma in Mouse but Not in Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *STEM CELLS* 29, 179–192. doi:10.1002/stem.571
- Santos, K.F., Mazzola, T.N., Carvalho, H.F., 2005. The prima donna of epigenetics: the regulation of gene expression by DNA methylation. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica* 38, 1531–1541. doi:S0100-879X2005001000010
- Schneider-Stock, R., Walter, H., Radig, K., Rys, J., Bosse, A., Kuhnen, C., Hoang-Vu, C., Roessner, A., 1998. MDM2 amplification and loss of heterozygosity at Rb and p53 genes: no simultaneous alterations in the oncogenesis of liposarcomas. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 124, 532–540. doi:10.1007/s004320050211
- Schneider-Stock, R., Ziegeler, A., Haeckel, C., Franke, D.-S., Rys, J., Roessner, A., 1999. Prognostic relevance of p53 alterations and Mib-1 proliferation index in subgroups of primary liposarcomas. *Clin. Cancer Res.* 5, 2830–2835.
- Seidel, C., Bartel, F., Rastetter, M., Bluemke, K., Wurl, P., Taubert, H., Dammann, R., 2005. Alterations of cancer-related genes in soft tissue sarcomas: Hypermethylation of RASSF1A is frequently detected in leiomyosarcoma and associated with poor prognosis in sarcoma. *Int. J. Cancer* 114, 442–447. doi:10.1002/ijc.20707
- Shapiro, G.I., 2006. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, 1770–1783. doi:10.1200/JCO.2005.03.7689
- Sharma, S., Kelly, T.K., Jones, P.A., 2010. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31, 27–36. doi:10.1093/carcin/bgp220
- Sharpless, N.E., 2004. Ink4a/Arf links senescence and aging. *Exp. Gerontol.* 39, 1751–1759. doi:10.1016/j.exger.2004.06.025
- Sherr, C.J., Bertwistle, D., Den Besten, W., Kuo, M.-L., Sugimoto, M., Tago, K., Williams, R.T., Zindy, F., Roussel, M.F., 2005. p53-Dependent and -Independent Functions of the Arf Tumor Suppressor. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 70, 129–137. doi:10.1101/sqb.2005.70.004
- Shimada, S., Ishizawa, T., Ishizawa, K., Matsumura, T., Hasegawa, T., Hirose, T., 2006. The value of MDM2 and CDK4 amplification levels using real-time polymerase

- chain reaction for the differential diagnosis of liposarcomas and their histologic mimickers. *Hum. Pathol.* 37, 1123–1129. doi:10.1016/j.humpath.2006.04.010
- Shim, B.Y., Yoo, J., Lee, Y.-S., Hong, Y.S., Kim, H.-K., Kang, J.-H., 2010. Prognostic Role of Rb, p16, Cyclin D1 Proteins in Soft Tissue Sarcomas. *Cancer Res. Treat. Off. J. Korean Cancer Assoc.* 42, 144–150. doi:10.4143/crt.2010.42.3.144
- Singer, S., Socci, N.D., Ambrosini, G., Sambol, E., Decarolis, P., Wu, Y., O'Connor, R., Maki, R., Viale, A., Sander, C., Schwartz, G.K., Antonescu, C.R., 2007. Gene Expression Profiling of Liposarcoma Identifies Distinct Biological Types/Subtypes and Potential Therapeutic Targets in Well-Differentiated and Dedifferentiated Liposarcoma. *Cancer Res.* 67, 6626–6636. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0584
- Sirvent, N., Coindre, J.-M., Maire, G., Hostein, I., Keslair, F., Guillou, L., Ranchere-Vince, D., Terrier, P., Pedeutour, F., 2007. Detection of MDM2-CDK4 amplification by fluorescence in situ hybridization in 200 paraffin-embedded tumor samples: utility in diagnosing adipocytic lesions and comparison with immunohistochemistry and real-time PCR. *Am. J. Surg. Pathol.* 31, 1476–1489. doi:10.1097/PAS.0b013e3180581fff
- Smith, T., Goldblum, J., 1996. Immunohistochemical analysis of p53 protein in myxoid/round cell liposarcomas of the extremities. *Appl. Immunohistochem.* 4, 228–234.
- Solyom, S., Kazazian, H.H., 2012. Mobile elements in the human genome: implications for disease. *Genome Med.* 4, 12. doi:10.1186/gm311
- Stott, F.J., Bates, S., James, M.C., McConnell, B.B., Starborg, M., Brookes, S., Palmero, I., Ryan, K., Hara, E., Vousden, K.H., Peters, G., 1998. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J.* 17, 5001–5014. doi:10.1093/emboj/17.17.5001
- Suh, S.O., Chen, Y., Zaman, M.S., Hirata, H., Yamamura, S., Shahryari, V., Liu, J., Tabatabai, Z.L., Kakar, S., Deng, G., Tanaka, Y., Dahiya, R., 2011. MicroRNA-145 is regulated by DNA methylation and p53 gene mutation in prostate cancer. *Carcinogenesis* 32, 772–778. doi:10.1093/carcin/bgr036
- Szyf, M., 2009. Epigenetics, DNA Methylation, and Chromatin Modifying Drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49, 243–263. doi:10.1146/annurev-pharmtox-061008-103102
- Takai, D., Jones, P.A., 2002. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 3740–3745. doi:10.1073/pnas.052410099
- Talos, F., Moll, U.M., 2010. Role of the p53 family in stabilizing the genome and preventing polyploidization. *Adv. Exp. Med. Biol.* 676, 73–91.
- Taubert, H., Würfl, P., Meye, A., Berger, D., Thamm, B., Neumann, K., Hinze, R., Schmidt, H., Rath, F.-W., 1995. Molecular and immunohistochemical p53 status in liposarcoma and malignant fibrous histiocytoma. Identification of seven new mutations for soft tissue sarcomas. *Cancer* 76, 1187–1196.
- Ten Heuvel, S.E., Hoekstra, H.J., van Ginkel, R.J., Bastiaannet, E., Suurmeijer, A.J.H., 2007. Clinicopathologic prognostic factors in myxoid liposarcoma: a retrospective study of 49 patients with long-term follow-up. *Ann. Surg. Oncol.*

- 14, 222–229. doi:10.1245/s10434-006-9043-7
- Thomas, D.M., Savage, S.A., Bond, G.L., 2012. Hereditary and environmental epidemiology of sarcomas. *Clin. Sarcoma Res.* 2, 13. doi:10.1186/2045-3329-2-13
- Thway, K., Flora, R., Shah, C., Olmos, D., Fisher, C., 2012. Diagnostic utility of p16, CDK4, and MDM2 as an immunohistochemical panel in distinguishing well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas from other adipocytic tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* 36, 462–469. doi:10.1097/PAS.0b013e3182417330
- Tsuchihara, K., Suzuki, Y., Wakaguri, H., Irie, T., Tanimoto, K., Hashimoto, S., Matsushima, K., Mizushima-Sugano, J., Yamashita, R., Nakai, K., Bentley, D., Esumi, H., Sugano, S., 2009. Massive transcriptional start site analysis of human genes in hypoxia cells. *Nucleic Acids Res.* 37, 2249–2263. doi:10.1093/nar/gkp066
- Tuna, B., Lebe, B., Sis, B., Yorukoglu, K., Kargi, A., 2004. Mdm2 gene expression in adipose-tissue tumors: association with tumor progression in liposarcomas. *Aegean Pathol. J.* 1, 11–18.
- Von Keyserling, H., Kühn, W., Schneider, A., Bergmann, T., Kaufmann, A.M., 2011. p16INK4a and p14ARF mRNA expression in Pap smears is age-related. *Mod. Pathol.* 25, 465–470.
- Wade, P.A., Geronne, A., Jones, P.L., Ballestar, E., Aubry, F., Wolffe, A.P., 1999. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat. Genet.* 23, 62–66. doi:10.1038/12664
- Wan, J., Oliver, V.F., Zhu, H., Zack, D.J., Qian, J., Merbs, S.L., 2013. Integrative analysis of tissue-specific methylation and alternative splicing identifies conserved transcription factor binding motifs. *Nucleic Acids Res.* 41, 8503–8514. doi:10.1093/nar/gkt652
- Weaver, J., Downs-Kelly, E., Goldblum, J.R., Turner, S., Kulkarni, S., Tubbs, R.R., Rubin, B.P., Skacel, M., 2008. Fluorescence in situ hybridization for MDM2 gene amplification as a diagnostic tool in lipomatous neoplasms. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 21, 943–949. doi:10.1038/modpathol.2008.84
- Weihrauch, M., Markwarth, A., Lehnert, G., Wittekind, C., Wrbitzky, R., Tannapfel, A., 2002. Abnormalities of the ARF-p53 pathway in primary angiosarcomas of the liver. *Hum. Pathol.* 33, 884–892.
- Wu, S.C., Zhang, Y., 2010. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 607–620. doi:10.1038/nrm2950
- Yang, J.C., Chang, A.E., Baker, A.R., Sindelar, W.F., Danforth, D.N., Topalian, S.L., DeLaney, T., Glatstein, E., Steinberg, S.M., Merino, M.J., Rosenberg, S.A., 1998. Randomized prospective study of the benefit of adjuvant radiation therapy in the treatment of soft tissue sarcomas of the extremity. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 16, 197–203.
- Yarbrough, W.G., Bessho, M., Zanation, A., Bisi, J.E., Xiong, Y., 2002. Human tumor suppressor ARF impedes S-phase progression independent of p53. *Cancer Res.* 62, 1171–1177.
- Zheng, S., Chen, P., McMillan, A., Lafuente, A., Lafuente, M.J., Ballesta, A., Trias, M., Wiencke, J.K., 2000. Correlations of partial and extensive methylation at the

- p14(ARF) locus with reduced mRNA expression in colorectal cancer cell lines and clinicopathological features in primary tumors. *Carcinogenesis* 21, 2057–2064.
- Zhu, J.-K., 2009. Active DNA Demethylation Mediated by DNA Glycosylases. *Annu. Rev. Genet.* 43, 143–166. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134205
- Zhu, P., Martin, E., Mengwasser, J., Schlag, P., Janssen, K.-P., Göttlicher, M., 2004. Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell* 5, 455–463.
- Zhu, X., Leav, I., Leung, Y.-K., Wu, M., Liu, Q., Gao, Y., McNeal, J.E., Ho, S.-M., 2004. Dynamic regulation of estrogen receptor-beta expression by DNA methylation during prostate cancer development and metastasis. *Am. J. Pathol.* 164, 2003–2012.
- Zysman, M.A., Chapman, W.B., Bapat, B., 2002. Considerations when analyzing the methylation status of PTEN tumor suppressor gene. *Am. J. Pathol.* 160, 795–800. doi:10.1016/S0002-9440(10)64902-4.

Стручна биографија

Радослав С. Давидовић рођен је 07.10.1977. године у Новом Саду. Биолошки факултет Универзитета у Београду, смер молекуларна биологија и физиологија, уписао је 1996. године. Дипломски рад, под насловом “Утицај сахарозе и дексаметазона на мастоците интерскапуларног мрког масног ткива пацова”, одбранио је 2003. године.

Од 2008. године запослен је у Лабораторији за радиобиологију и молекуларну генетику, Института за нуклеарне науке “Винча”. Школске 2008/2009. године уписао је докторске студије на Биолошком факултету, Универзитета у Београду на студијском смеру молекуларна биологија еукариота. Докторска дисертација под насловом “Анализа мутационог статуса гена p53 и метилационог статуса промотора гена p14 и p16 у липосаркомима” пријављена је на Биолошком факултету, Универзитета у Београду и одобрена је 27.02.2014. године. До данас су објављена два рада из докторске дисертације у међународним часописима.

Тренутно је ангажован на пројекту “Молекуларне детерминанте за дизајн тумор маркера”, који се води под ев. бројем 173049, Министарства за просвету и науку, Републике Србије.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Радослав Давидовић

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Анализа мутационог статуса гена *p53* и метилационог статуса промотора гена *p14* и *p16* у липосаркомима

- 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, 19. 06. 2014.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Радослав Давидовић

Број уписа _____

Студијски програм Молекуларна биологија еукариота

Наслов рада Анализа мутационог статуса гена p53 и метилационог статуса
промотора гена p14 и p16 у липосаркомима

Ментор др Весна Мандушић, научни сарадник Института за нуклеарне науке
„Винча“

др Горан Брајушковић, ванредни професор Биолошког факултета,
Универзитета у Београду

Потписани Радослав Давидовић

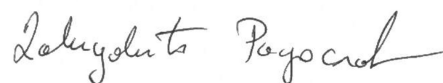
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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.

У Београду, 19. 06. 2014.

Потпис докторанда



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Анализа мутационог статуса гена *p53* и метилационог статуса промотора гена *p14* и *p16* у липосаркомима

која је моје ауторско дело.

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

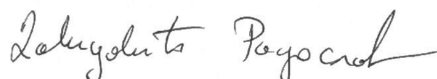
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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, 19. 06. 2014.



1. Ауторство - Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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.