

**UNIVERZITET U BEOGRADU**

**BIOLOŠKI FAKULTET**

Nađa S. Nikolić

**GENETIČKA I EPIGENETIČKA STUDIJA  
PLEOMORFNIH ADENOMA  
PLJUVAČNIH ŽLEZDA ČOVEKA:  
MUTACIONI STATUS *HER-2*, *C-MYC*,  
*H-RAS* I *TP53* GENA I METILACIONI  
STATUS *P14* I *P16* GENA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2015. godina

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Nađa S. Nikolić

**GENETIC AND EPIGENETIC STUDY OF  
PLEOMORPHIC ADENOMA OF THE  
SALIVARY GLANDS IN HUMANS:  
MUTATIONAL STATUS OF *HER-2*,  
*C-MYC*, *H-RAS* AND *TP53* GENES AND  
METHYLATION STATUS OF *P14* AND  
*P16* GENES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

## PODACI O MENTORU I ČLANOVIMA KOMISIJE

### MENTOR

**dr Jelena Milašin**, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Stomatološki fakultet

### ČLANOVI KOMISIJE

**dr Marina Stamenković – Radak**, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

**dr Jelena Milašin**, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Stomatološki fakultet

**dr Nasta Tanić**, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu – Institut za nuklearne nauke “Vinča”

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

## Zahvalnost

*Posebnu zahvalnost dugujem mojoj Mentorki prof. dr Jeleni Milašin koja me je na najbolji način uvela u istraživački rad. Hvala na ukazanom poverenju, podršci da se na pravi način izborim sa svim izazovima, na nesebičnim savetima, iscrpnim sugestijama i diskusijama tokom eksperimentalnog rada i pisanja. Hvala za entuzijazam, veru u uspeh i pokretačku energiju zahvaljujući kojima je ova disertacija postala stvarnost.*

*Zahvaljujem se i prof. dr Marini Stamenković-Radak za predusretljivost i dobru saradnju, znanje koje mi je nesebično prenosila još od ranih studentskih dana, kao i za svu podršku i pomoć u mom naučnom usavršavanju.*

*Zahvalnost dugujem i dr Nasti Tanić za profesionalan pristup i stručnu pomoć tokom eksperimentalnog rada, izrade publikacija i ove doktorske disertacije. Hvala na svim konstruktivnim savetima i prijateljskim sugestijama.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem mojim dragim Jeleni Čarkić, Jeleni Simonović i Bošku Toljiću za laboratorijske priče, pozitivnu i nasmejanu radnu atmosferu, prijateljstvo i neiscrpnu energiju.*

*Zahvaljujem se i hirurzima sa Klinike za maksilofacijalnu hirurgiju, pre svih dr Bobanu Aničiću, na ljubaznosti i prijatnom zajedničkom radu.*

*Posebno bih se zahvalila svima iz Laboratorije za humanu genetiku Stomatološkog fakulteta na vedrom duhu i pozitivnoj energiji kojim obogaćuju naš kolektiv, kao i na bezrezervnoj prijateljskoj podršci. Zahvaljujem se i svim kolegama i prijateljima iz naše Organizacione jedinice Stomatološkog fakulteta koji su na bilo koji način doprineli realizaciji ove doktorske disertacije.*

*Mojim prijateljima, koji su uvek bezrezervno verovali u mene, zahvaljujem što su bili i i dalje ostaju moja snaga i oslonac.*

*Ovaj rad posvećujem mojim najdražima, mojoj porodici. Vi ste moja inspiracija, moja najveća podrška. Naučili ste me pravim vrednostima u životu. Nadam se da ste ponosni!*

# GENETIČKA I EPIGENETIČKA STUDIJA PLEOMORFNIH ADENOMA PLJUVAČNIH ŽLEZDA ČOVEKA: MUTACIONI STATUS *HER-2*, *C-MYC*, *H-RAS* I *TP53* GENA I METILACIONI STATUS *P14* I *P16* GENA

## *Rezime*

**Uvod:** Pleomorfni adenom (PA) je spororastući benigni tumor koji se obično javlja u petoj deceniji života i mnogo se češće razvija kod žena. Najčešće pogađa velike pljuvačne žlezde, a čak u preko 70% slučajeva lokalizovan je u zaušnoj (parotidnoj) pljuvačnoj žlezdi. Uglavnom se uspešno leči hirurški, ali je ipak to jedini benigni tumor pljuvačnih žlezda koji pokazuje sklonost ka malignoj transformaciji u karcinom u pleomorfnom adenomu (CXPA).

U prvim, citogenetičkim studijama, analizom kariotipa pokazano je u najvećem broju slučajeva prisustvo karakteristične hromozomske translokacije koja uključuje *PLAG1* ili *HMGA2* gene. Međutim, kod ovih, kao i kod tumora sa neizmenjenim kariotipom, u nastanak i progresiju tumora su uključeni i drugi mehanizmi. Narušena mitogena signalna kaskada, koja u normalnim fiziološkim uslovima započinje na receptorima za faktore rasta (*HER-2* npr.), jedan je od ključnih mehanizama odgovornih za rast tumorske mase. Aberantni mitogeni signal može takođe biti generisan i endogeno kao rezultat mutacione aktivacije onko-proteina iz familije Ras. Jedan od mogućih mehanizama prenosa mitogenog signala realizuje se preko ciklin zavisnih kinaza, čiji je snažni regulator protein p16. Mitogeni signal prenosi se dalje u nukleus gde, između ostalih c-myc, stimuliše transkripciju gena uključenih u ćelijsku deobu. Ukoliko se u genomu dogode oštećenja, jedan od ključnih tumor supresorskih gena – *TP53*, zaustaviće ćelijski ciklus i/ili ćeliju uvesti u apoptozu. Jedan od pozitivnih regulatora p53 funkcije je p14, koji vezuje Mdm2, čime onemogućava formiranje Mdm2/p53 inhibitorynog kompleksa. Na funkciju i stabilnost ovih proteina mogu da utiču različite mutacije, a na nivo ekspresije različiti epigenetički mehanizmi, u prvom redu metilacija promotora.

**Cilj:** Cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje povezanosti mutacija u genima *HER-2*, *c-myc*, *H-ras* i *TP53*, kao i metilacionog statusa promotora *p16* i *p14* gena sa

nastankom, progresijom i malignom transformacijom pleomorfih adenoma parotidnih pljuvačnih žlezda.

**Materijal i metode:** Eksperimentalna grupa je obuhvatala 60 pacijenata sa dijagnostikovanim PA i 12 sa CXPA. Genomska DNK je izolovana iz isečaka tumorskog tkiva ukalupljenog u parafinu. Metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (real time PCR) analizirane su amplifikacije gena *HER-2* i *c-myc*; metodom konformacijskog polimorfizma jednolančanih segmenata DNK, uz potvrdu sekvenciranjem, analizirani su mutacioni statusi *H-ras* i *TP53* gena; metil specifičnim PCR-om utvrđen je metilacioni status promotora *p16* i *p14* gena. Hi kvadrat test i Fišerov test egzaktne verovatnoće korišćeni su za utvrđivanje razlika u distribuciji učestalosti mutacija i epimutacija u grupama (podela prema uzrastu, kliničkom ili patohistološkom nalazu, kao i među grupama - adenomi i karcinomi). Logističkom regresionom analizom ispitivani su genetički ili epigenetički prediktori maligne transformacije. Dobijeni rezultati su obrađeni statističkim programom SPSS 17.0.

**Rezultati:** Amplifikacija *HER-2* onkogeno utvrđena je kod 18% pacijenata sa PA i kod 42% pacijenata sa CXPA, dok je amplifikacija *c-myc* utvrđena kod svega 8% pacijenata sa PA i kod 33% pacijenata sa CXPA. Prisustvo mutacije u *H-ras* genu utvrđeno je u 15% PA i u 33% CXPA. U kodirajućim egzonima *TP53* gena mutaciju je imalo 25% pacijenata sa PA, i čak 75% pacijenata sa CXPA. Metilacija promotora *p16* gena utvrđena je u 67% adenoma i 67% karcinoma, a *p14* gena u 70% adenoma i 83% karcinoma. Nije uočeno postojanje asocijacije između mutacija ili epigenetičkih promena sa polom, uzrastom ili lošim navikama (pušenje i konzumacija alkohola), kao ni sa kliničkim ili patohistološkim parametrima. Poređenjem učestalosti mutacija i epigenetičkih promena u grupi pleomorfnih adenoma i karcinoma u pleomorfnom adenomu pokazano je da postoji statistički značajna razlika u učestalosti mutacija *c-myc* gena ( $p=0,037$ , Fišer) i *TP53* gena ( $p=0,002$ , Fišer) između ispitivanih grupa.

**Zaključak:** Ovim istraživanjem pokazana je visoka zastupljenost mutacija i epigenetičkih promena u ispitivanim genima. Epigenetičke promene u regionu

*CDKN2A* lokusa predstavljaju izuzetno značajan molekularni mehanizam u patogenezi pleomorfnog adenoma. Pokazano je da prisustvo genske amplifikacije *c-myc* 5,5 puta povećava šanse za malignu transformaciju pleomorfnog adenoma, dok prisustvo *TP53* mutacija čak 9 puta povećava šanse za malignu transformaciju.

**Ključne reči:** pleomorfni adenom, karcinom u pleomorfnom adenomu, mutacije, metilacioni status promotora, *HER-2*, *c-myc*, *H-ras*, *TP53*, *p16*, *p14*

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Genetika

**UDK:** [575.224+575.23]:[616-006.55:611.316](043.3)

**GENETIC AND EPIGENETIC STUDY OF PLEOMORPHIC ADENOMA OF THE SALIVARY  
GLANDS IN HUMANS: MUTATIONAL STATUS OF *HER-2,C-MYC, H-RAS* AND *TP53*  
GENES AND METHYLATION STATUS OF *P14* AND *P16* GENES**

***Abstract***

**Introduction:** Pleomorphic adenoma (PA) is a slow-growing benign tumor that usually develops in the fourth or fifth decade of life, more often in women. It is mostly found in the major salivary glands, and over 70% are localized in the parotid salivary gland. Surgical removal is usually successful and the patient is cured. However it is the only benign salivary gland tumor with a tendency toward malignant transformation into carcinoma ex pleomorphic adenoma (CXPA).

PAs have been extensively studied from a cytogenetic point of view and indeed the presence of specific chromosomal translocations involving *PLAG1* or *HMGA2* gene loci have been reported in many instances. There has been much less studies on other molecular events potentially involved in tumor development and progression. Disruption of the mitotic signaling cascade is one of the key mechanisms responsible for tumor growth. The aberrant signaling does not necessarily start from growth factors and their receptors. It may be generated endogenously, for instance from the mutated Ras protein. One possible transmission of the mitogen signal is through cyclin dependent kinases that are strongly regulated by the p16 protein. The signal is transmitted to the nucleus where c-myc, among others, stimulates the transcription of the cell cycle regulatory genes. Accumulation of DNA damage leads to cell cycle arrest and programmed cell death under the control of p53. p14 interactions with Mdm2 initiate p53-dependant cell cycle arrest and apoptosis. Lack of p14 results in higher levels of Mdm2 and p53 inhibition.

Expression, function and stability of these cancer gene products may be considerably affected by mutations, and epimutations – primarily gene promoter methylation.

**Aim:** The aim of this doctoral dissertation was to assess the frequency and thus the relevance of mutations in *HER-2, c-myc, H-ras* and *TP53* genes, as well as



methylation status of *p16* and *p14* gene promoters in the development, progression and malignant transformation of pleomorphic adenoma of parotid salivary glands.

**Material and Methods:** The study group included 60 patients diagnosed with PA and 12 diagnosed with CXPA. Genomic DNA was extracted from paraffin embedded tumor tissue. Gene amplifications of *HER-2* and *c-myc* genes was analyzed by real time polymerase chain reaction (real time PCR); the presence of mutations in the coding regions of *H-ras* and *TP53* genes was analyzed by single strand conformation polymorphism analysis and validated by sequencing; gene promoter methylation status of *p16* and *p14* genes was assessed by methylation specific PCR. Chi square test and Fisher exact test were used to analyze the differences in the distribution of mutations and epigenetic lesions among specific groups (according to age, clinical or pathohistological findings, as well as between groups – adenomas and carcinomas). Logistic regression analysis was used to assess genetic and/or epigenetic predictors of malignant transformation. Calculations were performed using SPSS 17.0 statistical software.

**Results:** Gene amplification of *HER-2* oncogene was found in 18% of PA patients and in 42% of CXPA patients, whilst gene amplification of *c-myc* oncogene was found in only 8% of PA patients and in 33% of CXPA patients. The presence of *H-ras* gene mutation was found in 15% of PA and in 33% of CXPA. Mutations in the coding regions of *TP53* gene were detected in 25% of PA patients, and as high as 75% of CXPA patients. The prevalence of *p16* gene promoter methylation was 67% in both adenoma and carcinoma groups, and *p14* gene promoter methylation was 70% in the adenoma group and 83% in the carcinoma group. No association was found between mutations and/or epigenetic changes with gender, age or bad habits (smoking and alcohol consumption), nor with clinical and pathohistological findings. Comparison of mutation prevalence and epigenetic changes between PA and CXPA group showed the presence of statistically significant difference in the distribution of *c-myc* ( $p=0.037$ , Fisher) and *TP53* mutations ( $p=0.002$ , Fisher).

**Conclusion:** This research showed a relatively high prevalence of mutations in the *HER/ras/myc* signaling cascade genes and also established the importance of *p14*

and *p16* gene promoter methylation. Epigenetic changes in the *CDKN2A* locus represent a critical event in pleomorphic adenoma pathogenesis. It was also demonstrated that the presence of *c-myc* oncogene amplification increases the chance for malignant transformation 5.5 times, whilst the presence of *TP53* mutations leads to a 9-fold increase in chance for malignant transformation.

**Key words:** pleomorphic adenoma, carcinoma ex pleomorphic adenoma, mutations, promoter methylation status, *HER-2*, *c-Myc*, *H-ras*, *TP53*, *p16*, *p14*

**Scientific field:** Biology

**Narrower scientific field:** Genetics

**UDC:** [575.224+575.23]:[616-006.55:611.316](043.3)

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. TUMORI</b> .....	3
<b>1.2. PLJUVAČNE ŽLEZDE</b> .....	3
<b>1.2.1. Građa i podela pljuvačnih žlezda</b> .....	4
<b>1.2.2. Tipovi tumora pljuvačnih žlezda</b> .....	5
<b>1.2.2.1. Pleomorfni adenom pljuvačnih žlezda</b> .....	7
<b>1.2.2.2. Karcinom u pleomorfnom adenomu</b> .....	8
<b>1.2.3. Epidemiologija i incidenca</b> .....	8
<b>1.2.4. Etiologija i etiopatogeneza</b> .....	9
<b>1.2.5. Histološka građa</b> .....	10
<b>1.3. MOLEKULARNA OSNOVA TUMORA</b> .....	16
<b>1.3.1. Onkogeni</b> .....	16
<b>1.3.1.1. HER-2</b> .....	18
<b>1.3.1.2. C-MYC</b> .....	20
<b>1.3.1.3. H-RAS</b> .....	23
<b>1.3.2. Tumor supresorski geni</b> .....	26
<b>1.3.2.1. TP53</b> .....	30
<b>1.3.2.2. CDKN2A lokus</b> .....	36
<b>1.3.2.2.1. p16 gen</b> .....	38
<b>1.3.2.2.2. p14 gen</b> .....	40
<b>2. CILJEVI</b> .....	43
<b>3. PACIJENTI, MATERIJAL I METODE</b> .....	45
<b>3.1. PACIJENTI I BIOLOŠKI MATERIJAL</b> .....	46
<b>3.2. METODE</b> .....	46
<b>3.2.1. Izolacija DNK iz parafinskih kalupa tumorskog tkiva</b> .....	46
<b>3.2.2. Određivanje koncentracije DNK u uzorku</b> .....	47
<b>3.2.3. Lančana reakcija polimeraze (PCR)</b> .....	48
<b>3.2.4. Poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE)</b> .....	48
<b>3.2.5. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (real time PCR, qPCR)</b> .....	49
<b>3.2.5.1. qPCR reakcija u detekciji genomske amplifikacije HER-2 gena</b> .....	51
<b>3.2.5.2. qPCR reakcija u detekciji genomske amplifikacije c-myc gena</b> .....	52
<b>3.2.6. SSCP</b> .....	53

3.2.6.1.	PCR-SSCP reakcija u detekciji mutacija u <i>H-ras</i> genu.....	53
3.2.6.2.	PCR-SSCP reakcija u detekciji mutacija u <i>TP53</i> genu.....	55
3.2.7.	Bisulfitna modifikacija DNK.....	57
3.2.8.	Metil specifična lančana reakcija polimeraze (metil specifični PCR) ....	57
3.2.8.1.	Metil specifični PCR za ispitivanje metilacionog statusa <i>p16</i> gena	58
3.2.8.2.	Metil specifični PCR za ispitivanje metilacionog statusa <i>p14</i> gena	59
3.2.9.	Statistička analiza.....	60
4.	<b>REZULTATI</b> .....	61
4.1.	<b>DISTRIBUCIJA PACIJENATA PREMA GODINAMA STAROSTI I POLU, KONZUMIRANJU DUVANA I ALKOHOLA</b> .....	62
4.2.	<b>LOKALIZACIJA TUMORA, VELIČINA TUMORA, VREME PROTEKLO OD UOČAVANJA PRVE PROMENE I HISTOLOŠKI TIP</b> .....	65
4.3.	<b>KARAKTERISTIKE KARCINOMA U PLEOMORFNOM ADENOMU</b> .....	68
4.4.	<b>ANALIZA GENETIČKIH REZULTATA</b> .....	70
4.4.1.	Genska amplifikacija <i>HER-2</i> gena .....	70
4.4.2.	Genska amplifikacija <i>c-myc</i> gena.....	71
4.4.3.	Mutacije u <i>H-ras</i> genu.....	71
4.4.4.	Mutacije u <i>TP53</i> genu.....	72
4.5.	<b>ANALIZA EPIGENETIČKIH REZULTATA</b> .....	74
4.5.1.	Metilacija promotora <i>p16</i> gena.....	74
4.5.2.	Metilacija promotora <i>p14</i> gena.....	75
4.6.	<b>UPOREDNA ANALIZA REZULTATA</b> .....	76
4.6.1.	Analiza kombinovane uloge mutacija u genima <i>HER-2/H-ras/c-myc</i> signalne kaskade u patogenezi pleomorfnog adenoma .....	77
4.6.2.	Analiza učestalosti kombinacija metilacije promotora <i>p16</i> i <i>p14</i> gena	78
4.7.	<b>ANALIZA POVEZANOSTI MUTACIJA I METILACIJE SA ETIOLOŠKIM FAKTORIMA I KLINIČKIM I PATOHISTOLOŠKIM NALAZOM</b> .....	79
4.8.	<b>ANALIZA PREDIKTORA MALIGNNE TRANSFORMACIJE</b> .....	81
5.	<b>DISKUSIJA</b> .....	84
6.	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	94
7.	<b>LITERATURA</b> .....	96
8.	<b>BIOGRAFIJA AUTORA</b> .....	119
9.	<b>PRILOZI</b> .....	121

# ***1. UVOD***

Tokom poslednjih nekoliko decenija postignut je značajan napredak u shvatanju osnove procesa nastanka i rasta tumora zahvaljujući razvoju velikog broja molekularno-bioloških i molekularno-genetičkih metoda. Bolje poznavanje strukture genetičkog materijala omogućilo je bolje razumevanje funkcionisanja ćelija, ali i patoloških promena u njima poput nekontrolisane deobe ili izostanka programirane ćelijske smrti. Usavršavanjem eksperimentalnih tehnika u velikoj meri olakšano je razumevanje etiologije benignih i malignih tumora. Time su povećane mogućnosti prevencije, preciznije dijagnoze i efikasnije, personalizovane terapije.

## 1.1. TUMORI

Tumor ili neoplazija je zajednički naziv za abnormalnu ćelijsku masu, odnosno klon koji nastaje kao posledica nekontrolisanih deoba genetički i/ili epigenetički oštećene ćelije.

Sve tumore delimo na maligne i benigne. Osnovna razlika između ove dve klase je u invazivnosti kao meri agresivnosti. Maligni tumori poseduju sposobnost prodiranja u okolna tkiva, kao i metastaziranja. Takođe ih karakteriše i anaplazija, odnosno gubitak strukturne i funkcionalne diferenciranosti ćelija.

Benigni tumori, za razliku od malignih, nikada ne prodiru u okolno tkivo. Ovu klasu tumora karakteriše relativno spor rast i prisustvo fibrozne kapsule sa neizmenjenim epitelom. Ćelije benignih tumora još uvek fenotipski podsećaju na normalnu ćeliju, odnosno pokazuju, i dalje, visok stepen diferenciranosti.

Benigni tumori se mogu klasifikovati na različite načine. Jedna od klasifikacija ovih tumora zasnovana je na tipu ćelija, tj. tkiva iz koga se tumor razvio. Tako razlikujemo: lipome – tumore koji se razvijaju u adipoznom tkivu, hondrome – benigne tumore hrskavičavog tkiva, adenome – benigne tumore žlezdanog tkiva, i druge.

## 1.2. PLJUVAČNE ŽLEZDE

Pljuvačne žlezde (*glandulae salivatores s. oris*) su parne žlezde sa spoljašnjim lučenjem, smeštene u ili oko usne duplje u koju, preko specijalnih izvodnih kanala - duktusa, izbacuju sadržaj - salivu, odnosno pljuvačku. Smatraju se važnom komponentom gornjeg dela digestivnog trakta budući da saliva, pored ostalog, sadrži enzime amilazu i lipazu sa kojima praktično i počinje varenje hrane. Pljuvačne žlezde, odnosno pljuvačka ima važnu ulogu u organizmu jer pored toga što „natapa“ hranu, olakšava gutanje i započinje varenje, saliva štiti zube od demineralizacije, ima antimikrobno dejstvo i štiti sluzokožu usne duplje od isušivanja, mehaničkih povreda i olakšava zarastanje rana (Mandel 1987).

### 1.2.1. Građa i podela pljuvačnih žlezda

Pljuvačne žlezde su parni organi ektodermalnog porekla koji nastaju invaginacijom pupoljaka epitela primitivne usne duplje u mezenhim. Raspoređene su oko i u usnoj duplji u koju i izlučuju svoj sadržaj. Pljuvačne žlezde delimo na velike i male (Holsinger i Bui 2007).

*Male pljuvačne žlezde* su smeštene ispod sluzokože većeg dela usne duplje, osim u predelu desni i prednjeg dela tvrdog nepca. Broj im se kreće od 600 do 1000. S obzirom na lokaciju, neposredno ispod mukozne membrane usne duplje, njihovi izvodni kanali su daleko kraći od izvodnih kanala velikih pljuvačnih žlezda. Opšta karakteristika svih malih pljuvačnih žlezda je odsustvo vezivno-tkivne kapsule. Prema lokalizaciji, male pljuvačne žlezde se dalje dele na: labijalne, bukalne, palatinalne, tonzilarne, retromolarne, lingvalne i faringealne. U manjem broju nalaze se i u nazofarinksu, larinksu, paranazalnim šupljinama i traheji i one su endodermalnog porekla.

*Velike pljuvačne žlezde* izdvojene su u posebne organe koji su okruženi vezivnom kapsulom, a septama podeljeni na lobuse i lobuluse. Sa usnom šupljinom povezane su preko dužih izvodnih kanala, duktusa. Kroz septe prolaze krvni i limfni sudovi, kao i nervna vlakna. Parenhim žlezde čini sistem kanala koji započinju loptastim proširenjima, nalik grozdu (sekretorni deo žlezde, tzv. acinus). Prostor između acinusa ispunjava dobro vaskularizovana vezivna stroma. Po lokaciji, velike pljuvačne žlezde su podeljene na:

- zaušne ili parotidne (*gl. parotis*),
- podvilične ili submandibularne (*gl. submandibularis*),
- podjezične ili sublingvalne (*gl. sublingvalis*).

Parotidne žlezde su najveće pljuvačne žlezde, seroznog tipa, smeštene u prostor ispred ušne školjke. Ove velike pljuvačne žlezde se nalaze u bliskom kontaktu sa perifernim ograncima facijalnog nerva - *nervus facialis* (Slika 1).





**Slika 1:** Anatomski odnos facijalnog nerva (*nervus facialis*) prema parotidnoj pljuvačnoj žlezdi  
(preuzeto:<http://www.parotidmd.com/salivary-gland-stones/>)

### **1.2.2. Tipovi tumora pljuvačnih žlezda**

Tumori pljuvačnih žlezda predstavljaju, morfološki i klinički, heterogenu grupu neoplazija sa relativno niskom učestalošću koja se u humanoj populaciji kreće oko 4%. Heterogenost ove klase tumora je posledica kako porekla – epitelnog, mezenhimalnog ili limfoidnog, tako i njihove invazivnosti – benigni i maligni (Speight i Barrett 2002).

Oko 95% svih tumora pljuvačnih žlezda javlja se kod odraslih osoba. Izuzetno su retki kod dece mlađe od 10 godina, a ako se jave obično je reč o pleomorfnom adenomu ili mukoepidermoidnom karcinomu (Bradley 2004).

Klasifikacija tumora pljuvačnih žlezda, koju je predložila SZO 2005. godine, bazira se na invazivnosti i tipu ćelija koje su pretrpele neoplastičnu transformaciju. Po toj klasifikaciji tumori pljuvačnih žlezda se dele na benigne i maligne. Benigni se

dalje, po tipu ćelija klasifikuju kao pleomorfni adenomi, mioepiteliomi, adenomi bazalnih ćelija, itd, a maligni na karcinome acinusnih ćelija, mukoepidermoidne karcinome, adenoidne cistične karcinome, itd. Potpuni spisak benignih i malignih neoplazija pljuvačnih žlezda, prikazan je u tabeli (Tabela 1).

**Tabela 1:** WHO Klasifikacija tumora pljuvačnih žlezda (Barnes 2005)

<b>Benigni epitelni tumori</b>	<b>Maligni epitelni tumori</b>
Pleomorfni adenom	Karcinom acinusnih ćelija
Mioepiteliom	Mukoepidermoidni karcinom
Adenom bazalnih ćelija	Adenoidni cistični karcinom
Warthin-ov tumor	Polimorfni „low grade“ karcinom
Onkocitom	Epitelno-mioepitelni karcinom
Kanalikularni adenom	Karcinom svetlih ćelija, NOS
Sebaceozni adenom	Adenokarcinom bazalnih ćelija
Limfadenom	Sebaceozni karcinom
Sebacealni	Sebaceozni limfadenokarcinom
Nesebacealni	Cistadenokarcinom
Duktalni papilomi	„Low-grade“ kribriformni cistadenokarcinom
Invertovani duktalni papilom	Mucinozni adenokarcinom
Intraduktalni papilom	Onkocitni karcinom
Sialoadenoma papiliferum	Karcinom pljuvačnog duktusa
Cistadenom	Adenokarcinom, NOS
	Mioepitelni karcinom
	Karcinom u pleomorfnom adenoma
	Karcinom skvamoznih ćelija
	Karcinom malih ćelija
	Karcinom velikih ćelija
	Limfoepitelni karcinom
	Sialoblastom
<b>Ne-epitelni tumori (tumori mekog tkiva i hematolimfoidni tumori)</b>	<b>Sekundarni tumori</b>

### 1.2.2.1. Pleomorfni adenom pljuvačnih žlezda

Pleomorfni adenom (PA) je najčešći i najbolje opisan tumor velikih pljuvačnih žlezda. Ovaj tip tumora karakterišu izrazito spor rast i gotovo potpuno odsustvo simptoma, kao i relativno retka maligna alteracija. Maligna alteracija, pojava karcinoma u pleomorfnom adenomu, karakteristična je za one PA koji su „rasli“ godinama. Tako se u kliničkoj praksi, sreću i slučajevi kod kojih je PA rastao preko četiri decenije pre nego što je došlo do maligne alteracije (Olsen i Lewis 2001).

Pleomorfni adenom se najčešće javlja u petoj deceniji života, a izuzetno retko kod dece i adolescenata, kod kojih je on, inače, najučestaliji tumor pljuvačnih žlezda (da Cruz Perez i sar. 2004). Istovremeno, pleomorfni adenomi su daleko češći kod žena, što ukazuje na potencijalnu ulogu estrogena u genezi pleomorfnog adenoma. Naime, podaci iz literature ukazuju na razlike u ekspresiji estrogenskih receptora kod PA u poređenju sa zdravim žlezdama, što podržava tezu o ulozi estrogena u njihovoj patogenezi (Wong i sar. 2009; Kolude i sar. 2013).

Makroskopski, pleomorfni adenom je ovalnog oblika, glatke površine, jasno ograničen i uvek inkapsuliran. Međutim, površina kapsule pleomorfnih adenoma, ponekad, može biti i perforirana zbog čega tumor „infiltrira“ okolno tkivo, što ishod lečenja čini neizvesnijim. Funkcija facijalnog nerva je očuvana. Poremećaj funkcije facijalnog nerva se javlja samo u slučaju njegove maligne alteracije.

Pleomorfni adenom se uglavnom uspešno leči hirurškom resekcijom. Prema literaturnim podacima stopa recidiviranja je varijabilna i može iznositi između 1 i 50% i to nakon dužeg vremenskog perioda (Thoeny 2007). Pored sklonosti ka recidiviranju, pleomorfni adenom je jedini benigni tumor pljuvačnih žlezda koji ima mogućnost maligne transformacije u oko 6% slučajeva (Gnepp 1993).

### **1.2.2.2. Karcinom u pleomorfnom adenomu**

Karcinom u pleomorfnom adenomu (CXPA) je maligni tumor koji nastaje unutar primarnog PA ili PA koji je recidivirao. Za CXPA je karakteristično prisustvo kako malignog, tako i benignog tumorskog tkiva, a od razlika u njihovom procentualnom odnosu zavisice i makroskopske karakteristike ovih malignih neoplazmi. Prema literaturnim podacima, udeo maligne komponente u CXPA iznosi najčešće preko 50% (Zbären i sar. 2008). U nekim slučajevima, događa se čak da maligna komponenta potpuno prevlada, ne ostavljajući tragove benignog. Utvrđivanje benignog porekla CXPA u takvim slučajevima, oslanja se na prethodnu biopsiju, kliničko – patohistološke korelacije ili na naknadnom uzorkovanju. Suprotno ovom, u CXPA je moguća i pojava raštrkanih, manjih polja maligno transformisanih ćelija koje karakteriše jedarna pleomorfnost, česte/atipične mitoze, hemoragija i nekroza. Ovakvi CXPA-ma predstavljaju poseban dijagnostički izazov, jer su čest uzrok pogrešne dijagnoze, a time i neadekvatnog terapijskog protokola.

Prema invazivnosti, karcinome u pleomorfnom adenomu delimo na: intrakapsularne (neinvazivne), minimalno invazivne i invazivne. Intrakapsularni su oni koji, kao što im ime kaže, ne napuštaju fibroznu kapsulu, dok se minimalno invazivni šire van nje na udaljenost manju od 1,5 mm, a invazivni na veću (Gnepp i sar. 2005).

### **1.2.3. Epidemiologija i incidenca**

Pleomorfni adenomi su najčešći benigni tumori pljuvačnih žlezda kod odraslih, a treći po učestalosti kod dece (Lowe i sar. 2001). Na osnovu podataka iz literature, udeo PA u benignim tumorima velikih pljuvačnih žlezda iznosi čak 70% (Moonis i sar. 2007), odnosno 50% svih parotidnih tumora (Spiro 1986). Prema nalazima Thoeny-a i sar. učestalost PA u parotidnoj žlezdi je znatno veća - 84%

(Thoeny 2007). Međutim, podaci o učestalosti ovih tumora na teritoriji naše zemlje nešto su drugačiji. Epidemiološka studija urađena na Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu 2010. godine, je pokazala da se udeo PA među ostalim tumorima pljuvačnih žlezda kreće oko 37% (Aničić i Dožić 2010).

Kao što je već istaknuto, pleomorfni adenomi su jedini tumori pljuvačnih žlezda koji maligno alteriraju, i to sa učestalošću koja se kreće između 5 i 25%. (Spiro 1986; Zbären i sar. 2003). Prema podacima o CXPA koje je sakupio Gnepp, učestalost maligne alteracije PA u odnosu na sve neoplazije pljuvačnih žlezda iznosi 3,6%, a u odnosu na maligne tumore pljuvačnih žlezda je 11,6%. (Gnepp 1993).

#### **1.2.4. Etiologija i etiopatogeneza**

Geneza pleomorfnog adenoma, kao i drugih tumora oralne duplje, stoji u tesnoj vezi sa nizom opštepoznatih faktora rizika. Među etiološke faktore od posebnog značaja u patogenezi pleomorfni adenoma, ubrajaju se alkohol i pušenje koji između ostalog, ispoljavaju i sinergistički i kumulativni efekat. Pored navedenih, u značajne etiološke faktore spadaju i izloženost aflatoksinima i zračenju, infekcija Epstein Bar virusom kao i određene dijetetske i nutritivne navike.

Etiopatogeneza, odnosno razvoj pleomorfnog adenoma pod uticajem pomenutih egzogenih, ali i endogenih faktora rizika, još uvek nije sasvim jasna. Po jednoj od teorija, *multicelularnoj*, svaki tip tumora pljuvačne žlezde, nastaje neoplastičnom transformacijom specifičnog tipa diferencirane ćelije pljuvačne žlezde. Tako je i pleomorfni adenom rezultat alteracije ćelije interkalatnog duktusa. Prema drugoj, *bicelularnoj teoriji matičnih ćelija*, svaka neoplazija vodi poreklo od jedne ili dve rezervne - matične ćelije interkalatnog duktusa, pri čemu stepen diferenciranosti matičnih ćelija određuje da li će neoplazija biti benigna ili maligna. Podaci iz literature uglavnom podržavaju bicelularnu teoriju matičnih ćelija u

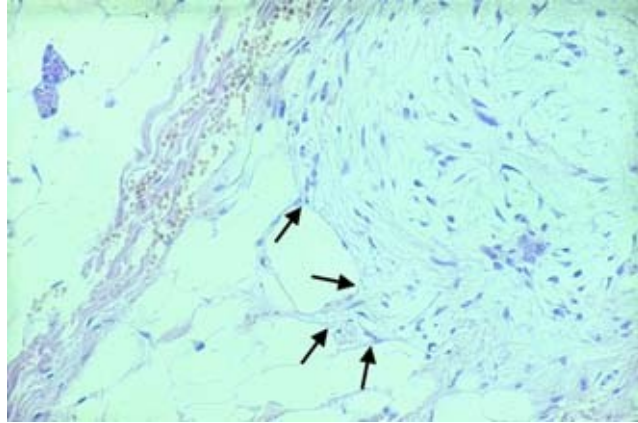
etiopatogenezi pleomorfnih adenoma pljuvačnih žlezda, jer ona bolje tumači moguće poreklo neoplazija koje sadrže više različitih tipova ćelija (Bradley 2004).

Patogeneza karcinoma u pleomorfnom adenomu odvija se u fazama, pa se često u literaturi označava kao sekvencijalna evolucija (Cheuk i Chan 2007). U najranijoj fazi, maligne ćelije sa velikim atipičnim jedrima zamenjuju epitelne ćelije duktusa u već postojećem pleomorfnom adenomu. Vremenom, ove ćelije se odvajaju i vrše invaziju okolne strome. U slučaju da invazija završi u okvirima postojećeg pleomorfno adenoma, karcinom postaje „intrakapsularni“, i nakon kompletne ekscizije, prognoza je odlična jer karcinom uglavnom ne metastazira.. Ukoliko se invazija nastavi van okvira fibrozne kapsule pleomorfno adenoma, karcinom prerasta u „minimalno invazivni“ ili „invazivni“.

### **1.2.5. Histološka građa**

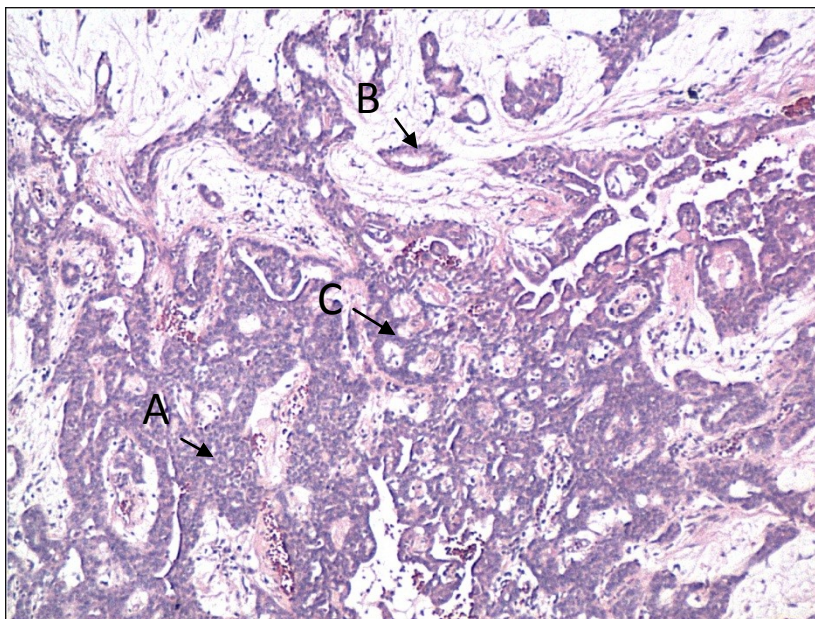
Pleomorfni adenomi su izgrađeni od vezivne kapsule, epitelnih i mioepitelnih ćelija i mezenhimskih odnosno stromalnih elemenata. Zbog prisustva ćelijskih elemenata različitog porekla, kao i zbog njihovog promenljivog međuodnosa, pleomorfni adenomi su ranije u literaturi označavani kao mešoviti (mixtus) tumori.

Kapsula pleomorfnih adenoma je najčešće varijabilne debljine (5-250  $\mu\text{m}$ ) i postojanosti. Tačnije, na pojedinim mestima možemo uočiti zone tumorskog tkiva sa izrazito tankom kapsulom (“focally very thin capsules”), bez kapsule (Slika 2) ili sa nekompletnom kapsulom (“focal absence of encapsulation”), kao i zone sa hernijacijom (“capsular herniation”). Istovremeno, za većinu PA je karakteristično da pružaju prstolike izraštaje u kapsulu ili čak prolaze kroz kapsulu i formiraju pseudopodije i satelitske čvorove (“satellite nodules”).

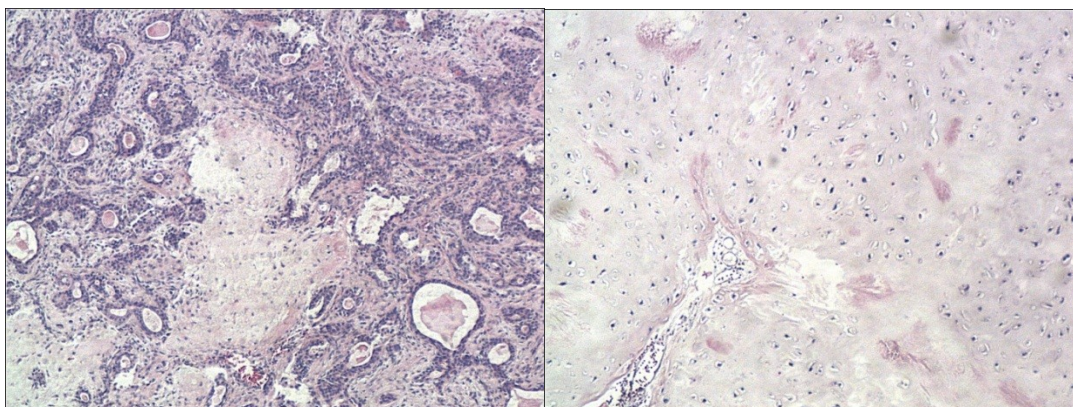


**Slika 2:** Zona miksoidnog PA bez kapsule, tumor prodire između adipocita (strelice) lobula u okolno tkivo parotidne žlezde (HE X 200); preuzeto (Stennert i sar. 2001)

Epitelna komponenta u PA građena je od epitelnih ćelija i obično formira ostrva, retikularne formacije ili duktusu-slične strukture (Slika 3). U okviru duktusu slične strukture, luminalne ćelije su uglavnom kuboidne, a ponekad je prisutan i spoljašnji sloj mioepitelnih ćelija. Mioepitelne ćelije morfološki mogu ličiti na (i) luminalne ćelije, (ii) hondrocite zbog vakuolizovane citoplazme ili pak (iii) glatko-mišićne ćelije zbog vretenastog oblika i eozinofilne citoplazme. Zajedno sa stromom, izmenjene mioepitelne ćelije čine mezenhimalnu komponentu tumora. Sa druge strane, stromalni elementi pokazuju različite nivoe miksoidne, hijalinske, hrskavičave, pa čak i koštane diferencijacije, zbog nakupljanja mukoidnog ili hijalinskog materijala između mioepitelnih ćelija (Slika 4).



**Slika 3:** Pleomorfni adenom (HE X 100). Na slici se vidi kako epitelna komponenta delom pravi plaže (A), delom duktuse (B) i retikularne formacije (C); stromalna komponenta miksomatozna.



**Slika 4:** (levo) u centru vidnog polja osteoidna komponenta; epitelne ćelije formiraju duktuse i plaže; (desno) osteoidna mezenhimalna komponenta izgrađena od hipercelularnog koštanog tkiva

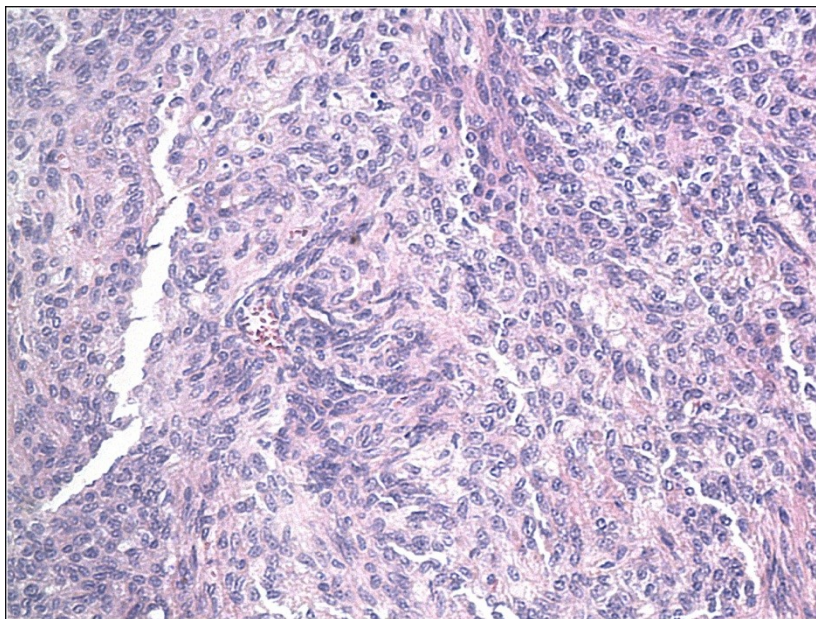
Histološku klasifikaciju PA dao je Seifert sa saradnicima, na osnovu uočenih pravilnosti u histološkim karakteristikama tumora, bez obzira na njihov



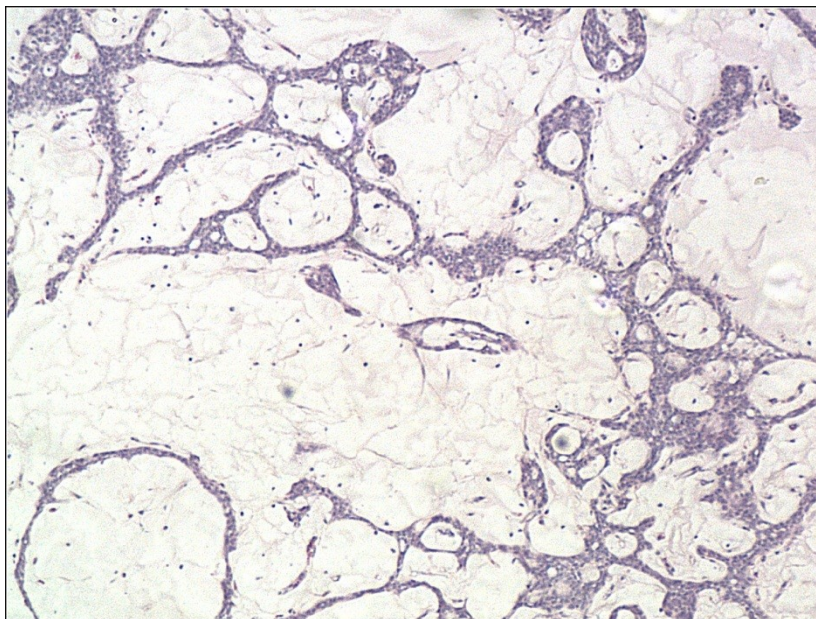
pleomorfizam (Seifert i sar. 1976). Podela na histološke tipove se dakle, bazira na stepenu diferencijacije epitelnih ćelija, količini i prirodi strome i njihovom količinskom međuodnosu. Prototip stromalne diferencijacije predstavlja miksomatozna stroma, dok je koštana diferencijacija najređa (1%).

Pleomorfne adenome delimo na:

- PA ćelijskog tipa (“cell-rich”), tumore sa mnoštvom epitelnih ćelija i malom količinom miksomatozne strome (Slika 5),
- PA miksoidnog tipa (“stroma-rich”), tumore sa stromom različitog stepena diferencijacije i malom količinom ćelija (Slika 6)
- klasični ili balansirani tip PA (“stroma-cell balanced”), tumore sa jednakim udelom epitelne i stromalne komponente.



**Slika 5:** Ćelijski histološki tip pleomorfnog adenoma sa više od 90% epitelnih ćelija



**Slika 6:** Miksoidni histološki tip pleomorfnog adenoma; na preparatu dominira miksomatozna stroma, dok epitelne komponente formiraju retikularnu strukturu

Podaci iz literature jasno sugerišu da je među pleomorfnim adenomima najčešće zastupljen PA miksoidnog tipa, a najređi je balansirani. Tako, Stennert i saradnici u analiziranom uzorku nalaze da je miksoidni tip zastupljen sa 51%, ćelijski sa 35%, a balansirani sa svega 14% (Stennert i sar. 2001). Sličan odnos u nivou učestalosti različitih histoloških tipova navode i drugi autori (Ito i sar. 2009).

Karcinomi u pleomorfnom adenomu se, kao što je već rečeno, prema invazivnosti mogu podeliti na intrakapsularne ili neinvazivne, minimalno invazivne i invazivne. Intrakapsularni CXPA se odlikuju benignim fenotipom, slično PA u kome se razvijaju (Brandwein i sar. 1996). Minimalno invazivni CXPA histološki nalikuju intrakapsularnim, sa nešto većim udelom maligne komponente. Invazivnim CXPA preovladava maligna komponenta, dok je benigna uglavnom u formi hijalinizirane strome sa proređenim, raštrkanim duktalnim strukturama. Maligne ćelije invazivnih CXPA pokazuju tendenciju smanjenja veličine i povećanja mobilnosti (Altemani i sar. 2005).

Karcinome u pleomorfnom adenomu možemo podeliti i prema ćelijskom poreklu maligne komponente na (Altemani i sar. 2005):

- CXPA sa samo epitelnim poreklom – maligno tkivo nastaje transformacijom epitelnih ćelija PA u kome se razvijaju,
- CXPA sa kombinovano epitelno-mioepitelnim poreklom – maligno tumorsko tkivo vodi poreklo od epitelnih, ali i izmenjenih mioepitelnih ćelija iz PA,
- CXPA sa isključivo mioepitelnim poreklom – maligno tkivo vodi poreklo od izmenjenih mioepitelnih ćelija PA.

CXPA sa epitelnom malignom komponentom su najčešći, dok su CXPA sa isključivo mioepitelnim poreklom najređi i uglavnom invazivni (Demasi i sar. 2009).

Varijabilnost ćelijske morfologije, prostorne organizacije, kao i stepena diferencijacije strome determiniše i različite kliničke osobine PA i CXPA i u mnogome utiče na ishod lečenja.

### **1.3. MOLEKULARNA OSNOVA TUMORA**

U osnovi neoplastične transformacije leži grupa gena koja se označava kancerskim genima. Oni su u normalnim ćelijama odgovorni za neometano odvijanje osnovnih ćelijskih procesa kao što su deoba, diferencijacija i apoptoza. Ukoliko dođe do strukturnih ili funkcionalnih lezija u kancerskim genima, oni stiču neoplastični potencijal, čime narušavaju balans između ćelijske deobe i apoptoze, a sama ćelija podleže neoplastičnoj transformaciji.

U genomu čoveka postoje tri klase kancerskih gena:

- Onkogeni
- Tumor supresorski geni
- Geni za popravku grešaka na molekulu DNK

Od ove tri klase gena, najvažnije mesto u genezi tumora imaju onkogeni i tumor supresorski geni. Svoj neoplastični potencijal stiču aktivacijom (onkogeni) ili inaktivacijom (tumor supresorski geni).

#### **1.3.1. Onkogeni**

Onkogeni su geni čiji proteinski produkti stimulišu ćelijski rast i deobu, odnosno promoteri ćelijskog ciklusa. U normalnoj ćeliji, oni se i prostorno i vremenski eksprimiraju na strogo kontrolisan način. Onkogeni potencijal pripadnici ove klase gena (proto-onkogeni), stiču strukturnim lezijama makar jednog alela, što ih svrstava u kategoriju dominantnih kancerskih gena.

Na osnovu položaja i funkcije koju u ćeliji imaju, proteinski produkti proto-onkogeni mogu biti:

- faktori rasta – inicijatori mitogenog signala (*c-sis*)
- receptori za faktore rasta – transmembranske protein kinaze (*HER-2*)
- proteini sa GTP-aznom aktivnošću i citoplazmatske protein kinaze – prenosioci mitogenog signala (*c-abl*, *c-src*, geni porodice *ras*)
- transkripcijski faktori (*c-myc*)

Osnovna karakteristika svih proto-onkogeni je visoka evolutivna konzerviranost kodirajućih sekvenci, što ukazuje na ulogu onkoproteina u osnovnim ćelijskim procesima. Danas znamo da mutirana forma proto-onkogeni uzrokuje nekontrolisan ćelijski rast, odnosno da su njihovi aberantni proteinski produkti odgovorni za produkciju, prijem, prenos i realizaciju „nelegitimnih“ mitogenih signala. To praktično znači da će aktivacija onkogeni čiji je proteinski proizvod faktor rasta, receptor za faktor rasta (*HER-2*) ili prenosilac mitogenog signala (*H-ras*) imati za posledicu nekontrolisanu proliferaciju ćelija.

Osnovni mehanizmi aktivacije proto-onkogeni su:

- mutacije
- amplifikacije gena
- hromozomski rearanžmani

Prve studije na PA bavile su se detekcijom i definisanjem tipa hromozomskih rearanžmana koji se mogu javiti u ovom tipu tumora. Rezultati su jasno pokazali da čak 70% PA nosi jedan od tri tipa specifičnih citogenetičkih aberacija: recipročne translokacije koje obuhvataju lokus 8q12 (39% slučajeva), translokacije ili insercije koje uključuju lokus 12q13-15 (8% slučajeva) i sporadične klonalne promene koje ne obuhvataju nijedan od ova dva lokusa (23% slučajeva) (Nagao i sar. 2005). Utvrđeno je da je većina translokacija uključivala gen *PLAG1* na lokusu 8q12, a translokacione partnere su činili: *CTNNB1* (gen koji kodira  $\beta$ -katenin), *LIFR* (engl. leukaemia inhibitory factor receptor) i *SII* (faktor elongacije transkripcije SII) u tzv. kriptičnoj translokaciji (Hess i Kossev 2002).

Citogenetičke studije, posebno različitih tipova translokacija *PLAG1* gena, decenijama su bile u fokusu naučnih istraživanja. Sa druge strane, molekularno-genetičkim i epigenetičkim promenama na genima koji kodiraju ključne aktere različitih signalnih puteva, počev od EGFR familije receptora, pa do transkripcionih faktora nije bila posvećena dovoljna pažnja.

Sa stanovišta genetike tumora glave i vrata, neophodno je usredsrediti se na grupu onkogeno iz mitogene signalne kaskade *HER-2/H-ras/c-myc*, za koju je pokazano da igra bitnu ulogu u nastanku različitih malignih oboljenja kod čoveka. Prema literaturnim podacima neki članovi ovog signalnog puta uključeni su i u procese neoplastične transformacije u tumorima pljuvačnih žlezda (Milasin i sar. 1993; Tsang i sar. 2004; Hashimoto i sar. 2012).

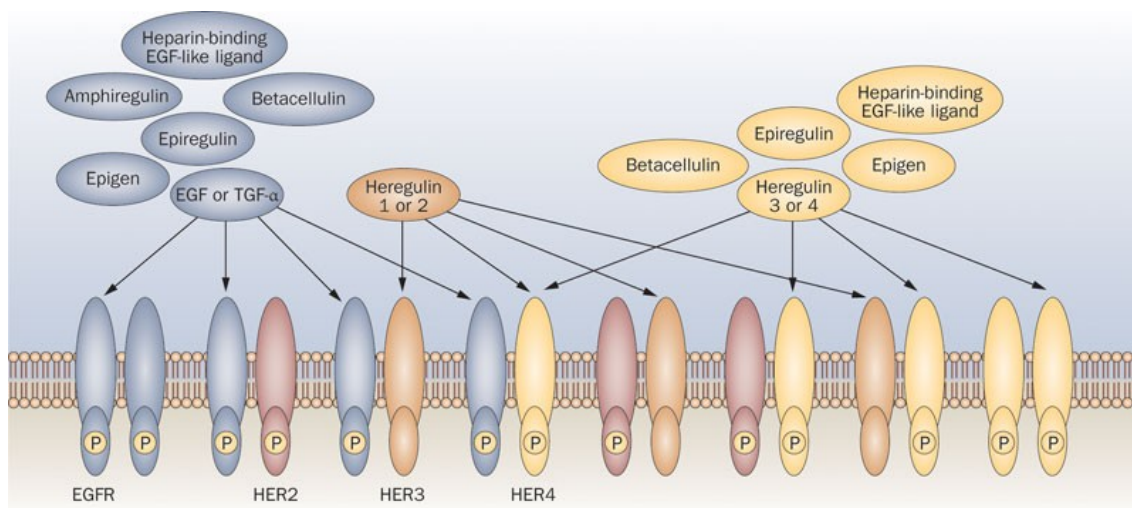
#### **1.3.1.1. HER-2**

HER-2 (od engl. human epidermal growth factor receptor-2) je transmembranski receptor za epidermalni faktor rasta koji je uključen u dva glavna puta transdukcije mitogenih signala, MAPK i AKT. Ovaj onkoprotein zajedno sa još tri člana (*HER-1/EGFR/ErbB-1*, *HER-3/ErbB-3* i *HER-4/ErbB-4*) čini familiju receptora za epidermalne faktore rasta, među kojima su najvažniji EGF i TGF- $\alpha$ . Treba napomenuti da HER-2 receptor za razliku od većine članova familije, nema specifičnog liganda.

Vezivanje liganda za N-terminalni domen receptora HER familije indukuje homo- ili heterodimerizaciju, odnosno njihovo sparivanje (Sorkin i Goh 2008). Dimerizacija dovodi do aktivacije unutarćelijskih kinaznih domena i fosforilacije specifičnih tirozinskih ostataka na citoplazmatskom kraju receptora. Ovako fosforilisani, vezuju različite signalne molekule, čije regrutovanje dovodi do aktivacije intracelularnih signalnih puteva i prenošenja mitogenog signala do jedra. Konstantno održavanje receptora u dimerizovanom stanju jedan je od razloga neoplastične transformacije ćelije. Ovako generisani signal dalje se prenosi do

jedra preko jedne od dve signalizacione kaskade MAPK ili Akt (PI3K) (Yarden i Sliwkowski 2001).

Dimerizacija je kritičan korak u HER-posredovanoj signalnoj transdukciji, pri čemu su moguće mnoge kombinacije receptora. (Slika 7).



**Slika 7:** Članovi HER familije receptora sa njihovim ligandima; preuzeto iz: (Okines i sar. 2011)

Do sada je identifikovano više specifičnih liganada za ove receptore. Svi ligandi karakterišu se prisustvom EGFR-u sličnog domena, što im pruža mogućnost specifičnog vezivanja. Neki od ovih liganada su: EGF, amfiregulin (AR) i transformišući faktor rasta- $\alpha$  (engl. Transforming Growth Factor- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ ) koji se vezuju za HER-1, betacelulin (BTC), heparin vezujući EGF (engl. heparin-binding EGF, HB-EGF) i epiregulin (EPR) koji se specifično vezuju i za HER-1 i za HER-4. Treću grupu liganda čine takozvani neuregulini (NRG) i vezuju se specifično za HER-3 i HER-4 (NRG-1 and NRG-2) ili samo za HER-4 (NRG-3 and NRG-4) (Holbro i sar. 2003). EGF indukuje heterodimerizaciju HER-1/HER-2 i homodimerizaciju HER1/HER-1, a neuregulin-1 inicira heterodimerizaciju HER-2/HER-3 ili HER-2/HER-4 (Riese i Stern 1998; Klapper i sar. 1999) (Slika 10).

Kao što je već rečeno, nije utvrđeno postojanje direktnog liganda za HER-2 (Olayioye i sar. 2000; Holbro i sar. 2003). Primarna funkcija HER-2 je da funkcioniše kao koreceptor. Utvrđeno je da je najčešći partner za heterodimerizaciju sa ostalim članovima HER familije receptora (Tzahar i sar. 1996; Graus-Porta i sar. 1997) i najzaslužniji za pokretanje signalne transdukcije posredovane HER receptorskom familijom (Beerli i sar. 1995; Graus-Porta i sar. 1995).

*HER-2* proto-onkogen je lociran na dugom kraku hromozoma 17, na poziciji 12 (17q12). Do onkogene aktivacije u ćelijama čoveka najčešće dolazi putem njegove amplifikacije (uvećanja broja kopija u genomu) ili povećane ekspresije. Ukoliko se na ovaj način nađu u višku, HER-2 proteini formiraju klastere u plazma membrani, što bi moglo imati značajnu ulogu u tumorigenezi (Nagy i sar. 1999; Kaufmann i sar. 2011). Dolazi do prenošenja nepostojećih, „fantomskih“ signala, onih koji se generišu kao rezultat spontane HER2 dimerizacije u odsustvu liganda i do nekontrolisanih ćelijskih deoba. Znatno ređe onkogene aktivacija se dešava kao posledica mutacija/delecija u kodirajućem regionu, na primer u ekstracelularnom domenu, ili mnogo češće u okviru kinaznog domena (Bose i sar. 2013).

#### **1.3.1.2. *C-MYC***

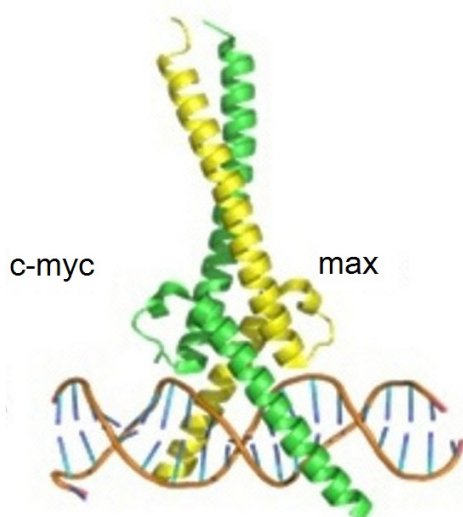
Mitogena kaskada, koja započinje od faktora rasta ili njihovih receptora, preko citoplazmatskih protein kinaza vodi do jedra i transkripcionih faktora. Jedan od najvažnijih transkripcionih faktora onkogenog potencijala, uključen u regulaciju ekspresije 10 - 15% gena kod sisara, je *c-myc* gen (Chung i Levens 2005). Na taj način *myc* protein je jedan od ključnih regulatora ćelijske proliferacije, rasta, diferencijacije i apoptoze.



*C-myc* protoonkogen koji kodira *c-myc* jedarni protein, je lociran na dugom kraku hromozoma 8, na poziciji 12.4. Pripada familiji sa većim brojem gena, a onkogeni potencijal osim *c-myc* imaju *l-* i *n-myc* geni (Henriksson i Lüscher 1996).

Kodirajuću sekvencu *c-myc* gena čine tri egzona, koji se prevode u dve izoforme *c-myc* proteina (Rabbitts i sar. 1985; Hann i sar. 1994). *c-myc* 2 protein koji podstiče ćelijski rast ima molekulsku masu od 64kDa i za 14 aminokiselina je kraći od *c-myc* 1 proteina koji ima 67kDa i inhibitornu ulogu (Hann i sar. 1988). U normalnim ćelijama ove dve forme *c-myc* proteina se diferencijalno eksprimiraju, odnosno njihov međuodnos se menja u zavisnosti od faze ćelijskog ciklusa. U tumorskim ćelijama, dominira *c-myc* 1 protein (Hann i Eisenman 1984; Hann i sar. 1992).

Funkcionalno važne regione *c-myc* proteina, predstavljaju njegovi C i N terminus. N terminus čini transaktivacioni domen od 143 aminokiseline, a C terminus čine aminokiseline od 355 do 439. *C-myc* protein preko svog C termina formira heterodimer sa srodnim Max proteinom (slika 8).

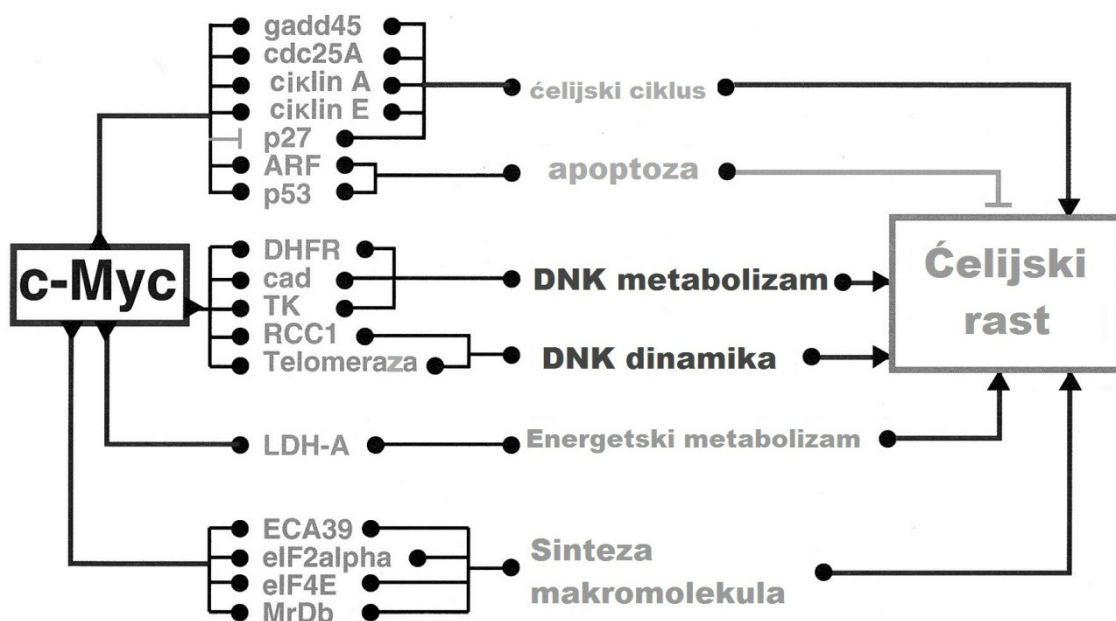


**Slika 8:**Heterodimer *c-myc*/Max u interakciji sa DNK molekulom

Strukturni domeni *c-myc* proteina odgovorni za njegovo vezivanje za specifičnu DNK sekvencu (CACGTG, takozvani E-box myc site, EMS), kao i za heterodimerizaciju sa Max proteinom sastoje se od dva motiva, heliks-petlja-helix

(HLH od engl. helix-loop-helix) i leucin „zipper” (LZ) motiv, a zajedno sa B (engl. base) domenom, ključni su za biološku aktivnost myc proteina (Amati i sar. 1993). Kada nastane transkripcijski kompleks myc/max, on se vezuje za CACGTG sekvencu promotora ili pojačivača ciljnih gena (Ferre-D'Amare i sar. 1993). N-terminus je takođe odgovoran za ćelijsku transformaciju, zbog svoje sposobnosti da vezuje kofaktore (npr. TRRAP protein) (McMahon i sar. 1998).

Neki od ciljnih gena čiju ekspresiju kontroliše c-myc protein, omogućavaju napredovanje ćelije kroz ćelijski ciklus (promoter ćelijske proliferacije (*ciklin A, E, D1, D2, cdk4, cdc25A, cdc2, Id2*), stopiraju ćelijski ciklus u G1 podfazi interfaze (represori ćelijskog rasta *p15<sup>Ink4B</sup>, p21<sup>Cip1</sup>, gadd45* i *gas1*) ili pak vode ćeliju u programiranu ćelijsku smrt (induktori apoptoze (*p14<sup>arf</sup>-Mdm2-TP53* signalni put) (Galaktionov i sar. 1996; Rudolph i sar. 1996; Pérez-Roger i sar. 1997; Zindy i sar. 1998) (slika 9).

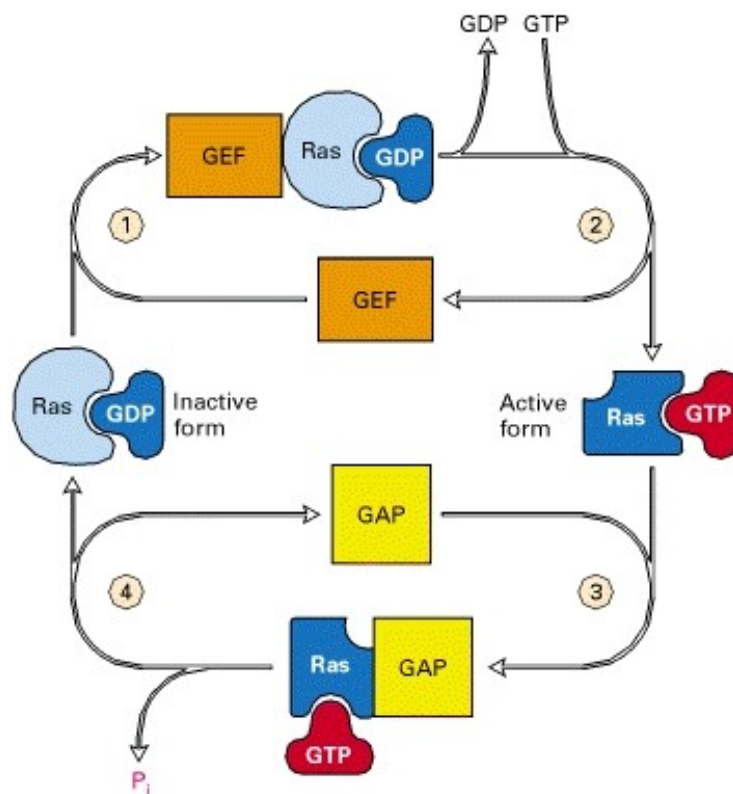


**Slika 9:** Kompleksna regulatorna mreža c-Myc i njegovih ciljnih gena, kao i njihove funkcije i uticaj na ćelijski rast (preuzeto: Dang, Mol Cell Biol., 1999; 19: 1-11, modifikovano).

Za razliku od drugih proto-onkogenih, odnosno proto-onkoproteina, kao što je na primer ras, kod kojih je neophodno da se desi izmena u primarnoj strukturi da bi se aktivirao (onkoprotein), narušen nivo ekspresije myc proteina je dovoljan da doprinese transformaciji ćelije *in vitro* i tumorigenezi *in vivo*, pa je tako najčešći oblik onkogene aktivacije *c-myc* gena je njegova amplifikacija.

### 1.3.1.3. *H-RAS*

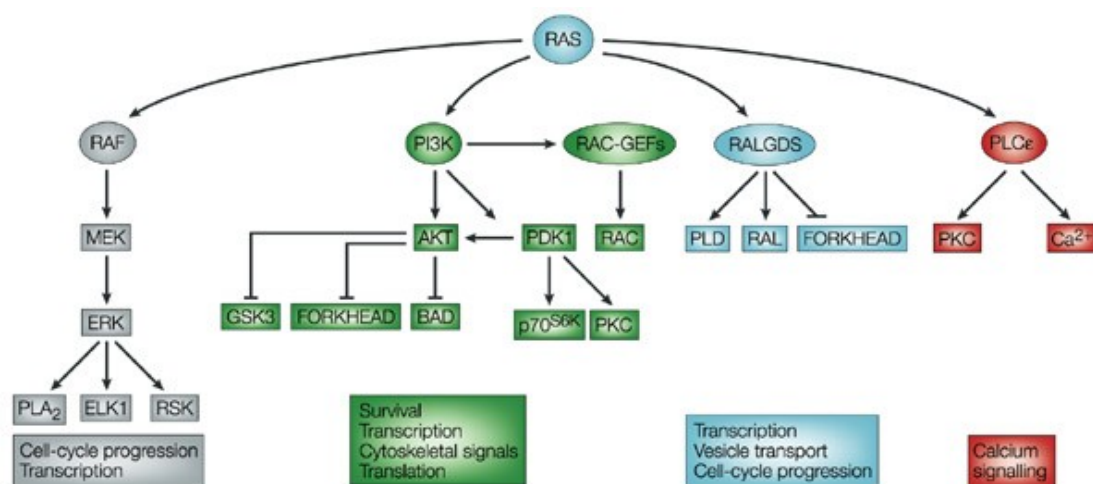
H-Ras protein, takođe poznat kao transformišući protein p21, je jedan od enzima sa GTP-aznom aktivnošću (pripada grupi takozvanih G-proteina) lociran na unutrašnjoj strani plazma membrane. On ima ulogu u transdukciji ekstracelularnog mitogenog signala sa transmembranskih receptora HER familije. Vezivanjem GTP nukleotida za sebe, ovaj protein prelazi u konformaciono aktivno stanje i aktivira nizvodne proteine, najčešće Raf, MAP i ERK kinaze i preko njih prenosi signale do transkripcionih faktora (*c-myc*, *c-Jun* i *c-Fos*) (Daum i sar. 1994; Khosravi-Far i sar. 1998). Na taj način H-Ras protein ostvaruje svoju važnu ulogu u kontroli ćelijske proliferacije, rasta i diferencijacije. Fosforilacijom Raf kinaze sam Ras protein prelazi u konformaciono neaktivno stanje, hidrolizom vezanog GTP-a u GDP od strane GAP (engl. GTP-ase activating protein). Zatim se aktivnošću GEF (engl. guanine nucleotide exchange factors) vrši izmena GDP sa GTP nukleotidom (s obzirom da je desetostruko zastupljeniji u ćeliji, GTP se vezuje sa većim afinitetom) i H-ras protein ponovo prelazi u svoju aktivnu konformaciju (Buday i Downward 1993) (Slika 10).



**Slika 10:** Petlja izmene Ras proteina u četiri koraka, između neaktivne forme sa vezanim GDP i aktivne forme sa vezanim GTP molekulom (preuzeto iz: Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. Molecular Cell Biology. Section 20.4, Receptor Tyrosine Kinases and Ras. 4th edition. 2000. New York. W. H. Freeman, ed.)

U aktivnom, GTP-vezanom stanju, Ras protein interaguje sa različitim efektornim proteinima, stimulišući njihovu katalitičku aktivnost. Jedna od najčešće aktiviranih kaskada je ona u kojoj Raf protein kinaze iniciraju mitogen-aktivirani protein (MAP), što vodi aktivaciji ERK (engl. extracellular regulated kinase). Ova kinaza ima mnogobrojne supstrate u citoplazmi i nukleusu, uključujući transkripcione faktore (npr. ELK1 koji reguliše progresiju ćelijskog ciklusa). Fosfoinozitol-3-kinaza tip 1 (PI3K) generiše sekundarne lipidne glasnike, kao što je fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat, koji aktivira brojne ciljne proteine, uključujući signalnu kaskadu ćelijskog preživljavanja označenu kao AKT/PKB. RALGDS proteini su faktori izmene guaninskih nukleotida (GEF, engl. guanine nucleotide exchange factors) za RAL, protein povezan sa Ras proteinom. Fosfolipaza C epsilon

(PLC $\epsilon$ ) katalizuje hidrolizu fosfatidilinozitol-4,5-difosfata na diacilglicerol i inozitol trifosfat, što rezultuje aktivacijom protein kinaze C (PKC) i mobilizacijom kalcijuma iz unutarćelijskih rezervi (Slika 11).



Nature Reviews | Cancer

**Slika 11:** Efektorski molekuli Ras signalnog puta i krajnje konsekvence na ćelijskom nivou; preuzeto:(Downward 2003)

Gen koji kodira H-Ras protein, *H-ras* gen, lociran je na kratkom kraku hromozoma 11 (pozicija 15.5). *H-ras* gen pripada ras familiji gena, koju osim njega čine još K-ras i N-ras gen, locirani na hromozomima 12 i 1 (Barbacid 1987). Ova tri gena kodiraju četiri slična proteina (H-Ras, K-Ras4A, K-Ras4B i N-Ras). Prvih 85 aminokiselina su identične kod sve četiri forme Ras proteina. U ovom regionu leže efektor vezujući domeni, mesta vezivanja svih ciljnih molekula Ras proteina. Sledećih 80 aminokiselina pokazuje 85% homologije između Ras proteinskih izoformi. C-terminalni region predstavlja hipervarijabilni region, startuje od 165 aminokiseline i ne pokazuje sličnost između različitih izoformi Ras proteina. Izuzetak je Cys186-A-X-COOH C-terminalni motiv, koji usmerava post-translacionu obradu i omogućava asocijaciju Ras protein sa unutrašnjom stranom plazma membrane. Osim njega, još četiri nekontinuirana domena neophodna su za normalnu funkciju Ras proteina: region od 5-63, 77-92, 109-123 i 139-165 aminokiseline (Barbacid 1987).

Osnovni mehanizam aktivacije gena iz familije *ras* je tačkastim mutacijama, koje u slučaju *H-ras* gena „pogađaju“ kodon 12, 13 ili (Bos 1989). Mutacije na kodonima 12 i 13 povećavaju afinitet GTP vezujućeg mesta ka GTP-u, dok mutacije na kodonu 61 uglavnom sprečavaju GTP-aznu aktivnost, odnosno vezivanje GAP-a. Neke od ređih mutacija se dešavaju na kodonima 28, 116 do 119, zatim 144 i 146 i uglavnom za posledicu imaju niži afinitet Ras proteina prema GDP-u u odnosu na GTP (Walter i sar. 1986; Reinstein i sar. 1991). Mutacije u efektornim regionima, od 35-39 u aminokiselinskom nizu, odražavaju se na konformaciju p21 proteina u GTP vezujućem mestu, a samim tim i na smanjen afinitet GAP-a (Adari i sar. 1988). Bez obzira da li se radi o onkogenim mutacijama koje onemogućavaju hidrolizu GTP-a, vezivanje GAP-a ili efektornim mutacijama, posledice su iste. Mutacije dovode do promena aminokiselinskog sastava Ras proteina, odnosno njegove konformacije, pa on u tako izmenjenom obliku formira stabilan kompleks sa GTP-om, odnosno zadržava se trajno u aktivnom stanju, inicirajući i prenoseći konstantni mitogeni signal.

### **1.3.2. Tumor supresorski geni**

Tumor supresorski geni – TSG (antionkogeni) su geni čije su osnovne funkcije regulacija ćelijskog ciklusa, kontrola proliferacije i diferencijacije i očuvanje stabilnosti genoma. Odsustvom ekspresije TSG narušena je kontrola ćelijskog ciklusa, što za posledicu ima akumuliranje lezija iz ciklusa u ciklus, odnosno opštu genomsku nestabilnost što je osnovna karakteristika tumorske ćelije. Takođe, u odsustvu produkata tumor supresorskih gena, izostaće prirodan odgovor ćelije na nakupljanje genomskih oštećenja, odnosno ne aktivira se programirana ćelijska smrt (apoptoza).

Gubitak ili inaktivacija tumor supresorskih gena pokazali su se možda čak kao važniji događaji od aktivacije proto-onkogeni u procesu neoplastične transformacije ćelija i nastanku tumora.

Na osnovu funkcije proteinskog produkta, tumor supresorski geni mogu biti:

- regulatori ćelijskog ciklusa
- regulatori signalne transdukcije
- geni koji učestvuju u međućelijskim interakcijama i interakciji ćelije i matriksa
- regulatori programirane ćelijske smrti
- "citoskeletni" geni
- neklasifikovani, sa do sada nepoznatom funkcijom u ćeliji

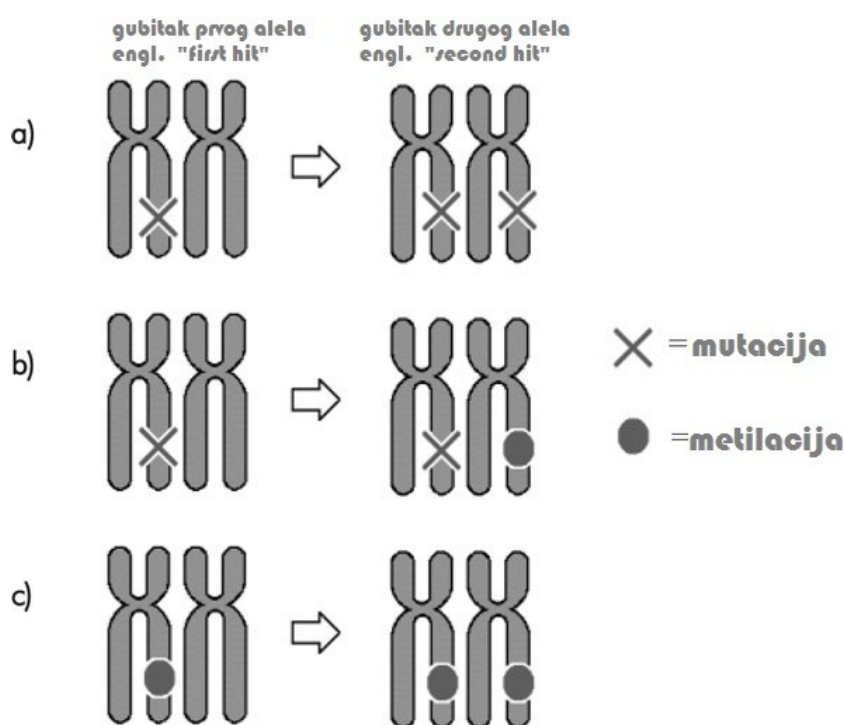
Brojni su i raznovrsni molekularni mehanizmi koji vode inaktivaciji TSG, ali mogu se grubo podeliti na:

- tačkaste mutacije,
- delecije,
- vezivanje virusnih onkogenih proteina,
- epigenetičke promene, i dr.

Za razliku od proto-onkogeni koji se aktiviraju po dominantnom principu, do inaktivacije tumor supresorskih gena dolazi usled molekularnih promena na oba alela – fenomen koji je u molekularnoj genetici poznat kao Knudson-ova „two-hit“ hipoteza. Svoj transformišući potencijal TSG stiču po recesivnom principu. Do gubitka funkcionalnog prvog alela (engl. *first hit*) uglavnom dolazi kao posledica tačkaste mutacije, dok se gubitak funkcije drugog alela (engl. *second hit*) pripisuje drugoj tačkastoj mutaciji. „Second hit“ ili druga greška često može da bude gubitak dela hromozoma koji sadrži i TSG, drugim rečima događa se da bude deletiran ceo gen što vodi pojavi „loss of heterozigosity“ odnosno gubitku heterozigotnosti.

Jedan od izuzetaka od ovog pravila je *TP53*, pošto mutacije u ovom genu funkcionišu po tzv. „dominantno negativnom“ principu, odnosno prisustvo mutiranog p53 proteina može blokirati funkciju nemutirane, normalne kopije.

U poslednje vreme velika pažnja usmerena je na epigenetičke promene i njihovu ulogu u neoplastičnoj transformaciji. Generalno je prihvaćeno stanovište da do nastanka tumora dolazi kada se naruši funkcija gena koji promovišu ili inhibiraju rast ćelije ili njeno preživljavanje, bilo genetičkim bilo epigenetičkim mehanizmima. Ove promene se nagomilavaju tokom života i sinergističkim delovanjem vode gubitku kontrole nad ćelijskim rastom i pojavi kancera. Uloga epigenetičkih promena u procesu nastanka tumora podjednako je važna koliko i uloga genetičkih mutacija (Novak 2004) (slika 12).



**Slika 12:** Različiti mehanizmi inaktivacije TSG a) originalna Knudson-ova „two-hit“ hipoteza po kojoj se inaktivacija dešava mutacijama/delecijom na oba alela; b) drugi molekularni događaj koji prvu mutaciju dovodi u hemizigotno stanje je metilacija; c) kod individue koja je nasledila epimutaciju, druga epimutacija dovodi do gubitka funkcije TSG (preuzeto: Mossman and Scott *Hereditary Cancer in Clinical Practice* 2006 4:75-80, modifikovano)

U epigenetičke promene ubrajaju se DNK metilacija, histonske modifikacije, kao i promene na nivou mikroRNK koja je odgovorna za kontrolu transkripcione



aktivnosti mnogih gena. Pokazano je da je čest mehanizam inaktivacije TSG metilacija njegovog promotora.

DNK metilacija predstavlja vezivanje metil grupe (CH<sub>3</sub>-) na poziciju 5 unutar citozinskog nukleotida. Kod sisara to se događa skoro isključivo na citozinima koji se nalaze uz guanin (CpG) u DNK sekvenci. Većina tih takozvanih CpG ostrva raštrkanih u kodirajućim, ali i u intronskim sekvencama u genomu čoveka, su metilovana. Obrasci DNK metilacije podležu izuzetno velikim promenama tokom nastanka i progresije tumora. Ukupna količina metilovanih citozina obično se smanjuje što rezultuje globalnom hipometilacijom.

Važan izuzetak od pravila da su CpG ostrva raštrkana po genomu i metilovana su mesta početka transkripcije odnosno promotori tumor supresorskih gena, u kojima se mogu naći desetine ili stotine CpG ostrva. Citozini u njima su obično nemetilovani i manje podložni selekcionom pritisku (jer su manje podložni mutacionim događajima od metilovanih). Održavanjem ovih CpG ostrva u nemetilovanoj formi, ćelija održava normalnu i neometanu ekspresiju ovih gena koji su uključeni u kontrolu ćelijskog rasta i diferencijacije, ćelijskog ciklusa i apoptoze. Međutim, za ćelije tumora karakteristična je hipermetilacija ovih CpG ostrva u promotorskim regionima TSG ili u njihovoj neposrednoj blizini i posledična inaktivacija TSG (Jones i Baylin 2002; Jones i Baylin 2007). Tako su ovi geni trajno „utišani“, jer se ovako stečena promena nakon mitoze održava i u tumorskom ćelijskom klonu.

Možda najbolja ilustracija kako metilacija CpG ostrva može imati iste posledice kao inaktivirajuće mutacije tumor supresorskih gena su studije na genima *Rb1* (Sakai i sar. 1991), *p16* (Myöhänen i sar. 1998) i *hMLH1* (Kane i sar. 1997). Svaki od ovih gena može biti inaktiviran DNK metilacijom ili mutacijama sa podjednakom šansom da dovedu do nastanka tumora.

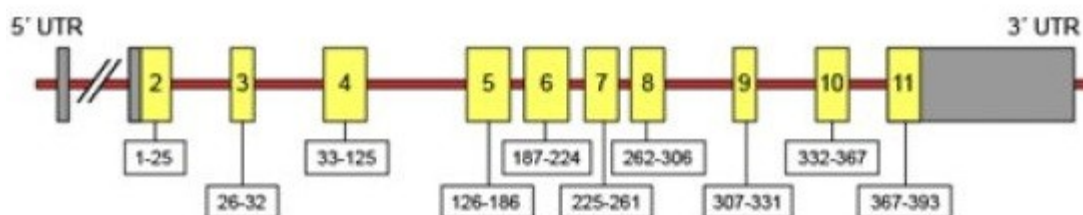
U genetičkim studijama malignih i benignih tumora glave i vrata posebna pažnja posvećena je inaktivaciji *TP53* gena, zbog jako velikog broja funkcija koje njegov proteinski produkt obavlja u ćeliji. Literaturni podaci o njegovoj ulozi u

patogenezi pleomorfnih adenoma nisu jasno ni potvrdili ni opovrgli njegov značaj u ovom procesu. Takođe, kao jedan od regulatora njegove aktivnosti, koji podleže epigenetičkoj regulaciji (metilacijom promotora), *p14* mogao bi biti jedan od važnih TSG u neoplastičnoj transformaciji. *p16* tumor supresorski gen često je ispitivan i impliciran kao važan regulator do čije inaktivacije hipermetilacijom promotora dolazi u benignim i malignim tumorima glave i vrata, između ostalog i zbog funkcionalne povezanosti sa *HER-2/H-ras/c-myc* signalnom kaskadom.

### 1.3.2.1. *TP53*

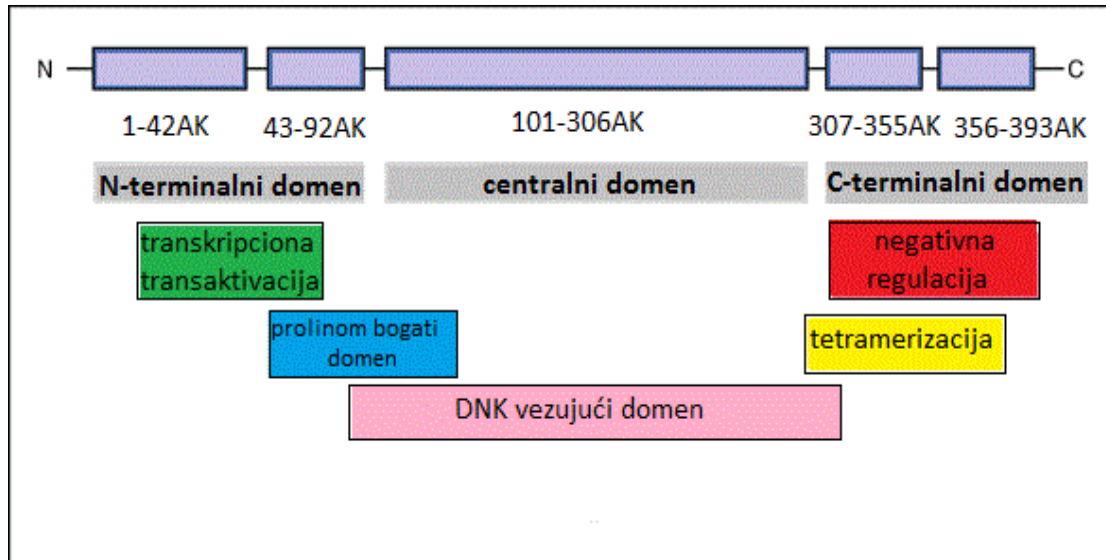
*TP53* (od engl. *tumor protein 53*) je jedan od najbolje proučenih tumor supresorskih gena uključenih u nastanak neoplazija čoveka (Ruddon 2007). Poznato je da je *TP53* gen jedan od najčešće mutiranih gena u tumorima. *TP53* funkcioniše kao potentni tumor supresorski gen, odnosno važan je u prevenciji nastanka i progresije tumora (Ko i Prives 1996; Bray i sar. 1998; Prives i Hall 1999).

*TP53* gen, koji kodira za p53 protein, lociran je na kratkom kraku hromozoma 17, na poziciji 13.1 (Isobe i sar. 1986). Gen se sastoji od 11 egzona i 10 intronskih sekvenci, s tim što je egzon 1 nekodirajući (Slika 13).



**Slika 13:** Strukturna organizacija *TP53* gena (Preuzeto: <http://www.stjude.org/stjude/v/index.jsp?vgnextoid=ed17ca796f775310VgnVCM100000290115acRCRD&vgnnextchannel=d645ff98a6775310VgnVCM100000290115acRCRD>, modifikovano)

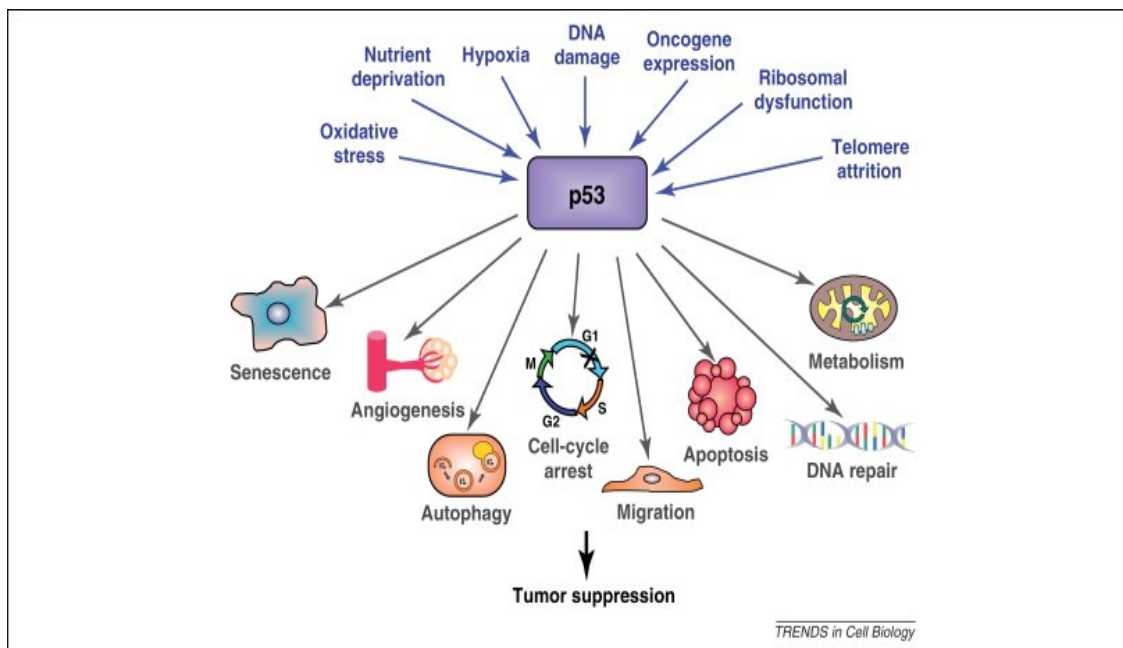
P53 protein sastoji se od 393 aminokiseline i poseduje 5 specifičnih funkcionalnih domena (Slika 14):



**Slika 14:** Struktura p53 proteina i njegovi funkcionalni domeni

1. Amino terminalni deo od 1-42 amino kiseline (AK), sadrži kiseli transaktivacioni domen (AD1) i MDM2 vezujuće mesto.
2. Region od 40-92 AK, sadrži niz ponovljenih prolinskih ostataka, kao i drugi transaktivacioni domen (AD2);
3. Centralni region od 101-306 AK, sadrži DNK vezujući domen. 90% svih mutacija u TP53 genu koje se javljaju u kancerima kod čoveka, a koje dovode do inaktivacije proteinskog produkta, nalazi se u ovom regionu. Većina ovih mutacija onemogućava vezivanje proteina za ciljnu DNK sekvencu i sprečava transkripcionu aktivaciju tih gena.
4. Oligomerizacioni domen (307-355 AK, TET), sadrži  $\beta$ -lanac koji interaguje sa drugim p53 monomerom formirajući dimer, dok  $\alpha$ -lanac omogućava dimerizaciju dva p53 čime se dobija aktivna forma tetramera koja može da indukuje zaustavljanje ćelijskog rasta ili apoptozu.
5. Karboksilni kraj p53 proteina, od 356-393 AK, sadrži tri jedarna lokalizaciona signala i nespecifični DNK vezujući domen koji se vezuje za oštećenu DNK. Ovaj region je uključen u nizvodnu regulaciju vezivanja centralnog domena za DNK.

p53 se aktivira u odgovoru na mnoštvo različitih tipova stresa (Slika 15), koji mogu uključivati DNK oštećenje indukovano UV zračenjem ili hemijskim agensima, zatim oksidativni stres, osmotski šok, deregulaciju ekspresije onkogeni itd. Latentna forma se u aktivnu prevodi fosforilacijom, acetilacijom ili glikozilacijom C-terminalnog domena (Sakaguchi i sar. 1998). Fosforilaciju katalizuju S i G2/M ciklin-zavisne kinaze koje utiču na odabir ciljne sekvence na DNK za koju će se vezati p53 čime moduliraju aktivaciju njegovog ciljnog gena (Rodier i sar. 2007). Protein kinaze koje fosforilišu aminokiseline u okviru N-terminusa mogu se podeliti u dve grupe. Prva grupa protein kinaza pripada MAPK familiji (JNK1-3, ERK, p38 MAPK) za koju se zna da odgovara na nekoliko različitih tipova stresa, kao što je oštećenje ćelijske membrane ili osmotski šok, oksidativni stres i dr. Druga grupa protein kinaza (ATR, ATM, CHK1 i CHK2, DNA-PK, CAK) je uključena u molekularnu kaskadu koja detektuje i odgovara na nekoliko tipova DNK oštećenja prouzrokovanih genotoksičnim stresom (Kaelin 1999; Barzilai i Yamamoto 2004). Onkogeni takođe mogu stimulisati aktivnost TP53, posredstvom proteina p14ARF (*eng. Alternate Reading Frame*) koji interaguje sa MDM2, čime ga inaktivira i omogućava aktivaciju TP53.



**Slika 15:** p53 se aktivira u odgovoru na neki od signala stresa i regulator je (pozitivni ili negativni) širokog spektra mogućih ćelijskih odgovora koji doprinose supresiji tumora; preuzeto: (Bieging i Attardi 2012).

p53 protein svoju antiproliferativnu ulogu obavlja kroz kontrolu transkripcije različitih ciljnih gena i kroz brojne protein-protein interakcije. Pošto je jedan od važnih regulatora ćelijskog ciklusa i kontrolora koji sprečava nagomilavanje mutacija, često se naziva „čuvarom genoma“ (Rodier i sar. 2007). Generalno je prihvaćeno stanovište da se tumor supresorska funkcija p53 proteina ostvaruje putem niza mehanizama: blokira ćelijsku deobu na prelazu iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa, stimuliše popravku oštećenja DNK i indukuje apoptozu. Naime, ako je molekul DNK oštećen, dolazi do akumulacije p53 proteina i zaustavlja se replikacija i ćelijska deoba dok se ne ispravi DNK oštećenje. Ako su mehanizmi ispravke neuspešni, p53 inicira apoptozu, a konačni rezultat je ćelijska smrt. Međutim, ukoliko izostaje p53 protein ili je izmenjen i nefunkcionalan kao posledica mutacije, ćelija nastavlja deobu, odnosno replikaciju lezije na DNK. Ovakve ćelije su genetički nestabilne, akumuliraju mutacije i dovode do transformacije ćelije u potencijalno malignu, što se ogleda u progresiji tumora (Frebourg i sar. 1992; Rodier i sar. 2007).

Osim što svojim transaktivirajućim dejstvom p53 protein stimuliše sintezu inhibitora ćelijskog ciklusa u G1 fazi (P21<sup>waf1</sup> i Gadd45), on može zaustaviti ćeliju i u G2 fazi, aktivirajući inhibitore ove faze (14-3-3sigma i Reprimo proteina) (Hermeking i sar. 1997; Ohki i sar. 2000).

Protein p53 u fiziološkim uslovima ima veoma kratak poluživot (4-5 minuta) i teško ga je detektovati u normalnom tkivu. Međutim, u odgovoru na stres biva stabilizovan fosforilacijom N-terminusa (Giaccia i Kastan 1998). Ovom post-translacionom modifikacijom vreme poluživota stabilizovanog p53 proteina produžava se na nekoliko časova. Mutirane forme p53 proteina su značajno stabilnije, sa vremenom poluživota od 6 časova. U normalnim ćelijama p53 protein se održava na niskom nivou kroz neprekidnu degradaciju. Nekoliko gena i njihovih produkata uključeno je u negativnu regulaciju aktivnosti p53, između ostalih i *Mdm2* gen. Proteinski produkt *Mdm2* gena se vezuje za p53 protein preko AD1 domena i tako blokira p53 transaktivacionu, odnosno transkripcionu aktivnost. Osim toga, vezivanje MDM2 proteina za p53 protein ogovorno je za transport p53 proteina iz jedra u citoplazmu gde dolazi do njegove degradacije (Leri i sar. 1999). Što se tiče pozitivne regulacije p53 ekspresije, povećana ekspresija različitih onkogeno, dejstvo citotoksičnih agenasa, jonizujuće zračenje i UV zračenje, ali i hipoksija, citokini, faktori rasta, dejstvo NO, nefunkcionalno deobno vreteno i drugi faktori mogu dovesti do njegove aktivacije (Gambino i sar. 2013).

Istraživanja su pokazala da je za gubitak funkcije *TP53* tumor supresorskog gena dovoljna jedna mutacija. Naime, mutirani polipeptid kroz dimerizaciju sa normalnim daje nefunkcionalne tetramerne forme p53 proteina. Dakle, dovoljan je samo jedan mutirani *TP53* gena, koji daje mutiranu formu p53 proteina, jer on ima dominantan negativni efekat na divlju formu p53 proteina u hetero-oligomernom kompleksu (Joers i sar. 1998).

Studije u kojima je ispitan mutacioni spektar u čitavoj kodirajućoj sekvenci *TP53* gena kod različitih tipova tumora, pokazale su da se preko 80% mutacija grupiše između kodona 125 i 300, što odgovara uglavnom DNK vezujućim regionima između egzona 5 i 8. Većina mutacija su „missense“. S druge strane,

izvan ovog regiona većina mutacija su „nonsense“ ili „frameshift“ (Olivier i sar. 2010).

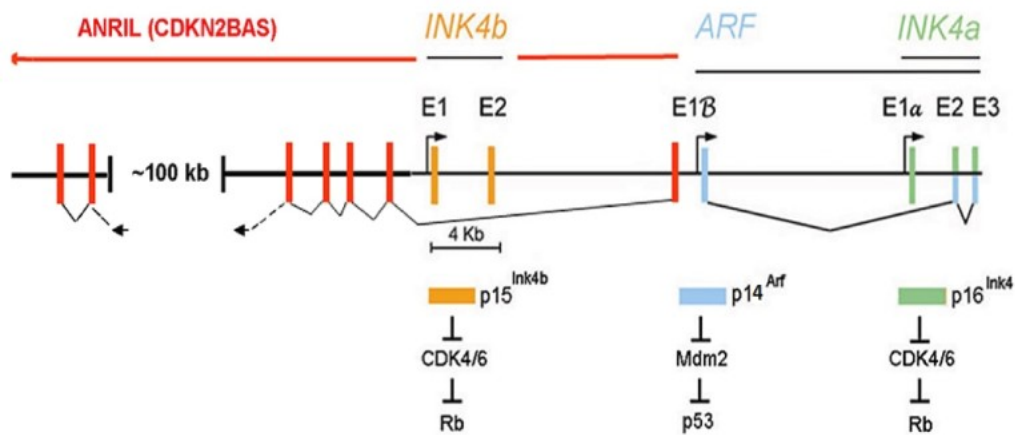
Nemaju sve mutacije isti efekat, ali ipak većina u potpunosti narušava uobičajenu funkcionalnost p53 proteina i favorizovane su tokom procesa tumorigeneze. p53 mutanti mogu biti ili tzv. „kontaktni“ ili tzv. „konformacijski“. Dok prvi dovode do gubitka sposobnosti vezivanja p53 proteina za promotore ciljnih gena, drugi onemogućavaju zauzimanje aktivne konformacije p53 proteina (Freed-Pastor i Prives 2012).

Osim tačkastih mutacija u nekom od kodirajućih egzona, moguće je da do gubitka funkcije ovog tumor supresorskog gena dođe i na uobičajeni način, gubitkom heterozigotnosti (LOH), pri čemu često dolazi do delecije nemutiranog alela. Do inaktivacije *TP53* gena može doći i epimutacijama, pošto je u tumorskim ćelijama česta hipermetilacija CpG dinukleotida u promotorskom regionu ovog gena.

### 1.3.2.2. *CDKN2A* lokus

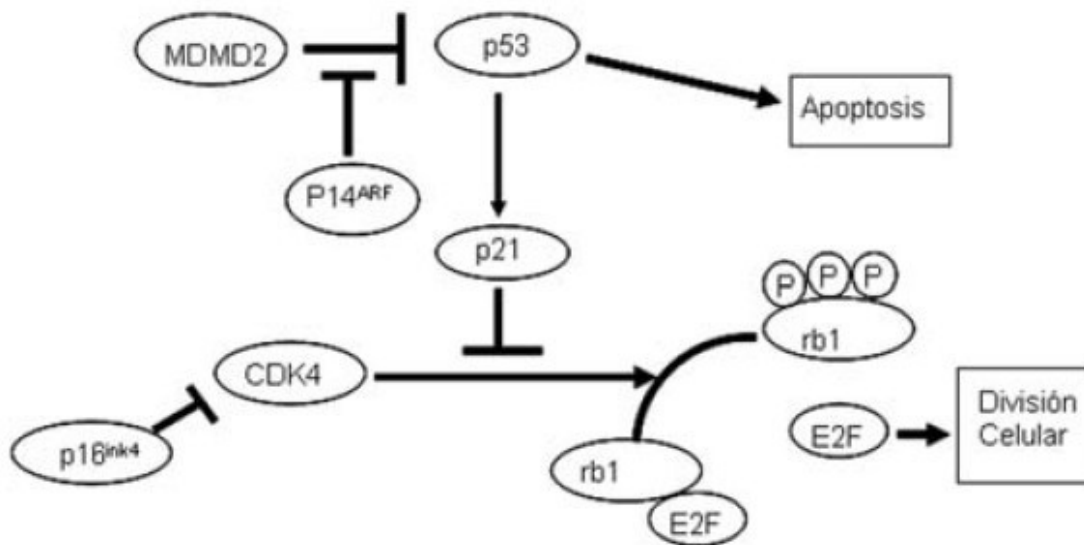
*CDKN2A* lokus (takođe poznat kao *INK4/ARF* lokus) lokalizovan je na kratkom kraku hromozoma 9 na poziciji 21.3. Sa ovog lokusa prepisuje se nekoliko transkripcionih varijanti koje se razlikuju u prvom egzonu. Postoje barem tri varijante dobijene alternativnim iskrajanjem (engl. splicing), a koje kodiraju različite proteine (p16, p15 i p14). Od toga, prva dva su strukturno srodne izoforme, inhibitori ciklin zavisne kinaze 4 (CDK4) i ciklin zavisne kinaze 6 (CDK6). Preostali transkript uključuje zasebni egzon 1, lokalizovan 20 kb uzvodno od ostatka gena; ovaj transkript, poznat kao *p14<sup>ARF</sup>* ili samo *p14*, podrazumeva izmenjeni otvoreni okvir čitanja (engl. alternate open reading frame (ARF) koji daje protein strukturno nesrodan preostalim transkriptima. *p14<sup>ARF</sup>* protein funkcioniše kao stabilizator tumor supresorskog proteina p53, kroz interakciju i inhibiciju Mdm2 proteina, odgovornog za degradaciju p53 proteina. Informacione RNK sa kojih se prevode p16 i p14 proteini se sastoje od po 3 egzona. Egzoni 2 i 3 su im zajednički, ali postoje dva različita transkripta egzona 1, varijante  $\alpha$  i  $\beta$ . Egzon 1 $\beta$  (E1 $\beta$ ) se poziciono nalazi između tandemskih gena za *p16 (INK4a)* i *p15 (INK4b)*. Iako su egzoni 1 $\alpha$  i 1 $\beta$  veoma slični u pogledu sastava i dužine, startni kodon (5' AUG) egzona 1 $\beta$  ima svoj promotor i otvara izmenjeni okvir čitanja egzona 2 (odatle ARF u nazivu *p14<sup>ARF</sup>*). Egzon 3 *p14* se ne prevodi u protein, pa bez obzira na preklapanje kodirajućih regiona, p16 i p14 proteini imaju različite aminokiselinske sastave i različite funkcije (Slika 16).





**Slika 16:** Prikaz *CDKN2A* (*INK4/ARF*) lokusa. Kodirajući egzoni su prikazani narandžasto (*p15*), plavo (*p14*) i zeleno (*p16*), pri čemu su egzoni 2 i 3 zajednički za *p14* i *p16* (prikazano kombinacijom boja). Crvenom bojom označena je duga intragenetska nekodirajuća RNK (označena kao *ANRIL* ili *CDKN2BAS*), ona se transkribuje sa neidentifikovanog promotorskog elementa u neposrednoj blizini *E1β*, u antisens smeru u odnosu na *INK4* i *ARF* transkripte. *ANRIL* transkripti se isecaju i potencijalni egzoni su prikazani crvenim kolonicama. (preuzeto: Sherr, C. J. 2012. Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology 1:731-741. © 2012 John Wiley & Sons, Ltd./Inc., modifikovano).

Uprkos strukturnim i funkcionalnim razlikama, izoforme CDK inhibitora (*p16* i *p15*) i *p14* (*ARF*) produkt dele zajedničku funkcionalnost u kontroli ćelijske deobe, zbog regulatornih uloga koje imaju *CDK4* i *p53* u progresiji G1 faze ćelijskog ciklusa (Slika 17). *p16* inhibira proliferaciju indirektno omogućavajući *Rb* proteinu da ostane u vezi sa *E2F* transkripcionim faktorima. *p14* je uključen u aktivaciju *p53* kroz inhibiciju *Mdm2*. *Mdm2* se vezuje za *p53*, inhibirajući njegovu transkripcionu aktivnost. Takođe *Mdm2* deluje kao ubikvitin ligaza, dajući signal za transport *p53* iz nukleusa u citoplazmu, gde dolazi do njegove degradacije. Delujući kao antagonist *Mdm2*, *ARF* omogućava transkripcionu aktivnost *p53* koja vodi zaustavljanju ćelijskog ciklusa i apoptozi. Stoga, gubitak *ARF* ili *p53* daje aberantnoj ćeliji mogućnost da preživi (Sherr 2006b).



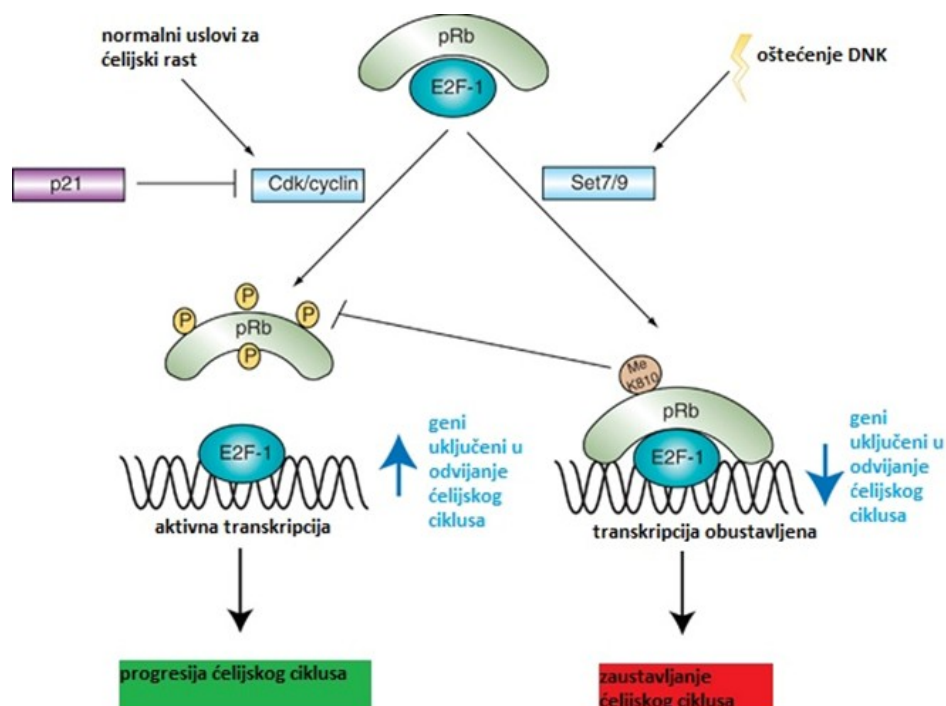
**Slika 17:** Veza dva signalna puta kontrole ćelijskog ciklusa (*TP53/MDM2/p14<sup>ARF</sup>* i *CDK4/p16<sup>INK4</sup>/Rb1*); preuzeto ([http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1130-14732007000500001&script=sci\\_arttext](http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1130-14732007000500001&script=sci_arttext)).

LOH (gubitak heterozigotnosti) na *CDN2A* lokusu je proces koji je impliciran u nastanku velikog broja različitih tumora (Kishi i sar. 2005). Kao što je već rečeno, više mehanizama vodi gubitku heterozigotnosti, a u slučaju ovog lokusa najčešće su u pitanju homozigotna delecija ili hipermetilacija promotora.

### 1.3.2.2.1. *p16* gen

*p16* gen kodira *p16<sup>INK4a</sup>* protein (*p16*, poznat i kao inhibitor ciklin zavisne kinaze 2A), tumor supresorski protein koji je ime dobio po svojoj molekularnoj težini i funkciji u inhibiciji *CDK4/6*. *CDK4/6* tokom ćelijske deobe (u kasnoj G1 fazi) vezuju ciklin D i formiraju aktivni proteinski kompleks koji fosforiliše retinoblastoma protein (*pRB*). Ovako fosforilisan *pRB* se oslobađa iz kompleksa sa transkripcionim faktorom *E2F*, čime njega prevodi u formu koja može iz citoplazme da uđe u nukleus, gde stimuliše transkripciju gena odgovornih za prelaz iz G1 u S fazu, odnosno gena uključenih u replikaciju DNK (Sherr 2001). *p16* svoju funkciju tumor supresora ostvaruje vezivanjem za ciklin zavisnu kinazu (*CDK4/6*),

čime sprečava interakciju sa ciklinom D. Ovo kao krajnju konsekvencu ima inhibiciju transkripcionih faktora, kao što je E2F1 na primer, i obustavljanje ćelijske proliferacije (Slika 18). Na ovaj način, DNK oštećenje ne može da se prenese na potomačke ćelije i ovi defekti postaju signal ćeliji da uđe u proces programirane ćelijske smrti.



**Slika 18:** Uloga Rb proteina u regulaciji ćelijskog ciklusa (Preuzeto: S Munro, S M Carr and N B La Thangue: Diversity within the pRb pathway: is there a code of conduct? *Oncogene* 31, 4343-4352 (4 October 2012), modifikovano)

Hipermetilacija promotora tumor supresorskih gena je proces koji je često opisan kao jedan od osnovnih mehanizama uključenih u tumorigenezu. Regulacija ekspresije *p16* gena je kompleksna i uključuje interakciju nekoliko transkripcionih faktora, kao i nekoliko proteina uključenih u epigenetičku modifikaciju kroz metilaciju i represiju promotorskog regiona.

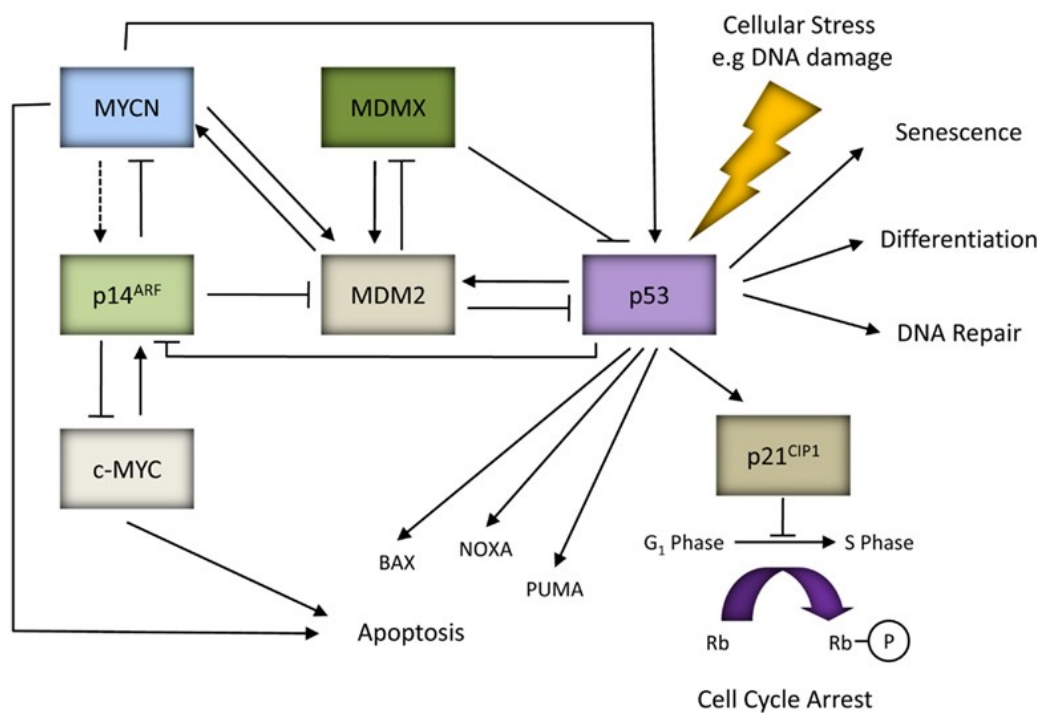
Aktuelni pravac u istraživanjima uloge *p16* gena je njegova identifikacija kao prognostičkog biomarkera u različitim kancerima. Sve veći broj studija pokazuje koliki je značaj inaktivacije ovog gena putem hipermetilacije u kancerima glave i vrata (Shaw i sar. 2006; Demokan i sar. 2012; Xu i sar. 2012). Takođe, sve je više

dokaza o ulozi hipermetilacije *p16* promotora u patogenezi neoplazija pljuvačnih žlezda (Nishimine i sar. 2003; Augello i sar. 2006; Guo i sar. 2007; Schache i sar. 2010; Hu i sar. 2011). Ovaj vid epigenetičke promene vodi gubitku funkcije tumor supresorskog gena kroz jedan od dva moguća mehanizma. Metilacija može fizički da onemogući transkripciju sa gena ili pak vodi regrutovanju proteina koji vrše represiju transkripcije. Oba mehanizma vode istom krajnjem ishodu – smanjenje genske ekspresije koja vodi smanjenom nivou *p16* proteina.

#### **1.3.2.2.2. *p14* gen**

*p14* gen kodira za *p14* protein, molekulske težine 14kDa i dužine 132 aminokiseline. U pitanju je transkripcioni produkt *CDKN2A* lokusa sa drugim okvirom čitanja (engl. alternate reading frame, ARF). Do indukcije *p14*ARF dolazi u odgovoru na povećanu mitogenu stimulaciju, kao što su aberantni signali poreklom od Myc ili Ras proteina (Abida i Gu 2008). Predominantno se akumulira u nukleolusu gde formira stabilne komplekse sa NPM ili Mdm2. Ove interakcije omogućavaju mu da vrši ulogu tumor supresora kroz inhibiciju biosinteze ribozoma ili inicijacijom *p53*-zavisnog zastoja ćelijskog ciklusa i apoptoze (Sherr 2006a). Nekoliko mehanizama regulacije Mdm2 je opisano. Jedan od njih je fosforilacija Mdm2 proteina, koja se odvija na više mesta u ćeliji. U odgovoru na DNK oštećenja ili drugi oblik ćelijskog stresa, fosforilacija Mdm2 vodi promenama proteinske funkcije i stabilizaciji *p53*. Osim toga, fosforilacija nekih AK ostataka unutar centralnog domena Mdm2 može stimulisati njegovu sposobnost targetovanja *p53* za degradaciju. Indukcija *p14* proteina je još jedan od mehanizama negativne regulacije *p53*-Mdm2 interakcije. *p53*, Mdm2 i *p14* formiraju autoregulatornu povratnu spregu da bi strogo regulisali ekspresiju i aktivnost *p53*. *p14* direktno interaguje sa Mdm2 i onemogućava njegovu produktivnu interakciju sa *p53*, što vodi povećanom *p53* posredovanom transkripcionom odgovoru. *p14* može da se aktivira u odgovoru na aberantne onkogene faktore kao što je npr. *c-myc*. Narušavanje *p14*/Mdm2/*p53* signalizacije je često kod kancera. *p14* može ispoljiti i *p53* nezavisnu tumor supresorsku

aktivnost direktnim vezivanjem i inhibicijom aktivnosti c-myc i MYCN proteina. I *TP53* i *Mdm2* su ciljni geni za MYCN. Mdm2 kontroliše stabilnost i translaciju *MYCN* iRNK, na taj način formirajući pozitivnu povratnu spregu (Slika 19).



**Slika 19:** MYC proteini (c-Myc i MYCN) i p53/Mdm2/p14<sup>ARF</sup> signalni put. Preuzeto (Chen L. and Tweddle D.A. p53, SKP2, and DKK3 as MYCN target genes and their potential therapeutic significance. *Front. Oncol.*, 28 November 2012).

Funkcija p14 pre svega se vezuje za MDM2/p53 kompleks. Međutim, p14 ima i ulogu inhibicije ćelijske proliferacije u ćelijama koje nemaju funkcionalni p53 ili p53 i Mdm2, a jedna od njih podrazumeva vezivanje za nukleofozmin (NPM). (Bertwistle i sar. 2004). NPM je ribozomski šaperon protein, a p14 u kompleksu sa njim, inhibira obradu rRNK, onemogućavajući formiranje funkcionalnog ribozoma. Iako se smatra da je indukcija p14 u odgovoru na onkogene signale primarni, najznačajniji mehanizam, nizak nivo p14 ekspresije uočen je u ćelijama u interfazi i ima značajnu ulogu u kontroli ćelijskog rasta. Stoga, uloga baznog nivoa p14 u

NPM/p14 kompleksu je izgleda da nadgleda proces biogeneze ribozoma i ćelijskog rasta nezavisno od prevencije proliferacije (Apicelli i sar. 2008).

## ***2. CILJEVI***

Predmet doktorske disertacije je analiza promena u genima *HER-2*, *c-myc*, *H-ras* i *TP53*, kao i stepena metilacije promotora *p16* i *p14* gena u pleomorfnim adenomima parotidnih pljuvačnih žlezda, kao i povezanosti promena na molekularnom nivou sa anamnestičkim i kliničkim parametrima, tokom i ishodom bolesti. Iz ovoga proističu sledeći zadaci istraživanja:

- Utvrđivanje učestalosti prisustva amplifikacije *HER-2* i *c-myc* onkogeni.
- Utvrđivanje učestalosti i tipa mutacija u *H-ras* onkogenu i *TP53* tumor supresorskom genu.
- Utvrđivanje stepena metilacije promotora *p16* i *p14* tumor supresorskih gena.
- Utvrđivanje povezanosti genetičkih i epigenetičkih promena sa anamnestičkim parametrima.
- Utvrđivanje povezanosti genetičkih i epigenetičkih promena sa kliničkim parametrima.
- Utvrđivanje povezanosti genetičkih i epigenetičkih promena sa transformacijom pleomorfno adenoma u karcinom.

## **HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA**

Prisustvo specifičnih mutacija u ispitivanim genima (*HER-2*, *c-myc*, *H-ras* i *TP53*) i/ili uvećana stopa metilacije promotora *p16* i *p14* gena može da se dovede u vezu sa nastankom pleomorfno adenoma parotidne pljuvačne žlezde i njegovom malignom transformacijom. Takođe, prisustvo određenih genetičkih i/ili epigenetičkih promena potencijalno može da posluži kao prediktor ishoda bolesti.



### ***3. PACIJENTI, MATERIJAL I METODE***

Ova studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj odobrenja 26/22, od 14.04.2014. godine).

### **3.1. PACIJENTI I BIOLOŠKI MATERIJAL**

U eksperimentalnom radu korišćena je genomska DNK pacijenata lečenih na Klinici za Maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu u periodu između 2000-te i 2011-te godine, izolovana iz parafinskih kalupa iz arhiva Laboratorije za patologiju Stomatološkog fakulteta.

Molekularno genetičko istraživanje sprovedeno je u Laboratoriji za humanu genetiku Stomatološkog fakulteta. Prva eksperimentalna grupa obuhvatila je uzorke 60 pacijenata, 11 muškaraca i 49 žena, starosti od 13 do 73, (prosečna starost  $44.77 \pm 14.45$  godina, medijana 45.50 godina) sa dijagnozom pleomorfnog adenoma parotidnih žlezda. Drugu grupu činilo je 12 uzoraka karcinoma u pleomorfnom adenomu. Svi uzorci obuhvaćeni ovom studijom bili su prethodno patohistološki okarakterisani.

### **3.2. METODE**

#### **3.2.1. Izolacija DNK iz parafinskih kalupa tumorskog tkiva**

Genomska DNK je izolovana iz isečaka tumorskog tkiva fiksiranog u formalinu i ukalupljenog u parafinu (FFPE, engl. formalin fixed paraffin embedded), metodom koja se zasniva na hemijskoj lizi ćelija i prevođenju DNK u vodenu fazu, uz hemijsko uklanjanje proteina i RNK.

Izolacija DNK iz 3-5 listića debljine 5  $\mu$ m tumorskog tkiva ukalupljenog u parafinu izvedena je na sledeći način:

Doda se 1 ml ksilola i mućka na vorteksu 30 min, a zatim centrifugira kratko na 13000 obrtaja. Supernatant se odbaci. Dodaje se 1 ml apsolutnog etanola, vorteksuje nekoliko minuta, centrifugira kratko na 13000 obrtaja i odbaci supernatant. Ova dva koraka ponove se po potrebi, dok se ne ukloni sav parafin iz

uzorka. Nakon završenih ispiranja, uzorak se ostavi u termostatu da ispari etanol. Naliva se digestivni TNE pufer u promenljivoj zapremini, zavisno od količine tkiva (100 mM NaCl, 10 mM TRIS HCl pH 8.0, 25 mM EDTA), proteinaza K (10 mg/ml) i 10% SDS (na 100  $\mu$ l TNE pufera dodaje se 2  $\mu$ l proteinaze K i 10  $\mu$ l SDS-a). Ostavi se u vodenom kupatilu na 37 °C preko noći.

Narednog dana dodaje se isti volumen smeše fenol/hloroform (u odnosu 1:1) i mućka blago da rastvor bude homogen. Centrifugira se na 3000 obrtaja 5 minuta da se odvoje dve faze: vodena i organska. Vodena faza prebacuje se u čistu mikrotubu, vodeći računa da se ne zahvati proteinska interfaza. Po potrebi postupak se ponovi, dok se ne dobije bistra vodena faza. Dodaje se isti volumen smeše hloroform/izoamilalkohol (u odnosu 24:1) i mućka se blago da rastvor bude homogen. Centrifugira se na 3000 obrtaja 5 minuta da se odvoje dve faze. Vodena faza prebacuje se u novu mikrotubu. Po potrebi ovaj korak se ponavlja. Dodaje se 2-3 volumena apsolutnog etanola (-20 °C), 1/10 volumena 3 M natrijum acetata i blago se mućka dok se ne pojavi končić DNK. Centrifugira se nekoliko sekundi, odbacuje etanol, zatim se ispira sa 70% etanolom (-20 °C), suši se talog i dodaje se destilovana voda (200  $\mu$ l).

Koncentracija DNK određuje se spektrofotometrijski.

### **3.2.2. Određivanje koncentracije DNK u uzorku**

Na spektrofotometru (BioPhotometer Plus, Eppendorf, Nemačka) su merene apsorbanse na 260 i 280 nm. Očitavanje apsorbanse na 260 nm omogućava računanje koncentracije DNK u uzorku, a vrednost apsorbanse izmerene na 280 nm daje količinu proteina u uzorku. Odnos apsorbaneci na 260 nm i 280 nm omogućava pocenu čistoće uzorka. Uzorak DNK zadovoljavajuće čistoće ima odnos  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  oko 1.8.

Vrednost  $A_{260\text{nm}}$  merilo je koncentracije DNK na sledeći način: jedna jedinica  $A_{260\text{nm}}$  predstavlja količinu DNK sadržanu u 1ml rastvora i daje vrednost OD = 1 (engl. OD

– optical density). 1 OD na 260 nm za dvolančanu DNK jednako je koncentraciji od 50 ng/μl.

Postupak rada je bio sledeći: pripremani su rastvori 1 μl DNK u 50 μl vode, tako da je faktor razblaženja 50. Nakon očitavanja vrednosti  $OD_{260nm}$ , koncentracija se računa prema formuli:  $OD_{260} \times 50 \text{ ng}/\mu\text{l} \times \text{faktor razblaženja}$ .

Primera radi, ukoliko je  $OD_{260nm} = 1.6$ , onda je koncentracija DNK u uzorku:

$$1.6 \times 50 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 50 = 4000 \text{ ng}/\mu\text{l}, \text{ odnosno } 4 \mu\text{g}/\mu\text{l}.$$

### **3.2.3. Lančana reakcija polimeraze (PCR)**

Lančana reakcija polimeraze (*engl. Polymerase Chain Reaction, PCR*) je *in vitro* sinteza odnosno umnožavanje definisane DNK sekvence, podražavajući proces replikacije DNK. Ova sinteza molekula DNK katalizovana je termostabilnom Taq polimerazom. Eksponencijalno umnožavanje specifičnog DNK fragmenta postiže se ponavljanjem ciklusa denaturacije DNK, hibridizacije prajmera i ekstenzije hibridizovanih prajmera od strane Taq polimeraze.

PCR reakcija odvija se u mikrotubi, a reakciona smeša zapremine između 25 i 50 μL se u PCR aparatu podvrgava preciznim, cikličnim promenama temperature.

### **3.2.4. Poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE)**

Gel elektroforeza je zasnovana na različitoj pokretljivosti biomolekula u električnom polju. Razloga za postojanje razlike u pokretljivosti je više: različite molekulske mase, prostorne konformacije, a iznad svega razlika u količini naelektrisanja (od presudnog značaja za smer kretanja biomolekula u električnom polju). Kada je u pitanju DNK molekul, on u svojoj primarnoj strukturi poseduje veliki broj fosfatnih grupa koje su na fiziološkom pH u jonizovanom stanju (negativno naelektrisane). Zahvaljujući tome, čitav molekul DNK poseduje ravnomerno raspoređeno negativno naelektrisanje, pa je kretanje ovog makromolekula usmereno od katode (negativne elektrode) ka anodi (pozitivnoj elektrodi).

Uspešnost PCR reakcije proveravana je analizom produkata vertikalnom elektroforezom na poliakrilamidnom gelu. Zahvaljujući brzini kojom se izvodi i visokoj rezoluciji, PAGE je jedna od najčešće korišćenih metoda za razdvajanje i vizuelizaciju nukleinskih kiselina.

Polimerizacijom monomera akrilamida dobijaju se dugački lanci polimera među kojima bis-akrilamid formira poprečne veze, te se na taj način dobija struktura nalik mreži. Kao inicijatori i katalizatori polimerizacije akrilamida dodaju se amonijum persulfat (APS) i N, N, N', N'- tetrametiletildiamin (TEMED). Odnosi zapremina komponenti poliakrilamidnog gela dati su u tabeli 2.

**Tabela 2:**Sastav 8% poliakrilamidnog gela

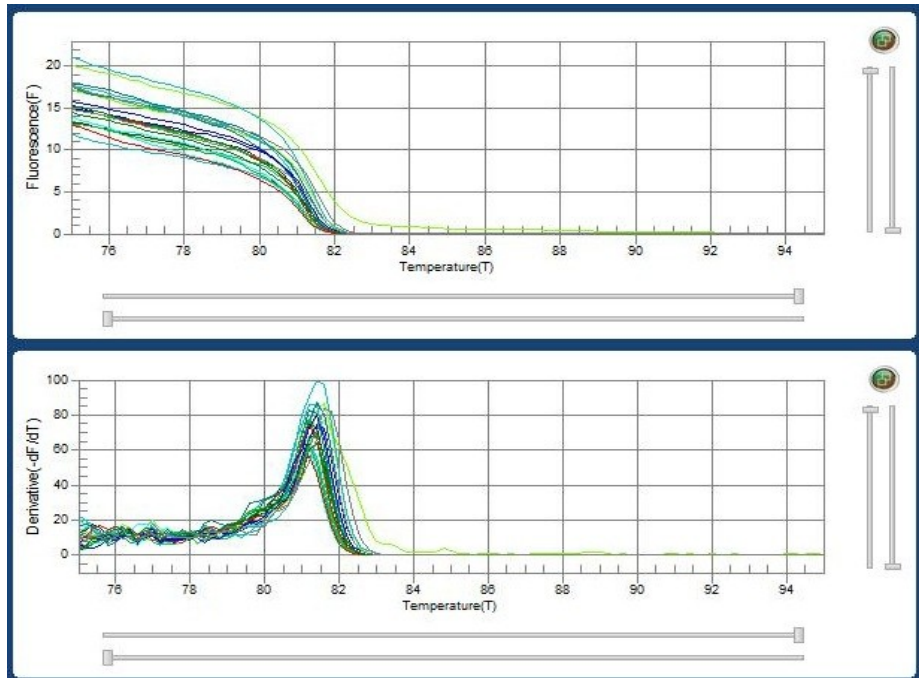
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	<b>3,9 mL</b>
<b>5 x TBE pufer</b>	<b>1,3 mL</b>
<b>Akrilamid / bis-akrilamid (40%)</b>	<b>1,3 mL</b>
<b>APS (10%)</b>	<b>46 µL</b>
<b>TEMED</b>	<b>8,4 µL</b>

Elektroforeza se odvija u 1 x TBE puferu, pri konstantnom naponu struje od 220 V u trajanju od oko 60 minuta. Da bi se vizuelizovali fragmenti DNK, gel je nakon elektroforeze potapan u vodeni rastvor etidijum bromida, interkalirajuće supstance koja se ugrađuje između lanaca DNK i fluorescira kada se osvetli UV svetlom.

### **3.2.5. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (real time PCR, qPCR)**

Metoda lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (engl. real time polymerase chain reaction, real time PCR, u literaturi označen kao qPCR) predstavlja modifikaciju PCR metode kojom je omogućeno praćenje toka reakcije. U reakcionoj smeši, pored standardnih komponenti, nalazi se i fluorescentna boja SYBR Green, nespecifična interkalirajuća boja koja se ugrađuje u dvolančane DNK produkte. PCR aparat u kome se izvodi ova reakcija ima pobuđivač i detektor

fluorescence, pa na kraju svakog od ciklusa detektuje nivo ugrađenog SYBR Green-a, čime je moguće pratiti tok PCR reakcije. Trenutak kada fluorescentni signal koji pratimo na ekranu kompjutera ulazi u eksponencijalnu fazu, odnosno kada započne eksponencijalno umnožavanje specifičnog PCR produkta, označava se kao Ct (engl. Cycle threshold, ciklus u kome se prelazi prag fluorescence). Što je više DNK u uzorku, kraće je vreme potrebno da se dostigne prag fluorescence, tj. Ct vrednost je manja. Ova metoda se zato označava i kao kvantitativni PCR, jer poznavanje Ct vrednosti omogućava određivanje relativnog broja kopija nekog gena u genomu, u odnosu na endogenu kontrolu, gen koji je uvek prisutan u pojedinačnoj kopiji. To se postiže poređenjem Ct vrednosti za svaki ciljni gen i endogenu kontrolu, a ovaj vid relativne kvantifikacije u literaturi se označava kao  $\Delta\Delta Ct$  metod. Specifičnost dobijenih PCR produkata proverava se podvrgavanjem reakcione smeše gradijentu topljenja (engl. Melting gradient). Svaki produkt ima karakterističnu temperaturu topljenja koja se definiše kao temperatura na kojoj je denaturisano 50% molekula. Oblik i pozicija krive topljenja su određeni veličinom DNK fragmenta i brojem GC odnosno AT baznih parova (Slika 20).



**Slika 20:** Analiza krive topljenja radi potvrde specifičnosti dobijenog PCR produkta  
Sastav reakcione smeše za amplifikaciju *HER-2* i *c-myc* gena dat je u tabeli 3. U obe reakcije kao endogena kontrola korišćen je gen za dopaminski D2 receptor.

**Tabela 3:** Sastav reakcione smeše za umnožavanje *HER-2* i *c-myc* gena, kao i endogene kontrole (*D2R* gen) (za svaki reakcioni smešu, korišćeni su odgovarajući prajmeri F i R)

	Finalna koncentracija	Zapremina po uzorku
Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	1X	12,5 µL
Prajmer F (10 µM)	0,2 µM	0,5 µL
Prajmer R (10 µM)	0,2 µM	0,5 µL
ddH <sub>2</sub> O	do 25 µL	8,5 µL
DNK uzorak (50ng/µL)	150 ng	3 µL

### 3.2.5.1. qPCR reakcija u detekciji genomske amplifikacije *HER-2* gena

Za potrebe određivanja relativnog broja kopija *HER-2* gena, rađene su dve PCR reakcije, korišćenjem prajmera za umnožavanje dela *HER-2* gena i *D2R* gena. Sekvence prajmera date su u Tabeli 4, temperaturni profil reakcije u Tabeli 5.

**Tabela 4:** Sekvence prajmera za PCR umnožavanje *HER-2* i *D2R* gena

Oznaka prajmera	Sekvenca prajmera
<i>HER-2 F</i>	5'CCTCTGACGTCCATCATCT3'
<i>HER-2 R</i>	5'ATCTTCTGCTGCCGTCGTT3'
<i>D2R F</i>	5' CCACTGAATCTGTCCTGGTATG 3'
<i>D2R R</i>	5' GTGTGGCATAGTAGTTGTAGTGG 3'

**Tabela 5:** Temperaturni uslovi qPCR reakcije za *HER-2* gen

	35 ciklusa				Gradijent topljenja na svakih 20 sekundi za po 0,2°C (75°C – 95°C)
Inicijalna denaturacija	Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija	Finalna ekstenzija	
10 minuta 95°C	30 sekundi 95°C	30 sekundi 50°C	30 sekundi 72°C	5 minuta 72°C	

### 3.2.5.2. qPCR reakcija u detekciji genomske amplifikacije *c-myc* gena

Za potrebe detekcije genomske amplifikacije *c-myc* gena qPCR  $\Delta\Delta C_t$  metodom, rađene su dve PCR reakcije uz primenu odgovarajućih prajmera. Sekvence prajmera date su u Tabeli 6, a temperaturni profil reakcije dat je u Tabeli 7.

**Tabela 6:** Sekvence prajmera za PCR umnožavanje *c-myc* i *D2R* gena

oznaka prajmera	sekvenca prajmera
<i>c-myc F</i>	5' GCTCCAAGACGTTGTGTGTTTCG 3'
<i>c-myc R</i>	5' GGAAGGACTATCCTGCTGCCAA 3'
<i>D2R F</i>	5' CCACTGAATCTGTCCTGGTATG 3'
<i>D2R R</i>	5' GTGTGGCATAGTAGTTGTAGTGG 3'

**Tabela 7:** Temperaturni uslovi qPCR reakcije za *c-myc* gen

	35 ciklusa				Gradijent topljenja na 20 sekundi za po 0,2°C (75°C – 95°C)
Inicijalna denaturacija	Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija	Finalna ekstenzija	
10 minuta 95°C	30 sekundi 95°C	30 sekundi 50°C	30 sekundi 72°C	5 minuta 72°C	

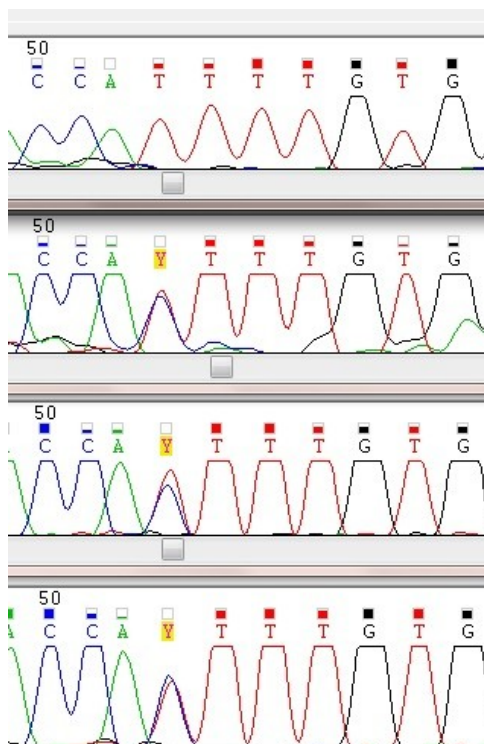


### 3.2.6. SSCP

Metoda konformacijski polimorfizam jednolančanih segmenata DNK (single strand conformation polymorphism, SSCP) bazira se na osobini jednolančane DNK da spontano zauzima različite konformacije koje zavise od njene primarne strukture, odnosno sekvence. Konformacijski polimorfizam utiče na pokretljivost DNK u električnom polju i omogućava uočavanje razlika između normalnog i mutiranog segmenta gena. Nakon umnožavanja sekvence metodom PCR-a, dobijeni produkt se denaturiše u prisustvu redukcionog agensa formamida, koji ima ulogu da stabilizuje jednolančanu formu DNK, odnosno onemogućuje renaturaciju. Uzorci se puštaju na PAGE elektroforezu i gel se nakon toga boji srebro nitratom.

#### 3.2.6.1. PCR-SSCP reakcija u detekciji mutacija u *H-ras* genu

Za potrebe analize tzv. hot-spot kodona (12 i 13) u egzonu 1 *H-ras* gena, korišćeni su odgovarajući prajmeri čija je sekvenca data u tabeli. Nakon PCR amplifikacije, a prema gore opisanoj proceduri, PCR produkti su analizirani na prisustvo mutacija koje bi uticale na promenu mobilnosti traka na PAA gelu. Uporedo sa našim uzorcima nepoznate sekvence, na svaki gel nalivana je kontrola poznate sekvence, bez prisustva mutacija. Time je izvršena selekcija uzoraka sa mutacijom, odnosno uzorci koji su imali drugačiji šablon traka na PAA gelu su mogli biti podvrgnuti proveru na prisustvo mutacija metodom sekvenciranja (Slika 21).



**Slika 21:** Hromatografski zapis DNK sekvence bez mutacije (gore) i sa mutacijom (nukleotidna zamena, donje tri sekvence)

Sekvence prajmera za PCR amplifikaciju segmenta *H-ras* gena date su u Tabeli 8, sastav reakcione smeše za PCR amplifikaciju dat je u Tabeli 9, a temperaturni profil reakcije u Tabeli 10.

**Tabela 8:** Sekvenca prajmera za PCR amplifikaciju prvog egzona *H-ras* gena

Gen	Sekvenca prajmera	Dužina PCR produkta
<i>H-ras</i>	5' - ATGACGGAATATAAGCTGGT - 3'	123 bp
	5' - CGCCAGGCTCACCTCTATA - 3'	

**Tabela 9:** Sastav reakcione smeše za PCR umnožavanje egzona 1 *H-ras* gena

<b>MgCl<sub>2</sub> (25 mM)</b>	<b>1,5 µL</b>
<b>10 x PCR pufer</b>	<b>2,5 µL</b>
<b>dNTP (10mM)</b>	<b>0,5 µL</b>
<b>prajmer F (5 µM)</b>	<b>0,5 µL</b>
<b>prajmer R (5 µM)</b>	<b>0,5 µL</b>
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	<b>16,5 µL</b>
<b>Taq polimeraza</b>	<b>0,2 µL</b>
<b>DNK uzorak (c = 200 µg/ µL)</b>	<b>3,0 µL</b>

**Tabela 10:** Temperaturni uslovi PCR reakcije za *H-ras* gen

	35 ciklusa			
<b>Inicijalna denaturacija</b>	<b>Denaturacija</b>	<b>Hibridizacija</b>	<b>Elongacija</b>	<b>Finalna ekstenzija</b>
<b>3 minuta</b>	<b>45 sekundi</b>	<b>45 sekundi</b>	<b>1 minut</b>	<b>5 minuta</b>
<b>95°C</b>	<b>95°C</b>	<b>50°C</b>	<b>72°C</b>	<b>72°C</b>

### 3.2.6.2. PCR-SSCP reakcija u detekciji mutacija u *TP53* genu

PCR reakcija korišćena je da bi se umnožili egzoni 5, 6 i 7 *TP53* gena, radi detekcije pristustva mutacija, po istom principu kao i za *H-ras* gen. Nakon umnožavanja, PCR produkti su podvrgnuti istoj analizi kao i u slučaju *H-ras* gena. Prisustvo mutacija potvrđeno je metodom sekvenciranja.

Sekvence prajmera za PCR amplifikaciju čitavih egzona 5, 6 i 7 *TP53* gena date su u Tabeli 11, sastav reakcione smeše za PCR amplifikaciju dat je u Tabeli 12, a temperaturni profil reakcije u Tabeli 13.

**Tabela 11:** Sekvence prajmera i veličina PCR produkata

Gen (egzon)	Sekvenca prajmera	Dužina PCR produkta
TP53 (egzon 5)	5' - TACTCCCCTGCCCTCAACAA - 3'	184 bp
	5' - CATCGCTATCTGAGCAGCGC - 3'	
TP53 (egzon 6)	5' - GTCTGGCCCCTCCTCAGCAT - 3'	113 bp
	5' - CTCAGGCGGCTCATAGGGCA - 3'	
TP53 (egzon 7)	5' - TCTCCTAGGTTGGTCCTGAC - 3'	110 bp
	5' - CAAGTGGCTCCTGACCTGGA - 3'	

**Tabela 12:** Sastav reakcione smeše za PCR umnožavanje egzona 5, 6 i 7 *TP53* gena

MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5 µL
10 x PCR pufer	2,5 µL
dNTP (10mM)	0,5 µL
prajmer F (5 µM)	0,5 µL
prajmer R (5 µM)	0,5 µL
ddH <sub>2</sub> O	16,5 µL
Taq polimeraza	0,2 µL
DNK uzorak (c = 200 µg/ µL)	3,0 µL

**Tabela 13:** Temperaturni uslovi PCR reakcije za *TP53* gen (egzon 5, 6 i 7)

	35 ciklusa			
<b>Inicijalna denaturacija</b> 3 minuta 95°C	<b>Denaturacija</b> 45 sekundi 95°C	<b>Hibridizacija</b> 1minut 61°C (egzon 5) 63°C (egzon 6) 60°C (egzon 7)	<b>Elongacija</b> 45 sekundi 72°C	<b>Finalna ekstenzija</b> 5 minuta 72°C

### **3.2.7. Bisulfitna modifikacija DNK**

Da bismo ispitali metilacioni status *p16* i *p14* gena, pre umnožavanja je neophodno tretirati DNK molekul kroz proces bisulfitne modifikacije. Kompletna genomski DNK se denaturiše natrijum hidroksidom, zatim se jednolančana DNK tretira koncentrovanim rastvorom natrijum bisulfita i hidrohina, te se vrši desulfonacija, prečišćavanje i taloženje modifikovane DNK. Razvijeni su komercijalni kitovi za bisulfitnu modifikaciju DNK (Zymo Research), koji olakšavaju proces modifikacije, a prečišćavanje se vrši na silikatnim kolonicama.

### **3.2.8. Metil specifična lančana reakcija polimeraze (metil specifični PCR)**

Metil specifična lančana reakcija polimeraze (engl. Methyl specific polymerase chain reaction, MS-PCR ili MSP) je modifikacija metode PCR-a kojom je moguće ispitivanje metilacionog statusa gena ili genskih promotora.

Bisulfitom modifikovana DNK ovde se koristi kao matrica za PCR, uz primenu odgovarajućih prajmera za metilovanu, odnosno nemetilovanu DNK. Za svaki uzorak modifikovane DNK rade se po dve PCR reakcije za odgovarajući gen: jedna sa setom za metilovane i druga sa setom za nemetilovane prajmere. Pored uzoraka, u svakoj PCR reakciji rađene su i kontrole za odgovarajuće setove prajmera. Kao pozitivna kontrola za nemetilovane prajmere korišćen je uzorak modifikovane DNK iz leukocita periferne krvi zdrave osobe, dok je kao pozitivna kontrola za metilovane prajmere korišćena modifikovana in vitro metilovana DNK (tretirana enzimom metil transferazom, uz prisustvo S adenozil metionina). S obzirom na činjenicu da je DNK tretirana bisulfitom poprilično fragmentisana, a imajući u vidu i činjenicu da je moguće nekompletno ispiranje agresivnih hemikalija tokom tretmana, u PCR reakcionu smešu dodaju se dva reagensa koja služe stabilizaciji enzima Taq polimeraze (BSA – engl. Bovine Serum Albumin) i inhibiraju formiranje sekundarnih struktura DNK matrice ili formiranje dimera prajmera (DMSO – engl. Dimethyl sulfoxide).

**Tabela 14:** Sastav reakcione smeše za PCR umnožavanje modifikovanog promotora *p16* i *p14* gena, u ukupnoj zapremini od 50  $\mu$ L

	Finalna koncentracija	Zapremina
10 x PCR pufer	1x	5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	6,7 $\mu$ M	9,4 $\mu$ L
dNTP (10mM)	1,25 $\mu$ M	6,25 $\mu$ L
BSA (20mg/ml)	0,4 $\mu$ g/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
DMSO (100%)	5%	2,5 $\mu$ L
prajmer 1 (5 $\mu$ M)	0,6 $\mu$ M	6 $\mu$ L
prajmer 2 (5 $\mu$ M)	0,6 $\mu$ M	6 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	do 50 $\mu$ L	10,55 $\mu$ L
Taq polimeraza (5 U/ $\mu$ L)	1,5 U	0,3 $\mu$ L
DNK uzorak (konvertovan)		3 $\mu$ L

### 3.2.8.1. Metil specifični PCR za ispitivanje metilacionog statusa *p16* gena

Za umnožavanje dela promotora *p16* gena, korišćeni su prajmeri posebno dizajnirani za bisulfitom modifikovanu DNK, koji sa nemodifikovanom DNK ne daju produkt. Prajmeri se razlikuju na mestima koja su najčešće pogođena metilacijom (Tabela 15).

**Tabela 15:** Sekvence prajmera, temperature hibridizacije i dužina produkta u amplifikaciji *p16* promotora

Oznaka prajmera	Nukleotidna sekvenca prajmera	Temperatura hibridizacije	Dužina PCR produkta
<i>p16<sup>INK4a</sup></i> U 1	5' TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT 3'	60 °C	151 bp
<i>p16<sup>INK4a</sup></i> U 2	5' CAACCCCAAACCACAACCATAA 3'		
<i>p16<sup>INK4a</sup></i> M 1	5' TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC 3'	65 °C	150 bp
<i>p16<sup>INK4a</sup></i> M 2	5' GACCCCGAACC GCGACCGTAA 3'		

**Tabela 16:** Temperaturni uslovi PCR reakcije za *p16* gen

	35 ciklusa			
<b>Inicijalna denaturacija</b>	<b>Denaturacija</b>	<b>Hibridizacija</b>	<b>Elongacija</b>	<b>Finalna ekstenzija</b>
<b>3 minuta</b>	<b>45 sekundi</b>	<b>45 sekundi</b>	<b>1 minut</b>	<b>4 minuta</b>
<b>95°C</b>	<b>95°C</b>	<b>60 °C/65 °C</b>	<b>72°C</b>	<b>72°C</b>

### 3.2.8.2. Metil specifični PCR za ispitivanje metilacionog statusa *p14* gena

Za umnožavanje dela promotora *p14* gena, korišćeni su prajmeri posebno dizajnirani za bisulfitom modifikovanu DNK, pa sa nemodifikovanom DNK izostaje produkt reakcije. Prajmeri se razlikuju na mestima koja su najčešće pogođena metilacijom (Tabela 17)

**Tabela 17:** Sekvence prajmera, temperature hibridizacije i dužina produkta u amplifikaciji *p16* promotora

Oznaka prajmera	Nukleotidna sekvenca prajmera	Temperatura hibridizacije	Dužina PCR produkta
<b>p14<sup>ARF</sup> U 1</b>	<b>5' TTTTGGGTGTTAAAGGGTGGTGTAGT 3'</b>	<b>53 °C</b>	<b>132 bp</b>
<b>p14<sup>ARF</sup> U 2</b>	<b>5' CACAAAAACCCCTCACTACAACAA 3'</b>		
<b>p14<sup>ARF</sup> M 1</b>	<b>5' GTGTAAAGGGCGGCGTAGC 3'</b>	<b>53 °C</b>	<b>122 bp</b>
<b>p14<sup>ARF</sup> M 2</b>	<b>5' AAAACCCCTCACTCGCGACGA 3'</b>		

**Tabela 18:** Temperaturni uslovi PCR reakcije za *p14* gen

	35 ciklusa			
<b>Inicijalna denaturacija</b>	<b>Denaturacija</b>	<b>Hibridizacija</b>	<b>Elongacija</b>	<b>Finalna ekstenzija</b>
<b>3 minuta</b>	<b>45 sekundi</b>	<b>45 sekundi</b>	<b>1 minut</b>	<b>5 minuta</b>
<b>95°C</b>	<b>95°C</b>	<b>53 °C</b>	<b>72°C</b>	<b>72°C</b>

### 3.2.9. Statistička analiza

Statistička obrada podataka urađena je korišćenjem deskriptivnih i analitičkih statističkih metoda.

Od deskriptivnih metoda korišćeni su:

- Apsolutni i relativni brojevi (%).
- Mere centralne tendencije (aritmetička sredina i medijana).
- Mere disperzije (standardna devijacija, minimum, maksimum).

Od analitičkih statističkih metoda korišćeni su:

- Hi kvadrat ( $\chi^2$ ) test za utvrđivanje razlika u distribuciji učestalosti mutacija i epimutacija u grupama (podela prema uzrastu, kliničkom ili patohistološkom nalazu, kao i među grupama- adenomi i karcinomi).
- Fišerovim testom egzaktne verovatnoće (*eng. Fisher Exact Probability Test*) su testirane razlike u slučaju da je očekivana učestalost manja od 5%.
- Logističkom regresionom analizom računat je odnos verovatnoća (*eng. Odds Ratio*) za utvrđivanje genetičkih ili epigenetičkih prediktora maligne transformacije, sa intervalom poverenja (*eng. Confidence Interval, CI*) od 95%.

Dobijeni rezultati su obrađeni statističkim programom SPSS 17.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, Illinois) i prikazani tabelarno i grafički. Sve prikazane p vrednostisu bile su *two-sided* i ukoliko je vrednost manja od 0.05, vrednosti dobijene odgovarajućim statističkim testom su smatrane statistički značajnim.

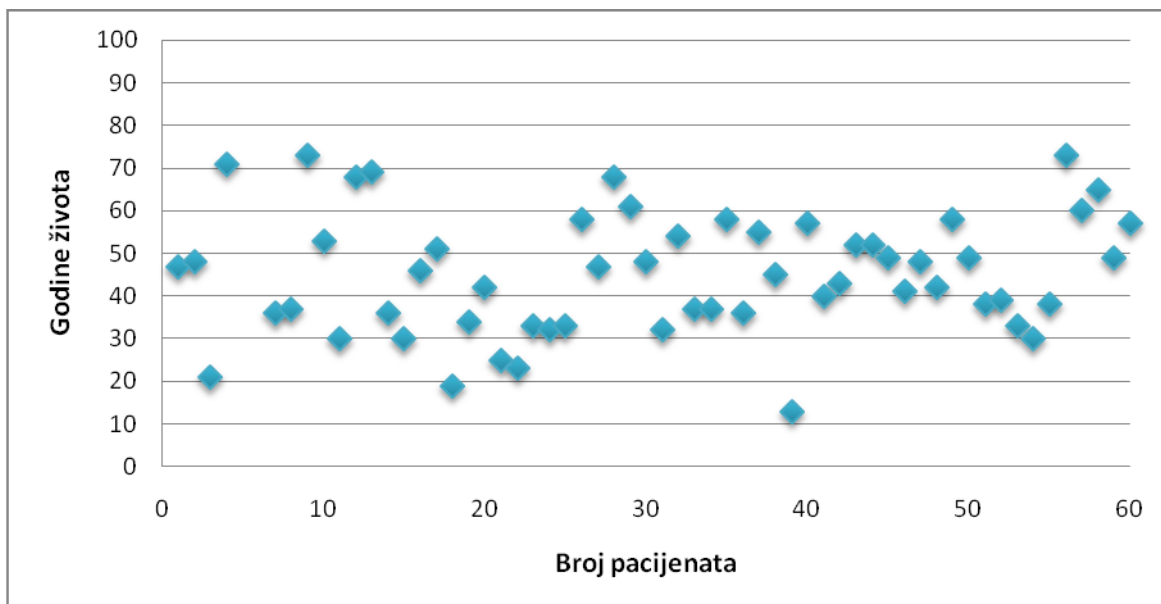


## ***4. REZULTATI***

#### 4.1. DISTRIBUCIJA PACIJENATA PREMA GODINAMA STAROSTI I POLU, KONZUMIRANJU DUVANA I ALKOHOLA

Analizom je obuhvaćeno ukupno 72 ispitanika, 60 pacijenata obolelih od pleomorfno adenoma i 12 pacijenata obolelih od karcinoma u pleomorfnom adenomu, svi lečeni na klinici za Maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Pacijenti sa pleomorfnim adenomom su operisani u periodu između 2007. i 2011. godine, dok je za potrebe sakupljanja zadovoljavajućeg minimalnog broja uzoraka karcinoma u pleomorfnom adenomu bilo neophodno pokriti vremenski period od 2000. do 2011. godine, imajući u vidu nisku incidencu ovog tipa karcinoma.

Grupa pacijenata obuhvatila je muškarce i žene uzrasta između 13 i 73 godina, prosečne starosti 44,77 godina, medijana 45,50 godina (Slika 22 i Tabela 19). Prema literaturnim podacima, srednja vrednost uzrasta u kome se javlja pleomorfni adenom je 46 godina, pri čemu se može javiti između prve i desete decenije života (Eveson i sar. 2005). Rezultati naše studije su u saglasnosti sa ovim podacima.



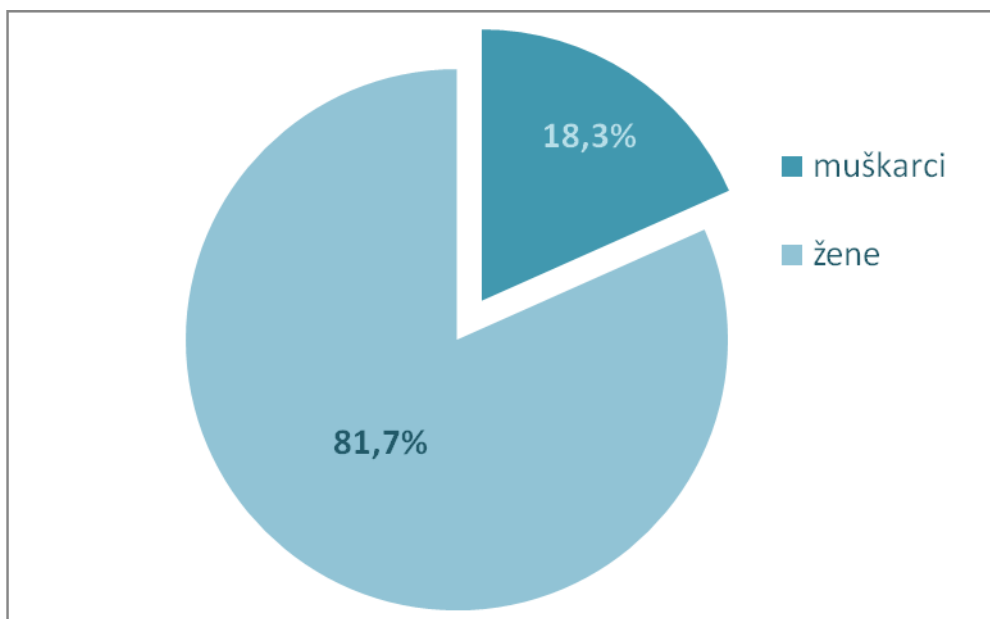
**Slika 22:** Prikaz odnosa broja pacijenata sa PA u odnosu na godine života

**Tabela 19:** Mere centralne tendencije i disperzije uzrasta pacijenata prilikom uspostavljanja dijagnoze

Broj pacijenata	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Medijana	Minimum	Maksimum
60	44,77	14,45	45,50	13	73

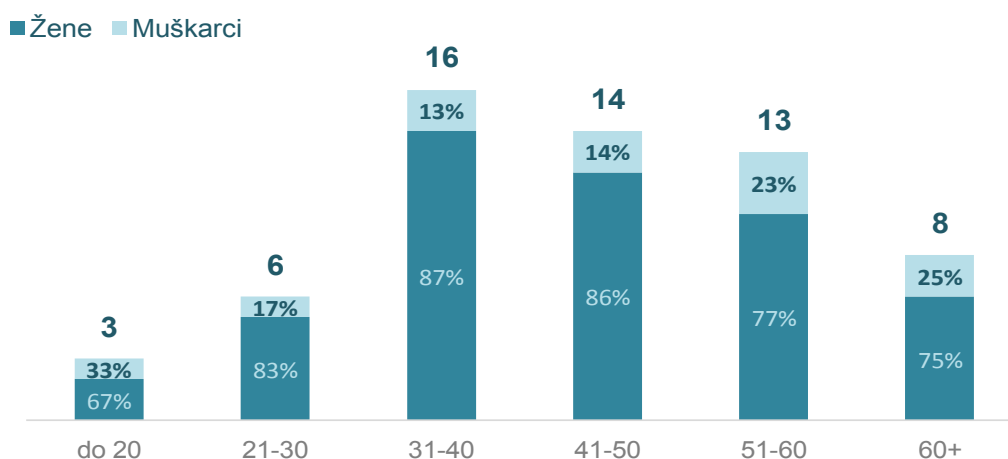
Ukoliko se pogleda odnos broja pacijenata mlađih i starijih od vrednosti prosečne starosti (44,77~45 godina), tačno polovina pacijenata sa dijagnozom pleomorfog adenoma bila je mlađa od 45 i isto toliko je bilo starijih od 45 godina.

Među pacijentima sa dijagnozom pleomorfog adenoma bilo je 11 muškaraca (18,3%) i 49 žena (81,7%). U našoj studiji, pleomorfni adenom se 4,45 puta češće javljao kod žena nego kod muškaraca (Slika 23). Prema dosadašnjim literaturnim podacima, razlike u distribuciji prema polu postoje; uglavnom od 2 do 5 puta češće se javljaju kod žena, što potvrđuje i naša studija.



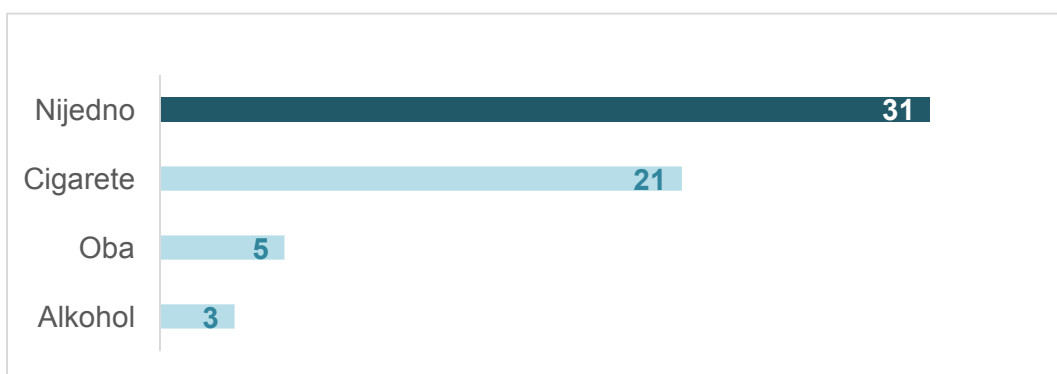
**Slika 23:** Distribucija pacijenata prema polu

Polna distribucija po dekadama uzrasta pacijenata bila je prilično ujednačena i uglavnom je odražavala ukupne razlike u učestalosti javljanja pleomorfog adenoma kod muškaraca i žena. (Slika 24)



**Slika 24:** Polna distribucija u različitim uzrasnim kategorijama (po dekadama)

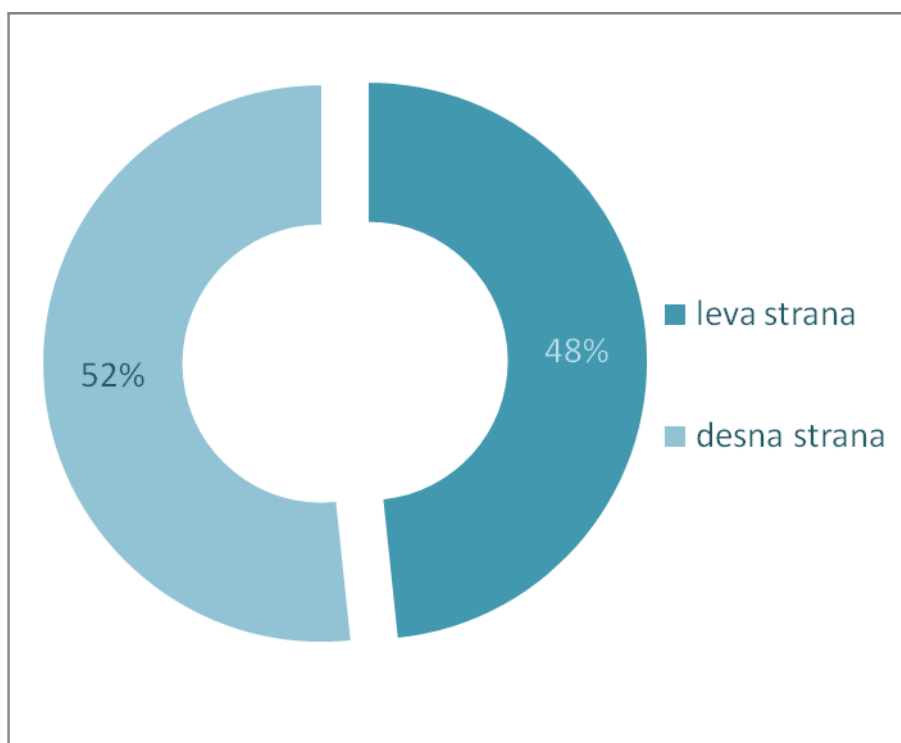
U ispitivanoj grupi pacijenata sa PA, pušača je bilo 26 (43,3%), alkohol je konzumiralo njih 8 (13,3%), bez ovih faktora rizika je bilo njih 31 (51,7%), a njih 5 su bili pušači i konzumirali su alkohol (8,3%)(Slika 25).



**Slika 25:** Loše navike

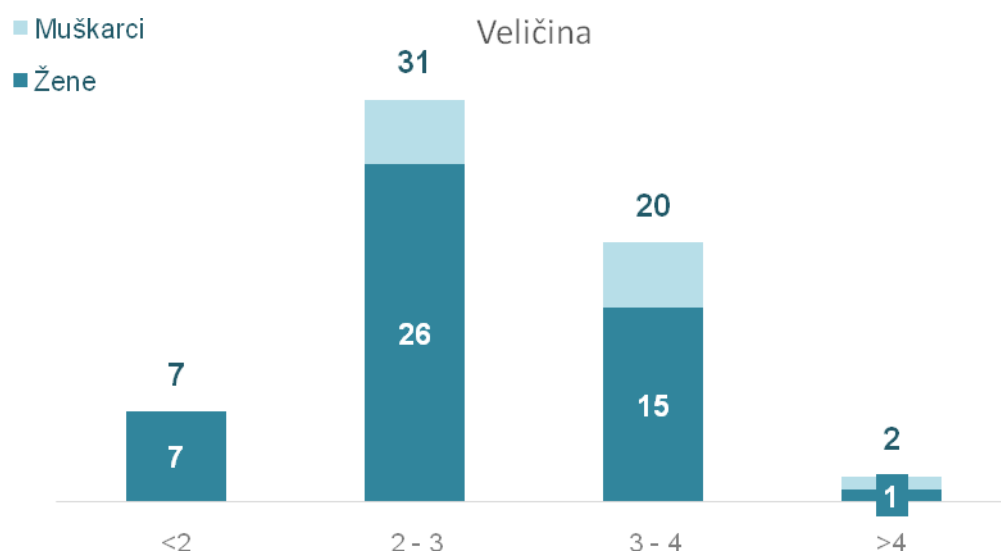
#### 4.2. LOKALIZACIJA TUMORA, VELIČINA TUMORA, VREME PROTEKLO OD UOČAVANJA PRVE PROMENE I HISTOLOŠKI TIP

Svi tumori bili su u parotidnoj pljuvačnoj žlezdi, a u pogledu lokalizacije sa leve ili desne strane, nije bilo razlike. Od 60 tumora, 29 je bilo lokalizovano na levoj (48,3%), a 31 na desnoj strani (51,7%) (Slika 26).

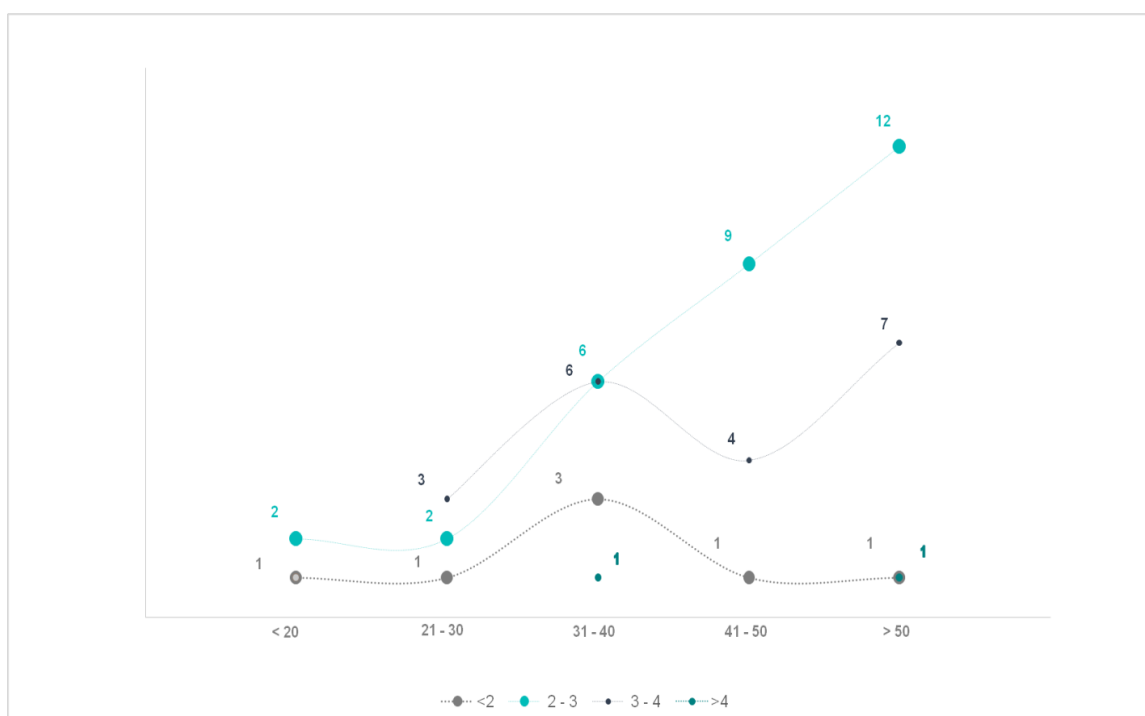


**Slika 26:** Distribucija pacijenata prema lokalizaciji tumora

Veličina tumora kretala se od 0,5 x 0,5 do najvećeg koji je bio dimenzija 7 x 6 cm. Najviše tumora (50%) bilo je dimenzija između 2 i 3 cm, dok su samo 2 (3,2 %) bila veća od 4 cm. Na slici 27 prikazana je distribucija pacijenata prema veličini tumora i polu, dok je na slici 28 ilustrovana učestalost javljanja određene veličine tumora u različitim uzrasnim grupama pacijenata (po dekadama života).



**Slika 27:** Distribucija pacijenata prema kliničkoj veličini tumora (u cm) i polu



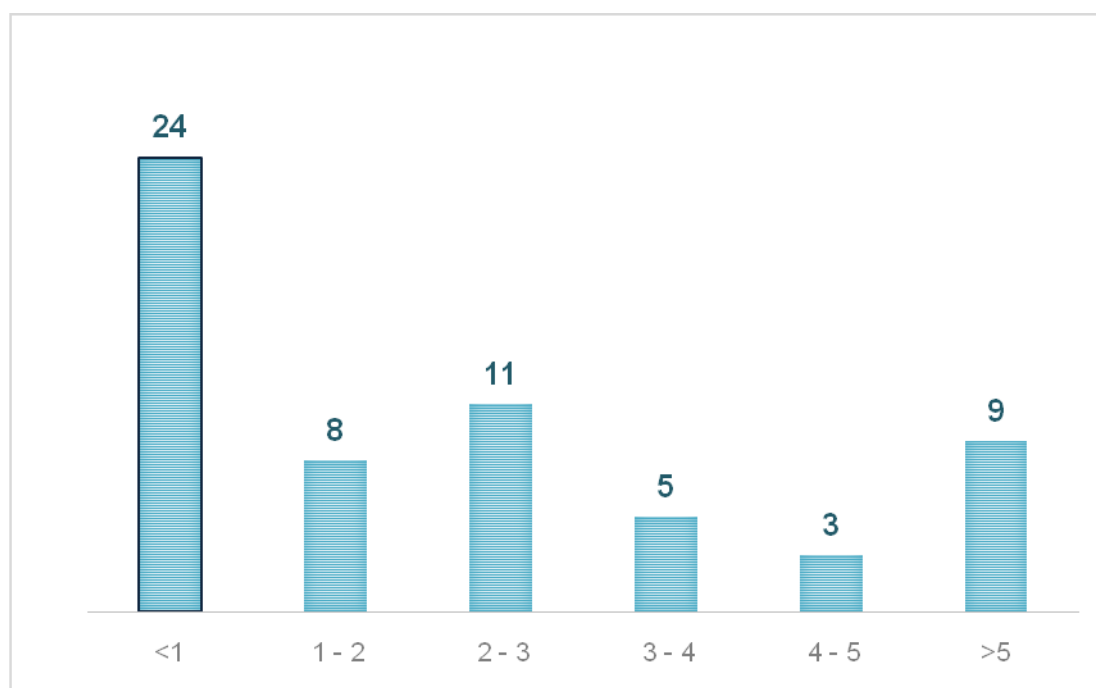
**Slika 28:** Distribucija pacijenata prema veličini tumora (u cm, legenda ispod grafika) i godinama starosti (po dekadama)

Veličina tumora nije proporcionalna vremenu njegovog rasta/evolucije (koeficijent korelacije 0,237;  $p=0,068$ ).

Najveći broj pacijenata lekaru se javilo radi otpočinjanja terapije tokom prve dve godine od uočavanja prvih simptoma (medijana 24, tabela 20). Po tri pacijenta su započeli sa lečenjem 2, odnosno 240 meseci nakon pojave prvih simptoma. Vremenski period od pojave prvih simptoma do početka lečenja je varirao u intervalu od 2 meseca do 240 meseci (slika 29).

**Tabela 20:** Mere centralne tendencije i disperzije vremenskog intervala od pojave prvih simptoma do početka lečenja

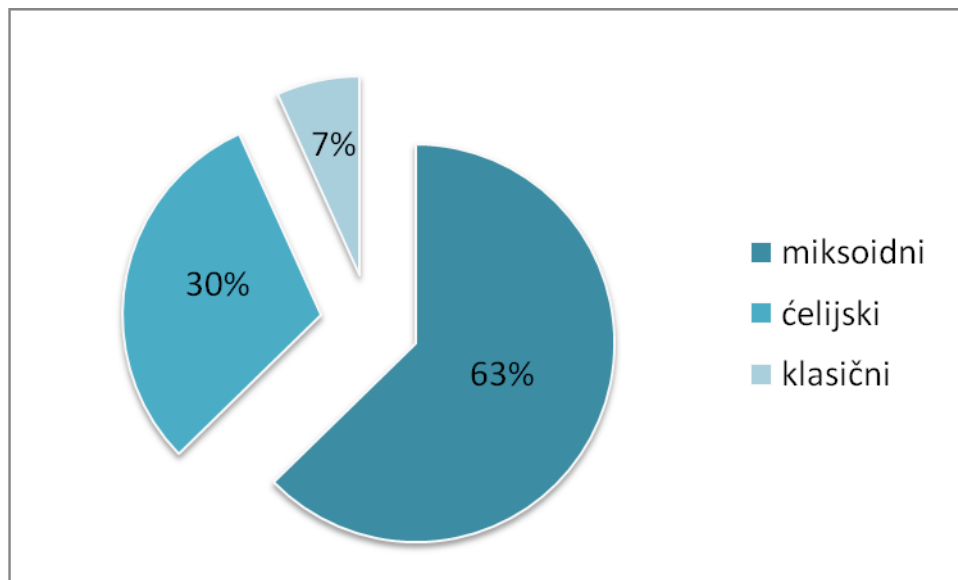
Broj pacijenata	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Medijana	Minimum	Maksimum
60	42,32	60,73	24	2	240



**Slika 29:** Prikaz odnosa broja pacijenata i vremena proteklog od uočavanja prve promene do trenutka početka lečenja (u godinama)

59 pleomorfni adenoma (98,3%) je operisano prvi put kao primarni tumor dok je 1 adenom recidivantan (1,7%) i po redosledu recidiviranja pojavljuje se četvrti put. Još jedan PA je recidivantan, ali kao karcinom u pleomorfnom adenomu.

Prema histološkom tipu, najčešći je bio miksoidni tip (62,7%), dok je klasični bio najređi (6,8%). Ovo je u skladu sa literaturnim podacima (Ito i sar. 2009) (slika 30).



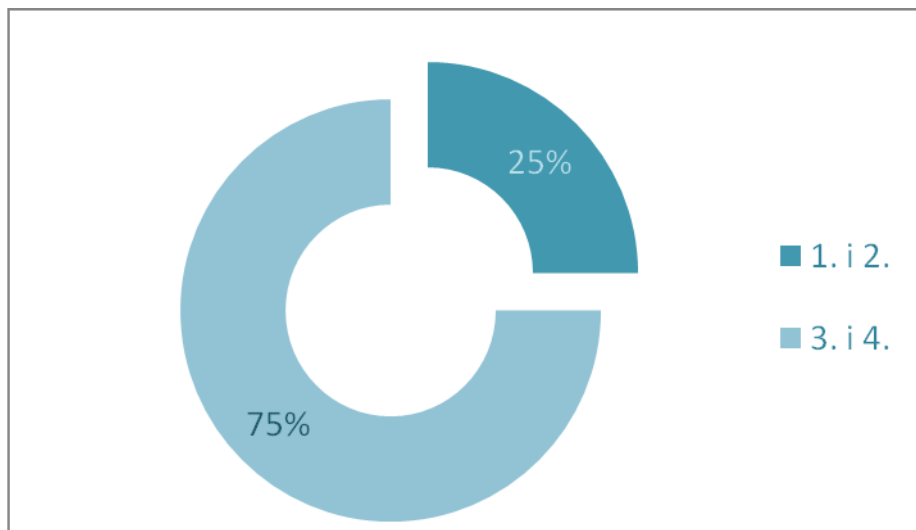
**Slika 30:** Distribucija pacijenata prema histološkom tipu pleomorfnog adenoma

### **4.3. KARAKTERISTIKE KARCINOMA U PLEOMORFNOM ADENOMU**

Ukupno 12 karcinoma u pleomorfnom adenomu je analizirano. Jedan je recidivirao (i primarni tumor i recidiv su analizirani). Na osnovu izvršene TNM klasifikacije, uzorci su klasifikovani u dve grupe, karcinome nižeg kliničkog stadijuma (stadijum 1 i 2) i karcinome višeg kliničkog stadijuma (stadijum 3 i 4). Takođe, podela je izvršena prema tome da li su transformisane ćelije zahvatile lokalne limfne čvorove ili ne. Udaljenih metastaza nije bilo.

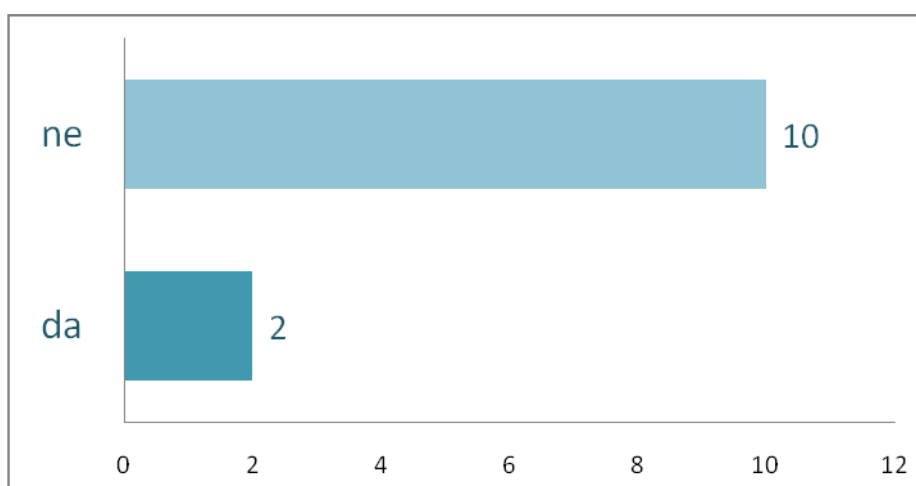


Od ukupno 12 uzoraka karcinoma u pleomorfnom adenomu, 3 (25%) su svrstana u tumore nižeg kliničkog stadijuma, a preostalih 9 (75%) u tumore višeg kliničkog stadijuma (Slika 31).



**Slika 31:** Distribucija pacijenata sa CXPA prema kliničkom stadijumu

Kod dva pacijenta uočena je infiltracija tumorskog tkiva u lokalni limfni čvor (17%). (Slika 32)



**Slika 32:** Distribucija pacijenata prema tome da li je zahvaćeno tkivo regionalnih limfnih čvorova

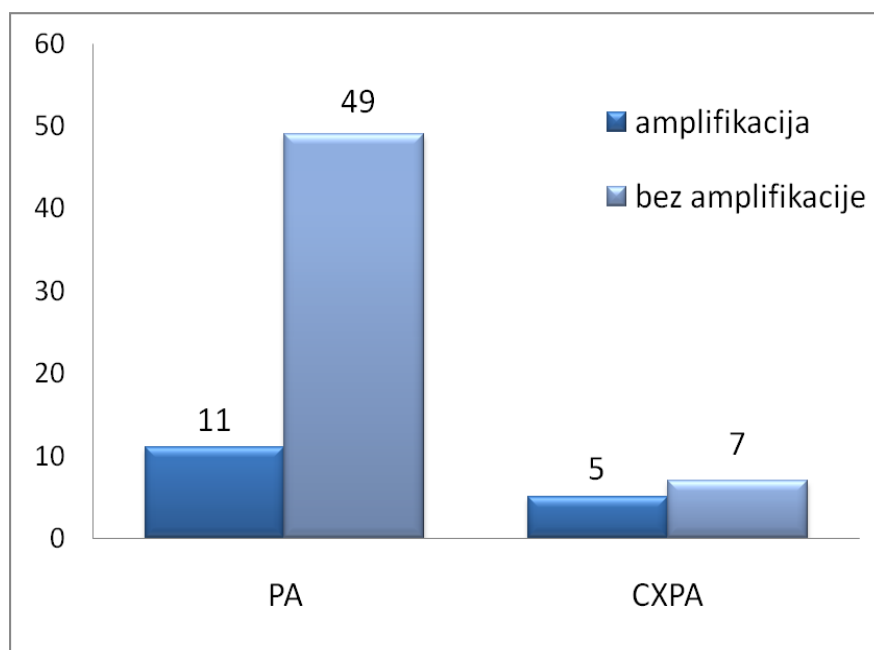
## 4.4. ANALIZA GENETIČKIH REZULTATA

### 4.4.1. Genska amplifikacija *HER-2* gena

Da bi bilo moguće utvrditi broj uzoraka sa genskom amplifikacijom *HER-2* gena, bilo je neophodno usvojiti određene prazne vrednosti (engl. cut – off value). Tako su npr, Tse i saradnici utvrdili da odnos *HER-2*/referentni gen vrednosti 2,2 ili više, daje najbolje korelacije sa pozitivnim rezultatima dobijenim FISH analizama (Tse i sar. 2005). Mnogi autori međutim predlažu da svaka laboratorija usvoji svoje vrednosti, te su u našoj studiji uzorci koji su imali *HER-2/D2R* odnos veći ili jednak 2,5 smatrani pozitivnim na prisustvo genske amplifikacije.

Genska amplifikacija *HER-2* gena detektovana je kod 11 pacijenata sa pleomorfim adenomom, odnosno u 18,3% slučajeva.

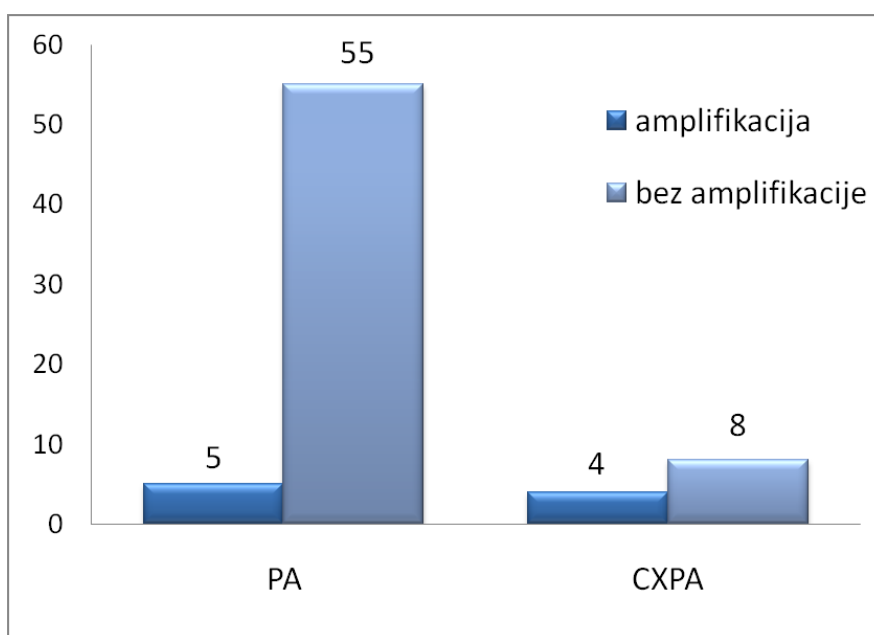
U grupi pacijenata sa karcinomom u pleomorfnom adenomu genska amplifikacija *HER-2* gena detektovana je kod 5 pacijenata, odnosno u 41,7% slučajeva. Na grafikonu (Slika 33) su prikazane učestalosti amplifikacije *HER-2* gena u pleomorfnom adenomu (PA, levo) i karcinomom u pleomorfnom adenomu (CXPA, desno).



**Slika 33:** Učestalosti genske amplifikacije *HER-2* gena u grupi pacijenata sa pleomorfnim adenomom (PA) i karcinomom u pleomorfnom adenomu (CXPA)

#### 4.4.2. Genska amplifikacija *c-myc* gena

Usvajanjem iste prazne vrednosti kao za *HER-2* gen, dobijeno je da je *c-myc* gen prisutan u uvećanom broju kopija kod 5 pacijenata sa pleomorfnim adenomom, odnosno u 8,3% slučajeva. Kod pacijenata sa karcinomom, taj procenat je znatno veći (33,3%) jer je genska amplifikacija detektovana kod 4 pacijenta. Na grafikonima (Slika 34) se mogu videti učestalosti amplifikacije *c-myc* gena u pleomorfnom adenomu (PA, levo) i karcinomu u pleomorfnom adenomu (CXPA, desno).



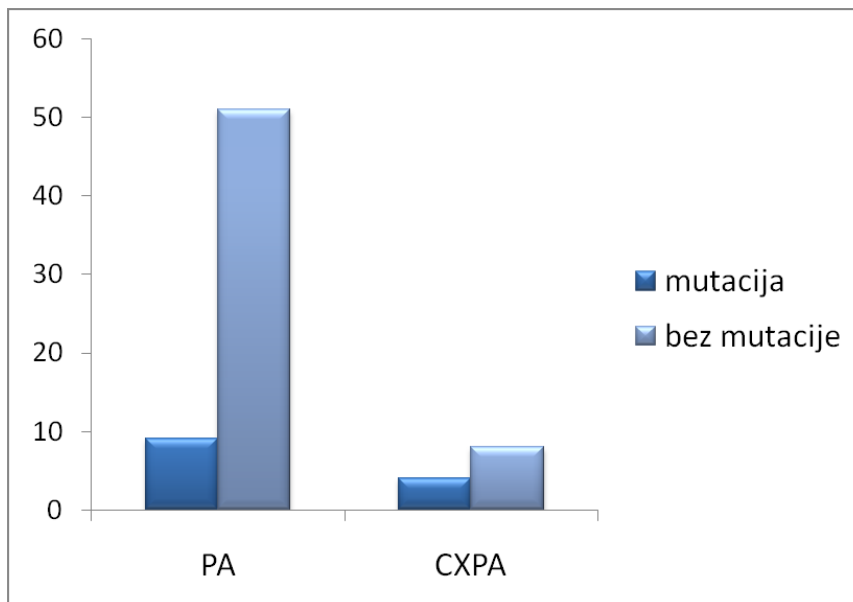
**Slika 34:** Učestalosti genske amplifikacije *c-myc* gena u grupi pacijenata sa pleomorfnim adenomom (PA) i karcinomom u pleomorfnom adenomu (CXPA)

#### 4.4.3. Mutacije u *H-ras* genu

Mutacije u *H-ras* genu detektovane su kod 9 pacijenata sa pleomorfnim adenomom, odnosno u 15% slučajeva.

Za razliku od njih, u grupi pacijenata sa karcinomom u pleomorfnom adenomu, mutacije u *H-ras* genu imala je trećina pacijenata (4 od 12).

Na slici 35 je prikazana učestalost mutacija u grupi pacijenata sa pleomorfnim adenomom i pacijenata sa karcinomom u pleomorfnom adenomu.

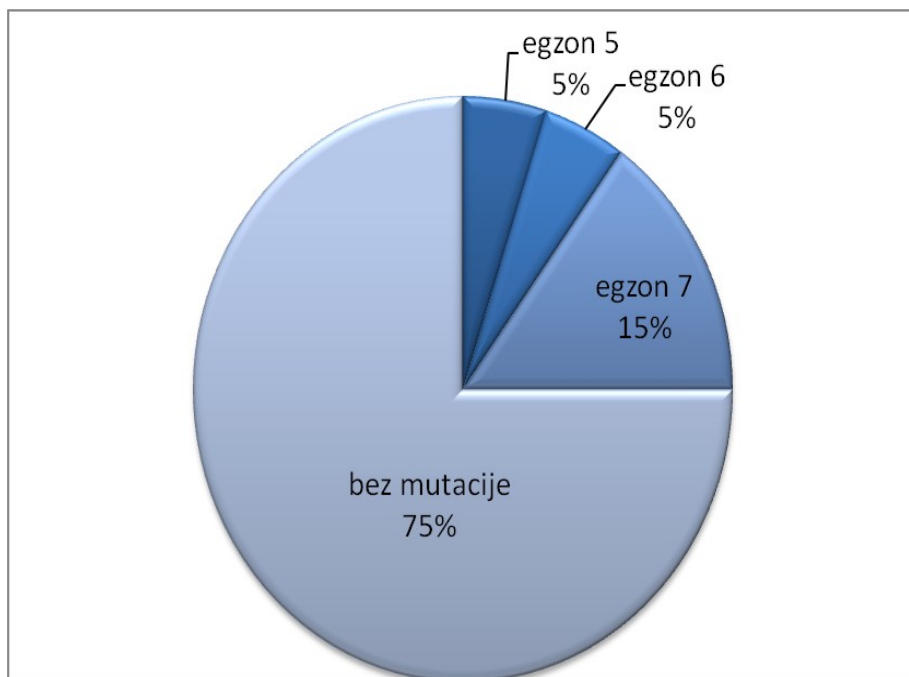


**Slika 35:** Učestalosti mutacija u grupi pacijenata sa pleomorfnim adenomom (PA) i karcinomom u pleomorfnom adenomu (CXPA)

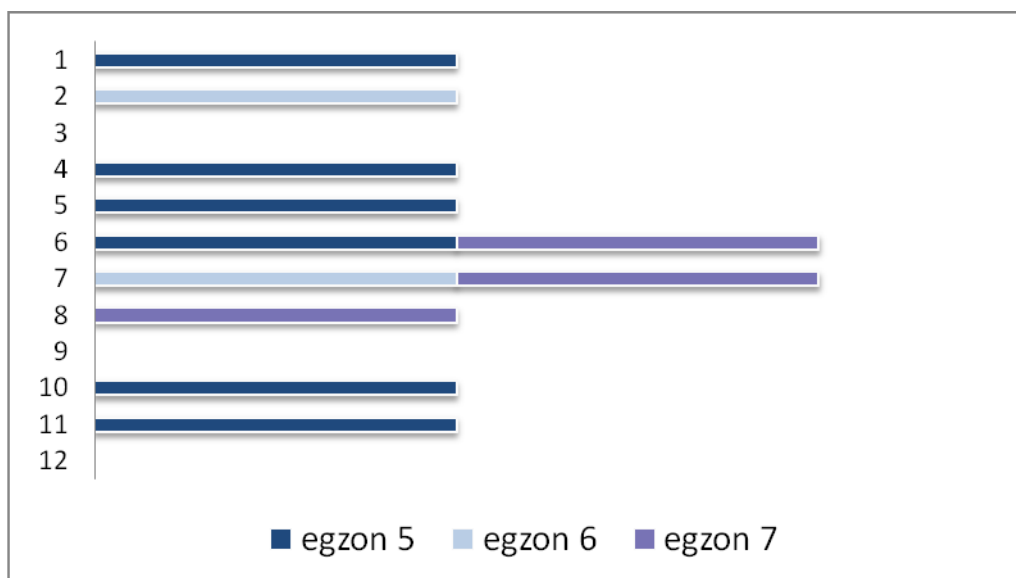
#### 4.4.4. Mutacije u *TP53* genu

U *TP53* genu kod pacijenata sa pleomorfnim adenomom detektovano je ukupno 15 mutacija (25% slučajeva), od toga 3 u egzonu 5 (5%), 3 u egzonu 6 (5%) i 9 u egzonu 7 (15%). Pri tome, ni jedan od pacijenata sa pleomorfnim adenomom nije imao mutacije u više od jednog egzona (slika 36).

S druge strane, 9 od 12 pacijenata sa karcinomom u pleomorfnom adenomu je imalo mutacije u *TP53* genu. Ukupno, 6 mutacija je bilo u egzonu 5 (50%), 2 u egzonu 6 (16,7%) i 3 u egzonu 7 (25%). 3 pacijenta uopšte nisu imale mutacije u *TP53* genu, 7 pacijenata je imalo mutacije u samo jednom od egzona, jedan pacijent je imao mutacije u egzonima 5 i 7, a jedan u egzonima 6 i 7 (slika 37).



**Slika 36:** Učestalost mutacija TP53 gena u pleomorfnom adenomu

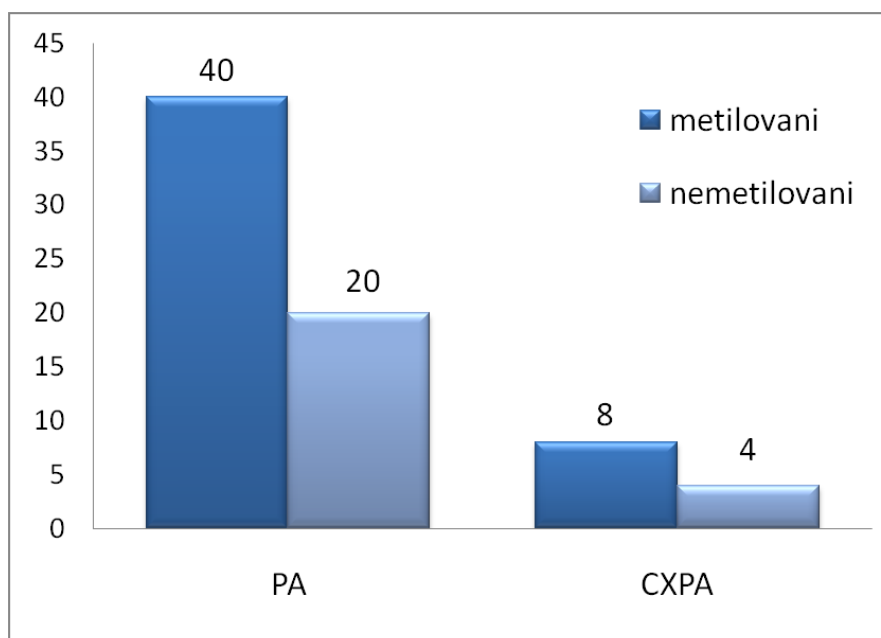


**Slika 37:** Raspodela mutacija u TP53 genu kod 12 pacijenata sa karcinomom u pleomorfnom adenomu; tamno plavo – mutacija u egzonu 5; svetlo plavo – mutacija u egzonu 6; ljubičasto – mutacija u egzonu 7.

## 4.5. ANALIZA EPIGENETIČKIH REZULTATA

### 4.5.1. Metilacija promotora *p16* gena

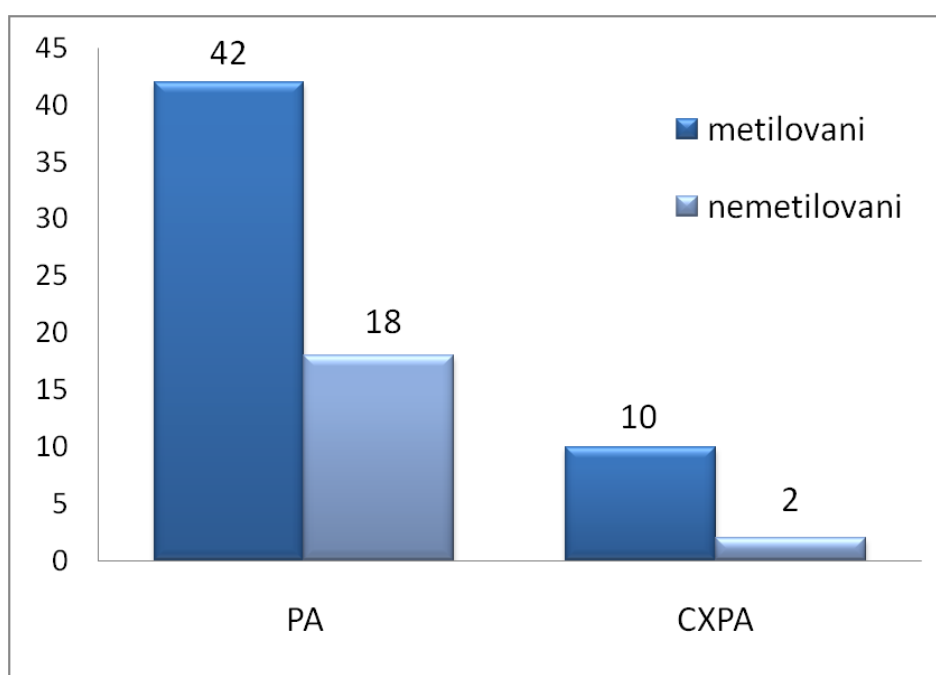
U grupi pacijenata sa pleomorfnim adenomom, promotor *p16* gena je bio metilovan kod 40 pacijenata, odnosno u 66,7% slučajeva. Što se tiče grupe uzoraka karcinoma u pleomorfnom adenomu, promotor *p16* gena metilovan je u 8 (66,7%) slučajeva. Na grafiku (Slika 38) su prikazane učestalosti metilacije promotora *p16* gena u grupi pleomorfnih adenoma (PA, levo) i karcinoma u pleomorfnom adenomu (CXPA, desno).



**Slika 38:** Učestalost metilacije promotora *p16* gena u PA i CXPA grupi

#### 4.5.2. Metilacija promotora *p14* gena

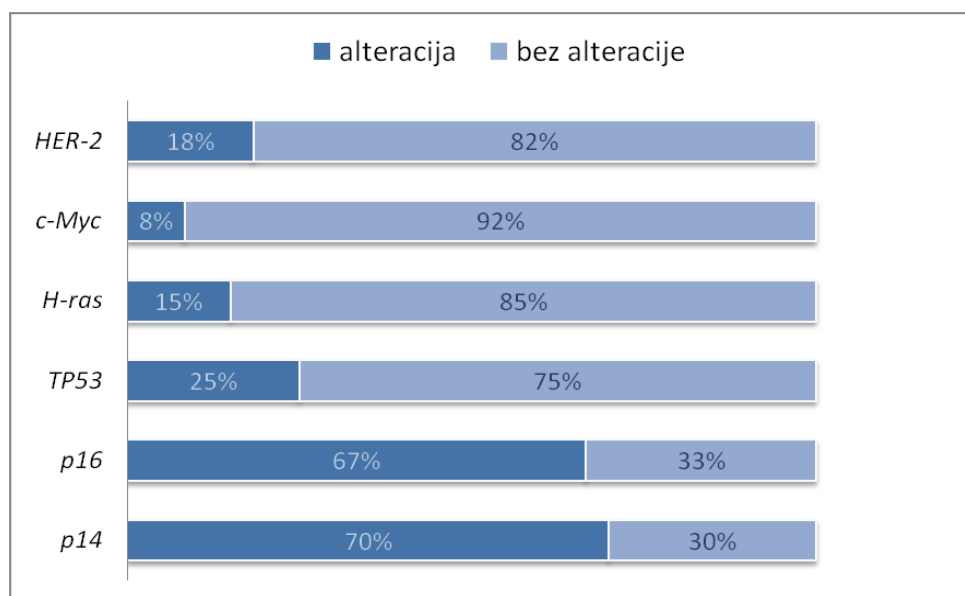
Metilacija promotora *p14* gena je utvrđena kod 42 pacijenta sa pleomorfnim adenomom, odnosno u 70% slučajeva. Kod pacijenata sa karcinomom u pleomorfnom adenomu, promotor *p14* gena metilovan je u 10 (83,3%) slučajeva. Na grafiku (Slika 39) su prikazane učestalosti metilacije promotora *p14* gena u grupi pleomorfnih adenoma (PA, levo) i karcinoma u pleomorfnom adenomu (CXPA, desno).



**Slika 39:** Učestalost metilacije promotora *p14* gena u PA i CXPA grupi

## 4.6. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA

Komparativni prikaz učestalosti alteracija u genima koji su ispitivani u okviru ove studije dat je na Slici 40.



**Slika 40:** Procentualna zastupljenost analiziranih genskih alteracija

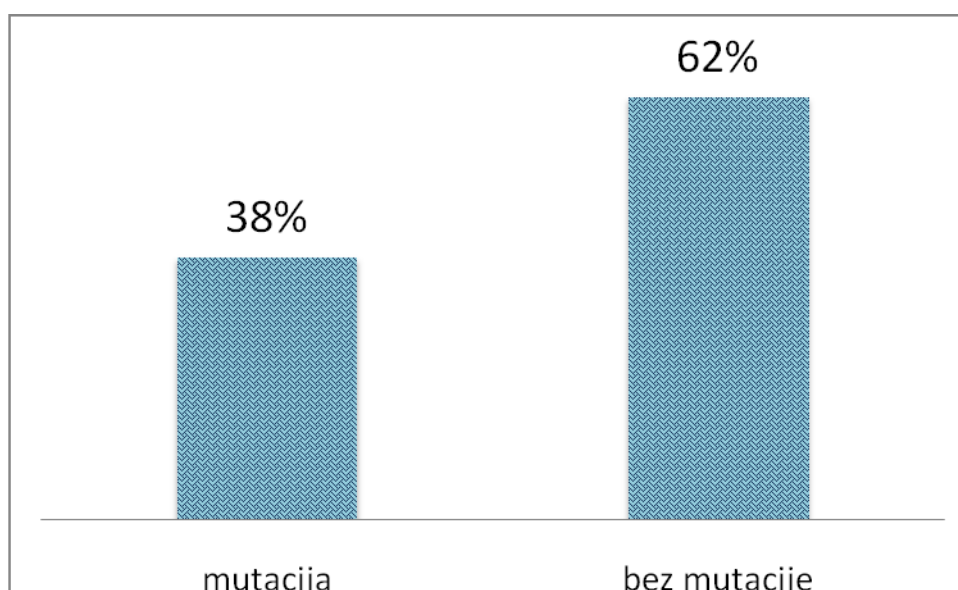
\* tamnije – mutacija/metilacija; svetlije - bez mutacije/metilacije



#### 4.6.1. Analiza kombinovane uloge mutacija u genima *HER-2/H-ras/c-myc* signalne kaskade u patogenezi pleomorfnog adenoma

Pojedinačni doprinosi mutacija u genima *HER-2*, *c-myc* i *H-ras* u patogenezi pleomorfnog adenoma parotidne žlezde su relativno mali, ako se ima u vidu njihova niska učestalost (18%, 8% i 15%, redom).

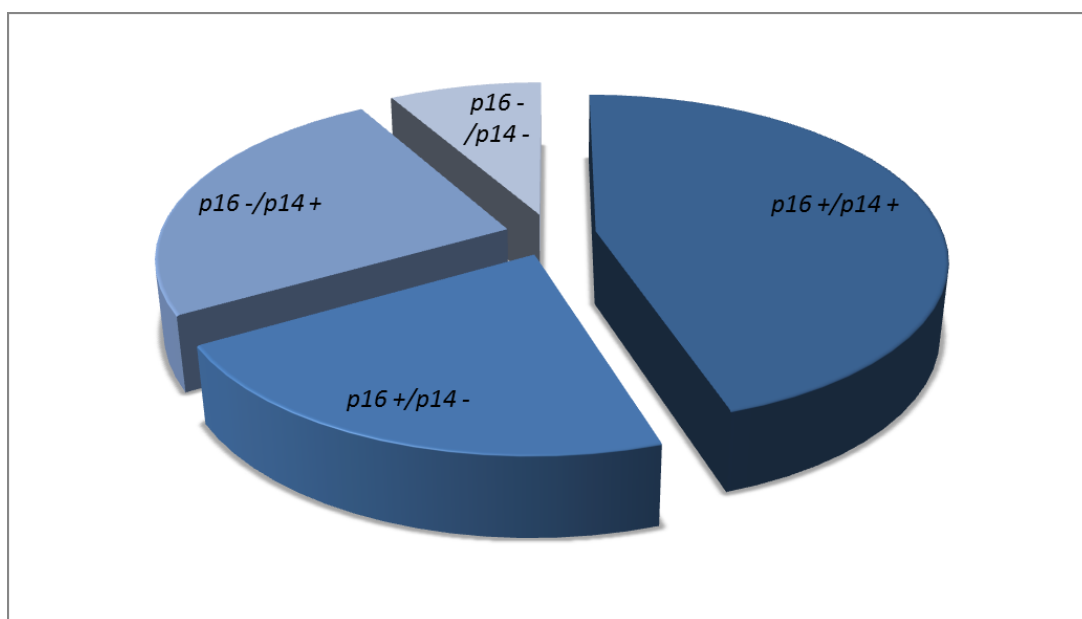
Ukoliko se pogleda koliko pacijenata je imalo mutacije u makar jednom od ova tri gena, taj procenat je znatno veći (38%), te se može zaključiti da se uticaj ove mitogene signalne kaskade ne može zanemariti (Slika 41).



**Slika 41:** Učestalost mutacija u jednom, dva ili sva tri gena *HER-2/H-ras/c-myc* signalne kaskade

#### 4.6.2. Analiza učestalosti kombinacija metilacije promotora *p16* i *p14* gena

Uporednom analizom metilacionog statusa *p16* i *p14* promotora kod pacijenata sa pleomorfnim adenomom utvrđeno je da su oba promotora bila metilovana kod 27 pacijenata (45%), samo *p16* promotor bio je metilovan kod 13 (22%), a samo *p14* kod 15 (25%) pacijenata. Ni jedan od ova dva promotora nije bio metilovan kod 5 pacijenata (8%) (Slika 42). Na osnovu ovih rezultata, može se reći da su ove dve metilacije nepovezani događaji ( $p = 0,39$ ).



**Slika 42:** Učestalosti kombinacija metilacije promotora *p16* i *p14* gena; (*p16+*/*p14+*) - oba promotora metilovana, (*p16+*/*p14-*) *p16* metilovan, a *p14* nemetilovan, (*p16-*/*p14+*) *p16* nemetilovan, a *p14* metilovan, (*p16-*/*p14-*) oba nemetilovana

#### **4.7. ANALIZA POVEZANOSTI MUTACIJA I METILACIJE SA ETIOLOŠKIM FAKTORIMA I KLINIČKIM I PATOHISTOLOŠKIM NALAZOM**

Asocijacije između analiziranih mutacija, odnosno epimutacija i etioloških faktora u grupi PA pacijenata su predstavljene u Tabeli 21. Nije uočena statistički značajna asocijacija neke mutacije ili epimutacije sa polom, uzrastom ili konzumacijom alkohola ili duvana (Tabela 21). *C-myc* je bio mutiran isključivo kod žena, ali ovo nije bilo statistički značajno ( $p = 0,349$ ).

Povezanost mutacija i epigenetičkih promena sa kliničkim i patohistološkim varijablama u proučavanoj PA grupi predstavljena je u Tabeli 22. Nijedna od kliničkih ili patohistoloških varijabli: strana, veličina, dužina trajanja ili patohistološki (PH) tip, nije bila asociirana sa analiziranim mutacijama ili epigenetičkim promenama u ovoj studiji (Tabela 22). Veća je učestalost mutacija *HER-2* uočena kod tumora kraće evolucije (25%, naspram 15% kod tumora duže evolucije), a *H-ras* mutacija kod tumora duže evolucije (36%, naspram 12,5% kod tumora kraće evolucije), ali ove razlike nisu statistički značajne ( $p = 0,714$  i  $p = 0,208$ , redom).

**Tabela 21.** Povezanost mutacija *HER-2*, *c-myc*, *H-ras* i *TP53* gena i epimutacija *p16* i *p14* gena sa etiološkim faktorima

varijabla	n	<i>HER-2</i>	<i>c-Myc</i>	<i>H-ras</i>	<i>TP53</i>	<i>p16</i>	<i>p14</i>
pol							
muški	11	2/9	0/11	2/9	2/9	7/4	7/4
ženski	49	9/40	5/44	7/42	13/36	33/16	35/14
	p	1.000	0.349	0.664	0.714	1.000	0.719
godine							
< 45	30	4/26	3/27	4/26	9/21	19/11	20/10
≥ 45	30	7/23	2/28	5/25	6/24	21/9	22/8
	p	0.506	1.000	1.000	0.552	0.785	0.779
pušenje							
ne	34	8/26	2/32	5/29	6/28	20/14	22/12
da	26	3/23	3/23	4/22	9/17	20/6	20/6
	p	0.320	0.644	1.000	0.148	0.174	0.398
alkohol							
ne	52	10/42	5/47	9/43	15/37	34/18	35/17
da	8	1/7	0/8	0/8	0/8	6/2	7/1
	p	1.000	1.000	0.339	0.182	0.707	0.415

\*rezultati u poljima prikazani kao: sa amplifikacijom/bez amplifikacije (*HER-2*, *c-myc*), sa mutacijom/bez mutacije (*H-ras*, *TP53*), metilovan/nemetilovan (*p16*, *p14*)

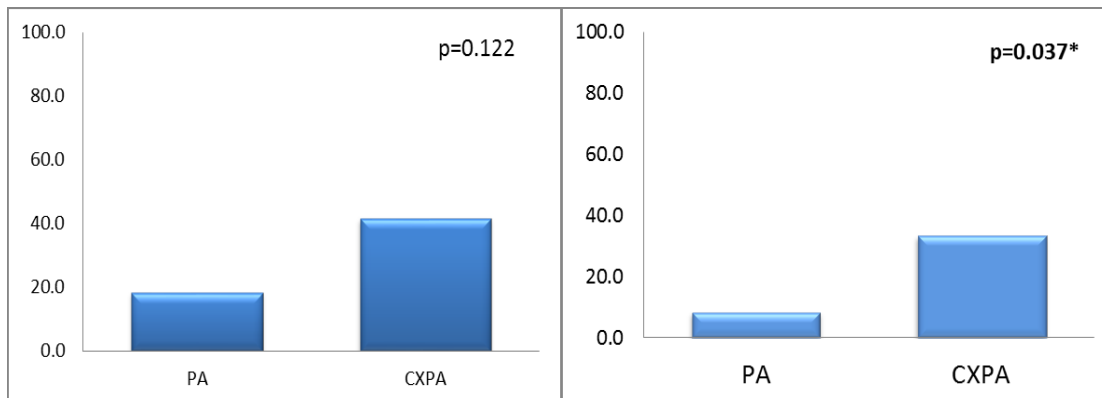
**Tabela 22.** Povezanost mutacija *HER-2*, *c-myc*, *H-ras* i *TP53* gena i epimutacija *p16* i *p14* gena sa kliničkim i patohistološkim varijablama

varijabla	n	<i>HER-2</i>	<i>c-Myc</i>	<i>H-ras</i>	<i>TP53</i>	<i>p16</i>	<i>p14</i>
strana							
leva	29	4/25	4/25	5/24	7/22	19/10	20/9
desna	31	7/24	1/30	4/27	8/23	21/10	22/9
	p	0.509	0.188	0.727	1.000	1.000	1.000
veličina							
do 2 cm	7	1/6	0/7	2/5	3/4	5/2	4/3
od 2 do 3 cm	30	6/24	2/28	4/26	9/21	19/11	21/9
od 3 do 4 cm	21	4/17	3/18	2/19	3/18	16/6	15/6
preko 4 cm	2	0/2	0/2	1/1	0/2	1/1	2/0
	p	0.899	0.593	0.322	0.315	0.877	0.699
trajanje							
do 42 meseca	45	9/36	3/42	5/40	11/34	30/15	32/13
preko 42 meseca	15	2/13	2/13	4/11	4/11	10/5	10/5
	p	0.714	0.591	0.208	1.000	1.000	0.754
PH tip							
miksolidni	37	5/32	5/32	4/33	9/28	22/15	25/12
ćeljski	18	6/12	0/18	5/13	5/13	15/3	13/5
klaslični	4	0/4	0/4	0/4	0/4	2/2	3/1
	p	0.127	0.197	0.176	0.493	0.167	0.912

\*rezultati u poljima prikazani kao: sa amplifikacijom/bez amplifikacije (*HER-2*, *c-myc*), sa mutacijom/bez mutacije (*H-ras*, *TP53*), metilovan/nemetilovan (*p16*, *p14*)

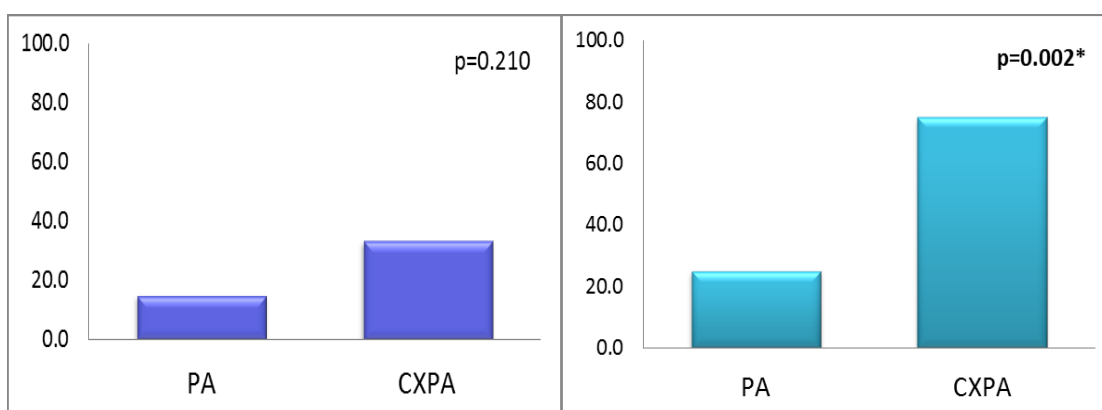
#### 4.8. ANALIZA PREDIKTORA MALIGNE TRANSFORMACIJE

Analiza zastupljenosti mutacija i epigenetičkih promena u proučavanim genima između grupe pacijenata sa pleomorfim adenomom i grupe sa karcinomom u pleomorfnom adenomu je pokazala da postoji statistički značajna razlika u učestalosti mutacija *c-myc* gena ( $p=0,037$ , Fisher) i *TP53* gena ( $p=0,002$ , Fisher) između ispitivanih grupa (Slika 43 i Tabela 23). Pokazano je da prisustvo genske amplifikacije *c-myc* 5,5 puta povećava šanse za malignu transformaciju pleomorfnog adenoma (OR 5,5; 95% CI 1.2155-24.886), dok prisustvo *TP53* mutacija čak 9 puta povećava šanse za malignu transformaciju (OR 9; 95% CI 2.1508-37.6603) (Tabela 23). Obe vrednosti su statistički značajne. Što se tiče preostalih analiziranih mutacija i epimutacija, razlike u učestalosti između PA i CXPA grupe nisu pronađene (Slika 43 i Tabela 23).



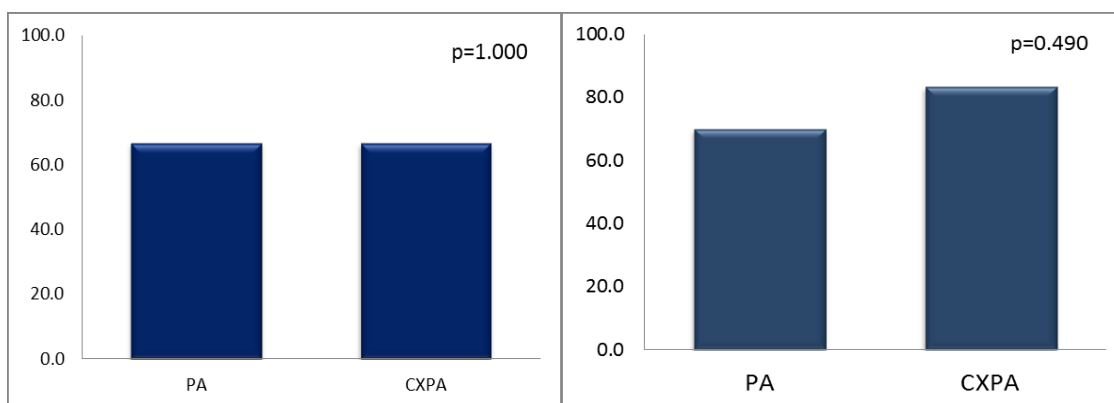
**a) *HER-2***

**b) *c-myc***



**c) *H-ras***

**d) *TP53***



**e) *p16***

**f) *p14***

**Slika 43:** Procentualna zastupljenost proučavanih mutacija i epimutacija u grupi pleomorfnih adenoma (PA) i karcinoma u pleomorfnom adenomu (CXPA): **a) *HER-2***; **b) *c-myc***; **c) *H-ras***; **d) *TP53***; **e) *p16***; **f) *p14***. Vrednosti  $p < 0,005$  su podebljane i označene zvezdicom.

**Tabela 23:** Distribucija mutacija u grupi pleomorfnih adenoma (PA) i karcinoma u pleomorfnom adenomu (CXPA)

Gen	alteracija	PA	CXPA	P	OR	95%CI
<i>HER-2</i>	mutacija	11	5	0.122	3.18	0.84-11.92
	bez mutacije	49	7			
<i>c-myc</i>	mutacija	5	4	0.037*	5.50	1.22-24.87
	bez mutacije	55	8			
<i>H-ras</i>	mutacija	9	4	0.21	2.83	0.70-11.42
	bez mutacije	51	8			
<i>TP53</i>	mutacija	15	9	0.002*	9.00	2.15-37.66
	bez mutacije	45	3			
<i>p16</i>	metilovani	40	8	1.000	1.00	0.27-3.72
	nemetilovani	20	4			
<i>p14</i>	metilovani	42	10	0.49	2.14	0.43-10.78
	nemetilovani	18	2			

p vrednosti manje od 0,005 označene su zvezdicom (\*) i statistički su značajne.

OR – odnos šansi (engl. odds ratio); 95% CI – 95% interval poverenja (engl. confidence interval)

## ***5. DISKUSIJA***



Progresivna akumulacija genetičkih i epigenetičkih promena, pre svega u genima regulatorima ćelijskog ciklusa i proliferacije, vodi favorizovanju ćelija koje imaju sposobnost da se brzo i neograničeno dele i izbegavaju odbrambene mehanizme organizma što dovodi do nastanka tumora.

Iako postoje podaci o ulozi onkogeni i tumor supresorskih gena u nastanku tumora pljuvačnih žlezda, i dalje se malo zna o ulozi mitogene *HER-2/H-ras/c-myc* signalne kaskade u patogenezi pleomorfnih adenoma. Rezultati izneti u okviru ove doktorske disertacije ukazuju na to da uloga ovog signalnog puta nije zanemarljiva, s obzirom da je 38% pacijenata imalo mutacije u jednom, dva ili sva tri gena.

Amplifikacija *HER-2* je pronađena kod 18% pacijenata sa pleomorfnim adenomom i kod 42% pacijenata sa karcinomom u pleomorfnom adenomu. Ova razlika u distribuciji, međutim, nije statistički značajna. *C-myc* je bio amplifikovan u nešto manjem procentu u odnosu na *HER-2*, odnosno u 8% pleomorfnih adenoma i 33% karcinoma u pleomorfnom adenomu ( $p = 0,037$ ). S obzirom na postojanje statistički značajne razlike u distribuciji ove mutacije između dve grupe, ovi rezultati ukazuju na to da bi genska amplifikacija *c-myc* mogla biti jedan od molekularnih mehanizama uključenih u proces maligne transformacije. Rezultate dobijene u karcinomima u pleomorfnom adenomu treba donekle uzeti sa rezervom, s obzirom na relativno mali uzorak.

*HER-2* je važan medijator u neoplastičnoj transformaciji, i njegova prekomerna ekspresija sreće se u velikom broju različitih tipova tumora. Nakon dimerizacije *HER-2* proteina, najvažniji unutarćelijski signalni putevi koji se aktiviraju pripadaju MAPK signalnoj osi, koja uključuje Ras, RAF, MEK i ERK proteine, važne aktere u ćelijskoj deobi.

Uvećanje broja kopija gena je događaj koji je često opisan u tumorskim ćelijama, a o značaju amplifikacije *HER-2* onkogeni u neoplazijama pljuvačnih žlezda govore studije još od pre nekoliko decenija, među kojima jedna pokazuje čak 30-struko povećanje broja kopija ovog onkogeni u adenokarcinomima pljuvačnih žlezda (Semba i sar. 1985). U novijoj studiji u kojoj je korišćena fluorescentna *in situ* hibridizacija nije utvrđeno postojanje genske amplifikacije

*HER-2* onkogena u pleomorfim adenomima (Wemmert i sar. 2013). Međutim, pokazano je da je *HER-2* amplifikacija čest događaj u transformaciji pleomorfno adenoma u karcinom (Di Palma i sar. 2005). Takođe je pokazan sinergistički efekat *HER-2* i *TP53* alteracija u ranim stadijumima maligne transformacije pleomorfno adenoma (Freitas i sar. 2005; Di Palma 2013).

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na povezanost *HER-2* amplifikacije u karcinomima sa pojavom recidiva, odnosno pronađena je i u primarnom karcinomu i u recidivu kod istog pacijenta. Slično ovim rezultatima, ali na nešto većem uzorku, Hashimoto i sar. su pokazali da amplifikacija *HER-2* gena igra ulogu u progresiji karcinoma u pleomorfno adenomu i da prisustvo genske amplifikacije *HER-2* može biti indikator lošije prognoze (Hashimoto i sar. 2012).

S obzirom na visoku učestalost amplifikacije *HER-2* gena u različitim tipovima tumora i njegovu važnu ulogu u procesu neoplastične transformacije, predloženi su i, u slučaju nekih tipova tumora ušli u kliničku primenu, anti-*HER-2* terapijski pristupi koji blokiraju njegov onkogeni efekat. Studije su takođe pokazale da *HER-2* pozitivnost (bilo usled prekomerne ekspresije ili amplifikacije gena) predstavlja nezavisni marker loše prognoze u mukoepidermoidnom i adenocističnom karcinomu (Press i sar. 1994; Giannoni i sar. 1995; Cornolti i sar. 2007).

Genska amplifikacija *c-myc* je prethodno bila ustanovljena u karcinomima u pleomorfno adenomu, ali ne i u pleomorfno adenomu (Rao i sar. 1998; Tsang i sar. 2004). U okviru ove disertacije prvi put je pokazano da *c-myc* amplifikacija može da se javi i u benignom tumoru pljuvačnih žlezda, iako u relativno malom procentu. Ovo govori u prilog značajnijoj ulozi *c-myc* amplifikacije u patogenezi malignih tumora pljuvačnih žlezda nego benignih. *C-myc* amplifikacija, nađena je i u drugim tipovima tumora pljuvačnih žleza, kao npr u adenocističnom karcinomu (ACK), ali i ovde je bila relativno redak događaj. Naime, Sequeiros-Santiago i saradnici, na uzorku od 24 ACK pljuvačnih žlezda, amplifikaciju su pokazali u svega 9% uzoraka (Sequeiros-Santiago i sar. 2009). Međutim, pored amplifikacije sugerisani su i alternativni mehanizmi koji bi mogli dovesti do prekomerne ekspresije *c-myc* proteina u pleomorfim adenomima i njihovog uključenja u

patogenezu PA. Zhao i saradnici su imunohistohemijski pokazali da prekomerna ekspresija PLAG1 (koja je česta u pleomorfnim adenomima) dovodi do izrazito povećane ekspresije c-myc proteina u tumorskom tkivu (Zhao i sar. 2006).

Učestalost mutacija *H-ras* gena je relativno niska (15%), međutim ako se uzmu u obzir prethodni rezultati na istoj populaciji (35%) (Milasin i sar. 1993), ne može se zanemariti udeo ove molekularne promene u patogenezi određene podgrupe PA. Nasuprot ovim rezultatima, Augello i sar. (Augello i sar. 2006) su pronašli mutirani *H-ras* u svega 4% slučajeva pleomorfno adenoma, uz zaključak da *H-ras* mutacije ne predstavljaju bitan molekularni događaj u PA patogenezi. Prisustvo *H-ras* mutacija ispitivano je i u drugim neoplazijama pljuvačnih žlezda, i utvrđeno je da se one relativno često sreću. Pokazano je na primer da su *H-ras* mutacije prisutne u 23% uzoraka adenokarcinoma, i čak se smatraju genetičkim markerom podgrupe adenokarcinoma pljuvačnih žlezda (van Halteren i sar. 1994).

*H-ras* mutacije su detektovane i u mukoepidermoidnom karcinomu, a učestalost im je povezana sa gradusom tumora (5% u tumorima nižeg gradusa, 17% u srednjem i 35% u tumorima visokog gradusa). Ovo svakako ukazuje na značaj onkogene aktivacije *H-ras* za patogenezu i/ili progresiju mukoepidermoidnog karcinoma (Yoo i Robinson 2000).

Mada nije utvrđena povezanost pojedinačnih mutacija ili metilacije sa kliničkim karakteristikama pleomorfnih adenoma, utvrđeno je postojanje asocijacije između amplifikacije *c-myc* gena/mutacija *TP53* gena i maligne transformacije pleomorfno adenoma. Ovo upućuje na potrebu za redovnim praćenjem PA pacijenata sa pomenutim mutacijama. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima do kojih su došli Deguchi i sar. koji zaključuju da aktivacija *c-myc* i *ras p21* proto-onkogene, zajedno sa mutacijama u *TP53* genu, može igrati značajnu ulogu u malignoj transformaciji PA (Deguchi i sar. 1993).

Somatske ćelije poseduju evoluciono konzervirane i vrlo precizne mehanizme zaštite od nekontrolisane proliferacije. Najvažniju ulogu u toj kontroli

igraju tumor supresorski geni koji, kada ćelija pretrpi akutni stres i oštećenja, zaustavljaju ćelijski ciklus da bi omogućili reparacionim mehanizmima da poprave nastala oštećenja. p53 protein, ključan faktor genomske stabilnosti, odgovara na stres posttranslacionim modifikacijama. Ovo za rezultat ima njegovu aktivaciju kao transkripcionog faktora koji inicira programe zastoja ćelijskog ciklusa, ćelijskog starenja ili apoptoze. Aktivacija p53 puta i njegove mreže gena pokreće složene autoregulatorne mehanizme, po principu pozitivne ili negativne povratne sprege, koji p53 put povezuju sa drugim signalizacionim kaskadama u ćeliji. Nakon aktivacije, p53 je u stanju da bilo inhibitorno, bilo stimulatorno, utiče na funkciju više stotina gena, što jasno govori o centralnom položaju koji ovaj gen zauzima u ćelijskoj homeostazi, kao i o razmerama efekata njegove genetičke ili epigenetičke alteracije.

Mutacije u kodirajućim egzonima *TP53* gena identifikovane su kod četvrtine pacijenata (25%) sa pleomorfim adenomom. Prema literaturnim podacima, ne postoji konsenzus o značaju *TP53* mutacija u patogenezi pleomorfnih adenoma. Tako na primer, Gomes i saradnici, koji su utvrdili prisustvo mutacija u svega dva adenoma, smatraju da je njihova uloga u patogenezi zanemarljiva (Gomes i sar. 2012). Više nego mutacijama, istraživači su se bavili imunohistohemijskom ekspresijom p53 i njenom povezanošću sa razvojem pleomorfog adenoma. Zanimljivo je da je meta-analiza Alaizari i saradnika, koja je obuhvatila studije iz poslednjih 15 godina, našla srednju vrednost za imunopozitivnost od 25% što je podudarno sa našim podacima o mutacijama (Alaizari i sar. 2015). Treba ipak istaći da autori zadržavaju određenu rezervu prema tim rezultatima i smatraju da je potrebno primeniti osetljivije metode da bi se dobila pouzdana slika o vezi između p53 i pleomorfog adenoma.

Prisustvo *TP53* mutacija više puta je pokazano u određenim podgrupama tumora pljuvačnih žlezda i neki autori čak smatraju da je u pitanju rani događaj u malignoj transformaciji pleomorfog adenoma. Nordkvist i saradnici su najviše pozitivne ekspresije p53 proteina opisali u CXPA. Od ukupno 237 malignih tumora uključenih u studiju ekspresije, 19 su analizirali na prisustvo mutacija u kodirajućim egzonima (4 do 9) i utvrdili prisustvo 9 mutacija u 7 tumora. S druge

strane, nijedan od 68 ispitivanih pleomorfnih adenoma nije pokazivao nivo nuklearne ekspresije veći od 10% (negativno bojenje, odnosno normalna ekspresija p53) kao ni prisustvo mutacija (Nordkvist i sar. 2000). Slično rezultatima iznetim u okviru ove doktorske disertacije, Augello i saradnici su pronašli značajno veći procenat mutacija u karcinomima u odnosu na pleomorfne adenome (60% u malignim tumorima naspram 14% u pleomorfnim adenomima) i zaključili da bi ovo mogao biti jedan od molekularnih mehanizama odgovornih za malignu transformaciju (Augello i sar. 2006).

Li i saradnici (Li i sar. 1997) su primenom fluorescentne *in situ* hibridizacije detektovali gubitak kopije hromozoma 17, odnosno monozomiju *TP53* gena. Oni su u studiji koja je obuhvatila 13 kontrola (tri normalne pljuvačne žlezde i 10 limfnih čvorova bez promena), 11 pleomorfnih adenoma i 9 karcinoma u pleomorfnom adenomu utvrdili da je gubitak kopije *TP53* gena bio znatno češći u adenomima (6 od 11) nego u kontrolama, što bi značilo da je u pitanju alteracija koja prethodi malignoj transformaciji. Takođe, ista alteracija najzastupljenija je u grupi karcinoma u pleomorfnom adenomu. Ovo je jedna od prvih studija u kojoj je ispitivana uloga *TP53* alteracija u patogenezi pleomorfnog adenoma i njegovoj transformaciji u karcinom u pleomorfnom adenomu. Skorašnja studija Wemmert-a i saradnika (Wemmert i sar. 2013) potvrdila je prisustvo promena u *TP53* genu u pleomorfnim adenomima, pokazavši deleciju u 4 od 29 slučajeva (14%) metodom komparativne genomske hibridizacije.

Ćelijsko ili replikativno starenje je vid zastoja ili blokade ćelijskog rasta (prvi put opisano u ćelijskoj kulturi fibroblasta) gde metabolički aktivne ćelije podležu stabilnom obustavljanju ćelijskog ciklusa u G1 fazi (Serrano i sar. 1997; Sharpless i DePinho 2005). Ovaj proces je indukovano različitim vidovima stresa i/ili oštećenja i predstavlja mehanizam zaštite ćelije u kojoj se nagomilavaju oštećenja i sprečavanje proliferacije ovakve ćelije i nastanka tumora. Regulatori ćelijskog ciklusa, kao na primer oni uključeni u retinoblastoma (Rb) ili p53-posredovane signalne kaskade predstavljaju svojevrsne „čuvarkuće“ koji održavaju proces replikativnog starenja. Jedna od važnih karakteristika ćelija u stanju

replikativnog starenja je da imaju skraćene telomere (skraćuju se pri svakoj ćelijskoj deobi do dostizanja kritične dužine). Ukoliko se aktivira neki od mehanizama produžavanja telomera, ćelija se može vratiti iz stanja replikativne starosti u aktivno proliferišuće stanje, što vodi nastanku i progresiji tumora. Stoga je jedan od dosta bitnih molekularnih mehanizama uključenih u patogenezu određenih tipova tumora, produženje ili skraćenje telomera, odnosno telomerna nestabilnost. Fenomen produžavanja telomera koji je prisutan u izvesnim tumorima glave i vrata, pre svega kancerima ezofagusa (Zhang i sar. 2014), ostvaruje se bilo aktivacijom telomerase bilo alternativnim mehanizmima (Shay i sar. 2001). Naši rezultati su takođe pokazali da produžavanje telomera može biti važan faktor u patogenezi pleomorfnih adenoma. Ova pojava, zajedno sa izraženom metilacijom *p16* i *p14* tumor supresorskih gena, ukazuje na to da su osnovni mehanizmi u patogenezi pleomorfnih adenoma predominantno usmereni na vraćanje ćelije iz replikativne starosti u aktivno proliferišuće stanje (Nikolic i sar. 2015).

Među važne kontrolore i regulatore ćelijskog (replikativnog) starenja ubrajaju se ciklin zavisne kinaze (CDK) i CDK inhibitori, među kojima su kao najznačajniji identifikovani produkti CDKN2A lokusa (*p14*, *p15* i *p16*) (Collado i sar. 2005). U odsustvu *p16* proteina, ciklin zavisne kinaze 4 i 6 vezuju se za ciklin D1 i Rb protein je fosforilisan, što dovodi do deregulacije G1/S kontrolne tačke u ćelijskom ciklusu i pokreće se ćelijska proliferacija. U humanim epitelnim ćelijama tokom starenja dolazi do povećanja produkcije *p16* (Serrano i sar. 1997). Činjenica da je gubitak funkcionalnog *p16* proteina čest u patogenezi mnogih tumora još jedan je od dokaza koji ide u prilog hipotezi da je najvažniji korak u neoplastičnoj transformaciji ćelije prevazilaženje replikativnog starenja.

*p14* se dobija alternativnim iskrajanjem iRNK transkribovane sa CDKN2A gena. *p14* je takođe negativni regulator ćelijskog ciklusa, funkcija koju ostvaruje zaustavljanjem ćelijske deobe u G1/S ili pak G2/M međufazi. *p14* interakcija inhibira MDM2 onkoprotein, blokirajući obrazovanje MDM2-p53 proteinskog kompleksa i sprečavajući MDM2-posredovanu degradaciju p53. U fibroblastima čoveka je pokazano da je *p14*-indukovano zaustavljanje ćelijskog ciklusa zavisno

od p53 (Stott i sar. 1998). Inaktivacija p16/Rb i/ili p53/p21 signalnih puteva smatra se odgovornom za kritično skraćenje telomera kod nekih tumora (Radpour i sar. 2010). S obzirom da je kod uzoraka ispitivanih u okviru ove doktorske disertacije pokazano da je hipermetilacija p14 promotora povezana sa dužim telomerama, ovi rezultati, iako za sada jedinstveni u literaturi, idu u prilog konceptu da p14 utišavanje utiče na p53 posredovanu inhibiciju tumorigeneze (Nikolic i sar. 2015).

DNK metilacija je čest mehanizam uključen u nastanak i progresiju tumora, bilo da se radi o hipometilaciji onkogenata što rezultuje njihovom aberantnom aktivacijom, ili o hipermetilaciji i sledstvenoj inhibiciji tumor supresorskih gena. Analiza i procena metilacionog statusa tumor supresorskih gena pokazala se kao moćno oruđe u uspostavljanju rane dijagnoze u različitim tipovima kancera (Esteller i Herman 2002). Neki od gena čiji su promotori locirani u okviru tzv. CpG ostrvaca su jako važni regulatori ćelijskog ciklusa, popravke oštećenja DNK ili pak procesa angiogeneze (Esteller 2000). I dalje je relativno mali broj studija koje su se bavile epigenetikom u tumorima pljuvačnih žlezda, uključujući i analize hipermetilacije *p16* i *p14* gena.

U našoj studiji, hipermetilacija oba promotora je vrlo česta (*p16* je bio metilovan u 67%, a *p14* u 70% slučajeva u grupi pleomorfnih adenoma, dok je u karcinomima *p16* bio metilovan u 67%, a *p14* u 83% slučajeva). Ovako visoke učestalosti ukazuju na činjenicu da bi hipermetilacija mogla biti značajan molekularni mehanizam u patogenezi kako pleomorfnog adenoma, tako i karcinoma u pleomorfnom adenomu. Studije na većem broju karcinoma u pleomorfnom adenomu, sa zasebnim analizama benignog i malignog dela neoplazije, bile bi neophodne za donošenje zaključka o ulozi epigenetike u patogenezi ovih tumorskih komponenti.

Nishimine i saradnici su u seriji od 36 karcinoma pljuvačnih žlezda takođe pokazali da bi inaktivacija *p16* i *p14* gena bilo homozigotnom delecijom bilo hipermetilacijom promotora mogla biti igrati značajnu ulogu u molekularnoj

patogenezi tumora pljuvačne žlezde, kao i da su epigenetičke promene (na prvom mestu metilacija) povezane sa karcinogenezom pljuvačnih žlezda (Nishimine i sar. 2003). Schache i saradnici su pokazali da je kombinovani epigenotip koji je uključivao *p16*, *hTERT*, *RASSF1* i *WT1* gene asociran sa značajno većom šansom za detektovanje maligniteta u bilo kom pozitivnom uzorku (OR 24,  $P < 0.001$ ). Drugim rečima, oni smatraju da bi qMSP mogao da se razvije kao značajan dijagnostički alat pomoću koga bi se napravila razlika između benignih PA i malignih karcinoma u PA (Schache i sar. 2010). U saglasnosti sa ovim rezultatima, Hu i saradnici su utvrdili da bi prekomerna ekspresija citoplazmatskog i smanjena ekspresija nuklearnog p16 proteina mogla biti značajan mehanizam u evoluciji PA u CXPA i da se metilacija promotora *p16* može korelisati sa malignom transformacijom PA (Hu i sar. 2011).

Weber i saradnici su hipermetilaciju *p16* identifikovali u svega 12 od 42 slučaja pleomorfno adenoma parotidne pljuvačne žlezde, što je manje od 30%, dok su hipermetilaciju *p14* opisali samo u jednom slučaju. Nisu pronašli ni jaku vezu između metilacionog statusa dva promotora, ali su utvrdili postojanje jasne veze između metilacije promotora i transkripcionog utišavanja, čime ukazuju da je hipermetilacija jedan od glavnih mehanizama inaktivacije CDK2A lokusa u pleomorfnom adenomu parotidne pljuvačne žlezde (Weber i sar. 2002). Slično ovim rezultatima, ni u okviru ove doktorske disertacije nije utvrđeno postojanje veze između metilacionih statusa p16 i p14 promotora.

Augello i saradnici su u njihovoj studiji hipermetilaciju *p16* opisali u još manjem procentu pleomorfno adenoma (4 od 28 slučajeva, što je 14%), ali je ovaj promotor bio metilovan u svih pet uzoraka karcinoma pljuvačnih žlezda, od čega je jedan bio karcinom u pleomorfnom adenomu (Augello i sar. 2006).

Li i saradnici ukazuju na značaj hipermetilacije promotora *p16* gena u razvoju adenocističnog karcinoma pljuvačne žlezde (u 28 od 60 uzoraka) (Li i sar. 2005).

Guo i saradnici su u studiji na 38 uzoraka mukoepidermoidnog karcinoma pokazali da su homozigotna delecija i hipermetilacija najčešće molekularne



promene koje su vodile transkripcionom utišavanju i gubitku tumor supresorske funkcije *p16* u ovim karcinomima (Guo i sar. 2007).

Brojne studije ukazuju na razlike u distribuciji hipermetilovanih gena i promotora među pripadnicima različitih rasnih ili etničkih grupa koje se pripisuju različitim životnim navikama (Mokarram i sar. 2009; Ambrosone i sar. 2014; Devaney i sar. 2015), što bi moglo da objasni diskrepancu između učestalosti hipermetilacije opisane u drugim studijama i rezultata iznetih u okviru ove doktorske disertacije.

## ***6. ZAKLJUČCI***

Na osnovu rezultata ove doktorske disertacije, izvedeni su sledeći zaključci:

- Amplifikacija *HER-2* onkogeno utvrđena je kod 18% pacijenata sa PA i kod 42% pacijenata sa CXPA ukazujući na značaj ove promene u patogenezi tumora pljuvačnih žlezda.
- *c-myc* amplifikacija utvrđena je kod svega 8% pacijenata sa PA i kod 33% pacijenata sa CXPA ukazujući na nešto manji uticaj ovog tipa alteracije na patogenezu tumora parotida.
- Prisustvo mutacije u *H-ras* genu utvrđeno je u 15% PA i u 33% CXPA.
- S obzirom da su mutacije u jednom, dva ili sva tri analizirana gena *HER-2/c-myc/H-ras* mitogene kaskade detektovane kod ukupno 38% pacijenata, uloga ovog signalnog puta u patogenezi PA ne može se zanemariti.
- U kodirajućim egzonima *TP53* gena mutaciju je imalo 25% pacijenata sa PA, i čak 75% pacijenata sa CXPA.
- Metilacija promotora *p16* gena utvrđena je u 67% adenoma i 67% karcinoma, a *p14* gena u 70% adenoma i 83% karcinoma. S obzirom na visoku učestalost hipermetilacije može se zaključiti da su epigenetičke promene u regionu *CDKN2A* lokusa izuzetno značajan molekularni mehanizam u patogenezi pleomorfno adenoma.
- Nije uočeno postojanje asocijacije između mutacija ili epigenetičkih promena sa polom, uzrastom ili lošim navikama (pušenje i konzumacija alkohola).
- Nijedan od kliničkih ili patohistoloških parametara nije asociiran sa analiziranim mutacijama ili epigenetičkim promenama.
- Poređenjem učestalosti mutacija i epigenetičkih promena u grupi pleomorfno adenoma i karcinoma u pleomorfnom adenomu utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike u zastupljenosti *c-myc* i *TP53* mutacija. Logističkom regresionom analizom pokazano je da prisustvo *c-myc* genske amplifikacije **5,5 puta povećava** šansu za malignu transformaciju, a prisustvo *TP53* mutacije čak **9 puta povećava** šansu za malignu transformaciju pleomorfno adenoma.

## ***7. LITERATURA***

**Abida WM, Gu W.** 2008. p53-Dependent and p53-independent activation of autophagy by ARF. *Cancer research* 68: 352-357.

**Adari H, Lowy DR, Willumsen BM, Der CJ, McCormick F.** 1988. Guanosine triphosphatase activating protein (GAP) interacts with the p21 ras effector binding domain. *Science* 240: 518-521.

**Alaizari NA, Tarakji B, Al-Maweri SA, Al-Shamiri HM, Darwish S, Baba F.** 2015. p53 expression in pleomorphic adenoma of salivary glands: A systematic review and meta-analysis. *Archives of Oral Biology* 60: 1437-1441.

**Altemani A, Martins MT, Freitas L, Soares F, Araújo NS, Araújo VC.** 2005. Carcinoma ex pleomorphic adenoma (CXPA): immunoprofile of the cells involved in carcinomatous progression. *Histopathology* 46: 635-641.

**Amati B, Brooks MW, Levy N, Littlewood TD, Evan GI, Land H.** 1993. Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell* 72: 233-245.

**Ambrosone CB, Young AC, Sucheston LE, Wang D, Yan L, Liu S, Tang L, Hu Q, Freudenheim JL, Shields PG, Morrison CD, Demissie K, Higgins MJ.** 2014. Genome-wide methylation patterns provide insight into differences in breast tumor biology between American women of African and European ancestry. *Oncotarget* 5: 237-248.

**Aničić B, Dožić B.** 2010. *Tumori pljuvačnih žlezda - petogodišnja studija*. Presented at 25. Congress of the International College for Maxillofacial Surgery, Belgrade, Serbia, 27-30 October

**Apicelli AJ, Maggi LB, Hirbe AC, Miceli AP, Olanich ME, Schulte-Winkeler CL, Saporita AJ, Kuchenreuther M, Sanchez J, Weilbaecher K.** 2008. A non-tumor suppressor role for basal p19ARF in maintaining nucleolar structure and function. *Molecular and cellular biology* 28: 1068-1080.

**Augello C, Gregorio V, Bazan V, Cammareri P, Agnese V, Cascio S, Corsale S, Calò V, Gullo A, Passantino R, Gargano G, Bruno L, Rinaldi G, Morello V, Gerbino A, Tomasino RM, Macaluso M, Surmacz E, Russo A.** 2006. TP53 and p16INK4A, but not H-KI-Ras, are involved in tumorigenesis and progression of pleomorphic adenomas. *J Cell Physiol* 207: 654-659.

**Barbacid M.** 1987. ras Genes. *Annual Review of Biochemistry* 56: 779-827.

**Barnes L.** 2005. *Pathology and genetics of head and neck tumours*. Lyon: IARC Press.

**Barzilai A, Yamamoto K-I.** 2004. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair* 3: 1109-1115.

**Berli RR, Graus-Porta D, Woods-Cook K, Chen X, Yarden Y, Hynes NE.** 1995. Neu differentiation factor activation of ErbB-3 and ErbB-4 is cell specific and displays a differential requirement for ErbB-2. *Molecular and Cellular Biology* 15: 6496-6505.

**Bertwistle D, Sugimoto M, Sherr CJ.** 2004. Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Molecular and cellular biology* 24: 985-996.

**Biegging KT, Attardi LD.** 2012. Deconstructing p53 transcriptional networks in tumor suppression. *Trends in Cell Biology* 22: 97-106.

**Bos JL.** 1989. ras Oncogenes in Human Cancer: A Review. *Cancer Research* 49: 4682-4689.

**Bose R, Kavuri SM, Searleman AC, Shen W, Shen D, Koboldt DC, Monsey J, Goel N, Aronson AB, Li S, Ma CX, Ding L, Mardis ER, Ellis MJ.** 2013. Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer. *Cancer discovery* 3: 224-237.

**Bradley PJ.** 2004. Neoplasms of the salivary glands. *Surgery (Oxford)* 22: 169-172.

**Brandwein M, Huvos AG, Dardick I, Thomas MJ, Theise ND.** 1996. Noninvasive and minimally invasive carcinoma ex mixed tumor: a clinicopathologic and ploidy study of 12 patients with major salivary tumors of low (or no?) malignant potential. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 81: 655-664.

**Bray SE, Schorl C, Hall PA.** 1998. The challenge of p53: Linking biochemistry, biology, and patient management. *Stem Cells* 16: 248-260.

**Buday L, Downward J.** 1993. Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 73: 611-620.

**Cheuk W, Chan JKC.** 2007. Advances in salivary gland pathology. *Histopathology* 51: 1-20.

**Chung HJ, Levens D.** 2005. c-myc expression: keep the noise down! *Mol Cells* 20: 157-166.

**Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, Benguría A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M.** 2005. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436: 642-642.

**Cornolti G, Ungari M, Morassi ML, Facchetti F, Rossi E, Lombardi D, Nicolai P.** 2007. Amplification and overexpression of HER2/neu gene and HER2/neu protein in salivary duct carcinoma of the parotid gland. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery* 133: 1031-1036.

**da Cruz Perez DE, Pires FR, Alves FA, Almeida OP, Kowalski LP.** 2004. Salivary gland tumors in children and adolescents: a clinicopathologic and immunohistochemical study of fifty-three cases. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 68: 895-902.



**Daum G, Eisenmann-Tappe I, Fries H-W, Troppmair J, Rapp UR.** 1994. The ins and outs of Raf kinases. *Trends in Biochemical Sciences* 19: 474-480.

**Deguchi H, Hamano H, Hayashi Y.** 1993. c- myc, ras p21 and p53 Expression in pleomorphic adenoma and its malignant form of the human salivary glands. *Pathology International* 43: 413-422.

**Demasi APD, Furuse C, Soares AB, Altemani A, Araújo VC.** 2009. Peroxiredoxin I, platelet-derived growth factor A, and platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$  are overexpressed in carcinoma ex pleomorphic adenoma: association with malignant transformation. *Human pathology* 40: 390-397.

**Demokan S, Chuang A, Suoğlu Y, Ulsan M, Yalınz Z, Califano JA, Dalay N.** 2012. Promoter methylation and loss of p16INK4a gene expression in head and neck cancer. *Head & neck* 34: 1470-1475.

**Devaney JM, Wang S, Furbert-Harris P, Apprey V, Ittmann M, Wang BD, Olender J, Lee NH, Kwabi-Addo B.** 2015. Genome-wide differentially methylated genes in prostate cancer tissues from African-American and Caucasian men. *Epigenetics* 10: 319-328.

**Di Palma S.** 2013. Carcinoma Ex Pleomorphic Adenoma, with Particular Emphasis on Early Lesions. *Head Neck Pathol*

**Di Palma S, Skálová A, Vaníček T, Simpson RH, Stárek I, Leivo I.** 2005. Non-invasive (intracapsular) carcinoma ex pleomorphic adenoma: recognition of focal

carcinoma by HER-2/neu and MIB1 immunohistochemistry. *Histopathology* 46: 144-152.

**Downward J.** 2003. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3: 11-22.

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

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

**Eveson JW, Auclair P, Gnepp DR, El-Naggar AK, Ellis G, R.H.W. S, Goode RK, Huvos AG, Luna MA, Wenig BM, Fonseca I, Soares J, Brandwein-Gensler MS, Sun KH, Gao Y, Li TJ, Sciubba JJ, Shimono M, Skálová A, Nagao T, van der Wal JE, Jäkel KT, Lewis JE, Olsen KD, Tsang WYW, Kuo TT, Chan JKC, Kusafuka K, Stenman G, Cardesa A, Alos L, de Araujo VC, Ferreiro JA, Cheuk W, Brannon RB, Sciubba JJ, Michal M, Odell E, Chan ACL, Abbondanzo SL, Löning T, Jäke KT.** 2005. Tumours of the Salivary Glands In *Pathology & Genetics Head and Neck Tumours*, ed. L Barnes, J W. Eveson, P Reichart, D Sidransky, pp. 209-281. Lyon: IARC Press

**Ferre-D'Amare AR, Prendergast GC, Ziff EB, Burley SK.** 1993. Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature* 363: 38-45.

**Frebourg T, Kassel J, Lam KT, Gryka MA, Barbier N, Andersen TI, Børresen AL, Friend SH.** 1992. Germ-line mutations of the p53 tumor suppressor gene in patients

with high risk for cancer inactivate the p53 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 6413-6417.

**Freed-Pastor WA, Prives C.** 2012. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes & development* 26: 1268-1286.

**Freitas LL, Araújo VC, Martins MT, Chone C, Crespo A, Altemani A.** 2005. Biomarker analysis in carcinoma ex pleomorphic adenoma at an early phase of carcinomatous transformation. *Int J Surg Pathol* 13: 337-342.

**Galaktionov K, Chen X, Beach D.** 1996. Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* 382: 511-517.

**Gambino V, De Michele G, Venezia O, Migliaccio P, Dall'Olio V, Bernard L, Minardi SP, Fazio MAD, Bartoli D, Servillo G, Alcalay M, Luzzi L, Giorgio M, Scoble H, Pelicci PG, Migliaccio E.** 2013. Oxidative stress activates a specific p53 transcriptional response that regulates cellular senescence and aging. *Aging Cell* 12: 435-445.

**Giaccia AJ, Kastan MB.** 1998. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes & development* 12: 2973-2983.

**Giannoni C, El-Naggar AK, Ordóñez NG, Tu ZN, Austin J, Luna MA, Batsakis JG.** 1995. C-erbB-2/neu oncogene and Ki-67 analysis in the assessment of palatal salivary gland neoplasms. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 112: 391-398.

**Gnepp DR.** 1993. Malignant mixed tumors of the salivary glands: a review. *Pathol Annu* 28 Pt 1: 279-328.

**Gnepp DR, Brandwein-Gensler MS, El-Naggar AK, Nagao T.** 2005. Carcinoma ex pleomorphic adenoma. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*: 242-243.

**Gomes CC, Diniz MG, Orsine LA, Duarte AP, Fonseca-Silva T, Conn BI, De Marco L, Pereira CM, Gomez RS.** 2012. Assessment of TP53 mutations in benign and malignant salivary gland neoplasms. *PLoS One* 7: e41261.

**Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE.** 1997. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *The EMBO Journal* 16: 1647-1655.

**Graus-Porta D, Beerli RR, Hynes NE.** 1995. Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Molecular and Cellular Biology* 15: 1182-1191.

**Guo XL, Sun SZ, Wang WX, Wei FC, Yu HB, Ma BL.** 2007. Alterations of p16INK4a tumour suppressor gene in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. *Int J Oral Maxillofac Surg* 36: 350-353.

**Hann SR, Dixit M, Sears RC, Sealy L.** 1994. The alternatively initiated c-Myc proteins differentially regulate transcription through a noncanonical DNA-binding site. *Genes & Development* 8: 2441-2452.

**Hann SR, Eisenman RN.** 1984. Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. *Molecular and Cellular Biology* 4: 2486-2497.

**Hann SR, King MW, Bentley DL, Anderson CW, Eisenman RN.** 1988. A non-AUG translational initiation in c-myc exon 1 generates an N-terminally distinct protein whose synthesis is disrupted in Burkitt's lymphomas. *Cell* 52: 185-195.

**Hann SR, Sloan-Brown K, Spotts GD.** 1992. Translational activation of the non-AUG-initiated c-myc 1 protein at high cell densities due to methionine deprivation. *Genes & Development* 6: 1229-1240.

**Hashimoto K, Yamamoto H, Shiratsuchi H, Nakashima T, Tamiya S, Nishiyama K, Higaki Y, Komune S, Tsuneyoshi M, Oda Y.** 2012. HER-2/neu gene amplification in carcinoma ex pleomorphic adenoma in relation to progression and prognosis: a chromogenic in-situ hybridization study. *Histopathology* 60: E131-142.

**Henriksson M, Lüscher B.** 1996. Proteins of the Myc Network: Essential Regulators of Cell Growth and Differentiation In *Advances in Cancer Research*, ed. FVWaGK George, pp. 109-182: Academic Press

**Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He T-C, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B.** 1997. 14-3-3 $\sigma$  Is a p53-Regulated Inhibitor of G2/M Progression. *Molecular Cell* 1: 3-11.

**Hess JL, Kossev P.** 2002. Molecular Genetics of Benign Tumors. *Cancer Investigation* 20: 362-372.

**Holbro T, Civenni G, Hynes NE.** 2003. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Experimental Cell Research* 284: 99-110.

Holsinger FC, Bui DT. 2007. Anatomy, function, and evaluation of the salivary glands In *Salivary gland disorders*, pp. 1-16: Springer

**Hu Y-H, Zhang C-Y, Wang L-Z.** 2011. Aberrant protein expression and promoter methylation of p16 gene are correlated with malignant transformation of salivary pleomorphic adenoma. *Archives of pathology & laboratory medicine* 135: 882.

**Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM.** 1986. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 320: 84-85.

**Ito FA, Jorge J, Vargas PA, Lopes MA.** 2009. Histopathological findings of pleomorphic adenomas of the salivary glands. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 14: E57-61.

**Joers A, Kristjuhan A, Kadaja L, Maimets T.** 1998. Tumour associated mutants of p53 can inhibit transcriptional activity of p53 without heterooligomerization. *Oncogene* 17: 2351-2358.

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

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

**Kaelin WG.** 1999. The emerging p53 gene family. *Journal of the National Cancer Institute* 91: 594-598.

**Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R.** 1997. Methylation of the hMLH1 Promoter Correlates with Lack of Expression of hMLH1 in Sporadic Colon Tumors and Mismatch Repair-defective Human Tumor Cell Lines. *Cancer Research* 57: 808-811.

**Kaufmann R, Müller P, Hildenbrand G, Hausmann M, Cremer C.** 2011. Analysis of Her2/neu membrane protein clusters in different types of breast cancer cells using localization microscopy. *Journal of Microscopy* 242: 46-54.

**Khosravi-Far R, Campbell S, Rossman KL, Der CJ.** 1998. Increasing complexity of Ras signal transduction: involvement of Rho family proteins. *Adv Cancer Res* 72: 57-107.

**Kishi M, Nakamura M, Nishimine M, Ikuta M, Kirita T, Konishi N.** 2005. Genetic and epigenetic alteration profiles for multiple genes in salivary gland carcinomas. *Oral Oncol* 41: 161-169.

**Klapper LN, Glathe S, Vaisman N, Hynes NE, Andrews GC, Sela M, Yarden Y.** 1999. The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 4995-5000.

**Ko LJ, Prives C.** 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes & Development* 10: 1054-1072.

**Kolude B, Adisa A, Adeyemi B, Lawal A.** 2013. Immunohistochemical expression of oestrogen receptor- $\alpha$  and progesterone receptor in salivary gland tumours. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 42: 716-719.

**Leri A, Liu Y, Claudio PP, Kajstura J, Wang X, Wang S, Kang P, Malhotra A, Anversa P.** 1999. Insulin-like growth factor-1 induces Mdm2 and down-regulates p53, attenuating the myocyte renin-angiotensin system and stretch-mediated apoptosis. *The American journal of pathology* 154: 567-580.

**Li J, El-Naggar A, Mao L.** 2005. Promoter methylation of p16INK4a, RASSF1A, and DAPK is frequent in salivary adenoid cystic carcinoma. *Cancer* 104: 771-776.

**Li X, Tsuji T, Wen S, Mimura Y, Sasaki K, Shinozaki F.** 1997. Detection of numeric abnormalities of chromosome 17 and p53 deletions by fluorescence in situ hybridization



in pleomorphic adenomas and carcinomas in pleomorphic adenoma. *Cancer* 79: 2314-2319.

**Lowe LH, Stokes LS, Johnson JE, Heller RM, Royal SA, Wushensky C, Hernanz-Schulman M.** 2001. Swelling at the Angle of the Mandible: Imaging of the Pediatric Parotid Gland and Periparotid Region. *RadioGraphics* 21: 1211-1227.

**Mandel ID.** 1987. The Functions of Saliva. *Journal of Dental Research* 66: 623-627.

**McMahon SB, Van Buskirk HA, Dugan KA, Copeland TD, Cole MD.** 1998. The Novel ATM-Related Protein TRRAP Is an Essential Cofactor for the c-Myc and E2F Oncoproteins. *Cell* 94: 363-374.

**Milasin J, Pujić N, Dedović N, Gavrić M, Vranić V, Petrović V, Minić A.** 1993. H-ras gene mutations in salivary gland pleomorphic adenomas. *Int J Oral Maxillofac Surg* 22: 359-361.

**Mokarram P, Kumar K, Brim H, Naghibalhossaini F, Saberi-firoozi M, Nouraie M, Green R, Lee E, Smoot DT, Ashktorab H.** 2009. Distinct high-profile methylated genes in colorectal cancer. *PLoS One* 4: e7012.

**Moonis G, Patel P, Koshkareva Y, Newman J, Loevner LA.** 2007. Imaging Characteristics of Recurrent Pleomorphic Adenoma of the Parotid Gland. *American Journal of Neuroradiology* 28: 1532-1536.

**Myöhänen SK, Baylin SB, Herman JG.** 1998. Hypermethylation Can Selectively Silence Individual p16ink4A Alleles in Neoplasia. *Cancer Research* 58: 591-593.

**Nagao T, Eveson JW, Kusafuka K, Stenman G.** 2005. Pleomorphic adenoma. *Pathology and Genetics Head and Neck Tumours. Lyon: IARC:* 256-260.

**Nagy P, Jenei A, Kirsch AK, Szollosi J, Damjanovich S, Jovin TM.** 1999. Activation-dependent clustering of the erbB2 receptor tyrosine kinase detected by scanning near-field optical microscopy. *Journal of Cell Science* 112: 1733-1741.

**Nikolic N, Anicic B, Carkic J, Simonovic J, Toljic B, Tanic N, Tepavcevic Z, Vukadinovic M, Konstantinovic VS, Milasin J.** 2015. High frequency of p16 and p14 promoter hypermethylation and marked telomere instability in salivary gland tumors. *Archives of Oral Biology* 60: 1662-1666.

**Nishimine M, Nakamura M, Kishi M, Okamoto M, Shimada K, Ishida E, Kirita T, Konishi N.** 2003. Alterations of p14ARF and p16INK4a genes in salivary gland carcinomas. *Oncol Rep* 10: 555-560.

**Nordkvist A, Röijer E, Bang G, Gustafsson H, Behrendt M, Ryd W, Thoresen S, Donath K, Stenman G.** 2000. Expression and mutation patterns of p53 in benign and malignant salivary gland tumors. *International journal of oncology* 16: 477-560.

**Novak K.** 2004. Epigenetics Changes in Cancer Cells: Highlights of the American Association for Cancer Research Special Conference on Chromatin, Chromosomes, and

Cancer Epigenetics; November 10-14, 2004; Waikoloa, Hawaii. *Medscape General Medicine* 6: 17.

**Ohki R, Nemoto J, Murasawa H, Oda E, Inazawa J, Tanaka N, Taniguchi T.** 2000. Reprimo, a New Candidate Mediator of the p53-mediated Cell Cycle Arrest at the G2 Phase. *Journal of Biological Chemistry* 275: 22627-22630.

**Okines A, Cunningham D, Chau I.** 2011. Targeting the human EGFR family in esophagogastric cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 8: 492-503.

**Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE.** 2000. NEW EMBO MEMBERS' REVIEW: The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *The EMBO Journal* 19: 3159-3167.

**Olivier M, Hollstein M, Hainaut P.** 2010. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2: a001008.

**Olsen KD, Lewis JE.** 2001. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: A clinicopathologic review. *Head & Neck* 23: 705-712.

**Pérez-Roger I, Solomon DL, Sewing A, Land H.** 1997. Myc activation of cyclin E/Cdk2 kinase involves induction of cyclin E gene transcription and inhibition of p27(Kip1) binding to newly formed complexes. *Oncogene* 14: 2373-2381.

**Press MF, Pike MC, Hung G, Zhou JY, Ma Y, George J, Dietz-Band J, James W, Slamon DJ, Batsakis JG.** 1994. Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis. *Cancer Res* 54: 5675-5682.

**Prives C, Hall PA.** 1999. The p53 pathway. *The Journal of pathology* 187: 112-126.

**Rabbitts PH, Forster A, Stinson MA, Rabbitts TH.** 1985. Truncation of exon 1 from the c-myc gene results in prolonged c-myc mRNA stability. *The EMBO Journal* 4: 3727-3733.

**Radpour R, Barekati Z, Haghghi MM, Kohler C, Asadollahi R, Torbati PM, Holzgreve W, Zhong XY.** 2010. Correlation of telomere length shortening with promoter methylation profile of p16/Rb and p53/p21 pathways in breast cancer. *Mod Pathol* 23: 763-772.

**Rao PH, Murty VV, Louie DC, Chaganti RS.** 1998. Nonsyntenic amplification of MYC with CDK4 and MDM2 in a malignant mixed tumor of salivary gland. *Cancer Genet Cytogenet* 105: 160-163.

**Reinstein J, Schlichting I, Frech M, Goody RS, Wittinghofer A.** 1991. p21 with a phenylalanine 28----leucine mutation reacts normally with the GTPase activating protein GAP but nevertheless has transforming properties. *Journal of Biological Chemistry* 266: 17700-17706.

**Riese DJ, Stern DF.** 1998. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *BioEssays* 20: 41-48.

**Rodier F, Campisi J, Bhaumik D.** 2007. Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic acids research* 35: 7475-7484.

**Ruddon RW.** 2007. *Cancer biology*. Oxford University Press.

**Rudolph B, Saffrich R, Zwicker J, Henglein B, Müller R, Ansorge W, Eilers M.** 1996. Activation of cyclin-dependent kinases by Myc mediates induction of cyclin A, but not apoptosis. *The EMBO Journal* 15: 3065-3076.

**Sakaguchi K, Herrera JE, Saito Si, Miki T, Bustin M, Vassilev A, Anderson CW, Appella E.** 1998. DNA damage activates p53 through a phosphorylation–acetylation cascade. *Genes & development* 12: 2831-2841.

**Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM, Dryja TP.** 1991. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *American journal of human genetics* 48: 880.

**Schache AG, Hall G, Woolgar JA, Nikolaidis G, Triantafyllou A, Lowe D, Risk JM, Shaw RJ, Liloglou T.** 2010. Quantitative promoter methylation differentiates carcinoma ex pleomorphic adenoma from pleomorphic salivary adenoma. *British journal of cancer* 103: 1846-1851.

**Seifert G, Langrock I, Donath K.** 1976. [A pathological classification of pleomorphic adenoma of the salivary glands (author's transl)]. *HNO* 24: 415-426.

**Semba K, Kamata N, Toyoshima K, Yamamoto T.** 1985. A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82: 6497-6501.

**Sequeiros-Santiago G, García-Carracedo D, Fresno MF, Suarez C, Rodrigo JP, Gonzalez M.** 2009. Oncogene amplification pattern in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Oncology reports* 21: 1215-1222.

**Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW.** 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16 INK4a. *Cell* 88: 593-602.

**Sharpless NE, DePinho RA.** 2005. Cancer: crime and punishment. *Nature* 436: 636-637.

**Shaw RJ, Liloglou T, Rogers SN, Brown JS, Vaughan ED, Lowe D, Field JK, Risk JM.** 2006. Promoter methylation of P16, RAR $\beta$ , E-cadherin, cyclin A1 and cytoglobin in oral cancer: quantitative evaluation using pyrosequencing. *British journal of cancer* 94: 561-568.

**Shay JW, Zou Y, Hiyama E, Wright WE.** 2001. Telomerase and cancer. *Hum Mol Genet* 10: 677-685.

**Sherr CJ.** 2001. THE INK4a/ARF NETWORK IN TUMOUR SUPPRESSION. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 731-737.

**Sherr CJ.** 2006a. Autophagy by ARF: a short story. *Molecular cell* 22: 436-437.

**Sherr CJ.** 2006b. Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat Rev Cancer* 6: 663-673.

**Sorkin A, Goh LK.** 2008. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Experimental cell research* 314: 3093-3106.

**Speight PM, Barrett AW.** 2002. Salivary gland tumours. *Oral Dis* 8: 229-240.

**Spiro RH.** 1986. Salivary neoplasms: Overview of a 35-year experience with 2,807 patients. *Head & Neck Surgery* 8: 177-184.

**Stennert E, Guntinas-Lichius O, Klussmann JP, Arnold G.** 2001. Histopathology of pleomorphic adenoma in the parotid gland: a prospective unselected series of 100 cases. *Laryngoscope* 111: 2195-2200.

**Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH.** 1998. The alternative product from the human

CDKN2A locus, p14ARF, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *The EMBO journal* 17: 5001-5014.

**Thoeny HC.** 2007. Imaging of salivary gland tumours. *Cancer Imaging* 7: 52-62.

**Tsang YT, Chang YM, Lu X, Rao PH, Lau CC, Wong KK.** 2004. Amplification of MGC2177, PLAG1, PSMC6P, and LYN in a malignant mixed tumor of salivary gland detected by cDNA microarray with tyramide signal amplification. *Cancer Genet Cytogenet* 152: 124-128.

**Tse C, Brault D, Gligorov J, Antoine M, Neumann R, Lotz J-P, Capeau J.** 2005. Evaluation of the quantitative analytical methods real-time PCR for HER-2 gene quantification and ELISA of serum HER-2 protein and comparison with fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for determining HER-2 status in breast cancer patients. *Clinical chemistry* 51: 1093-1101.

**Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunagaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, Yarden Y.** 1996. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Molecular and Cellular Biology* 16: 5276-5287.

**van Halteren HK, Top B, Moor WJ, Balm AJM, Rodenhuis S.** 1994. Association of H-ras mutations with adenocarcinomas of the parotid gland. *International journal of cancer* 57: 362-364.



**Walter M, Clark SG, Levinson AD.** 1986. The oncogenic activation of human p21ras by a novel mechanism. *Science* 233: 649-652.

**Weber A, Langhanki L, Schütz A, Wittekind C, Bootz F, Tannapfel A.** 2002. Alterations of the INK4a-ARF gene locus in pleomorphic adenoma of the parotid gland. *J Pathol* 198: 326-334.

**Wemmert S, Willnecker V, Brunner C, Wenzel GI, Sauter B, Meinelt H, Bartholmé N, Saada C, Bohle RM, Urbschat S, Schick B.** 2013. New genetic findings in parotid gland pleomorphic adenomas. *Head Neck* 35: 1431-1438.

**Wong MHW, Dobbins TA, Tseung J, Tran N, Lee CS, O'Brien CJ, Clark J, Rose BR.** 2009. Oestrogen receptor  $\beta$  expression in pleomorphic adenomas of the parotid gland. *Journal of Clinical Pathology* 62: 789-793.

**Xu R, Wang F, Wu L, Wang J, Lu C.** 2012. A systematic review of hypermethylation of p16 gene in esophageal cancer. *Cancer biomarkers: section A of Disease markers* 13: 215-226.

**Yarden Y, Sliwkowski MX.** 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 127-137.

**Yoo J, Robinson RA.** 2000. H- ras gene mutations in salivary gland mucoepidermoid carcinomas. *Cancer* 88: 518-523.

**Zbären P, Schüpbach J, Nuyens M, Stauffer E, Greiner R, Häusler R.** 2003. Carcinoma of the parotid gland. *The American Journal of Surgery* 186: 57-62.

**Zbären P, Zbären S, Caversaccio MD, Stauffer E.** 2008. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: Diagnostic difficulty and outcome. *Otolaryngology -- Head and Neck Surgery* 138: 601-605.

**Zhang D-H, Chen J-Y, Hong C-Q, Yi D-Q, Wang F, Cui W.** 2014. High-risk human papillomavirus infection associated with telomere elongation in patients with esophageal squamous cell carcinoma with poor prognosis. *Cancer* 120: 2673-2683.

**Zhao X, Ren W, Yang W, Wang Y, Kong H, Wang L, Yan L, Xu G, Fei J, Fu J.** 2006. Wnt pathway is involved in pleomorphic adenomas induced by overexpression of PLAG1 in transgenic mice. *International journal of cancer* 118: 643-648.

**Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, Roussel MF.** 1998. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes & Development* 12: 2424-2433.

## ***8. BIOGRAFIJA AUTORA***

Diplomirani molekularni biolog i fiziolog Nađa Nikolić rođena je 6.12.1983. godine u Beogradu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, upisala je školske 2002/2003. godine, a diplomirala školske 2008/2009. godine na usmerenju Primenjena genetika. Školske 2010/2011. godine upisala je doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Genetika.

Od 2011. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik na naučnom projektu iz programa Osnovnih istraživanja finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod nazivom „Genetička kontrola i molekularni mehanizmi u malignim, inflamatornim i razvojnim patologijama orofacijalne regije” (evidencioni broj 175075), a pod rukovodstvom prof.dr Jelene Milašin. Zvanje istraživač saradnik stekla je 2013. godine.

U periodu od 2012-2015. učestvovala je u vođenju praktične nastave na predmetu Humana genetika, u okviru Katedre za genetiku Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Bila je član sekretarijata V kongresa Društva genetičara Srbije, održanog od 28.9-2.10.2014. godine, kao i Organizacionog odbora XI Balkanskog kongresa Humane genetike, održanog od 17-20. septembra 2015. godine. Član je Društva genetičara Srbije od 2011. godine.

Nađa Nikolić je do sada bila autor i koautor 13 naučnih publikacija u časopisima međunarodnog značaja i 20 saopštenja na skupovima međunarodnog značaja iz uže naučne oblasti. Uža naučna oblast interesovanja su: molekularna genetika kancera i humana populaciona genetika.

## **9. PRILOZI**

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Нађа С. Николић \_\_\_\_\_

број индекса \_\_\_\_\_ Б3003/2010 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Генетичка и епигенетичка студија плеоморфних аденома пљувачних жлезда  
човека: мутациони статус *HER-2*, *c-myc*, *H-ras* и *TP53* гена и метилациони статус  
*p14* и *p16* гена“

- 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, 10.12.2015. године

Нађа Николић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Нађа С. Николић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ Б3003/2010 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Биологија \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_\_ „Генетичка и епигенетичка студија плеоморфних аденома  
пљувачних жлезда човека: мутациони статус *HER-2*, *c-myc*, *H-ras* и *TP53* гена и  
метилациони статус *p14* и *p16* гена“ \_\_\_\_\_

Ментор \_\_\_\_\_ др Јелена Милашин \_\_\_\_\_

Потписани/а \_\_\_\_\_ Нађа С. Николић \_\_\_\_\_

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_ 10.12.2015. године \_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

„Генетичка и епигенетичка студија плеоморфних аденома пљувачних жлезда човека: мутациони статус *HER-2*, *c-myc*, *H-ras* и *TP53* гена и метилациони статус *p14* и *p16* гена“

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, 10.12.2015. године

Натша Никсантић



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

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

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

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

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

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