

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Nevena S. Kotarac

**STUDIJA ASOCIJACIJE GENA ZA
MIKRORNAK (*MIR34*, *MIR143*, *MIR145* I
MIR378) I GENA ZA ODRŽAVANJE TKIVNE
HOMEOSTAZE SA KARCINOMOM
PROSTATE**

doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Nevena S. Kotarac

**ASSOCIATION STUDY OF MICRORNA GENES
(*MIR34*, *MIR143*, *MIR145* I *MIR378*) AND GENES
INVOLVED IN TISSUE HOMEOSTASIS WITH
PROSTATE CANCER**

Doctorial Dissertation

Belgrade, 2020

Mentor:

dr Goran Brajušković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Dušanka Savić-Pavićević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

dr Zorana Dobrijević, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu-Institut za primenu nuklearne energije INEP

dr Ivan Vuković, docent, Univerzitet u Beogradu-Medicinski fakultet

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Svom mentoru, prof. dr Goranu Brajuškoviću, dugujem zahvalnost na ukazanoj prilici i poverenju da svoju doktorsku disertaciju radim u Centru za humanu molekularnu genetiku i budem deo njegovog naučnog tima. Takođe, svom mentoru dugujem zahvalnost na istrajnoj pomoći, strpljenju i pronicljivim savetima tokom pisanja svojih naučnih radova, a kasnije i same teze, ali i na razumevanju koje je katkad prevazilazilo profesionalne okvire i bivalo toplo, ljudski i pre svega prijateljski usmereno.

Prof. dr Dušanki Savić-Pavićević, dugujem veliku zahvalnost na istinskoj podršci tokom mog rada i učenja u Centru, dobronamernim savetima, obazrivosti i rečima „možeš“ onda kada je to i meni samoj delovalo daleko. Ljubav prema nauci, profesionalna podrška, posvećenost i istrajnost koju pruža svima nama je nemerljiva.

Svojoj kolegini, dr Zorani Dobrijević dugujem mnogo toga, a pre svega zahvalnost na nesebičnoj pomoći tokom celog ovog puta. „Zoka“, kako je ja oduvek zovem, je neko kome sam uvek mogla da se obratim za pomoć, a da me ne bude stid da pitam nešto „što naizgled svi već znaju“. To je ona starija kolegini i drug, a sada i članica moje komisije čija su profesionalna pomoć i znanje učinili da mnogo lakše savladam neke prepreke.

Doc. dr Ivanu Vukoviću zahvaljujem na pomoći koja se odnosila na klinički aspekt mog rada, kao i korisnim sugestijama tokom pisanja ove teze.

Svojoj mlađoj kolegini, koja je tokom celog ovog puta postala i moj prijatelj, Suzani Matijašević, dugujem veliku ljudsku i profesionalnu zahvalnost. Suza je snaga, pamet i samouverenost onda kada je ja nisam pronalazila kod sebe. Od spremanja vežbi, preslišavanja za Petnicu, do naših zajedničkih tumačenja DNK profila pored sekvenatora gde bismo usput stizale da prepričamo jedna drugoj i svoje emotivne dogodovštine, bila je moj saučesnik, podrška, moja osoba.

Dr Jovanu Pešoviću, drugu i mom prvom kolegi, od kojeg me svakog radnog dana deli ni pola radnog stola, dugujem veliku zahvalnost na svojoj podršci, nesebičnim savetima, razumevanju, istrajnosti u prenošenju profesionalnog znanja i veština kako u svakodnevnom molekularno-dijagnostičkom radu tako i prilikom objavljivanja svog prvog rada. Kad god bih se uplašila da ne razumem neku proceduru ili kad bi me paralisale stranice i stranice neprohodnog teksta, Jovan bi bio tu da kaže „čekaj da vidimo to zajedno“.

Iskrenu zahvalnost dugujem i svom asistentu sa osnovnih studija, a sada svom kolegi dr Milošu Brkušaninu na svim znanjima i veštinama koja mi je preneo, strpljenju, smehu, prihvatanju, preterivanjima u slatkijima i onoj poruci koju me naterao da pošaljem pre četiri godine. ☺ Kad sam tek došla u Centar, Miloš je bio prvi osmeh i prva podrška.

Zahvalnost dugujem i mojim kolegincama dr Jeleni Karanović i Lani Radenković, kao i kolegi Nemanji Radovanoviću na iskrenoj podršci i ukazanoj pomoći kad god je ona bila potrebna.

Mojoj Dunji Petrović, koja je isprva bila master student u našem Centru, a onda postala moj demonstrator i moja osoba veliko hvala što mi je pomogla da preživim svoju prvu godinu držanja vežbi na našem fakultetu. Njena pamet i posvećenost, njeno bivanje „tu“, njen rozi iPhone 4 koji je uvek guglao najkritičnije stvari na licu mesta, učinio je da tu godinu uspešno izguramo zajedno. Sa Dudom sam se od samog početka razumela bez puno reči, a ona je danas zasigurno jedna od najvažnijih osoba.

Veliku zahvalnost dugujem i Ljubici Stanković, nekome ko je takođe tokom celog ovog puta postao prijatelj, na nesebičnom razumevanju, prevođenju stvari koje nekom drugom ne bi morale da se prevedu, *slušanju* i istinskoj podršci.

Hvala i mojim *nestvarnim* ljudima iz Petnice koji su mi vratili veru u sebe onda kada je ona bila poljuljana: Zverku, Draganu Bajkanoviću, Zorici Sofilj, najdražoj Ani Urošević, Vladani Sušić, Milici Joksimović, Jovanu Trapariću, Nikoli Mitoviću, Stefanu Maksimoviću, Tamari Lujčić, Nemanji Stanojeviću, Mihailu Filepu, Mihajlu Stašuku, Luki Velimirovu, Katarini Tomić. Provođenje vremena sa njima, kako na seminarima Biomedicine, tako i na druge načine čini da se osećam srećno, prihvaćeno i mirno.

Neizmerno hvala jednoj od najvažnijih osoba u mom životu, mom najboljem prijatelju, Andriji Raduloviću koji je preživeo sve ovo sa mnom. Njegovo beskompromisno *tu* tokom svih ovih godina, smirenost i pamet koja prevazilazi okvire običnog, spoznaja stvari daleko pre svih drugih i čekanje da i ja dođem do istog pa da odatle nastavimo zajedno, čini da se baš uvek osećam shvaćeno i zaštićeno.

Istinsku zahvalnost dugujem mojoj Neveni bez čije bi ljubavi, dobrote i iskrenosti sve ovo bilo daleko teže.

Svojoj porodici, a pre svega svojoj majci Snežani, dugujem najveću zahvalnost na razumevanju i podršci tokom mog celokupnog odrastanja i školovanja. Svojoj majci i posvećujem ovu tezu. *Hvala ti što uvek razumeš.*

Studija asocijacije gena za mikroRNK (*MIR34*, *MIR143*, *MIR145* i *MIR378*) i gena za održavanje tkivne homeostaze sa karcinomom prostate

Sažetak

Karcinom prostate (KP) je drugi po učestalosti maligni tumor muškaraca i predstavlja jedan od vodećih izazova savremene onkologije. Danas se intenzivno istražuju novi biološki markeri koji bi se u kombinaciji sa standardnim prognostičkim parametrima KP koristili u dijagnostici i lečenju ovih bolesnika. Kandidate za nove markere KP predstavljaju i potencijalno funkcionalne genetičke varijante sa efektom na nivoe transkripcije i/ili obradu u genima za mikroRNK kao i genetičke varijante u mestima vezivanja mikroRNK za proteine analizirane u okviru ove doktorske disertacije. Asocijacija potencijalno funkcionalnih genetičkih varijanti u regulatornim regionima gena *hsa-miR-34b/c* (rs4938723), *hsa-miR-378* (rs1076064), *hsa-miR-143/145* (rs4705342) i genima *KLK3* (rs1058205), *VAMP8* (rs1010) i *MDM4* (rs4245739), a koje menjaju mesta vezivanja mikroRNK, analizirana je u grupi od 355 bolesnika sa KP, 358 bolesnika sa benignom hiperplazijom prostate i 370 zdravih muškaraca koji su činili kontrolnu grupu. Genotipizacija odabranih genetičkih varijanti vršena je upotrebom TaqMan eseja za genotipizaciju tačkastih genetičkih varijanti i *real-time* PCR-a. Nakon statističke obrade dobijenih rezultata utvrđena je asocijacija genetičke varijante rs4705354 sa povećanim rizikom za razvoj KP kod bolesnika iz populacije Srbije. Istovremeno, za genetičku varijantu rs1076064 ustanovljena je asocijacija sa rizikom za progresiju bolesti kod bolesnika iz naše populacije. Ostale analizirane genetičke varijante u okviru ove teze pokazivale su asocijaciju sa vrednostima različitih standardnih prognostičkih parametara KP. Dobijeni rezultati upućuju na to da odabrane genetičke varijante mogu biti od značaja prilikom procene rizika za progresiju tumora kod bolesnika iz naše populacije.

Ključne reči: karcinom prostate, studija asocijacije, genetičke varijante, mikroRNK, *hsa-miR-34b/c*, *hsa-miR-378*, *hsa-miR-143/145*, *KLK3*, *VAMP8*, *MDM4*.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija

Association study of microRNA genes (*MIR34*, *MIR143*, *MIR145* and *MIR378*) and genes involved in tissue homeostasis with prostate cancer

Abstract

Prostate cancer (PCa) is the most common cancer among men in Europe and one of the major medical problems in modern health practice. Novel molecular markers are urgently needed for better management and risk stratification of patients. Among the novel candidate genetic variants for the present study with the potential of becoming novel biological markers of PCa development and progression are single nucleotide variants (SNVs) with potential effect on microRNA processing/level of transcription as well as SNVs affecting the microRNA-binding mechanisms in *KLK3*, *VAMP8* and *MDM4* genes. The effect of SNVs rs4938723, rs1076064 and rs4705343 occurring in regulatory regions of miR-34b/c, miR-143/145 and miR-378, respectively, on PCa risk and progression in Serbian population was assessed on 355 patients with PCa, 358 patients with benign prostatic hyperplasia and 370 healthy volunteers. The same study group was used for evaluation of *KLK3* (rs1058205), *VAMP8* (rs1010) and *MDM4* (rs4245739) genetic variants effect on PCa risk and progression in our population. Genotyping of selected SNVs was performed by Taqman® SNP Genotyping Assays and real-time PCR. Results were statistically evaluated and genetic variant rs4705342 was identified as PCa susceptibility variant in Serbian population, while rs1076064, rs4938723, rs1058205, rs1010 and rs4245739 showed no association with PCa risk. At the same time genetic variant rs1076064 was associated with the risk of PCa progression. Genetic variants rs4938723, rs1076064 and all three SNVs affecting microRNA binding mechanisms have shown the association with the parameters of PCa progression. The obtained results point out the potential relevance of the tested SNVs for the disease aggressiveness assessment.

Keywords: prostate cancer, association study, genetic variants, microRNA, *hsa-miR-34b/c*, *hsa-miR-378*, *hsa-miR-143/145*, *KLK3*, *VAMP8*, *MDM4*.

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Biochemistry and Molecular Biology

Skraćenice

- ADT** – terapija lečenja karcinoma prostate deprivacijom androgenih hormona (eng. *androgen deprivation therapy*, ADT)
- Ago** – protein Argonaut (eng. *Argonaute*, AGO)
- AGO1** – protein Argonaut 1 (eng. *Argonaute 1*, AGO1)
- AGO2** – protein Argonaut 2 (eng. *Argonaute 1*, AGO1)
- AIC** – Akaike informacijski kriterijum (eng. *Akaike information criterion*, AIC)
- AJCC** – američki sistem za određivanje stadijuma primarnog tumora (eng. *American Joint Committee on Cancer*, AJCC)
- AR** – androgeni receptor
- ARE** – element odgovora na androgene
- BCL2** – anti-apoptotski protein limfoma B ćelija 2 (eng. *B-cell lymphoma 2*, BCL2)
- BPH** – benigna hiperplazija prostate
- BRCA1** – gen karcinoma dojke 1 (eng. *Breast cancer 1 gene*, BRCA1)
- BRCA2** – gen karcinoma dojke 2 (eng. *Breast cancer 2 gene*, BRCA2)
- CI** – interval poverenja (eng. *Confidence Interval*, CI)
- C-MYC** – ćelijski MYC proto-onkogen, homolog virusnog onkogen v-Myc (eng. *MYC Proto-Oncogene*, *V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog*, MYC)
- CRPC** – karcinom prostate neosetljiv na kastraciju (eng. *castration resistant prostate cancer*, CRPC)
- CYP17A1** – član 1 porodice 17, podfamilije A gena za citohrom P450 (eng. *Cytochrome P450 Family 17 Subfamily A Member 1*, CYP17A1)
- CYP19A1** – član 1 porodice 19, podfamilije A gena za citohrom P450 (eng. *Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1*, CYP19A1)
- CZ** – centralna zona prostate
- DGCR8/Pasha** – kritični region 8 za DiGeorge-ov sindrom/Paša (eng. *DiGeorge syndrome chromosomal region 8/Pasha*, DGCR8/Pasha)
- DNK** – dezoksiribonukleinska kiselina
- DRE** – digitorektalni pregled (eng. *digital-rectal examination*, DRE)
- E2F1** – E2F transkripcijski faktor 1 (eng. *E2F transcription factor 1*, E2F1)
- EAU** – Evropsko udruženje urologa (eng. *European Association of Urologists*, EAU)
- EDTA** – etilen diamin tetra sirćetna kiselina
- ESCC** – skvamozni karcinom jednjaka (eng. *Esophageal Squamous Cell Carcinoma*, ESCC)
- Et-Br** – etidijum-bromid
- fPSA** – slobodni prostata specifični antigen (eng. *free PSA*, fPSA)
- FRET** – prenos fluorescentne rezonantne energije (eng. *fluorescence resonance energy transfer*, FRET)
- GEMIN3** – Gem-asocirani protein 3 (eng. *Gem Nuclear Organelle Associated Protein 3*, GEMIN3)
- GEMIN4** – Gem-asocirani protein 4 (eng. *Gem Nuclear Organelle Associated Protein 4*, GEMIN4)
- GS** – Glison skor
- GWAS** – Studija asocijacije na čitavom genomu (eng. *Genome-wide association studies*, GWAS)
- hER** – hrapavi endoplazmatični retikulum
- HPC1/RNASEL** – nasledni region karcinoma prostate 1/Ribonukleaza 1 (eng. *Prostate Cancer Hereditary 1/Ribonuclease L*, HPC1/RNASEL)
- HPC3** – nasledni region karcinoma prostate 3 (eng. *Prostate Cancer Hereditary 3*, HPC3)
- HPC8** – nasledni region karcinoma prostate 8 (eng. *Prostate Cancer Hereditary 8*, HPC8)
- HPCX1** – X-vezani nasledni region karcinoma prostate 1 (eng. *Prostate Cancer Hereditary X-Linked 1*, HPCX1)

HSD17B1 – hidroksteroid 17- β dehidrogenaza I (eng. *Hydroxysteroid 17-Beta Dehydrogenase 1*, HSD17B1)

HSD3B1 – 3 β -hidroksteroid dehidrogenaza tip I (eng. *3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1*, HSD3B1)

HWE – Hardi-Vajnbergova ravnoteža (eng. *Hardy-Weinberg Equilibrium*, HWE)

INDEL – inserciono delecione varijante (eng. *INsertion/DELetion*, INDEL's)

iRNK – informaciona RNK

K562 – DNK standard za količinu

KLK3 – Kalikreinu slična peptidaza 3 (eng. *Kalikrein Related Peptidase 3*, KLK3)

KP – karcinom prostate

MDM2 – ljudski homolog P53 vezujućeg proteina (eng. *Mouse Double-Minute 2, Human Homolog Of P53-Binding Protein*, MDM2)

MDM4 – MDM4 regulator proteina p53 (eng. *MDM4 Regulator of p53*, MDM4)

min – minut

miRISC – mikroRNK-indukujući utišavajući kompleks (eng. *miRNA-induced silencing complex*, miRISC)

MMR - geni za popravku oštećenja na molekulu DNK (eng. *DNA mismatch repair genes*, MMR geni)

MRE – regulatorni elementi za mikroRNK (eng. *microRNA regulatory elements*, MRE)

NF-kB – nuklearni faktor Kappa-B (eng. *Nuclear Factor Kappa-B*, NF-kB)

OR – odnos šansi (eng. *odds ratio*, OR)

p2PSA – [-2]proPSA

PCBC – gen suspektan na karcinom prostate/karcinom mozga (eng. *Prostate Cancer/Brain Cancer Susceptibility*, PCBC)

PCR – Lančana reakcija polimeraze

PHI – indeks zdravlja prostate (eng. *Prostate Health Index*, PHI)

PIVOT – američko istraživanje PIVOT (eng. *The Prostate Cancer Intervention Versus Observation Trial*, PIVOT)

PPARGC1B – peroksizomima aktivirani proliferativni receptor-GAMMA (eng. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-GAMMA, Coactivator 1, Beta*; PPARGC1B)

PSA – prostata specifični antigen (eng. *prostate specific antigen*, PSA)

PZ – periferna zona prostate

RAN – nuklearni protein povezan sa Ras-om (eng. *Ras-Related Nuclear Protein*, RAN)

Ran-GTP – nuklearni protein povezan sa Ras-om i GTP-om (eng. *Ras-related nuclear protein-GTP*)

RNK – ribonukleinska kiselina

rpm – obrtaja po minuti (eng. *rounds per minute*, rpm)

RR – relativni rizik (eng. *relative risk*, RR)

s – sekunda

SCLC – sitnoćelijski karcinom pluća (eng. *Small Cell Lung Cancer*, SCLC)

SLITRK1 – SLIT i NTRK-sličan član porodice 1 (eng. *SLIT And NTRK Like Family Member 1*, SLITRK1)

Smad3 – član 3 porodice SMAD proteina (eng. *SMAD family member 3*, Smad3)

Smad4 – član 4 porodice SMAD proteina (eng. *SMAD family member 4*, Smad4)

SNARE- porodica solubilnih receptorskih proteina osjetljivih na N-etilmaleimid (eng. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptors*, SNAREs)

SNV – tačkasta genetička varijanta (eng. *single nucleotide variant*, SNV)

SRD5A2 – steroidna 5- α reduktaza II (eng. *steroid 5 alpha-reductase II*, SRD5A2)

TBE – Tris-borat-EDTA

TGF β – transformišući faktor rasta β (eng. *Transforming growth factor β* , TGF β)

TNM – sistem za određivanje stadijuma primarnog karcinoma gde T predstavlja primarni tumor, N regionalnu proširenost tumora u limfne noduse, a M prisustvo ili odsustvo metastaza (eng. *Tumor, Node, Metastasis*, TNM)

TP53 – tumor protein p53 (eng. *Tumor Protein p53, TP53*)

tPSA – totalni prostata specifični antigen (eng. *total PSA, tPSA*)

TRBP – gen za TAR RNK-vezujući protein 2 (eng. *TAR RNA-Binding Protein 2, TARBP2* ili *TRBP*)

TRUS – transrektalni ultrazvučni pregled (eng. *transrectal ultrasonography, TRUS*)

TZ – tranziciona zona prostate

UTR – netranslatirajući region

UV – ultravioletno zračenje

VAMP8 – membranski protein 8 asociiran sa vezikulama (eng. *Vesicle Associated Membrane Protein 8, VAMP8*)

VNTR – varijante u broju uzastopnih (tandemskih) ponovaka (eng. *Variable Number of Tandem Repeats, VNTRs*)

XPO5 – Exportin-5 protein

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Prostata	1
1.1.1. Anatomija, histologija i fiziologija prostate.....	1
1.1.2. Bolesti prostate.....	2
1.1.2.1. Prostatitis	2
1.1.2.2. Benigna hiperplazija prostate	2
1.1.2.3. Maligni tumori prostate	2
1.2. Karcinom prostate	3
1.2.1. Epidemiologija karcinoma prostate	3
1.2.2. Faktori rizika za KP	3
1.2.3. Postavljanje dijagnoze karcinoma prostate	4
1.2.3.1. Primena PSA kao dijagnostičko-prognostičkog parametra kod KP	5
1.2.3.2. Određivanje patohistološkog gradusa karcinoma prostate	5
1.2.3.3. Određivanje kliničkog stadijuma karcinoma prostate	6
1.2.4. Lečenje karcinoma prostate	7
1.3. Molekularno-genetička osnova KP	7
1.3.1. Molekularno-genetičke studije naslednih formi KP	7
1.3.2. Molekularno-genetičke studije sporadičnih formi KP	8
1.3.2.1. Studije asocijacije na čitavom genomu (GWAS).....	8
1.3.2.2. Studije gena kandidata	9
1.4. Uloga RNK interferencije u patogenezi KP	10
1.4.1. Biogeneza i funkcija mikroRNK.....	10
1.4.2. MikroRNK i KP	12
1.4.2.1. SNV u genima za mikroRNK	13
1.4.2.2. Potencijalno funkcionalne genetičke varijante u regulatornim regionima gena za mikroRNK i KP	16
1.4.2.3. Genetičke varijante u mestima vezivanja mikroRNK i KP	16
2. Ciljevi rada	18
3. Materijal i metode	19
3.1. Materijal	19
3.2. Metode.....	19
3.2.1. Selekcija bolesnika sa KP u grupe sa različitim rizikom za progresju bolesti.....	19
3.2.2. Izolovanje genomske DNK iz pune periferne krvi	20
3.2.3. Provera kvaliteta izolovane DNK	21
3.2.4. Kriterijumi za odabir genetičkih varijanti u potencijalnim regulatornim regionima gena za mikroRNK i/ili regionima koji kodiraju pri-mikroRNK	21
3.2.5. Genotipizacija odabranih genetičkih varijanti u genima <i>MIR34B</i> , <i>MIR34C</i> , <i>MIR378</i> , <i>MIR143</i> , <i>MIR145</i> kao i genima <i>KLK3</i> , <i>VAMP8</i> , <i>MDM4</i>	21
3.2.6. Statistička obrada dobijenih rezultata	25
4. Rezultati	27
4.1. Rezultati selekcije bolesnika na osnovu vrednosti standardnih i prognostičkih parametara KP i rizika za progresiju bolesti	27
4.2. Rezultati provere kvaliteta izolovane genomske DNK elektroforezom u agaroznom gelu	28
4.3. Rezultati odabira genetičkih varijanti u genima za mikroRNK i genima <i>KLK3</i> , <i>VAMP8</i> i <i>MDM4</i>	28
4.4. Rezultati genotipizacije genetičkih varijanti u genima za mikroRNK i genima <i>KLK3</i> , <i>VAMP8</i> i <i>MDM4</i>	29
4.5. Rezultati analize asocijacije odabranih genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj KP.....	34

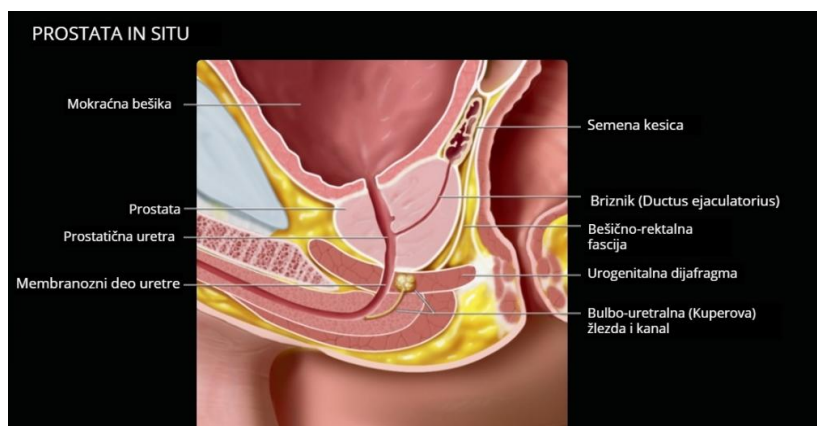
4.5.1.	Rezultati analize asocijacije genetičkih varijanti u regulatornim regionima gena <i>miR-34b/c</i> , <i>miR-378</i> i <i>miR-143/145</i> sa rizikom za razvoj KP	34
4.5.2.	Rezultati analize asocijacije genetičkih varijanti u genima <i>KLK3</i> , <i>VAMP8</i> i <i>MDM4</i> , a koje menjaju mesta vezivanja mikroRNK, sa rizikom za razvoj KP	37
4.6.	Rezultati analize asocijacije odabranih genetičkih varijanti sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara i sa rizikom za progresiju KP	40
4.6.1.	Rezultati analize asocijacije genetičkih varijanti u regulatornim regionima gena <i>miR-34b/c</i> , <i>miR-378</i> i <i>miR-143/145</i> sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara i rizikom za progresiju KP	40
4.6.2.	Rezultati analize asocijacija genetičkih varijanti u genima <i>KLK3</i> , <i>VAMP8</i> i <i>MDM4</i> , a koje menjaju mesta vezivanja mikroRNK, sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara i rizikom za progresiju bolesti.....	47
5.	Diskusija	55
6.	Zaključci	67
7.	Literatura	68
8.	Prilozi	82

1. Uvod

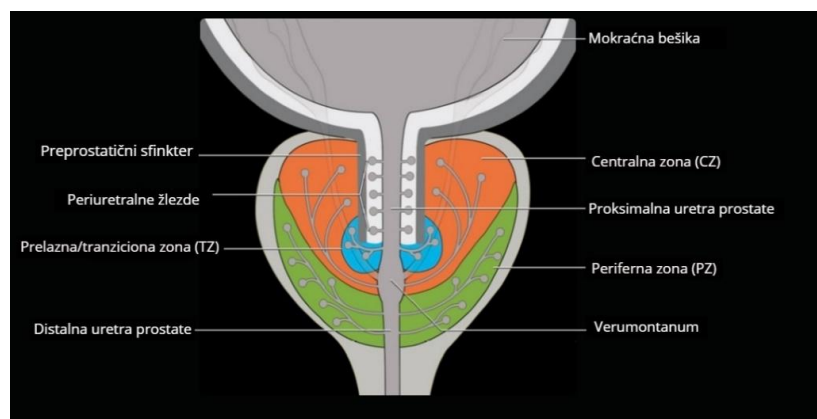
1.1. Prostata

1.1.1. Anatomija, histologija i fiziologija prostate

Prostata je neparna žlezda, oblika kestena, koja se nalazi ispod mokraćne bešike. Smeštena je u potperitonealnom spratu karlične duplje, iza preponske simfize, a ispred rektuma (Slika 1.). Kroz prostatu prolazi *pars prostatica urethrae*. U njoj se spajaju urinarni (*pars prostatica urethrae*) i reproduktivni sistem (*ductus ejaculatorius*) muškaraca. To je žlezdano-mišićni organ pridodat semenim putevima čija se funkcija ogleda u likvefakciji semene tečnosti. Prostata luči baznu tečnost koja omogućava pokretljivost spermatozoida i zaštitu prilikom ulaska u ženski reproduktivni sistem. Prostata je izgrađena od žlezda i strome koji zajedno okružuju uretru. Parenhim prostate podeljen je na više biološki različitih zona od kojih su najvažnije: periferna zona (PZ), centralna zona (CZ), prelazna zona (eng. *transitional zone*, TZ) i periuretralna zona (Slika 2). Zonalna podela prostate dobija na značaju nakon otkrića njene povezanosti sa lokalizacijom najčešćih bolesti prostate. Prostata sadrži oko 50 žlezdanih acinusa (*gladulae prostaticae*) različitog oblika i veličine smeštenih u fibromuskularnoj stromi. Mišićno tkivo prostate (*m. prostaticus*) izgrađeno je od ćelija glatkih mišića koje svojom kontrakcijom izbacuju sadržaj prostatičnih žlezda u uretru (1).



Slika 1.1. Pozicija prostate. Prostata je smeštena ispod mokraćne bešike, iza preponske simfize, a ispred rektuma (Slika preuzeta i modifikovana iz Kamaya A. & Wong J., 2016.) (1).



Slika 1.2. Zonalna podela prostate. Centralna zona okružuje uretru koju većim delom okružuje periferna zona. Prelazna zona prostate okružuje spoj proksimalnog i distalnog kanala uretre. (Slika preuzeta i modifikovana iz Kamaya A. & Wong J., 2016.) (1).

1.1.2. Bolesti prostate

Najčešća oboljenja prostate su: *prostatitis* (zapaljenje prostate), benigna hiperplazija prostate (eng. *benign prostatic hyperplasia*, BPH) i maligni tumori prostate (karcinom prostate) (2).

1.1.2.1. Prostatitis

Prostatitis, zapaljenska lezija prostate, može biti akutni i hronični. Vrlo često se dijagnostikuje kod muškaraca nakon kultivisanja uzorka mokraće pre i posle digitorektalnog pregleda. Akutni prostatitis nastaje kao posledica bakterijskih infekcija, naročito *Escherichie coli* (3). Ukoliko se ne leči, akutni prostatitis vrlo često prelazi u hroničnu formu bolesti. Hronični prostatitis može biti bakterijski, abakterijski i granulomatozni. Kod abakterijskog hroničnog prostatitisa mikrobiološke kulture sekreta prostate su negativne i najčešće ga izazivaju *Chlamydia trachomatis* i *Ureaplasma urealyticum*. Granulomatozni hronični prostatitis odlikuje se prisustvom granuloma unutar prostate, i može nastati kako infekcijom izazvanom bakterijom *Mycobacterium tuberculosis*, tako i mehaničkim i radijacionim, ozledama prostate, itd. U akutnom prostatitisu, prostata je često uvećana i bolno osetljiva na dodir tokom pregleda. Hronični prostatitis može biti simptomatski ili asimptomatski. On je važan izvor ponovljenih infekcija urinarnog trakta kod muškaraca (2, 4).

1.1.2.2. Benigna hiperplazija prostate

Benigna hiperplazija prostate nastaje proliferacijom žlezdanih ćelija i strome u prelaznoj (TZ) i centralnoj zoni (CZ) prostate, dok najveći procenat karcinoma prostate (KP) nastaje u perifernoj zoni (2). Ovo oboljenje veoma je često i već u četrdesetim godinama manifestuje se kod značajnog broja muškaraca. Sa porastom životne dobi, progresivno raste i učestalost oboljevanja od BPH, te tako kod muškaraca u osmoj deceniji života predstavlja najčešće oboljenje prostate. Hiperplaziju prostate izaziva povećana proliferacija ćelija strome i žlezda što dovodi do uvećanja prostate i opstrukcije mokraćnih puteva. Iako tačan uzrok ove bolesti nije poznat, smatra se da poremećaji u androgenoj signalizaciji predstavljaju glavni "okidač" u njenom nastanku. Dihidrotestosteron, glavni aktivni oblik testosterona u tkivu, vezujući se za androgeni receptor (AR) dovodi do njegove aktivacije i translokacije u jedro. Vezujući se za elemente odgovora na androgene (eng. *androgen response elements*, ARE), AR učestvuje u regulaciji ekspresije brojnih gena. Takva molekularna kaskada dovodi do benignog uvećanja prostate. S obzirom na to da se BPH javlja u unutrašnjim zonama prostate, uvećani nodulusi komprimuju prostatični deo uretre. U velikom broju slučajeva to dovodi do opstrukcije donjih delova urinarnog trakta što za posledicu ima poremećaje u mokrenju. Kod nekih muškaraca može doći i do potpune opstrukcije mokrenja što stvara uslove za pojavu infekcija urinarnog trakta a u težim, nelečenim oblicima urinarne opstrukcije uzrokovane BPH može doći i do hidronefroze (2, 5).

1.1.2.3. Maligni tumori prostate

Mikroskopski, većina malignih tumora posledica je abnormalne proliferacije žlezdanog epitela prostate (adenokarcinom), dok svega 2% čine mezenhimalni tumori – sarkomi (6). Zbog toga se termin karcinom prostate (KP) najčešće odnosi na sporadične oblike adenokarcinoma. KP je drugi najčešće dijagnostikovani karcinom kod muškaraca u svetu. Prema proceni Američkog društva za maligne bolesti, u Sjedinjenim Američkim Državama u 2020. godini od KP-a će oboleti gotovo 191 930 muškaraca od čega će u preko 33 000 slučajeva rezultovati smrtnim ishodom (7). U Srbiji, prema podacima Instituta za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“ KP je treće maligno oboljenje po broju dijagnostikovanih slučajeva, ali ujedno i bolest koju prati najveći trend smrtnosti u našoj zemlji (8). Procenjuje se da će od tumora prostate u proseku oboleti svaki deveti muškarac na svetu (7).

1.2. Karcinom prostate

Karcinom prostate predstavlja jedan od najvećih izazova savremene medicine i to kako zbog kontinuiranog porasta incidence tako i zbog izuzetne heterogenosti u biološkom ispoljavanju bolesti. Neki KP su asimptomatski i takvi muškarci najčešće umiru od drugih komplikacija koje nisu vezane za samo maligno oboljenje. Druga, velika većina muškaraca, ima takozvanu latentnu formu bolesti koja u dugom vremenskom intervalu neće ugroziti život bolesnika i predstavlja formu bolesti koju je, u dugom vremenskom periodu, neophodno lečiti isključivo modalitetom aktivnog praćenja bez bilo kakvih drugih radikalnijih intervencija koje bi mogle ugroziti kvalitet života tih bolesnika (9). Rano dijagnostikovanje latentnih KP vezuje se za fenomene „preterane dijagnoze“ i „preteranog lečenja“ ove bolesti (10). Postoji i treća grupa bolesnika sa KP koji imaju onu najagresivniju formu bolesti koja najčešće dovodi do pretećih posledica po život. Savremena istraživanja u oblasti KP sve su više okrenuta ka identifikaciji razlika u biološkim mehanizmima koji dovode do toga da neke forme KP-a u dugom vremenskom periodu ostanu latentne i blage, dok druge imaju izuzetno brz progres rezultujući smrtnim ishodom (11, 12).

1.2.1. Epidemiologija karcinoma prostate

Karcinom prostate odlikuje različita incidenca oboljevanja u različitim populacijama ljudi (13). Najpodložniji ovom malignom oboljenju su Amerikanci afričkog porekla, potom slede Evropljani, dok Azijate prati najmanja učestalost oboljevanja (13, 14). U SAD Amerikanci afričkog porekla imaju gotovo 60% veću incidencu oboljevanja u poređenju sa Amerikancima evropskog porekla (15, 16). Takođe, zabeležena je i mnogo veća smrtnost među pripadnicima te populacije. Razlike u oboljevanju i smrtnosti pripisuju se kako genetičkim tako i uticajima spoljašne sredine, ali i brojnim sociološkim faktorima (dostupnost zdravstvene zaštite, modaliteti skrininga na bolest, itd.) (13).

1.2.2. Faktori rizika za KP

Tri najprepoznatija faktora rizika za razvoj KP su starosna dob, etničko poreklo i porodična anamneza (17). Ovo maligno oboljenje se još uvek smatra bolešću starije životne dobi iako je primećeno sve češće oboljevanje muškaraca u ranim pedesetim godinama. Rezultati epidemioloških studija takođe ukazuju da je 10% KP dijagnostikovano kod muškaraca mlađih od 56 godina (18). Takvi KP predstavljaju takozvane rano-otkrivene (eng. *early-onset*) forme za koje su brojne studije pokazale da imaju znatno agresivniji tok bolesti i iziskuju primenu što ranijih, agresivnijih, modaliteta lečenja. Budući da takvi rano-otkriveni KP mogu nastati zbog prisustva naslednih mutacija, takvi bolesnici vrlo često su uključeni u studije genetičke asocijacije koje za cilj imaju razotkrivanje pojedinačnih gena-uzročnika KP (19).

S obzirom na to da su primećene različite incidence oboljevanja od KP kod ljudi različitog etničkog porekla, odnosno da Amerikanci afričkog porekla spadaju u najrizičniju kategoriju, smatra se da poreklo ima važnu ulogu u etiologiji KP (20).

Karcinom prostate je visoko heritabilan, odnosno visoko nasledan karcinom (21). Udeo nasledne komponente u njegovom nastanku veći je čak i u poređenju sa karcinomom dojke, odnosno karcinomom kolona (22, 23). Genetički faktori imaju gotovo 60% udela u riziku za nastanak i progresiju KP (24). Ostatku rizika za KP doprinose različiti faktori sredine kao i sama interakcija između gena i sredine. Iako je najveći broj KP sporadičan, primećena je i njegova familijarna kao i nasledna forma. Naslednim KP se smatra ona forma bolesti nastala kao posledica retkih mutacija u genima visoke penetrabilnosti koju odlikuje Mendelovski tip nasleđivanja (autozomalno-dominantno ili ređe X-vezano recesivno/autozomalno-recesivno nasleđivanje) (25).

Nasledni KP čini svega 5% slučajeva KP i dijagnostikuje se kod muškaraca mlađe životne dobi (26). Definisani su i vrlo strogi kriterijumi za svrstavanje nekog KP u nasledni tip. Porodice sa naslednim tipom KP moraju zadovoljavati jedan od sledećih kriterijuma: tri ili više člana porodice prvog stepena imaju KP (otac, brat, sin); pristustvo KP u tri uzastopne generacije ili srodstvo sa barem dva dalja člana porodice kod kojih je KP dijagnostikovano pre 55. godine života. Familijarni tip karakteriše KP od kog su barem dva bliska člana porodice obolela. Između 13% i 25% svih KP čini familijarni tip bolesti (26). Baš kao i kod sporadičnog KP, nastanku familijarnog tipa bolesti mnogo više doprinose mnogobrojni lokusi niske penetrabilnosti, njihova međusobna interakcija, ali i interakcija sa faktorima sredine (26, 27).

Jedna velika epidemiološka meta-analiza koja je analizirala preko 33 studije slučajeva i kontrola pokazala je da je rizik za razvijanje KP veći kod muškaraca koji imaju obolelog brata nego obolelog oca od KP (28). Rizik je obrnuto proporcionalan životnoj dobi obolele srodne osobe. Dodatno, pokazano je da na povećan rizik za razvoj KP utiče i pozitivna porodična anamneza karcinoma dojke i karcinoma jajnika (29). U jednoj od studija zabeležen je povećan rizik za KP kod muškaraca čije su majka ili sestra imale neki od ova dva maligniteta (RR 1.7, 95% CI 1.0-3.0) (30). U isto vreme, primećeno je i da porodična anamneza KP povećava rizik za oboljevanje ženskih srodnika od karcinoma dojke, pogotovu kod Amerikanki afričkog porekla (prilagođeni HR 1.14; 95% CI, 1.02–1.26) (31). Veza između povećanih incidenca oboljevanja u porodicama u kojima su prisutna ova dva maligniteta objašnjava se mutacijama u genima *BRCA1* (eng. *Breast cancer 1 gene, BRCA1*) i *BRCA2* (eng. *Breast cancer 2 gene, BRCA2*) odgovornim za nasledne oblike karcinoma dojke, karcinoma jajnika kao i rano-dijagnostikovane forme KP (32). Povećana incidenca oboljevanja od KP primećena je i kod porodica sa naslednim nepolipoznim kolorektalnim karcinomom (Linčov sindrom) i sporadičnim kolorektalnim karcinomom. Nasledne promene u genima za popravku oštećenja molekula DNK (eng. *DNA mismatch repair genes, MMR genes*), a koje dovode do razvoja ova dva maligniteta nalaze se i u etiologiji nastanka KP (33).

1.2.3. Postavljanje dijagnoze karcinoma prostate

Iako se KP sve češće dijagnostikuje kod muškaraca u sve mlađoj životnoj dobi, ipak njegova najveća incidenca je kod muškaraca između 66 i 75 godine života (34). Sedamdeset do osamdeset posto KP javlja se u perifernim žlezdama koje se u vidu tvrdih nepravilnih nodusa mogu detektovati digitorektalnim pregledom (eng. *digital-rectal examination, DRE*). Rane lezije KP tipično se nalaze odmah ispod kapsule prostate, dok lokalno uznapredovali karcinomi mogu naseliti susedne semene kesice, prostatični deo uretre, pa čak i izvršiti invaziju uzidove mokraćne bešike (6).

U početnom stadijumu, KP često su asimptomatski. Obdukcijom kod gotovo trećine muškaraca između 30 i 40 godine pronađeni su mikroskopski lokusi ovog karcinoma. Simptomi KP su nespecifični, zajednički sa benignim bolestima prostate i najčešće su povezani sa opstrukcijom donjeg urinarnog takta. Nažalost, u ne malo broju slučajeva, mestastaze praćene bolom u kostima su prvi klinički simptomi koje dovode do dijagnostike KP (2, 6).

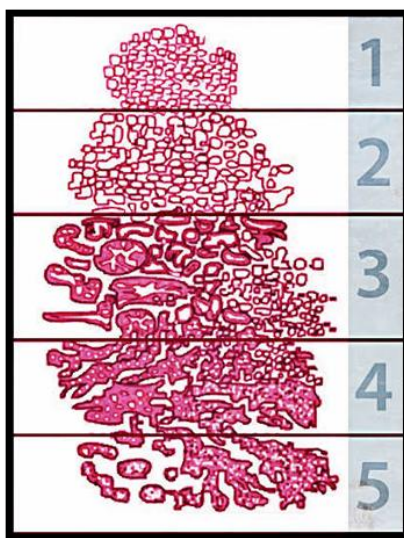
KP se danas dijagnostikuje kliničkim pregledom urologa koji obuhvata porodičnu anamnezu, digitorektalni pregled prostate (eng. *digital-rectal examination, DRE*), ultrazvučni pregled abdomena, bešike i prostate kroz rektum (eng. *transrectal ultrasonography, TRUS*), kao i laboratorijsko određivanje serumske vrednosti prostata specifičnog antigena (eng. *prostate specific antigene, PSA*) (35). Iako neophodan, DRE sve više gubi na značaju zbog svoje nespecifičnosti. Naime, pokazano je da bolesnici sa KP mogu imati potpuno normalan nalaz DRE, a da pojedini bolesnici sa zapaljenskim bolestima prostate mogu dati lokalna zadebljanja prostate koja lažno asociraju na karcinom (36).

1.2.3.1. Primena PSA kao dijagnostičko-prognostičkog parametra kod KP

Veoma važno mesto u dijagnostici, ali i praćenju kliničkog toka bolesti ima merenje serumske vrednosti PSA (37). PSA je proteolitički enzim kojeg stvaraju i izlučuju kako neizmenjene tako i neoplastično transformisane ćelije žlezdanog epitela prostate. Ovaj enzim izlučuje se u acinuse prostate, a odatle u semenu tečnost gde obezbeđuje pokretljivost spermatozoida tako što održava seminalni sekret tečnim. Fiziološke vrednosti serumskog PSA kreću se u granicama od 0 do 4 ng/mL (2, 37). Iako karinomske ćelije sekretuju veće količine PSA, do povećanja njegove vrednosti u serumu bolesnika može doći i kao posledica benigne hiperplazije prostate ili bilo kog drugog stanja koji remeti normalnu funkciju prostate. Iako se određivanje serumske vrednosti PSA rutinski primenjuje u dijagnostici i praćenju progresije KP već više od 20 godina, on nije bolest-specifičan marker (37, 38). Štaviše, pokazano je da kod određenog broja muškaraca sa lokalnim KP, ograničenim samo na tkivo prostate, vrednost PSA ne mora biti povišena. Zbog takvih ograničenja u specifičnosti, serumska vrednost PSA ima ograničenu primenu i ne koristi se kao izolovan test za pretragu KP kod muškaraca (39). PSA ima mnogo veću primenu u praćenju terapijskog odgovora. Od izuzetne je važnosti za praćenje relapsa bolesti nakon primenjene adekvatne terapije. Povećana vrednost PSA nakon lečenja ukazuje na recidiv bolesti ili pojavu metastaza. Merenje brzine PSA, gustine PSA (određivanje odnosa između serumske vrednosti PSA i zapremine prostate), kao i određivanje procenta slobodne frakcije ovog markera u odnosu na njegovu neaktivnu, vezanu, formu može biti od pomoći u „sivoj zoni“ vrednosti PSA od 4-10 ng/mL (40).

1.2.3.2. Određivanje patohistološkog gradusa karcinoma prostate

Biopsija prostate i to transrektalnim ultrazvkom vođena biopsija (eng. *transrectal ultrasound-guided biopsy*, TRUS guided biopsy) jedina je metoda kojom se sa sigurnošću dijagnostikuje KP (2, 6). Broj isečaka tkiva prostate koji se uzima najčešće iznosi od 6-12. Histopatološkom analizom bioptiranog tkiva prostate određuje se gradus tumora (41). Određivanjem gradusa karcinoma procenjuje se biološki potencijal tumora odnosno njegova agresivnost i potencijal za formiranje metastaza. Zasniva se na citološkoj diferencijaciji tumorskih ćelija i broju mitozu u analiziranim isečcima tumora. Za određivanje gradusa tumora prostate najčešće se primenjuje Glison gradus sistem koji se zasniva na identifikaciji pet različitih histoloških slika (42) (Slika 1.3).



Slika 1.3. Shematski prikaz tipičnih morfoloških slika Glison gradus sistema (Slika dostupna na URL adresi: <http://www.clevelandhealth.info/prostate-cancer-gleason-score/>)

Histološka slika 1 predstavlja najbolje diferentovan tumor, sa okruglim, uniformnim, neizmenjenim žlezdanim ćelijama, dok sliku 5 Glison gradusa odlikuje u potpunosti narušena žlezdana arhitektura, u kojoj tumorske ćelije infiltriraju stromu u vidu traka ili snopova. Pošto većina tumora sadrži više od jedne histološke slike, nakon mikroskopske analize tkiva utvrđuje se zbirni Glison gradus, odnosno Glisonov skor. Vrednosti ovog skora kreću se od 2-10 i predstavljaju zbir histološke slike koja se uočava u većini preseka, prvu dominantnu sliku, i drugu ređu sliku sa najvišim primećenim histološkim obrascem izmena u strukturi žlezdanog epitela (42). Što je veći gradus karcinoma, tj. što je veći Glison skor to je i veći maligni potencijal tumora.

1.2.3.3. Određivanje kliničkog stadijuma karcinoma prostate

Klinički stadijum bolesti ima važnu ulogu u proceni i lečenju KP. Utvrđuje se fizikalnim pregledom i radiološkim tehnikama (kompjuterizovana tomografija i magnetna rezonancija), a u retkim slučajevima i hirurškom pretragom (2). Određivanje stadijuma zasniva se na veličini primarne lezije, obimu proširenosti tumora u regionalne limfne noduse i prisustvu ili odsustvu udaljenih metastaza. Trenutno se koriste dve metode za prikazivanje stadijuma tumora, TNM sistem (eng. *Tumor, Node, Metastasis*, TNM) i AJCC sistem (eng. *American Joint Committee on Cancer*, AJCC)(43). U TNM sistemu koji je danas više u upotrebi, T predstavlja primarni tumor, N regionalnu proširenost tumora u limfne noduse, a M prisustvo ili odsustvo metastaza. T1, T2, T3, T4 opisuje rastuće dimenzije primarnog tumora, N1 ili N0 označava zahvaćenost/odsustvo tumora u regionalnim limfnim nodusima, dok M1/M0 predstavlja prisustvo odnosno odsustvo udaljenih metastaza (Tabela 1.1). Određivanje kliničkog stadijuma tumora ima veću kliničku vrednost od gradiranja tumora. Nakon hirurškog lečenja KP postavlja se definitivni patohistološki stadijum tumora (41).

Tabela 1.1. Određivanje stadijuma KP na osnovu TNM sistema klasifikacije

Oznaka	Značenje
T_x	Zbog manjka informacija, tumor ne može biti detektovan
T₀	Nema znakova primarnog tumora
T₁	Klinički neprimetna lezija
T_{1a}	Tumor zahvata ≤ 5% reseciranog tkiva
T_{1b}	Tumor zahvata > 5% reseciranog tkiva
T_{1c}	Tumor se nalazi u uzorku dobijenom iglenom biopsijom uz povišen PSA
T₂	Tumor je detektabilan tokom DRE i nalazi se samo u okviru žlezde
T_{2a}	Tumor zauzima manje od 50% jednog lobusa prostate
T_{2b}	Tumor zauzima više od 50% jednog lobusa prostate
T_{2c}	Tumor je proširen i zahvata oba lobusa prostate
T₃	Tumor izlazi van žlezde
T_{3a}	Tumor je van prostate, širenje van kapsule
T_{3b}	Invazija semenih kesica
T₄	Tumor se proširio van semenih kesica i obližnjih nodusa stigavši do bešike
N_x	Susedni limfni nodusi nisu istraženi
N₀	Nema proširenosti tumora u susedne limfne noduse
N₁	Tumor je proširen na susedne limfne noduse
M₀	Tumor se nije proširio van prostate
M₁	Tumor je metastazirao van prostate
M_{1a}	Tumor je zahvatio distalne limfne noduse
M_{1b}	Tumor je metastazirao na kosti
M_{1c}	Tumor je metastazirao na udaljene organe

1.2.4. Lečenje karcinoma prostate

KP leči se različitim kombinacijama hirurške, zračne i hormonske terapije (44). Lokalizovana bolest koja je ograničena na tkivo prostate leči se hirurškim putem odnosno radikalnom prostatektomijom. U uslovima kada hirurška terapija nosi povećan rizik za bolesnika, naročito kod onih u starijoj životnoj dobi, primenjuje se i zračna terapija. Centralnu ulogu u lečenju uznapredovalog karcinoma ima hormonska terapija odnosno deprivacija androgena (eng. *androgen deprivation therapy*, ADT) (44, 45). Većina KP osetljiva je na androgene, te tako hirurška ili medikamentozna kastracija, estrogeni i lekovi koji blokiraju androgene receptore igraju važnu ulogu u lečenju diseminovanog KP. Progresija bolesti kod bolesnika na hormonskoj terapiji neizbežno vodi ka razvoju hormonske rezistencije. Za hormonski rezistentne metastatske KP (eng. *castration resistant prostate cancer*, CRPC) primenjuju se citostatska terapija. Nažalost, ovaj vid terapije vrlo često se završava sa suportivnom terapijom i terapijom bola s obzirom na loše prognoze takvih bolesnika (46). Modalitet lečenja osim od stadijuma bolesti, zavisi i od starosne dobi bolesnika kao i od njegovog opšteg stanja (47).

1.3. Molekularno-genetička osnova KP

1.3.1. Molekularno-genetičke studije naslednih formi KP

Različite genetičko-epidemiološke studije (studije blizanaca, studije unutar familija, studije slučajeva i kontrola) ukazuju da geni asocirani sa rizikom za razvoj KP, takozvani geni podložnosti, postoje u populacijama (48).

Najveća do sada, skandinavska studija na monoziotnim i dizigotnim blizancima Hjelmborga i saradnika pokazala je da 58% (95% CI, 52%–63%) rizika za nastanak KP čini genetička komponenta (24). U toj studiji pokazano je da je vreme do postavljanja dijagnoze kod drugog brata kraće kada se radi o monoziotnim blizancima (prosečno 3.8 godina za monoziotni blizanački par, odnosno 6.5 godina za dizigotni blizanački par). Dodatno, Jansson i saradnici utvrdili su da ukoliko jedan od blizanaca ima KP visokog rizika da je mnogo veća verovatnoća kod monoziotnih blizanaca da i drugi brat ima istu tu agresivnu formu KP (OR 3.82 (95% CI, 0.99-16.72) (49). Za braću koji nisu blizanci odnos šansi za takav ishod iznosio je 1.21 (95% CI, 1.04-1.39). Sve ove studije jasno upućuju na heritabilnost i veliki udeo genetike u nastanku i progresiji KP.

U cilju identifikovanja gena uzročnika KP studije vezanosti nasleđivanja (eng. *linkage analysis studies*) sprovedene su na bolesnicima iz visoko-rizičnih porodica u kojima postoji veći broj obolelih članova (50). Patogene varijante koje se identifikuju na takav način obično su retke u populaciji, srednje do visoko penetrabilne unutar tih porodica i imaju veliki efekat na razvoj bolesti. Identifikovanje takvih varijanti ima za cilj uvođenje genetičkog testa koji bi olakšao pružanje genetičkog saveta u takvim porodicama (51). Ove retke genetičke varijante visoke penetrabilnosti doprinose nastanku naslednog KP (26, 51).

Studije vezanosti nasleđivanja dizajniraju se kao studije slučajeva i kontrola gde se statistički upoređuju učestalosti genotipova obolelih i zdravih članova šire porodice i traga se za genetičkim markerima koji su specifični samo za obolele članove porodice. Ukoliko se ustanovi veza odnosno statistička značajnost između nekog lokusa hromozoma i bolesti smatra se da se u tom regionu na hromozomu nalazi verovatni uzročnik. Tako anotirani regioni hromozoma potom se detaljnije ispituju na prisustvo potencijalnih gena uzročnika KP. Ovakvim studijama identifikovani

su brojni lokusi visoke penetrabilnosti specifični za KP. Takođe, identifikovani su i geni na tim lokusima asocirani sa ovim malignitetom. Jedan od prvih gena podložnosti za KP anotiran na ovaj način je *HPC1/RNASEL* (eng. *Prostate Cancer Hereditary 1/ Ribonuclease L*, HPC1/RNASEL) (1q25.3), a potom su otkriveni i geni *HPC8* (eng. *Prostate Cancer Hereditary 8*, HPC8) (1q42.2-q43), *HPCX1* (eng. *Prostate Cancer Hereditary X-Linked 1*, HPCX1) (Xq27-28), *PCBC* (eng. *Prostate Cancer/Brain Cancer Susceptibility*, PCBC) (1p36.12), *HPC3* (eng. *Prostate Cancer Hereditary 3*, HPC3) (20q13), kao i asocijacija intergenskih regiona na 8p i 8q hromozomu (52, 53). U manjem broju studija pokazane su asocijacije sa KP i unutar dodatnih hromozomskih regiona: 3p14, 3p24-26, 5q11-12, 5q35, 6p22.3, 7q32, 8q13, 9q34, 11q22, 15q11, 16q23, 17q21-22, 22q12.3. Ovim genetičkim markerima objašnjava se svega 3-5% slučajeva KP, a neke od primećenih varijacija odlika su samo malog broja porodica sa KP (21, 50, 54).

1.3.2. Molekularno-genetičke studije sporadičnih formi KP

S obzirom da većina dijagnostikovanih KP pripada sporadičnom tipu, drugi pristup istraživanju genetičke osnove KP je sprovođenjem studija genetičke asocijacije na čitavom genomu (eng. *Genome-wide association studies*, GWAS). Na taj način, analizom čitavih genoma velikog broja bolesnika i kontrola, anotiraju se genetičke varijante koje su česte u populaciji, ali imaju nisku penetrabilnost (55).

Još jedan od načina identifikovanja čestih genetičkih varijanti asociranih sa KP je i studija gena-kandidata (56). Ovakve studije zahtevaju prethodno poznavanje procesa neoplastične transformacije tkiva prostate. Geni kandidati biraju se na osnovu njihove uloge u metaboličkim putevima žlezdanih ćelija prostate, njihove uloge u procesima maligne transformacije i njihovog značaja u procesima odgovornim za invaziju i metastaziranje KP (57). Proteinski produkti tih gena učestvuju u putevima androgene signalizacije, kontroli ćelijskog ciklusa i apoptoze, putevima ćelijske adhezije i međućelijske komunikacije (58). Geni kandidati analiziraju se u studijama slučajeva i kontrola na prisustvo genetičkih varijanti niske do srednje penetrabilnosti koje asociraju sa rizikom za razvoj KP-a (26).

1.3.2.1. Studije asocijacije na čitavom genomu (GWAS)

Studije asocijacije na čitavom genomu, za razliku od studija vezanosti, dizajnirane su tako da identifikuju mnogobrojne česte alele u populaciji koji povećavaju rizik za oboljevanje od mnogih kompleksnih bolesti (59). Osnovna premisa GWA studija je da je genetička arhitektura genoma koja dovodi do razvoja multifaktorijskih bolesti kakav je i KP sastavljena od velikog broja lokusa na kojima se nalaze česte genetičke varijante niske penetrabilnosti koje pojedinačno ostvaruju mali efekat (OR 1.3 po jednom rizičnom alelu) (60-62). Procenjuje se da muškarac sa većim brojem takvih rizičnih varijanti ima 5.7 puta povećan rizik od razvoja KP u odnosu na bilo koju drugu mušku osobu iz populacije (60). Genetičke varijante koje se analiziraju u okviru GWA studije imaju učestalost ređeg alela veću od 5%. U ovakvoj studiji ispituje se inicijalno između 1 i 5 miliona tačkastih genetičkih varijanti (eng. *single nucleotide variants*, SNVs) u kojima se upoređuju frekvence raspodela alela i genotipova između velikog broja slučajeva i kontrola (63). Statistički najznačajnije asocijacije proveravaju se u dodatnim studijama. Rezultati prvih GWAS ukazali su da se većina rizičnih varijanti nalazi u takozvanim genskim pustinjama gde nema gena koji kodiraju za proteine (64). Pretpostavlja se da se u takvim regionima nalaze regulatorni elementi koji svoj efekat ostvaruju na susedne proto-onkogene i tumor-supresorske gene. Takođe, sve je više eksperimentalnih dokaza da se u takvim regionima nalaze i brojni geni za RNK (65). Gotovo svi rezultati prvih GWA studija značajno su upućivali na jedan isti hromozomski region asociran sa

rizikom za KP, 8q24 (66-69). Ovi inicijalni nalazi potvrđeni su i u populaciji evropskih Amerikanaca, ali i Amerikanaca afričkog porekla, kao i u populaciji muškaraca sa Islanda i Švedske. U tom regionu dugačkom oko jedne megabaze nalazi se 9 različitih genetičkih varijanti od kojih svaka nezavisno povećava rizik za KP (60, 68). Ove genetičke varijante svoj efekat ostvaruju regulacijom ekspresije susednih gena, od kojih je najznačajniji proto-onkogen *C-MYC* (eng. *MYC Proto-Oncogene, V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog*, MYC) (70). Kasnije, osim regiona 8q24, detektovani su i dodatni regioni hromozoma asocirani sa rizikom za razvoj i progresiju KP: 17q12, 17q24, 10q11, i 19q13 (71-73). U njima se takođe nalaze brojne genetičke varijante koje svoj efekat ostvaruju uticajem na ekspresiju susednih gena, povećavajući rizik od KP-a. Do danas, na ovaj način, identifikovano je i validirano gotovo 170 genetičkih varijanti (GWAS katalog) za koje se procenjuje da obašnjavaju svega oko 28.4% ukupnog rizika za nastanak familijarne forme KP (74, 75). Genetičke varijante identifikovane na ovaj način, odnosno visokorizični paneli SNV u kliničkoj praksi mogli bi poslužiti za lakšu identifikaciju ali i precizniju stratifikaciju bolesnika u grupe na osnovu rizika za progresiju bolesti s obzirom da standardni prognostički parametri KP imaju brojne nedostatke i nisu se pokazali dovoljno senzitivnim za prevazilaženje problema preterane dijagnoze i preteranog lečenja KP (76).

U post-GWAS eri sve su izraženije funkcionalne genetičke studije koje će objasniti tačan mehanizam kojim brojni identifikovani rizični SNV doprinose nastanku i progresiji KP (77). Ono što takođe postaje jasno jeste da su nam neophodna dodatna istraživanja koja bi otkrila preostale SNV kojima bi se objasnilo preostalih gotovo 30% genetičkog udela u heritabilnosti ove bolesti (78).

1.3.2.2. Studije gena kandidata

Čak i pre GWA studija sprovedene su i sprovode se i dalje brojne studije gene kandidata koje za cilj imaju identifikaciju lokusa niske penetrabilnosti kojima bi se mogao objasniti rizik za nastanak familijarne, ali prevashodno i sporadične forme KP (79). Jedan od prvih gena kandidata analiziran na ovaj način bio je gen za androgeni receptor (AR) koji ima centralnu ulogu u funkcionisanju ćelija prostate (80). Dodatno, AR visoko je ekspimiran tokom svih faza karcinogeneze, a njegova povećana ekspresija detektuje se u velikom broju uznapredovalih, agresivnih KP. Nasledne genetičke varijante u genu za AR bile su predmet intenzivnih istraživanja. Mikrosatelitski, trinukleotidni ponovci CAG i GGN koji se nalaze u prvom egzonu gena za AR od početka su bili ispitivani u kontekstu asocijacije sa rizikom za razvoj i progresiju KP. Primećeno je da duži CAG nizovi postoje kod Azijata, dok one manje ekspanzije, sa oko 20 ponovaka, karakterišu pripadnike afroameričke populacije (81). Međutim, iako su inicijalne studije ukazivale na asocijaciju dužine tog poli-glutaminskog niza u AR sa KP, brojne replikativne studije na različitim populacijama nisu potvrdile postojanje takve asocijacije (82, 83). Ni studije genetičke asocijacije GGN niza u genu za AR nisu dovele do konsenzusnog zaključka oko uloge ovog polimorfnog niza u patogenezi KP (84). Kako je put androgne signalizacije od presudnog značaja za razvoj i funkcionisanje epitelnih ćelija tkiva prostate, analizirani su dodatni geni kandidati iz ovog puta prenosa signala. Međusobno suprotstavljeni rezultati dobijeni su i za asocijaciju različitih genetičkih varijanti u genu *SRD5A2* (85). Postoje dve izoforme 5- α reduktaze, a 5- α reduktaza tip II (*SRD5A2*) je glavna aktivna forma u tkivu prostate. Ovaj enzim ireverzibilno prevodi testosteron u dihidrotestosteron koji ima deset puta veći afinitet vezivanja za AR. Iako se veliki broj studija bavio genetičkim varijantama u genu za ovaj enzim, jasna asocijacija sa KP još uvek nije pokazana. Analizirane su i varijante u genima za enzime uključene u biosintezu androgena *CYP17A1* (eng. *Cytochrome P450 Family 17 Subfamily A Member 1*, CYP17A1), *CYP19A1* (eng. *Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1*, CYP19A1), *HSD17B1* (eng. *Hydroxysteroid 17-Beta*

Dehydrogenase 1, HSD17B1), i *HSD3B1* (eng. *3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1*, HSD3B1), ali validacija inicijalno dobijenih rezultata takođe je izostala (86, 87).

Brojne tačkaste genetičke varijante u genima čiji su proteinski produkti uključeni u puteve popravke oštećenja na molekulu DNK, ćelijskom ciklusu i apoptozi analizirane su u kontekstu KP (88). Za varijantu bez smisla SNP309 u genu *MDM2* (eng. *Mouse Double-Minute 2*, *Human Homolog Of P53-Binding Protein*, MDM2) pokazana je asocijacija sa rizikom i za razvoj i za progresiju KP (89). Najviše izučavana tačkasta genetička varijanta u genu *TP53* (eng. *Tumor Protein p53*, *TP53*) je varijanta rs1042522 (p.Arg72Pro) (90). Ova genetička varijanta pokazala se značajnom u populacijama Evropljana. Kada je u pitanju anti-apoptotski protein BCL2 (eng. *B-cell lymphoma 2*, BCL2), za tačkastu genetičku varijantu c.-938C > A u promotoru istoimenog gena inicijalno je utvrđena asocijacija sa rizikom za razvoj KP, bolest-specifičnim preživljavanjem bolesnika kao i biohemijskim relapsom bolesti (91). U studijama gena kandidata analizirane su i genetičke varijante u genima čiji proteinski produkti učestvuju u signalnom putu vitamina D, mehanizmima ćelijske detoksikacije, inflamacije, angiogenezi, ćelijskoj adheziji, ali i one varijante koje utiču na nivo i obrazac ekspresije gena koji kodiraju za duge nekodirajuće RNK i mikroRNK (92-98). Glavni nedostatak ovakvih studija je dobijanje lažno-pozitivnih rezultata, odnosno vrlo česta nemogućnost replikacije prethodno ustanovljenih asocijacija (99).

1.4. Uloga RNK interferencije u patogenezi KP

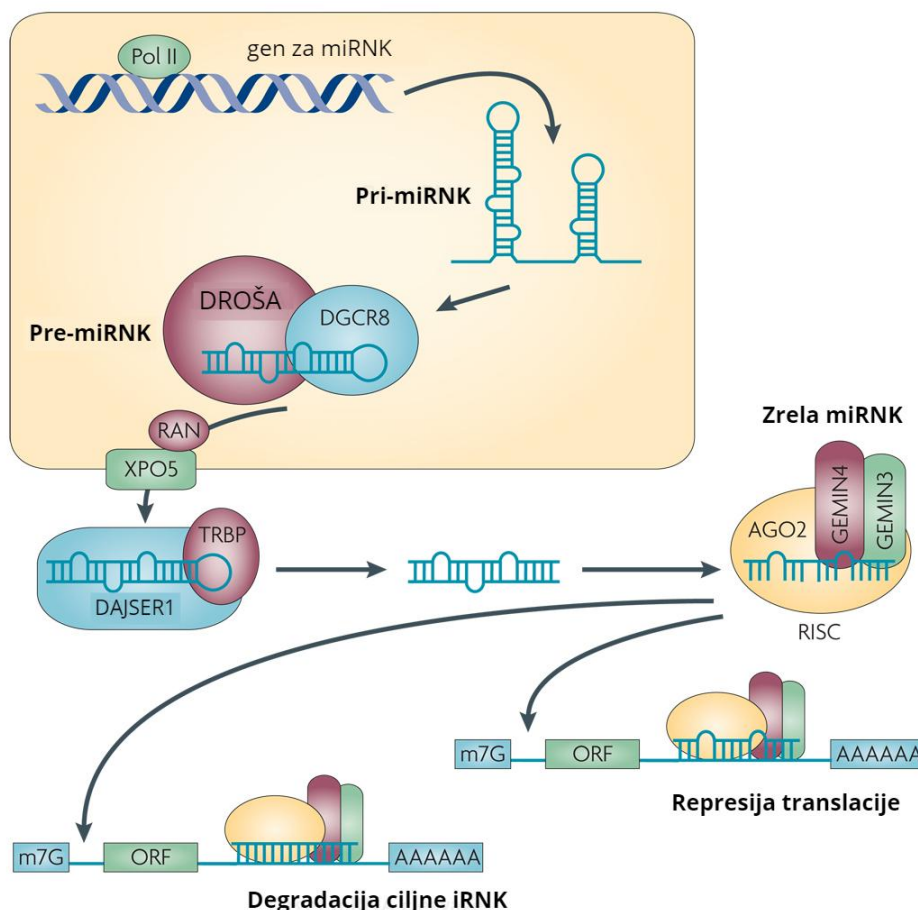
1.4.1. Biogeneza i funkcija mikroRNK

MikroRNK imaju dužinu 21-23 nukleotida i svoje delovanje ostvaruju komplementarnim vezivanjem za regulatorne elemente mikroRNK, (eng. *microRNA regulatory elements*, MRE), takozvane MRE sekvence, koje se najčešće nalaze u 3'UTR-ovima informacionih RNK (iRNK) (100). Znatno manji broj takvih sekvenci postoji u 5'UTR-u, kodirajućim delovima gena i promotorskim sekvencama (101). Svaka iRNK ima veliki broj MRE sekvenci i može biti regulisana od strane velikog broja mikroRNK. Istovremeno, jedna mikroRNK može učestvovati u regulaciji ekspresije većeg broja različitih transkripata. Selekcija ciljnih iRNK, ali i funkcionalna posledica tog vezivanja zavise od stepena komplementarnosti između regiona semena (nukleotidi 2-8) mikroRNK i MRE sekvenci u 3'UTR-u iRNK. U zavisnosti od stepena komplementarnosti sa 3'UTR-om, postoje dva funkcionalna efekta: posttranskripciona regulacija ekspresije koja dovodi do degradacije ciljne iRNK ili represija translacije koja za posledicu obično ima smanjenje nivoa kodiranog proteina. U ređem broju slučajeva primećeno je da mikroRNK mogu stimulisati translaciju (102).

Geni za mikroRNK bivaju transkribovani RNK polimerazom II ili RNK polimerazom III u pri-miRNK dužine nekoliko stotina do nekoliko hiljada nukleotida (Slika 1.4.). Obradu pri-miRNK vrši enzim Droša zajedno sa mikroprocesorskim kompleksom DGCR8/Pasha (eng. *DiGeorge syndrome chromosomal region 8/Pasha*, DGCR8/Pasha) stvarajući na taj način pre-miRNK dužine 70-100 nukleotida. Pre-miRNK nakon toga biva eksportovana iz jedra u citoplazmu uz pomoć proteinskog kompleksa Exportin-5 (XPO5)/Ran-GTP (eng. *Ras-related nuclear protein-GTP*). U citoplazmi pri-miRNK postaje supstrat Rnaza III endonukleaze Dajser koji dalje obrađuje i daje zrele, dvolančanu mikroRNK dužine 21-23 nukleotida. Ovakva mikroRNK stupa u interakciju sa proteinima iz porodice Argonaut (Ago1-4) i proteinima GEMIN3 (eng. *Gem Nuclear Organelle Associated Protein 3*, GEMIN3) i GEMIN4 (eng. *Gem Nuclear Organelle Associated Protein 4*, GEMIN4), a selektovanjem lanca-vodiča nastaje mikroRNK-indukujući utišavajući kompleks (eng. *miRNA-induced silencing complex*, miRISC) koji prepoznaje ciljne transkripte i reguliše nivo njihove ekspresije u procesu koji se naziva RNK interferencija (103, 104).

U ćelijama prisustvo mikoRNK detektovano je u hrapavom endoplazmatičnom retikulumu (hER), Goldzi kompleksima, P telima, stres granulama, endozomima, multivezikularnim telima, lizozomima, mitohondrijama i jedru (101).

Na kraju, pokazano je da su poremećaji u strukturi i funkciji mikroRNK uključeni u procese neoplastične transformacije brojnih ćelija i tkiva u telu čoveka (105). Poslednjih godina postala je takođe jasno da značajna grupa mikroRNK koje se nazivaju epi-mikroRNK učestvuju u regulaciji gena čiji su proteinski produkti uključeni u epigenetičke mehanizme transkripcionog utišavanja sa implikacijom na procese maligne transformacije tkiva uključujući i tkivo prostate (106).



Slika 1.4. Biogeneza i funkcija mikroRNK. RNK polimeraza II (Pol II) transkribuje primarnu transkript mikroRNK (pri-miRNK) dužine od 500-3000 nukleotida. Ona se dalje obrađuje uz pomoć multiproteinskog kompleksa Droša-DGCR8 i nastaje prekursorska mikroRNK dužine od 60-100 nukleotida (pre-miRNK). Eksportom u citoplazmu pre-miRNK postaje supstrat enzima Dajser čijom obradom nastaje zrela mikroRNK dužine 21-23 nukleotida. Zrela mikroRNK stupa u interakciju sa proteinima iz familije Argonaut (Ago 2) i proteinima GEMIN3 i GEMIN4. Selektovanjem lanca-vodiča nastaje mikroRNK-utišavajući kompleks (miRISC) koji u najvećem broju slučajeva dovodi ili do degradacije ili do translacione represije iRNK sa kojima stupa u interakciju (Modifikovano iz Ryan et al., 2010.) (97).

1.4.2. MikroRNK i KP

Brojni su dokazi o ulozi mikroRNK u patogenezi KP (107). MikroRNK su male nekodirajuće, dvolančane RNK za koje se danas procenjuje da posttranskripciono, fenomenom RNK interferencije, regulišu ekspresiju gotovo 60% ljudskih gena (108). Ove male nekodirajuće RNK učestvuju kako u regulaciji ekspresije gena za AR tako i u regulaciji ekspresije brojnih drugih gena iz puta androgene signalizacije (109). Pored toga, ove male RNK kontrolišu ćelijski ciklus, programiranu ćelijsku smrt, ali i epitelno-mezenhimalnu tranziciju, ključni događaj u procesima invazije KP (110). Takođe je pokazano da su mirkoRNK uključene u sve korake formiranja metastaza (111). MikroRNK, vezujući se komplementarno za 3'UTR velikog broja iRNK, učestvuju u procesu neoplastične transformacije. One mikroRNK koje utišavaju ekspresiju gena za onkogene proteine definišu se kao tumor-supresorske, i obrnuto, one mikroRNK koje utišavaju ekspresiju gena za tumor-supresorske proteine definišu se kao onkogene mikroRNK (112). Veliki je broj eksperimentalnih dokaza o poremećenju ekspresiji brojnih tumor-supresorskih i onkogenih mikroRNK u brojnim malignim tumorima uključujući i KP (113). Uloga onkogenih i tumor-supresorskih mikroRNK u patogenezi KP data je Tabelama 1.2 i 1.3 (114). To je razlog što se mikroRNK danas smatraju ključnim nekodirajućim molekulima RNK uključenih u procese neoplastične transformacije (115). Pored toga, poslednja istraživanja pokazuju i da se profil ekspresije mikroRNK razlikuje u zavisnosti od starosne dobi bolesnika sa KP (116). S obzirom na ključnu ulogu koju ostvaruju u procesu neoplastične transformacije žlezdanog epitela prostate, mikroRNK su se nametnule kao dobri geni-kandidati za izučavanje molekularne osnove KP.

Tabela 1.2. Uloga onkogenih mikroRNK u KP

mikoRNK	Uloga u procesima
miR-21	Invazije tumora
miR-221/miR-222	Ćelijske proliferacije i invazije
miR-141	Razvoju androgen rezistentih formi KP
miR-375	Ranoj detekciji KP
miR-18a, miR-106/miR-25	Progresije KP
miR-4534	Neoplasične transformacije ćelija <i>in vitro</i>
miR-650	Inhibicije ćelijskog odgovora na stres
miR-32, miR-125b	Inhibicije apoptoze i aktivacija proliferacije ćelija

Tabela 1.3. Uloga tumor-supresorskih mikroRNK u KP

mikroRNK	Uloga u procesima
miR-34a	G1 zastoja, apoptoze, inhibicije ćelijske proliferacije i invazije ćelija
miR-145, miR-224	Inhibicije invazije i migracije ćelija KP
miR-452	Regulacije ćelijskog ciklusa, ćelijske adhezije i pokretljivosti
miR-200b	Inhibicije ćeljskog rasta i invazije
miR-382, miR-372, has-miR-135-a-1	Inhibicije ćelijske proliferacije, migracije i invazije
miR-17-92a	Regulacije ćelijskog ciklusa i ekspresije mezenhimalnih markera
miR-27	Supresije MAP2K4 u ćelijama KP
miR-204-5p	Indukcije apoptoze
miR-30a	Inhibicije ekspresije proteina ciklina E2
miR-133/miR-146a	Inhibicije progresije KP
Let-7	Regulacije ćelijskog ciklusa, migracije i proliferacije ćelija i epitelno-mezenhimalne tranzicije

Pored bazičnih istaživanja uloge mikroRNK u patogenezi KP i njihove primene u dijagnostici i praćenju bolesnika, poslednjih godina pažnja naučne javnosti je usmerena i na primeni u lečenju KP. Pre svega to se odnosi na strategije utišavanja onkogenih mikroRNK i aktiviranja tumor-supresorskih RNK. Trenutno se istražuje efekat antisens oligonukleotida i sintetskih mikroRNK (eng. *miRNA mimics*), dugih nekodirajućih RNK kao molekularnih sundera za mikroRNK i malih molekula inhibitora RNK na utišavanje ekspresije onkogenih mikroRNK (114).

1.4.2.1. SNV u genima za mikroRNK

Do danas je identifikovano 2654 zrelih mikroRNK u ćelijama čoveka (117). Geni za mikroRNK mogu biti organizovani u klastere, iako se velika većina gena nalazi u intergenskim regionima. Takođe, mogu se nalaziti u intronima drugih gena, ponovljenim sekvencama, UTR-ovima, ali i kodirajućim delovima gena domaćina (*geni unutar gena*) (118). Procenjuje se da se polovina gena za mikroRNK nalazi u fragilnim mestima ili regionima genoma asociiranim sa malignim bolestima (119). Do povećane ekspresije nekih mikroRNK može doći amplifikacijama gena za mikroRNK, dok do utišavanja njihove ekspresije može doći kao posledica delecije regiona u kojem se nalaze njihovi geni, epigenetičkog utišavanja ili poremećajima u procesima njihove biogeneze i aktivnosti (120). MikroRNK predstavljaju idealne gene-kandidate za rasvetljavanje genetičke osnove nastanka velikog broja sporadičnih KP s obzirom da male promene u nivou njihove ekspresije imaju ogromne posledice po regulaciju ekspresije brojnih gena. Postoje dva scenarija po kojima genetičke varijante u genima za mikroRNK učestvuju u nastanku karcinoma: varijante koje kreiraju događaj sticanja nove funkcije (eng. *gain-of function event*) i varijante koje dovode do gubitka prethodne funkcije (eng. *loss-of function event*). Prvi scenario se odnosi na inhibiciju ekspresije ili narušavanje funkcije tumor-supresorskih mikroRNK, dok drugi scenario podrazumeva suprotne efekte na aktivnost onkogenih mikroRNK (121).

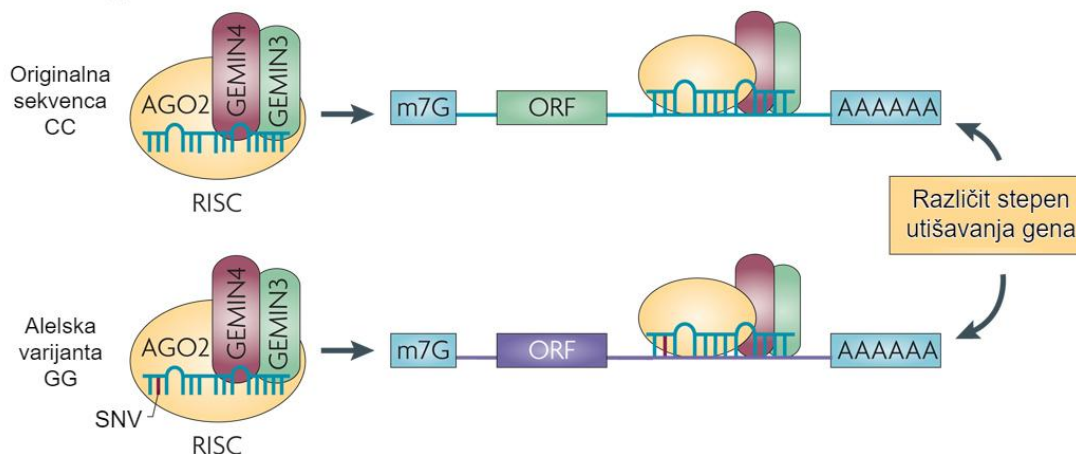
SNV u genima za mikroRNK ostvaruju svoje efekte na tri načina uticajem na: nivoe transkripcije (genetičke varijante u primarnim mikroRNK, genetičke varijante u regulatornim regionima transkripcije i genima uključenim u biogenezu mikroRNK); način obrade primarnih- (pri-miRNK) i prekusorskih mikroRNK (pre-miRNK) (genetičke varijante u pri-, pre-miRNK ili genima uključenim u biogenezu zrelih mikroRNK sa posledičnim efektom na funkcionalnost utišavajućeg kompleksa); i prepoznavanje i vezivanje mikroRNK i iRNK (genetičke varijante u regionu semena zrele mikroRNK ili u mestima vezivanja mikroRNK u molekulu iRNK) (105, 122).

Genetičke varijante u genima za proteine uključene u obradu mikroRNK mogu uticati kako na nivo ekspresije tih proteina tako i na efikasnost utišavanja posredstvom miRISC kompleksa. Pokazano je da brojne SNV u genima za *GEMIN4* (eng. *Gem Nuclear Organelle-Associated Protein 4*, GEMIN4), *GEMIN3* (eng. *Dead/H BOX 20*, DDX20 ili GEMIN3), *XPO5* (eng. *Exportin 5*, XPO5), *AGO1* (eng. *Argonaute 1, Risc Catalytic Component*, AGO1), *AGO2* (eng. *Argonaute 2, Risc Catalytic Component*, AGO2), *TRBP* (eng. *TAR RNA-Binding Protein 2*, TARBP2 ili TRBP) i *RAN* (eng. *Ras-Related Nuclear Protein*, RAN) asociiraju sa malignim oboljenjima (123).

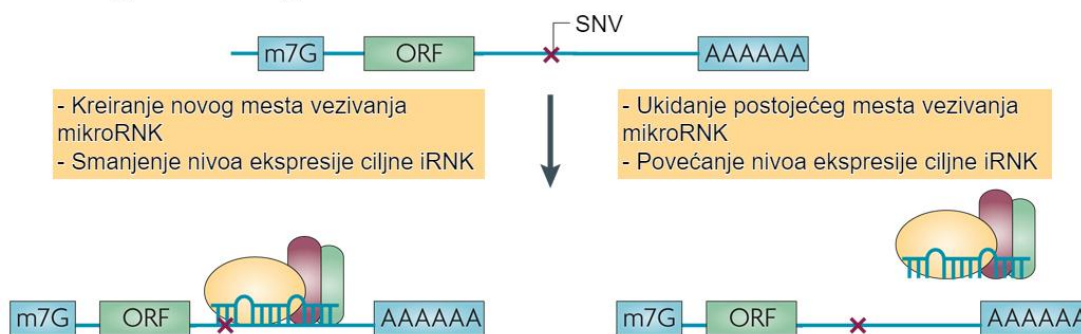
Genetičke varijante u genima za mikroRNK mogu na više nivoa biti uključene u molekularne puteve patogeneze karcinoma. Varijante u pri-/pre-miRNK mogu imati posledice na stabilnost i efikasnost obrade primarnih i prekusorskih transkripata. Genetičke varijante u promotorskim i regulatornim elementima utiču na nivo transkripcije, dok SNV u sekvenci zrele mikroRNK, pogotovu ako se ona nalazi u regionu semena, mogu imati uticaj na odabir kao i efikasnost utišavanja ciljnih gena (Slika 1.4.) (105, 124).

U odnosu na sekvence pri-, pre- i zrelih mikroRNK, SNV u 3'UTR-ovima ciljnih kodirajućih gena najzastupljenija su vrsta alteracija u putu mikroRNK, sa ograničenijim aspektom efekata. Tačkaste genetičke varijante u mestima vezivanja mikroRNK imaju efekat samo na iRNK u kojima se nalaze. Dve su vrste posledica do kojih može dovesti prisustvo genetičkih varijanti u mestima vezivanja mikroRNK: ove varijante mogu stabilisati ili destabilisati interakcije molekula mikroRNK i iRNK i dodatno, ove genetičke varijante mogu ili kreirati novo mesto vezivanja za neku mikroRNK ili ukinuti već postojeće mesto vezivanja (Slika 1.5.) (125). Do danas postoje brojni dokazi o ulozi genetičkih varijanti u mestima vezivanja mikroRNK u patogenezi bolesti čoveka. To se odnosi i na maligne bolesti uključujući i KP (126, 127).

SNV u regionu semena miRNK



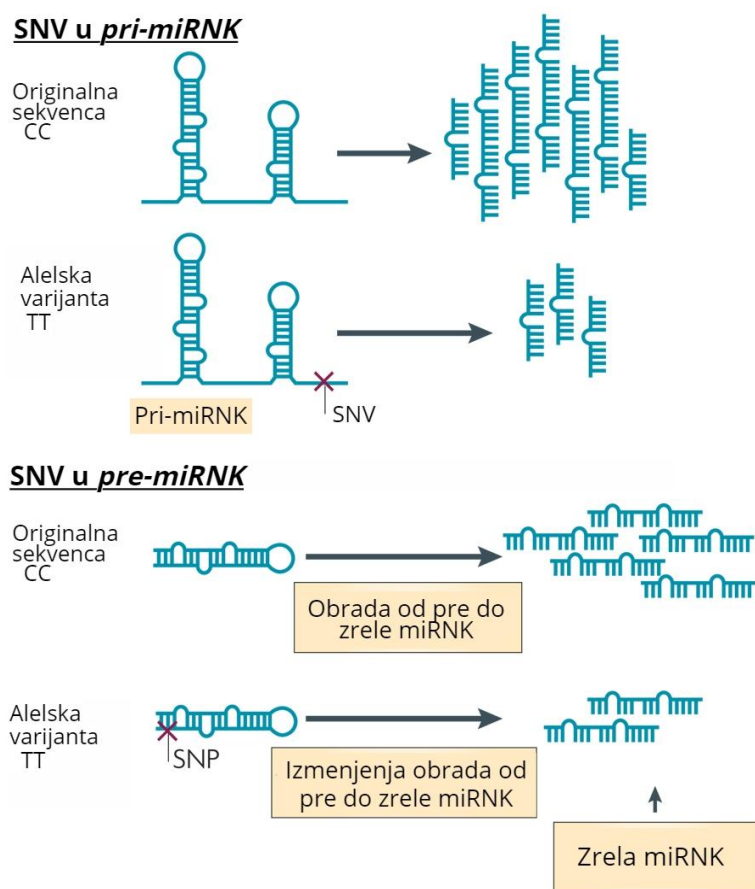
SNV u regulatornim regionima miRNK



Slika 1.5. Funkcija SNV u regionu semena zrele mikroRNK i u mestima vezivanja mikroRNK. Tačkaste genetičke varijante u regionu semena mikroRNK mogu pojačati ili oslabiti vezu između mikroRNK i ciljne iRNK i na taj način ostvariti uticaj na efikasnost utišavanja. SNV u mestima vezivanja mikroRNK mogu kreirati nova ili ukinuti postojeća mesta vezivanja za mikroRNK sa posledičnim uticajem na nivo ekspresije ciljne iRNK (Modifikovano iz Ryan et al., 2010.) (97).

Do danas, brojne studije upućuju da je funkcionalna posledica SNV u pri-mikroRNK uticaj na obradu i nivo zrele mikroRNK sintetisane sa tog primarnog transkripta (Slika 1.6.). U određenom broju studija SNV u genima za pri-miRNK asociirane su sa nekim malignim bolestima kao što su hepatocelularni karcinom, karcinom želuca, hronična limfocitna leukemija (128) . SNV rs531564 u genu za *pri-miR-124-1* povećavala je rizik za razvoj karcinoma bešike, dok je varijanta rs213210 u *pri-miR-219* asociirala sa rizikom za razvoj karcinoma jednjaka (129, 130). Studije slučajeva i kontrola takođe su doprinele razotkrivanju asocijacija SNV u pre-miRNK i riziku za razvoj malignih tumora (131). U nekoliko istraživanja pokazano je da SNV u tom region utiče na

nivo sintetisane zrele mikroRNK sa prekursorskog transkripta (Slika 1.6.). Postoje i primeri da SNV u regionu petlje pre-miRNK utiče na sazrevanje mikroRNK. Za genetičku varijantu rs895819 u regionu petlje pre-miR-27a pretpostavljeno je da menja afinitet vezivanja proteina Drosha i da na taj način dovodi do smanjenja niva zrele miR-27a (132).



Slika 1.6. Funkcionalne posledice genetičkih varijanti u pri-/pre-mikroRNK na sazrevanje mikroRNK. SNV u genima za pri-mikroRNK i pre-mikroRNK mogu imati uticaj na obradu mikroRNK i uticati na nivo zrele mikroRNK sa tih transkripata (Modifikovano iz Ryan et al., 2010.) (97).

Jedne od prvih studija koje su se bavile ovim genetičkim varijantama u genima za mikroRNK sprovedene su u populacijama azijskog porekla. SNV u genima za *hsa-miR-146a*, *hsa-miR-196a2* i *hsa-miR499* dale su međusobno suprotstavljene rezultate o asocijaciji tih genetički varijanti sa rizikom za razvoj KP (133-135). Nešto kasnije, ustanovljena je asocijacija SNV rs895819 u genu za *miR-27a* sa rizikom za razvoj, ali i metastaziranje KP (135). Za *miR-27a* pokazano je da stimuliše androgenu signalizaciju, a dodatno da je i sama regulisana androgenima (135). Od tada, sve je više eksperimentalnih dokaza da genetičke varijante u genima za mikroRNK i putu RNK interferencije predstavljaju izvor novih, dodatnih markera za procenu rizika i progresije KP (127). Na osnovu dosadašnjih ispitivanja za pretpostaviti je da studije slučajeva i kontrola, kao i studije na različitim grupama bolesnika sa KP (eng. *case-only studies*) mogu pomoći u identifikaciji novih SNV iz puta mikroRNK. Anotacija i validacija većeg broja takvih genetičkih varijanti mogla bi poslužiti konstrukciji algoritma koji bi olakšao identifikaciju i selekciju bolesnika sa KP u grupe na osnovu rizika za progresiju bolesti i time poboljšao terapijske pristupe u dijagnostici i lečenju KP (125).

Dosadašnjim analizama u populaciji Srbije bile su obuhvaćene varijante u genima za mikroRNK koje utiču na sekvencu zrelih molekula ili pre-mikroRNK, kao i potencijalno funkcionalne varijante u genima koji kodiraju komponente utišavajućeg kompleksa (135-137). S obzirom na to da su rezultati navedene analize ukazali na asocijaciju ispitivanih varijanti sa rizikom za razvoj i/ili progresiju KP, dalji koraci u ispitivanju značaja varijanti vezanih za aktivnost mikroRNK bili bi bazirani na ispitivanju dodatnih varijanti sa drugim funkcionalnim svojstvima. Stoga, u okviru ove doktorske disertacije biće ispitivan uticaj potencijalno funkcionalnih genetičkih varijanti u regulatornim regionima gena za mikroRNK i/ili u pri-mikroRNK, kao i u mestima vezivanja mikroRNK u okviru ciljnih iRNK.

1.4.2.2. Potencijalno funkcionalne genetičke varijante u regulatornim regionima gena za mikroRNK i KP

Dosadašnjih podataka o potencijalnoj asocijaciji varijanti u regulatornim regionima gena *MIR34B*, *MIR34C*, *MIR143*, *MIR145* i *MIR378* sa rizikom za razvoj i progresiju KP ima relativno malo. Analiza asocijacije varijante rs4938723 u regulatornom regionu gena *MIR34B* i *MIR34C* sa rizikom za razvoj KP i progresiju KP sprovedena je samo u populaciji Irana (138). Ova genetička varijanta koja se nalazi u regulatornom regionu *pri-miR-34b/c* prethodno je asociirana sa rizikom za razvoj cervikalnog karcinoma, hepatocelularnog karcinoma, dečije akutne limfoblastne leukemije, karcinomom želuca, kao i skvamoznim karcinomom jednjaka (139).

MiR-143 i miR-145 smatraju se tumor-supresorskim mikroRNK, a njihov snižen nivo ekspresije zabeležen je u karcinomu želuca, karcinomu mokraćne bešike, kolorektalnom karcinomu, ali i KP (140-142). SNV koje potencijalno menjaju nivo ekspresije njihovih prekursora ispitivane su u brojnim malignitetima. Genetička varijanta rs4705342 u regulatornom regionu *pri-miR-143/145* prethodno je asociirana sa rizikom za razvoj i progresiju KP samo u populaciji Kine (143). Za genetičku varijantu rs1076064 u potencijalnom regulatornom regionu i/ili primarnom transkriptu miR-378 pokazana je asocijacija sa rizikom za razvoj različitih malignih tumora čoveka (144). Međutim, ova verovatno funkcionalna genetička varijanta nije analizirana u smislu potencijalne asocijacije sa KP.

Ispitivanje genetičkih varijanti rs4938723 i rs4705342 u okviru ove teze pomoći će u rasvetljavanju njihovog efekta na rizik za razvoj i progresiju KP u populaciji evropskog porekla dok će efekti genetičke varijante rs1076064 po prvi put biti ispitana u kontekstu KP.

1.4.2.3. Genetičke varijante u mestima vezivanja mikroRNK i KP

Genetičke varijante sa potencijalnim funkcionalnim značajem su i SNV u mestima vezivanja mikroRNK. U najvećoj do sada sprovedenoj studiji koja je za predmet imala analizu preko 2,169 varijanti ovog tipa sa rizikom za razvoj i progresiju KP na uzorku od 22 301 bolesnika i 22 320 kontrola evropskog porekla, ukupno 22 tačkaste genetičke varijante u mestima vezivanja mikroRNK asociirale su sa rizikom za KP (127). Najznačajnija razlika u distribuciji genotipova između agresivne i neagresivne forme KP primećena je za genetičku varijantu rs1058205 u genu *KLK3* (eng. *Kalikrein Related Peptidase 3*, *KLK3*) i genetičku varijantu rs1010 u genu *VAMP8* (eng. *Vesicle Associated Membrane Protein 8*, *VAMP8*). Te dve varijante takođe su bile i funkcionalno okarakterisane, otkrivajući da SNV rs1058205 u genu *KLK3* kreira novo mesto vezivanja za miR-3162-5p, dok miR-370-5p stiče veći afinitet vezivanja ukoliko se u genu *VAMP8* nalazi alel A genetičke varijante rs1010. Ista grupa autora takođe je pokazala da genetička varijanta rs4245739 u genu *MDM4* (eng. *MDM4 Regulator of p53*, *MDM4*) asociira sa rizikom za KP na

sličan način, kreirajući nova mesta vezivanja za više različitih mikroRNK (145). Upotrebom luciferaznih genskih eseja, pokazano je da miR-191-5p i miR-887 imaju veći afinitet vezivanja za alel C genetičke varijante rs4245739 implicirajući mehanizam kojim je netargetovani, češće zastupljeni alel A asociran sa povećanim rizikom za KP (145).

Gen *KLK3* kodira prostata specifični antigen (PSA), člana velike porodice serinskih proteaza, široko primenjen biomarker u skriningu i praćenju progresije bolesti (146). I pre studije Stegemana i saradnika, genetičke varijante u genu *KLK3* bile su kandidati za studije slučajeva i kontrola (127).

Genetička varijanta rs1058205 u 3'-UTR ovog gena koji se nalazi na hromozomskom lokusu 19q13.33 prethodno je asocirana na sniženim vrednostima PSA u serumu bolesnika afroameričke i švedske populacije (147, 148). Iako je sve veći broj međusobno suprotstavljenih rezultata, u nekim populacijama primećeno je da rs1058205 snižava rizik za razvoj KP (149, 150).

Genetička varijanta rs1010 koja se nalazi u 3'-UTR-u gena *VAMP8*, a za koju je u studiji Stegemana i saradnika pokazana snažna asocijacija sa agresivnošću KP, nije prethodno analizirana na drugim karcinomima (127). Iako značaj proteina *VAMP8* nije u potpunosti rasvetljen u KP, ovaj protein eksprimira se u ćelijama žlezdanog epitela prostate (151). Poznata je međutim njegova uloga u metabolizmu glukoze što ga i čini jednim od gena kandidata za izučavanje procesa kancerogeneze (152). Pored tih, postoje i eksperimentalni dokazi da *VAMP8* protein ima ulogu u sprečavanju razvoja metastaza kod bolesnika sa karcinomom pluća (153).

Onkogen *MDM4* negativno reguliše ekspresiju gena *TP53*, ali i mnoge druge tumor-supresorske gene u brojnim malignitetima. To je razlog što je genetička varijanta rs4245739 gena *MDM4* asocirana sa brojnim karcinomima uključujući karcinom ovarijuma, karcinom dojke, sitnoćelijski karcinom pluća kao i skvamozni karcinom jednjaka (154-157). U meta-analizi Xu-a i saradnika, varijanta rs4245739 A>C smanjivala je ukupni rizik za razvoj karcinoma, pogotovo među pripadnicima azijske populacije (158). Sa druge strane, meta-analiza jedne istraživačke grupe iz Norveške za rezultat je imala zaključak da genetička varijanta rs4245739 snižava rizik za razvoj karcinoma dojke, dok sa karcinomom pluća, kolona i prostate nije pokazana značajnu asocijaciju (159).

Imajući u vidu funkcionalni značaj miRSNP-ova i njihov veliki potencijal da postanu dijagnostički i prognostički biomarkeri KP, kao i međusobno suprotstavljene rezultate kada je reč o uticaju genetičkih varijanti rs1058205 i rs4245739 na rizik za razvoj i progresiju KP u različitim populacijama, još jedan od ciljeva ove teze je ispitivanje njihovog uticaja na rizik za razvoj i progresiju KP kod bolesnika iz populacije Srbije. S obzirom da je ograničen broj studija genetičke asocijacije koje su ispitivale uticaj ove dve genetičke varijante, rezultati ove doktorske disertacije mogli bi poslužiti boljem razumevanju njihove uloge u jednoj od populacija evropskog porekla. Budući da je za genetičku varijantu rs1010 pokazana asocijacija sa rizikom za razvoj, a posebno rizikom za invazivnost tumora prostate samo u jednoj studiji (127), cilj rada u okviru ove teze je i razjašnjenje njenog uticaja na rizik za razvoj i progresiju KP kod bolesnika iz naše populacije. Fokusirajući se na efekte genetičkih varijanti u mestima vezivanja mikroRNK na proces RNK interferencije i mehanizam neoplastične transformacije, cilj je ispitati da li odabrane SNV predstavljaju potencijalan izvor bioloških markera KP.

2. Ciljevi rada

1. Ispitati moguću asocijaciju potencijalno funkcionalnih genetičkih varijanti u regulatornim regionima gena *hsa-miR-34b/c* (rs4938723), *hsa-miR-378* (rs1076064), *hsa-miR-143/145* (rs4705342) sa rizikom za razvoj KP.
2. Ispitati moguću asocijaciju potencijalno funkcionalnih genetičkih varijanti u regulatornim regionima gena *hsa-miR-34b/c* (rs4938723), *hsa-miR-378* (rs1076064), *hsa-miR-143/145* (rs4705342) sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP.
3. Ispitati moguću asocijaciju potencijalno funkcionalnih genetičkih varijanti u regulatornim regionima gena *hsa-miR-34b/c* (rs4938723), *hsa-miR-378* (rs1076064), *hsa-miR-143/145* (rs4705342) sa rizikom za progresiju KP.
4. Ispitati moguću asocijaciju genetičkih varijanti u genima *KLK3* (rs1058205), *VAMP8* (rs1010) i *MDM4* (rs4245739), a koje menjaju mesta vezivanja mikroRNK, sa rizikom za razvoj KP.
5. Ispitati moguću asocijaciju genetičkih varijanti u genima *KLK3* (rs1058205), *VAMP8* (rs1010) i *MDM4* (rs4245739), a koje menjaju mesta vezivanja mikroRNK, sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP.
6. Ispitati moguću asocijaciju genetičkih varijanti u genima *KLK3* (rs1058205), *VAMP8* (rs1010) i *MDM4* (rs4245739), a koje menjaju mesta vezivanja mikroRNK, sa rizikom za progresiju KP.

3. Materijal i metode

3.1. Materijal

Ova teza rađena je na kolekcijama periferne krvi kao i DNK uzoraka Centra za humanu molekularnu genetiku, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Kolekciju uzoraka sačinjavali su bolesnici lečeni u periodu od 2008. do 2013. u Kliničkom centru „Dr Dragiša Mišović Dedinje“ i Kliničko bolničkom centru „Zvezdara“. Sva istraživanja u okviru ove teze sprovedena su uz prethodno odobrenje Etičkih odbora pomenutih medicinskih institucija (18-5309/29 i 01-1907/17), uz pisani informisani pristanak svih bolesnika kao i u skladu sa deklaracijom iz Helsinkija iz 1975. godine. Ova doktorska teza je rađena u okviru naučnog projekta osnovnih istraživanja “Analiza promena u strukturi genoma kao dijagnostički i prognostički parametar humanih bolesti“ (OI173016) koji je bio finansirani od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

U ovoj doktorskoj disertaciji studije genetičkih asocijacija sprovedene su na ukupno 1083 uzorka. Grupu bolesnika sa KP sačinjavalo je 355 bolesnika, dok je u grupi sa BPH bilo njih 358. Kontrolnu grupu sačinjavalo je 370 zdravih muškaraca, u istoj životnoj dobi, bez znakova bolesti prostate. Dijagnostika bolesti prostate vršena je standardnim kliničkim pregledom od strane urologa koji je podrazumevao digitorektalni pregled (DRE) i transrektalnu ultrasonografiju (TRUS) prostate. Vršene su i dodatne dijagnostičke procedure od strane radiologa (scintigrafija i radiografija kostiju) u cilju detekcije metastaza koštanog tkiva. Laboratorijski, serumske vrednosti prostata-specifičnog antigena (PSA) određivane su monoklonskim imunoesejom *Hybritech* metodom. Nakon histopatološke analize biopsiranog tkiva prostate od strane patologa, bolesnici su svrstavani u grupu bolesnika sa KP i u grupu bolesnika sa BPH. TNM sistem klasifikacije je korišćen za određivanje kliničkog stadijuma bolesnika sa KP, dok je za određivanje biološkog potencijala tumora korišćen Glisonov skor. Patohistološki stadijum bolesti određivan je na hirurški odstranjenom tkivu prostate svetlomikroskopskom analizom od strane patologa.

3.2. Metode

3.2.1. Selekcija bolesnika sa KP u grupe sa različitim rizikom za progresiju bolesti

Na osnovu vrednosti standardnih prognostičkih parametara prilikom uspostavljanja kliničke i patohistološke dijagnoze bolesnici sa KP su dalje svrstavani u grupe sa različitim rizikom za progresiju bolesti. Prvo je vršena selekcija bolesnika prema vrednostima pojedinačnih prognostičkih parametara prema sledećem obrascu: serumske vrednosti PSA ($PSA < 10$ ng/ml; 10 ng/ml \leq PSA \leq 20 ng/ml; PSA $>$ 20 ng/ml), Glison skora (GS $<$ 7; GS = 7; GS $>$ 7) i T kliničkog stadijuma (T1; T2; T3/T4). Nakon toga prema preporukama Evropske asocijacije urologa (eng. *European Association of Urologists*, EAU) bolesnici sa KP selektovani su tri grupe. Prvu grupu, grupu niskog rizika (eng. *low-risc group*) sačinjavali su bolesnici sa vrednostima PSA $<$ 10 ng/ml, GS $<$ 7 i T kliničkim stadijumom T₁-T_{2a} (160). Drugu grupu, grupu srednjeg rizika za progresiju (eng. *intermediate-risc group*) sačinjavali su bolesnici sa sledećim vrednostima: PSA 10-20 ng/ml, GS=7 ili T klinički stadijum T_{2b}-T_{2c}. U grupi visokog rizika (eng. *high-risc group*) bili su bolesnici sa vrednostima PSA $>$ 20 ng/ml, GS $>$ 7 i T kliničkim stadijumima T₃/T₄ (160). U treću grupu, bez obzira na vrednosti standardnih prognostičkih parametara, svrstavani su i svi bolesnici sa dijagnostikovanim prisustvom udaljenih metastaza.

3.2.2. Izolovanje genomske DNK iz pune periferne krvi

Izolovanje genomske DNK iz pune periferne krvi vršeno je uz pomoć komercijalno dostupnih setova za izolaciju *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (*Qiagen*, Nemačka) i *Blood DNA Isolation Mini Kit* (*Norgen Biotek Corp.*, Kanada) prema uputstvima proizvođača.

Protokol za izolovanje DNK iz krvi korišćenjem seta QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Nemačka):

- U ependorf tubu zapremine 1,5 ml pipetirano je po 10 µl QIAGEN proteinaze, 300 µl uzorka periferne krvi i 300 µl pufera AL;
- Smeša je vorteksovana 15 sekundi (s), a potom inkubirana 60 minuta (min) u vodenom kupatilu na temperaturi od 56°C;
- Smeša je kratko centrifugirana do 2000 obrtaja u minuti (rpm) (*Heraeus™ Megafuge™ 8 Benchtop, rotor MicroClic 30x2 Fixed Angle, Heraeus*, Nemačka);
- Dodavano je 300µl 96-100% etanola i smeša je vorteksovana 15 s, a zatim kratko opet centrifugirana (do 2000 rpm);
- Sadržaj ependorf epruvete nanet je na kolonu sa silika-membranom, smeštenoj u kolektorskoj tubi;
- Vršeno je centrifugiranje na 8000 rpm/1 min;
- Kolektorska tuba sa filtratom je odbacivana, a kolona je smeštena u novu kolektorsku tubu;
- Dodavano je 500µl pufera AW1 i smeša je centrifugirana na 8000 rpm/1 min.
- Kolektorska tuba sa filtratom je odbacivana, a kolona je smeštena u novu kolektorsku tubu;
- Dodavano je 500 µl pufera AW2 i smeša je centrifugirana na 13000 rpm/3 min.
- Kolektorska tuba sa filtratom je odbacivana, a kolona je smeštena u novu ependorf epruvetu zapremine 1,5 ml;
- Dodavano je 200µl dejonizovane vode, i smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 20 min, a zatim centrifugirana na 13000 rpm/1 min;
- Eluirani uzorci DNK čuvni su na temperaturi od +4°C ili -20°C.

Protokol izolovanja DNK iz krvi uz pomoć komercijalnog seta Blood DNA Isolation Mini Kit (Norgen Biotek Corp., Canada):

- U ependorf tubu zapremine 1,5 ml pipetirano je po 20 µl NORGEN proteinaze, 300 µl uzorka periferne krvi i 300 µl *Lysis buffer B*;
- Smeša je vorteksovana 15 s, a potom inkubirana 60 min u vodenom kupatilu na temperaturi od 56°C;
- Smeša je kratko centrifugirana do 2000 rpm (*Heraeus™ Megafuge™ 8 Benchtop, rotor MicroClic 30x2 Fixed Angle, Heraeus*, Nemačka);
- Dodavano je 110µl 96-100% etanola i smeša je vorteksovana 15 s, a zatim kratko opet centrifugirana (do 2000 rpm);
- Sadržaj ependorf epruvete nanet je na kolonu sa silika-membranom, smeštenoj u kolektorskoj tubi;
- Vršeno je centrifugiranje na 8000 rpm/1 min;
- Kolektorska tuba sa filtratom je odbacivana, a kolona je smeštena u novu kolektorsku tubu;
- Dodavano je 500µl pufera WN i smeša je centrifugirana na 8000 rpm/1 min.
- Kolektorska tuba sa filtratom je odbacivana, a kolona je smeštena u novu kolektorsku tubu;
- Dodavano je 500 µl pufera *Wash Solution A* i smeša je centrifugirana na 13000 rpm/1 min.
- Kolektorska tuba sa filtratom je odbacivana, a kolona je smeštena u novu kolektorsku tubu;
- Dodavano je 500 µl pufera *Wash Solution A* i smeša je centrifugirana na 13000 rpm/3 min.

- Kolektorska tuba sa filtratom je odbacivana, a kolona je smeštena u novu ependorf epruvetu zapremine 1,5 ml;
- Dodavano je 200 μ l dejonizovane vode, i smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 20 min, a zatim centrifugirana na 13000 rpm/1 min;
- Eluirani uzorci DNK čuvni su na temperaturi od +4°C ili -20°C.

3.2.3. Provera kvaliteta izolovane DNK

Kvalitet izolovane genomske DNK proveravan je agaroznom gel elektroforezom (161). U tu svrhu korišćen je 0.8% agarozni gel napravljen u 0.5xTBE puferu (0.045 M Tris-borat, 0.001 EDTA, pH=8.0) i bojen rastvorom etidijum-bromida (EtBr) tako da je njegova finalna koncentracija u rastvoru bila 0.5 μ g/ml. Elektroforeza je takođe izvođena u 0.5xTBE puferu, a kao pufer za nalivanje uzoraka korišćen je 0.25% bromfenol-plavo, 0.25% ksilen-cijanol i 30% glicerol.

0.8% rastvor agaroze (*Serva*, Nemačka) zagrevan je postepeno do ključanja dok rastvor nije postao potpuno bistar. Nakon dodavanja 5 μ l EtBr rastvor je hlađen do temperature ~60°C. Takav rastvor izliven je u kadicu za elektroforezu i ostavljen da polimeriše na sobnoj temperaturi. Nakon toga, po 5 μ l uzorka pomešanog sa 1 μ l pufera za nalivanje nalivano je na gel. Elektroforeza je vršena u 0.5xTBE pri konstantnom naponu od 100V u trajanju od 10 minuta u sistemu za elektroforezu *Wide Mini-Sub® Cell GT (BioRad, SAD)*. Po završetku, gel je izlagan UV svetlu ($\lambda=254$ nm) na transiluminatoru (*Transilluminator, Vilber Lourmat, Francuska*) i fotografisan.

3.2.4. Kriterijumi za odabir genetičkih varijanti u potencijalnim regulatornim regionima gena za mikroRNK i/ili regionima koji kodiraju pri-mikroRNK

Genetičke varijante u potencijalnim regulatornim regionima gena za mikroRNK i/ili regionima koji kodiraju pri-mikroRNK odabrane za studiju slučajeva i kontrola morale su ispunjavati minimum tri od pet navedenih kriterijuma:

1. Prethodno analizirana asocijacija sa KP u drugim populacijama;
2. Utvrđena asocijacija sa rizikom za razvoj i/ili progresiju drugih malignih tumora čoveka;
3. Postojanje eksperimentalnih dokaza o njihovom efektu na nivo transkripcije primarnih miRNK u malignom tkivu ili ćelijskim linijama drugih karcinoma;
4. Utvrđen značaj promena u primarnoj strukturi gena i/ili nivoa ekspresije mikroRNK u procesma neoplastične transformacije tkiva prostate;
5. Učestalost manje zastupljenog alela veća od 5% u evropskim populacijama.

Za razliku od njih, izabrane genetičke varijante u mestima vezivanja mikroRNK morale su da ispunjavaju sledeća dva kriterijuma:

1. Prethodna asocijacija sa rizikom za razvoj i progresiju KP u barem jednoj studiji gena kandidata;
2. Da alelske varijante tih gena imaju efekat na efikasnost vezivanja mikroRNK koji je potvrđen u ćelijskim linijama karcinoma prostate.

3.2.5. Genotipizacija odabranih genetičkih varijanti u genima *MIR34B*, *MIR34C*, *MIR378*, *MIR143*, *MIR145* kao i genima *KLK3*, *VAMP8*, *MDM4*

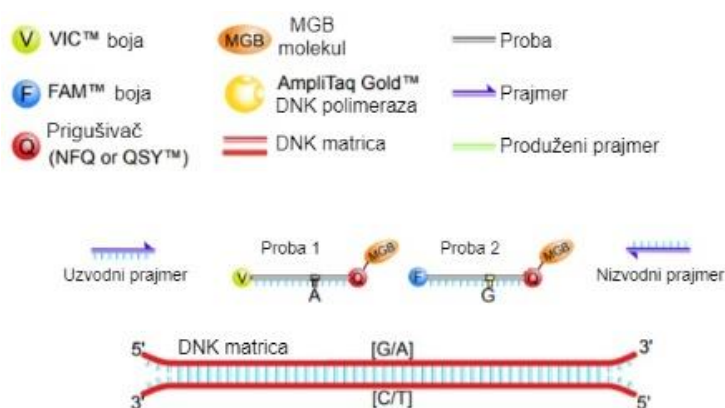
Genotipizacija tačkastih genetičkih varijanti rs4938723, rs1076064, rs4705342 u genima *MIR34B*, *MIR34C*, *MIR378*, *MIR143*, *MIR145*, kao i SNV rs1058205, rs1010 i rs4245739 u genima

KLK3, *VAMP8* i *MDM4*, redom, vršena je uz pomoć Taqman® Eseja za genotipizaciju tačkastih genetičkih varijanti (*Applied Biosystems, Foster City, California, SAD*) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. TaqMan eseji korišćeni za genotipizaciju odabranih genetičkih varijanti

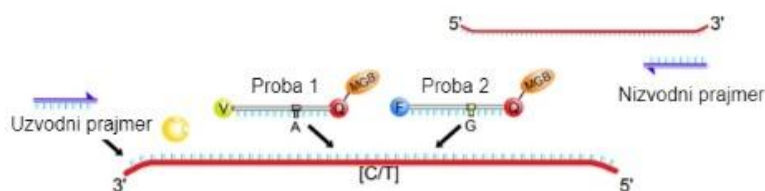
Genetička varijanta / Gen	TaqMan esej (<i>Applied Biosystems, SAD</i>)
rs4938723 / <i>hsa-miR-34b/c</i>	C__3081610_10
rs1076064 / <i>hsa-miR-378</i>	C__918673_10
rs4705342 / <i>hsa-miR-143/145</i>	C__28015723_20
rs1058205 / <i>KLK3</i>	C__8705590_10
rs1010 / <i>VAMP8</i>	C__2091644_20
rs4245739 / <i>MDM4</i>	C__11623776_10

TaqMan eseji za genotipizaciju tačkastih genetičkih varijanti nazivaju se i 5'-nukleazni eseji. Takav naziv potiče od 5'-3' egzokleazne aktivnosti polimeraze koja se koristi za izvođenje PCR reakcija. DNK polimeraza svojim 5'-nukleaznim domenom ima sposobnost da hidrolizuje nizvodne oligonukleotidne lance koji su komplementarno sparni sa matricom. Drugi ključni element svakog TaqMan eseja za genotipizaciju zasniva se na fenomenu prenosa fluorescentne rezonancione energije (eng. *fluorescence resonance energy transfer, FRET*). FRET je prenos kvanta energije sa mesta apsorpcije na mesto iskorišćenja u molekulu bez emitovanja zračenja, kroz rezonantnu interakciju između hromofora, bez donorsko akceptorskih kinetičkih sudara. Donor je hromofora koja početno apsorbira energiju, dok je akceptor molekul na koji se zatim prenosi energija. Kada je molekul donora u ekscitovanom stanju dolazi do rezonantnog prenosa energije ka akceptoru koji se nalazi u neposrednoj blizini. U većini slučajeva donor i akceptor su različito obojeni molekuli i tada se FRET može detektovati po slabljenju emisije donora. Emitovanje fluorescencije akceptora može se u potpunosti sprečiti fenomenom FRET-a ukoliko se u neposrednoj blizini fluorescentno obeleženog reporterskog molekula nalazi drugi molekul koji je označen kao prigušivač. Reporterski molekul ima višu energiju emisije i kraću talasnu dužinu u poređenju sa prigušivačem. Kada su reporter i prigušivač u neposrednoj blizini, dolazi do prenosa i pada energije sa višeg na niži energetski nivo i posledično do prigušenja signala. Ukoliko se reporter i prigušivač ne nalaze u neposrednoj blizini, efekat FRET-a biva onemogućen i tada reporterski molekul nesmetano emituje svoju energiju zračenja (162). 5'-nukleazni eseji za genotipizaciju sastoje se od jednog para prajmera i dve TaqMan probe obeležene različitim reporterskim molekulima (Slika 3.1).

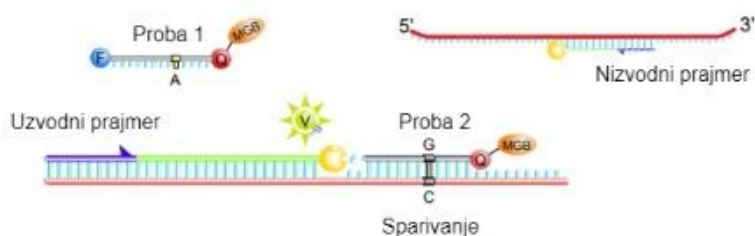


Slika 3.1. TaqMan eseji za genotipizaciju sastoje se od para prajmera i dve različite probe, specifične za različite alelske varijante određene SNV. TaqMan probe različito su obeležene. Jedna proba obeležena je Vic florescentnom bojom, a druga Fam bojom. (Slika preuzeta i modifikovana sa URL: https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0009593_TaqManSNP_UG.pdf.)

TaqMan probe za genotipizaciju razlikuju se međusobno i u sekvenci ali samo u jednom nukleotidu. Jedan proba specifična je za učestaliju alelsku varijantu, dok je druga proba specifična za drugi, ređe učestalu alelsku varijantu selektovane genetičke varijante. Pre početka PCR reakcije, obe probe su intaktne, reporterski molekuli se nalaze u blizini prigušivača i zbog fenomena FRET-a ne dolazi do emisije fluorescencije i očitavanja signala. Tokom reakcije PCR-a prajmeri se vezuju komplementarno za DNK matricu, a vezivanje adekvatne probe zavisi od prisutnog genotipa te matrice (Slika 3.2). DNK polimeraza vrši elongaciju prajmera uzvodno od mesta vezivanja probe. Kada DNK polimeraza stigne do mesta gde se nalazi komplementarno vezana TaqMan proba za matricu, ona svojom 5'-3'-nukleaznom aktivnošću vrši njenu hidrolizu (Slika 3.3). U tom koraku dolazi do odvajanja reportera od prigušivača i emisije fluorescencije reporterskog molekula. Korak hidrolize probe dešava se u svakom ciklusu PCR-a, a nivo fluorescencije poreklom od reporterskog molekula hidrolizovanih proba eksponencijalno raste (163). Korelacija između detektovane fluorescencije i genotipa matrice prikazana je u Tabeli 3.2.



Slika 3.2. Prajmeri i probe se vezuju za matricu na način specifičan od sekvence. (Slika preuzeta i modifikovana sa URL: https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0009593_TaqManSNP_UG.pdf).



Slika 3.3. Polimeraza započinje elongaciju prajmera, a kada stigne to TaqMan probe koja je komplementarno vezana za matricu dolazi do hidrolize probe. Reporterski molekul hidrolizovane TaqMan probe se oslobađa od prigušivača i dolazi do emisije, a potom i detekcije signala. (Slika preuzeta i modifikovana sa URL: https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0009593_TaqManSNP_UG.pdf).

Tabela 3.2. Korelacija između fluorescentnog signala i genotipa uzorka

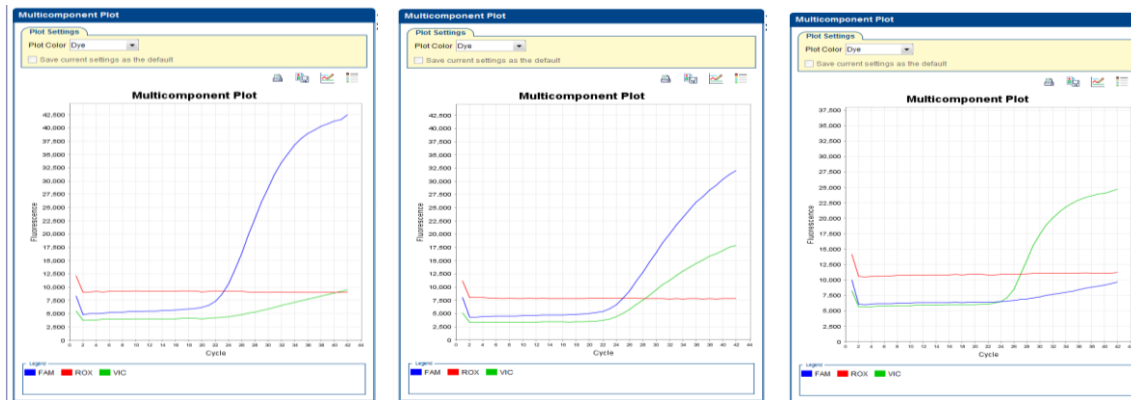
Fluorescentni signal	Detektovani genotip
VIC™ signal	Homozigot za Alel 1
FAM™ signal	Homozigot za Alel 2
VIC™ i FAM™ signali	Heterozigot Alel 1-Alel 2

PCR reakcije za sve selektovane genetičke varijante izvođene su na plejtovima od 96 bunarića (*MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate*, Applied Biosystems, SAD) prekrivanim optičkim prijanjajućim folijama (*MicroAmp® Optical Adhesive Film*, Applied Biosystems, SAD) u *StepOnePlus™ Real-Time PCR* mašini (Applied Biosystems, SAD). Reakciona smeša za alelsku diskriminaciju svakog uzorka pripremana je prema uputstvu proizvođača u finalnoj zapremini od 6 µl. Sastav reakcione smeše prikazan je u Tabeli 3.3.

Tabela 3.3. Sastav reakcione smeše za alelsku diskriminaciju TaqMan probama

Komponenta	Osnovna koncentracija	Finalna koncentracija	Zapremina u reakcionoj smeši
FastGene®Probe 2 x qPCR Universal Mix	40 x	1 x	2.45 µl
SNP Genotyping Assay	/	/	0.12 µl
Rox fluorescentna boja	50 µM	30 nM	0.03 µl
Voda bez nukleaza (Qiagen, Nemačka)	/	/	2.40 µl
Genomska DNK	/	/	1µl (2-50 ng)

Sve reakcije genotipizacije odvijale su se prema sledećem temperaturnom profilu u *StepOnePlus™ Real-Time PCR mašini*: očitavanje početnog nivoa fluorescencije (eng. *pre-read*) vršeno je na 60°C u trajanju od 30 s, potom je sledila faza PCR reakcije (eng. *read*) gde je aparat beležio fluorescenciju reporterskih boja hidrolizovanih TaqMan proba i na kraju, po završenoj PCR reakciji, vršeno je očitavanje fluorescencije (eng. *post-read*) na temperaturi od 60°C u trajanju od 30 s. Oduzimanjem fluorescencija pre i posle početka PCR reakcije aparat je automatski beležio nivo fluorescencije poreklom od same PCR reakcije. Reakcija PCR sastojala se iz koraka inicijalne denaturacije od 2 min na 95°C, a potom je sledilo 40 ciklusa u kojima su se menjivale faze denaturacije trajanja 5 s na 95°C i jedinstven korak na 60°C u trajanju od 30 min u kojem su se odvijale hibridizacija, elognacija i hidroliza TaqMan proba. Nakon faza *pre-read-a*, *read-a* i *post-read-a* aparat je automatski dodeljivao adekvatan genotip svakom od uzoraka. Na osnovu uvida u krive amplifikacije bilo je moguće i manuelno odrediti genotipove nekih od uzoraka. Za svaki pojedinačni uzorak, aparat je generisao takozvani multikomponentni plot (Slika 3.4) gde se na *X-osi* nalazio broj ciklusa, a na *Y-osi* nivo fluorescencije. Za homozigotnu genetičku varijantu kriva amplifikacije imala je značajan porast na talasnoj dužini koja je odgovarala reporterskoj fluoroboji jedne od korišćenih TaqMan proba. Ukoliko je bio detektovan heterozigotni nosilac za određenu genetičku varijantu, na amplifikacionom plotu pojavljivale su se dve krive umnožavanja, svaka talasne dužine odgovarajućeg reporterskog molekula iz para TaqMan probi. Dobijeni rezultati genotipizacije prikazivani su i tabelarno, ali i uz pomoć alelskog diskriminativnog plota.



Slika 3.4. Izgled multikomponentnih plotova za uzorke različitih genotipova. Krive amplifikacije homozigotnih genetičkih varijanti imaju porast fluorescencije na talasnoj dužini koja odgovara reporterskoj hromofori jedne TaqMan probe. Heterozigotna genetička varijanta (slika u sredini) poseduje dve amplifikacijske krive poreklom od reporterskih hromofora obe TaqMan probe. Crvena linija predstavlja pasivnu referencu (Rox fluorescentna boja).

3.2.6. Statistička obrada dobijenih rezultata

Prvi korak prilikom statističke obrade dobijenih rezultata bio je provera prisustva Hardi Vajnbergove ravnoteže (eng. *Hardy Weinberg equilibrium*, HWE) kojom se utvrđuje genetička struktura odnosno ispravnost selekcije različitih grupa ispitanika i tačnost rezultata odabrane metode genotipizacije. Provera prisustva HWE izvršena je u kontrolnoj grupi. U tu svrhu korišćen je adekvatni egzaktni test u okviru statističkog programa SNPStats (*Catalan Institute of Oncology, Barcelona, Španija*) (164).

Nakon provere HWE u sve tri grupe ispitanika, usledila je analiza genetičke asocijacije odabranih genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj KP. Poređenje učestalosti alela i raspodele genotipova u grupama bolesnika sa KP, bolesnika sa BPH i kontrolnoj grupi za svaku analiziranu genetičku varijantu zasnivalo se na primeni logističke regresije, pri čemu su svi rezultati bili podešeni za razlike u starosti bolesnika i kontrola. Sprovedeno je 6 različitih nezavisnih testiranja. Učestalosti raspodele genotipova svake genetičke varijante ponaosob poređene su istovremeno u po dve različite grupe: grupama bolesnika sa KP i BPH, grupi bolesnika sa KP i kontrolnoj grupi, kao i u grupi bolesnika sa BPH i kontrolnoj grupi. Kao mera asocijacije određenog alela ili genotipa sa rizikom za razvoj KP korišćen je odnos šansi (eng. *odds ratio*, OR) sa intervalom poverenja od 95% (CI 95%). Odnos šansi je veličina koja ukazuje na to koliko je veća verovatnoća da osoba sa određenim alelom ili genotipom razvije KP u odnosu na bilo koji drugu osobu koja taj alel ili genotip ne poseduje. Kao prag statističke značajnosti korišćena je P vrednost od 0.05.

Za odabrane genetičke varijante potom je testirana asocijacija sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara, kao i sa rizikom za progresiju bolesti. Asocijacija genetičke varijante sa rizikom za progresiju bolesti analizirana je u različitim grupama bolesnika svrstavanih u grupe na osnovu vrednosti standardnih prognostičkih parametara, a prema preporukama EAU. Učestalosti alela i raspodele genotipova svake selektovane genetičke varijante poređene su u sledećim grupama: bolesnici niskog rizika vs. bolesnici srednjeg rizika, bolesnici niskog rizika vs. bolesnici visokog rizika i bolesnici srednjeg rizika vs. bolesnici visokog rizika. I testovi asocijacije odabranih genetičkih varijanti sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara i rizikom za progresiju KP takođe su bili zasnovani na primeni logističke regresije. Dobijeni rezultati podešeni su za razlike

u starosti bolesnika u grupama koje se porede. Dobijeni rezultati analizirani su u statističkom programu SNPStats (*Catalan Institute of Oncology, Barcelona, Španija*).

Prilikom procene asocijacije odabranih genetičkih varijanti sa rizicima za razvoj i progresiju KP, kao i vrednostima standardnih prognostičkih parametara korišćeni su različiti genetički modeli: kodominantni, recesivni, dominantni, overdominantni i log-aditivni (165). Za procenu genetičkog modela koji najbolje odgovara uočenim razlikama u raspodelama genotipova između bolesnika sa KP i kontrolnih grupa, kao i između različitih grupa bolesnika korišćen je Akaike informacioni kriterijum (eng. *Akaike information criteria, AIC*). Prema tom kriterijumu, za najadekvatniji genetički model smatran je onaj za koji je dobijana najmanja vrednost AIC skora. Ukoliko je razlika između dve najmanje vrednosti AIC skora u datom testu bila manja od 2, smatralo se da je svaki od genetičkih modela potencijalno adekvatan (166).

4. Rezultati

4.1. Rezultati selekcije bolesnika na osnovu vrednosti standardnih prognostičkih parametara KP i rizika za progresiju bolesti

U okviru ove teze analizirano je ukupno 355 uzoraka DNK bolesnika sa KP, 358 uzoraka DNK bolesnika sa BPH i 370 uzoraka DNK muškaraca iz opšte populacije Srbije koji su činili kontrolnu grupu. Prosečna starost bolesnika sa KP iznosila je 69 godina, bolesnika sa BPH 68 godina i dva meseca, dok je prosečna starost u kontrolnoj grupi iznosila 68 godina i deset meseci. Na osnovu vrednosti standardnih prognostičkih parametara, a prema preporukama EAU, bolesnici sa KP svrstavani su u tri grupe u zavisnosti od serumske vrednosti PSA, zbirnog GS i kliničkog stadijuma bolesti prema TNM sistemu. Nakon klasifikacije bolesnika, ustanovljeno je da najveći broj njih, 42.9%, ima serumske vrednosti PSA iznad 20 ng/ml, da 53.8% bolesnika ima zbirni GS 6, a 24% zbirni GS 7 dok je T klinički stadijum T₂ ustanovljen kod ukupno 55% bolesnika sa KP. Prisustvo udaljenih metastaza dijagnostikovano je kod 16% bolesnika uključenih u ovu studiju.

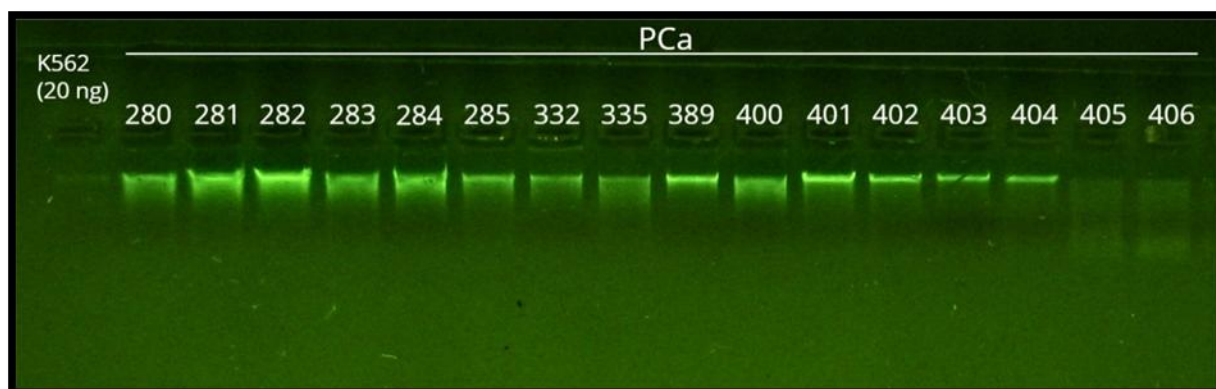
Tabela 4.1. Klasifikacija bolesnika sa KP na osnovu vrednosti standardnih prognostičkih parametara, prisustva udaljenih metastaza i rizika za progresiju bolesti

Standardni prognostički parametri	Bolesnici sa KP n (%)
PSA pri dijagnozi	
<10 ng/ml	100 (28.4)
10-20 ng/ml	101 (28.7)
>20 ng/ml	151 (42.9)
Glison skor	
GS < 7	207 (60.5)
GS=7	82 (24)
GS > 7	53 (15.5)
TNM klinički stadijum	
T1	49 (15.9)
T2	170 (55)
T3/T4	90 (29.1)
Metastaze	
Udaljene (M+)	51 (15.8)
Regionalne (N+) ili nisu detektovane	271 (84.2)
Rizik za progresiju bolesti (EAU 2014.)	
Nizak	22 (6.6)
Srednji	115 (34.3)
Visok	198 (59.1)

Dodatno, na osnovu vrednosti standardnih prognostički parametara bolesnici su podeljeni u tri grupe prema riziku za progresiju bolesti. Pridržavajući se kriterijuma koje preporučuje EAU (ref), bolesnici su podeljeni u grupu niskog, srednjeg i visokog rizika za progresiju KP. Na taj način, za gotovo 60% bolesnika procenjeno je da imaju agresivniju formu, odnosno poseduju visok rizik za progresiju bolesti.

4.2. Rezultati provere kvaliteta izolovane genomske DNK elektroforezom u agaroznom gelu

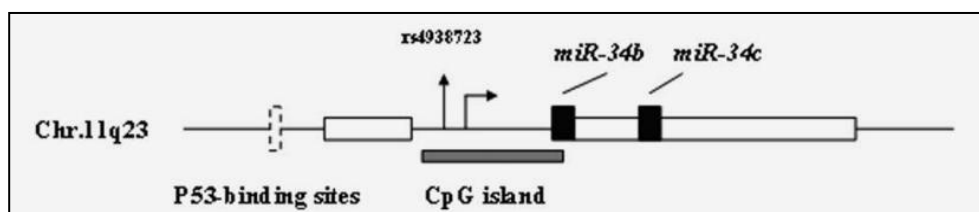
Kvalitet izolovane genomske DNK proveravan je agaroznom gel elektroforezom na 0.8% gelu sa EtBr. Prisustvo diskretnih traka na gelu ukazivalo je na nativnu genomsku DNK, dok je razmaz (eng. *smear*) upućivao na delimičnu degradaciju izolovane DNK. Osim provere kvaliteta, proveravana je i relativna koncentracija izolovanih DNK. Nalivanjem standardna za količinu K562 u prvi bunar na gelu denzitometrijski bilo je moguće utvrditi da je većina izolata imala koncentraciju veću od 4 ng/μl.



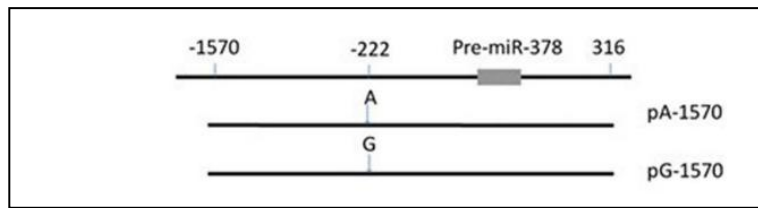
Slika 4.1. Provera izolacije i koncentracije izolovane genomske DNK bolesnika sa KP i bolesnika sa BPH agaroznom gel elektroforezom na 0.8% gelu bojenom EtBr. (K562 (20ng) – standard za količinu, koncentracije 10ng/μl. Brojevima od 280 do 335 označeni su KP, dok uzorci DNK BPH imaju oznake od 389 do 406; i PCa – karcinom prostate)

4.3. Rezultati odabira genetičkih varijanti u genima za mikroRNK i genima *KLK3*, *VAMP8* i *MDM4*

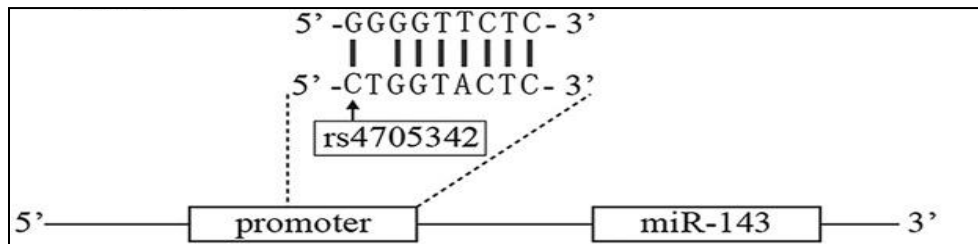
Na osnovu prethodno definisanih kriterijuma (*vidi odeljak 3.2.4 u poglavlju Materijal i metode*), u okviru ove doktorske disertacije odabrano je šest genetičkih varijanti za dalju studiju. Pozicija genetički varijanti u potencijalnim regulatornim regionima gena *hsa-miR-34b/c*, *hsa-miR-378* i *hsa-miR-143/145* prikazane su na Slikama 4.2, 4.3 i 4.4. Genetička varijanta rs4938723 T>C nalazi se u potencijalnom promotorskom regionu pri-miR-34b/c 423 bp uzvodno od mesta početka transkripcije (167). Genetička varijanta rs1076064 locirana je 222bp uzvodno od regiona koji kodira za pre-miR-378, u intronu gena *PPARGC1B* (eng. *PPARG coactivator 1 beta*, *PPARGC1B*) (168, 169), a genetička varijanta rs4705342 nalazi se uzvodno od regiona koji kodira za pre-miR-143 i pre-miR-145 i potencijalno utiče na nivo transkripcije i/ili obradu pri-miR-143/145 (170).



Slika 4.2. Pozicija genetičke varijante rs4938723 u potencijalnom regulatornom regionu genu *MIR34B* i *MIR34C*. (Slika preuzeta i modifikovana iz Xu et al., 2011) (167).



Slika 4.3. Pozicija genetičke varijante rs1076064 u potencijalnom regulatornom regionu i/ili primarnom transkriptu gena MIR378. (Slika preuzeta i modifikovana iz An et al., 2014) (168).



Slika 4.4. Pozicija genetičke varijante rs4705342 u potencijalnom regulatornom regionu i/ili primarnom transkriptu klastera gena *MIR143* i *MIR145*. (Slika preuzeta i modifikovana iz Yin et al., 2018.) (170)

Kada je reč o genetičkim varijantama u 3'-netranslatirajućim regionima gena *KLK3*, *VAMP8* i *MDM4*, njihov eksperimentalno potvrđeni funkcionalni efekat, odnosno mikroRNK molekuli na čije vezivanje utiču njihove alelske varijante prikazane su u Tabeli 4.2. Dodatno, proteinski produkti kodirani ovim genima predstavljaju važne učesnike u održavanju tkivne homeostaze prostate.

Tabela 4.2. Varijante u genima *KLK3*, *VAMP8* i *MDM4* koje menjaju mesta vezivanja mikroRNK

Gen	Genetička varijanta	mikroRNK
<i>KLK3</i>	rs1058205	miR-3162-5p
<i>VAMP8</i>	rs1010	miR-370-5p
<i>MDM4</i>	rs4245739	miR-191-5p, miR-887 i miR-3669

4.4. Rezultati genotipizacije genetičkih varijanti u genima za mikroRNK i genima *KLK3*, *VAMP8* i *MDM4*

Rezultati genotipizacije genetičkih varijanti rs4938723, rs1076064 i rs4705342 u genima za mikroRNK i genetičkih varijanti rs1058205, rs1010 i rs4245739 u genima *KLK3*, *VAMP8* i *MDM4* upotrebom TaqMan eseja za genotipizaciju (*Applied Biosystems*, SAD) prikazani su tabelarno i u vidu grafikona. U tabelarnom prikazu prikazane su normalizovane vrednosti intenziteta fluorescencije za oba alela kao i odgovarajući genotip uzorka određen automatski ili u manjem broju slučajeva i manuelno, poređenjem krivi amplifikacija sa izgledom i intenzitetom fluorescencije u kontrolnim uzorcima (Slika 4.5).

Na grafičkom prikazu vidi se prikaz rezultata sa celog plejta sa tri odvojena klastera u kojima su grupisani uzorci odgovarajućeg genotipa. U slučaju genetičke varijante rs4938723 plavim

krugovima prikazani su svi uzorci koji su homozigoti za alel T čiji je intenzitet fluorescencije prikazan na Y-osi, crvenim krugovima svi uzorci koji su homozigoti za alel C čiji je intenzitet fluorescencije dat na X-osi, dok su zelenim krugovima predstavljeni heterozigoti za tu genetičku varijantu. Na sličan način, za genetičku varijantu rs1076064, na alelskom plotu prikazano grupisanje uzoraka na osnovu prisutnih genotipova. Za tu genetičku varijantu, intenzitet fluorescencije alela G prikazan je na Y-osi, dok se na X-osi nalazi intenzitet fluorescencije alela A. Plavim krugovima grafički su prikazani uzorci koji su homozigotni za alel G, crvenim krugovima homozigoti za alela A, dok su heterozigoti AG predstavljeni takođe zelenim krugovima (Slika 4.6). Za SNV rs4705342, rs1058205 i rs1010 plavim krugovima prikazani su homozigoti za alel T čiji se intenziteti fluorescencije nalaze na Y-osi, crvenim krugovima predstavljeni su uzorci sve tri genetičke varijante koji su homozigoti za alel C čiji je intenzitet fluorescencije dat na X-osi, dok su zelenim krugovima prikazani heterozigotni uzorci tih genetičkih varijanti. Kada je reč o grafičkom prikazu rezultata genotipizacije za genetičku varijantu rs4245739, intenzitet fluorescencije alela C prikazan je na Y-osi, dok se na X-osi nalazi intenzitet fluorescencije alela A. Svi uzorci koji su homozigoti za alel C ove genetičke varijante prikazani su plavim krugovima. Crvenim krugovima predstavljeni su homozigoti za alel A, dok su heterozigotni nosioci predstavljeni zelenim krugovima (Slika 4.6).

Za potrebe testiranja asocijacije genetičkih varijanti u genima za mikroRNK i genetičkih varijanti u genima *KLK3*, *VAMP8* i *MDM4* sa rizikom za razvoj i progresiju KP genotipizovane su kompletne kolekcije bolesnika sa KP, bolesnika sa BPH, kao i svi uzorci iz kontrolne grupe. Rezultati genotipizacije, kao i procentualna zastupljenost svakog genotipa za ove tri genetičke varijante kod bolesnika sa KP i BPH, ali i u kontrolnoj grupi prikazani su tabelarno (Tabela 4.3, Tabela 4.4).

Tabela 4.3. Rezultati genotipizacije genetičkih varijanti u genima za mikroRNK

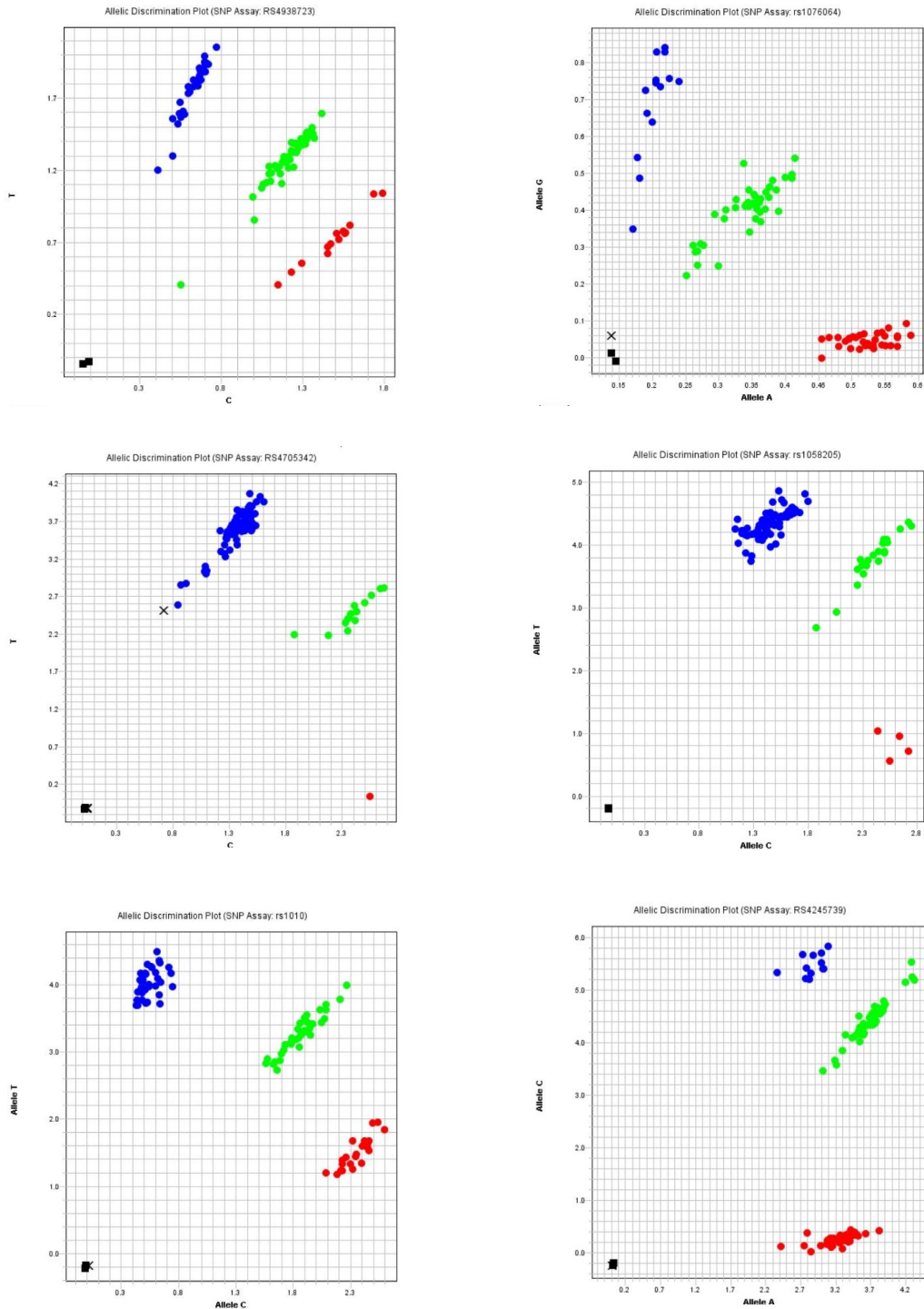
SNV	Genotip	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj kontrola (%)	Broj bolesnika sa BPH (%)
rs4938723	TT	129 (37.4)	138 (39.5)	134 (38.4)
	TC	169 (49)	164 (47)	170 (48.7)
	CC	47 (13.6)	47 (13.5)	45 (12.9)
rs1076064	AA	135 (38.9)	125 (35.4)	127 (36.1)
	AG	152 (43.8)	179 (50.7)	166 (47.2)
	GG	60 (17.3)	49 (13.9)	59 (16.8)
rs4705342	TT	280 (80.9)	276 (78.2)	290 (82.6)
	TC	61 (17.6)	71 (20.1)	61 (17.4)
	CC	5 (1.4)	6 (1.7)	0 (0)

Tabela 4.4. Rezultati genotipizacije genetičkih varijanti u genima *KLK3*, *VAMP8* i *MDM4*

SNV	Genotip	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj zdravih kontrola (%)	Broj bolesnika sa BPH (%)
rs1058205	TT	249 (70.3)	262 (70.8)	265 (74.2)
	CT	95 (26.8)	93 (25.1)	81 (22.7)
	CC	10 (2.8)	15 (4)	11 (3.1)
rs1010	TT	124 (34.9)	119 (32.7)	118 (33.1)
	CT	161 (45.4)	184 (50.5)	184 (51.7)
	CC	70 (19.7)	61 (16.8)	54 (15.2)
rs4245739	AA	198 (56.2)	182 (51)	204 (57.3)
	AC	131 (37.2)	144 (40.3)	122 (34.3)
	CC	23 (6.5)	31 (8.7)	30 (8.4)

Well	Sample	SNP Assay	Task	Allele 1 ΔRn	Allele 2 ΔRn	Call	Quality Threshold	Call Type
A1		RS4938723	NTC	-0.033	-0.1048	NTC	1	Auto
A2		RS4938723	NTC	-0.0679	-0.1182	NTC	1	Auto
A3	PCa598	RS4938723	UNKNOWN	0.5312	1.5919	T/T	0.9975	Auto
A4	PCa599	RS4938723	UNKNOWN	1.1228	1.2368	C/T	0.9988	Auto
A5	PCa600	RS4938723	UNKNOWN	0.6499	1.9155	T/T	0.9988	Auto
A6	PCa601	RS4938723	UNKNOWN	1.3498	1.4463	C/T	0.9952	Auto
A7	PCa602	RS4938723	UNKNOWN	1.2408	1.3489	C/T	0.9996	Auto
A8	PCa603	RS4938723	UNKNOWN	1.1543	1.2827	C/T	0.9995	Auto
A9	PCa604	RS4938723	UNKNOWN	0.5295	0.4309	C/T	1	Manual
A10	PCa605	RS4938723	UNKNOWN	0.649	1.8856	T/T	0.9992	Auto
A11	PCa606	RS4938723	UNKNOWN	0.5235	1.6181	T/T	0.9974	Auto
A12	PCa607	RS4938723	UNKNOWN	0.9799	0.8774	C/T	1	Manual
Well	Sample	SNP Assay	Task	Allele 1 ΔRn	Allele 2 ΔRn	Call	Quality Threshold	Call Type
A1		rs1076064	NTC	0.1401	0.001	NTC	1	Auto
A2	WH846	rs1076064	UNKNOWN	0.2674	0.3194	Allele A/Allele G	0.9998	Auto
A3	WH910	rs1076064	UNKNOWN	0.518	0.0454	Allele A/Allele A	0.9998	Auto
A4	WH779	rs1076064	UNKNOWN	0.3501	0.3866	Allele A/Allele G	0.9967	Auto
A5	CMT413	rs1076064	UNKNOWN	0.3556	0.4302	Allele A/Allele G	0.9992	Auto
A6	MD582	rs1076064	UNKNOWN	0.2342	0.7576	Allele G/Allele G	0.9893	Auto
A7	MD479	rs1076064	UNKNOWN	0.3656	0.4585	Allele A/Allele G	0.9987	Auto
A8	MD444	rs1076064	UNKNOWN	0.4925	0.0355	Allele A/Allele A	0.9979	Auto
A9	MD357	rs1076064	UNKNOWN	0.5147	0.042	Allele A/Allele A	0.9996	Auto
A10	MD322	rs1076064	UNKNOWN	0.5638	0.0402	Allele A/Allele A	0.9951	Auto
A11	HN35	rs1076064	UNKNOWN	0.2135	0.8395	Allele G/Allele G	0.9973	Auto
A12	WH938	rs1076064	UNKNOWN	0.2938	0.2586	Allele A/Allele G	0.9828	Auto
Well	Sample	SNP Assay	Task	Allele 1 ΔRn	Allele 2 ΔRn	Call	Quality Threshold	Call Type
A1	NTC	RS4705342	NTC	-0.0143	-0.0825	NTC	1	Auto
A2	NTC	RS4705342	NTC	-0.0114	-0.0687	NTC	1	Auto
A3	PCa705	RS4705342	UNKNOWN	2.1435	2.2255	C/T	0.9869	Auto
A4	PCa706	RS4705342	UNKNOWN	1.2336	3.2782	T/T	0.9887	Auto
A5	PCa707	RS4705342	UNKNOWN	1.2756	3.6378	T/T	0.9909	Auto
A6	PCa708	RS4705342	UNKNOWN	1.4358	3.9265	T/T	0.9894	Auto
A7	PCa709	RS4705342	UNKNOWN	1.5754	4.0082	T/T	0.9833	Auto
A8	PCa710	RS4705342	UNKNOWN	1.3202	3.7517	T/T	0.9908	Auto
A9	PCa711	RS4705342	UNKNOWN	1.4168	3.795	T/T	0.9902	Auto
A10	PCa712	RS4705342	UNKNOWN	2.3957	2.5462	C/T	0.9914	Auto
A11	PCa713	RS4705342	UNKNOWN	2.3936	2.5427	C/T	0.9914	Auto
A12	PCa714	RS4705342	UNKNOWN	0.6841	2.5644	Undetermined	0.9203	Auto
Well	Sample	SNP Assay	Task	Allele 1 ΔRn	Allele 2 ΔRn	Call	Quality Threshold	Call Type
A1	NTC	rs1058205	NTC	-0.0448	-0.125	NTC	1	Auto
A2	NTC	rs1058205	NTC	-0.0845	-0.19	NTC	1	Auto
A3	PCA288	rs1058205	UNKNOWN	1.584	4.1379	Allele T/Allele T	0.9883	Auto
A4	PCA289	rs1058205	UNKNOWN	1.165	4.0025	Allele T/Allele T	0.9887	Auto
A5	PCA290	rs1058205	UNKNOWN	1.4965	4.5795	Allele T/Allele T	0.9988	Auto
A6	PCA291	rs1058205	UNKNOWN	1.2654	4.7902	Allele T/Allele T	0.9973	Auto
A7	PCA292	rs1058205	UNKNOWN	2.3164	3.1499	Allele C/Allele T	0.9731	Auto
A8	PCA293	rs1058205	UNKNOWN	2.8336	1.0272	Allele C/Allele C	0.9988	Auto
A9	PCA294	rs1058205	UNKNOWN	1.4627	5.0945	Allele T/Allele T	0.9963	Auto
A10	PCA295	rs1058205	UNKNOWN	1.5533	4.7537	Allele T/Allele T	0.9979	Auto
A11	PCA296	rs1058205	UNKNOWN	1.4109	4.353	Allele T/Allele T	0.9979	Auto
A12	PCA297	rs1058205	UNKNOWN	1.5205	4.5554	Allele T/Allele T	0.9981	Auto
Well	Sample	SNP Assay	Task	Allele 1 ΔRn	Allele 2 ΔRn	Call	Quality Threshold	Call Type
A1	NTC	rs1010	NTC	-0.0449	-0.1687	NTC	1	Auto
A2	NTC	rs1010	NTC	-0.0373	-0.1295	NTC	1	Auto
A3	PCA500	rs1010	UNKNOWN	-0.0208	-0.1275	Undetermined	0	Auto
A4	PCA501	rs1010	UNKNOWN	0.7204	4.0314	Allele T/Allele T	0.9862	Auto
A5	PCA502	rs1010	UNKNOWN	1.755	3.2072	Allele C/Allele T	0.9994	Auto
A6	PCA503	rs1010	UNKNOWN	0.6075	4.3764	Allele T/Allele T	0.9941	Auto
A7	PCA504	rs1010	UNKNOWN	0.4762	3.9801	Allele T/Allele T	0.9991	Auto
A8	PCA505	rs1010	UNKNOWN	0.4565	4.1296	Allele T/Allele T	0.9985	Auto
A9	PCA506	rs1010	UNKNOWN	0.585	4.1535	Allele T/Allele T	0.9985	Auto
A10	PCA507	rs1010	UNKNOWN	0.4116	3.9435	Allele T/Allele T	0.9958	Auto
A11	PCA508	rs1010	UNKNOWN	0.451	3.8231	Allele T/Allele T	0.9958	Auto
A12	PCA509	rs1010	UNKNOWN	0.3997	3.7452	Allele T/Allele T	0.9911	Auto
Well	Sample	SNP Assay	Task	Allele 1 ΔRn	Allele 2 ΔRn	Call	Quality Threshold	Call Type
A1	NTC	RS4245739	NTC	-0.0291	-0.1664	NTC	1	Auto
A2	NTC	RS4245739	NTC	-0.0203	-0.1252	NTC	1	Auto
A3	MD289	RS4245739	UNKNOWN	2.9326	0.2069	Allele A/Allele A	0.9969	Auto
A4	MD284	RS4245739	UNKNOWN	2.7973	0.0833	Allele A/Allele A	0.9908	Auto
A5	HN46	RS4245739	UNKNOWN	2.7203	5.2878	Allele C/Allele C	0.997	Auto
A6	HN35	RS4245739	UNKNOWN	3.7961	4.6719	Allele A/Allele C	0.9994	Auto
A7	HN33	RS4245739	UNKNOWN	3.4211	0.4542	Allele A/Allele A	0.9972	Auto
A8	WH952	RS4245739	UNKNOWN	3.3631	0.5043	Allele A/Allele A	0.9971	Auto
A9	WH947	RS4245739	UNKNOWN	3.2449	0.1428	Allele A/Allele A	0.9975	Auto
A10	WH944	RS4245739	UNKNOWN	3.1412	3.7275	Allele A/Allele C	0.9886	Auto
A11	WH940	RS4245739	UNKNOWN	3.6302	4.4069	Allele A/Allele C	0.9995	Auto
A12	WH937	RS4245739	UNKNOWN	3.7934	4.6302	Allele A/Allele C	0.9993	Auto

Slika 4.5. Prikaz genotipizacije genetičkih varijanti rs4938723, rs1076064, rs4705342, rs1058205, rs1010 i rs4245739 konstruisan pomoću *Applied Biosystems StepOnePlus™* softvera. Označeni su normalizovani intenziteti fluorescencije za oba alela (kolone „Allele 1 ΔRn“ i „Allele 2 ΔRn“) kao i genotipovi (kolona „Call“).



Slika 4.6. Grafički prikaz genotipizacije genetičkih varijanti rs4938723, rs1076064, rs4705342, rs1058205, rs1010 i rs4245739 konstruisan pomoću *Applied Biosystems StepOnePlus™ softvera*. Homozigotni aleli kojima odgovara Y osa prikazani su plavim krugovima, homozigotni aleli kojima odgovara X osa crvenim krugovima, dok su heterozigoti predstavljeni zelenim. Crni kvadrati na samom početku koordinatnog sistema odgovaraju negativnim kontrolama. Na levom plotu oznakom „X“ u dnu kordinatnog sistema predstavljen je uzorak za koji u toj reakciji nije mogao biti određen genotip.

4.5. Rezultati analize asocijacije odbranih genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj KP

4.5.1. Rezultati analize asocijacije genetičkih varijanti u regulatornim regionima gena *miR-34b/c*, *miR-378* i *miR-143/145* sa rizikom za razvoj KP

Genotipizacija tačkastih genetičkih varijanti rs4938723, rs1076064 i rs4705342 sprovedena je na kompletnom setu bolesnika i kontrola i bila je uspešna u preko 98% uzoraka. Za sve tri genetičke varijante, kontrolna grupa nije pokazivala odstupanja od Hardy-Vajnbergove ravnoteže ($P=0.91$, $P=0.26$ i $P=0.6$ za rs4938723, rs1076064 i rs4705342, redom). Učestalosti alela i genotipova analiziranih genetičkih varijanti kod bolesnika sa KP, bolesnika sa BPH i kontrola grupisanih prema odgovarajućim testiranim genetičkim modelima prikazane su u Tabeli 4.5.

Poređenjem učestalosti alela i distribucija genotipova tačkastih genetičkih varijanti rs4938723i rs1076064 između bolesnika sa KP i zdravih kontrola, kao i između bolesnika sa KP i BPH nije ustanovljena asocijacija sa rizikom za razvoj KP (Tabela 4.5).

Sa druge strane, poređenjem distribucije genotipova između bolesnika sa KP i bolesnika sa BPH za genetičku varijantu rs4705342 u genu *hsa-miR-143/145* za manje učestali alel, alel C, ustanovljena je statistički značajna asocijacija sa rizikom za razvoj KP. Testovi genetičke asocijacije dali su statistički značajne rezultate za dva genetička modela: kodominantni model ($P=0.031$) i recesivni model ($P=0.0088$). Tačan odnos šansi (OR) po kojem ova dva genetička modela povećavaju rizik za razvoj KP nije mogao biti ustanovljen budući da kod bolesnika sa BPH genotip CC u potpunosti odsustvuje. S obzirom na to da je razlika u AIC skoru za navedene genetičke modele manja od 2, nije bilo statistički opravdano izabrati najadekvatniji genetički model, iako je manja vrednost AIC dobijena za recesivni model.

Tabela 4.5. Asocijacija genetičkih varijanti u regulatornim regionima gena *miR-34b/c*, *miR-378* i *miR-143/145* sa rizikom za razvoj KP

SNV	Genetički model	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj kontrola (%)	Broj bolesnika sa BPH (%)	KPVskontrola			KPVs BPH		
					OR (95% CI) [†]	P vrednost [†]	AIC	OR (95% CI) [†]	P vrednost [†]	AIC
rs4938723										
	Kodominantni									
	TT	129 (37.4)	138 (39.5)	134 (38.4)	1.00			1.00		
	TC	169 (49)	164 (47)	170 (48.7)	1.10 (0.80-1.52)	0.84	969.7	1.02 (0.74-1.41)	0.95	960.9
	CC	47 (13.6)	47 (13.5)	45 (12.9)	1.07 (0.67-1.71)			1.08 (0.67-1.74)		
	Dominantni									
	TT	129 (37.4)	138 (39.5)	134 (38.4)	1.00			1.00		
	TC+CC	216 (62.6)	211 (60.5)	215 (61.6)	1.09 (0.81-1.49)	0.56	967.7	1.03 (0.76-1.41)	0.83	958.9
	Recesivni									
	TT+TC	298 (86.4)	302 (86.5)	304 (87.1)	1.00			1.00		
	CC	47 (13.6)	47 (13.5)	45 (12.9)	1.01 (0.66-1.56)	0.95	968	1.06 (0.68-1.65)	0.79	958.9
	Overdominantni									
	TT+CC	176 (51)	185 (53)	179 (51.3)	1.00			1.00		
	TC	169 (49)	164 (47)	170 (48.7)	1.08 (0.80-1.46)	0.6	967.8	1.00 (0.74-1.35)	0.98	958.9
	Log-aditivni									
	-	-	-	-	1.05 (0.84-1.31)	0.66	967.8	1.03 (0.83-1.29)	0.77	958.9
rs1076064										
	Kodominantni									
	AA	135 (38.9)	125 (35.4)	127 (36.1)	1.00			1.00		
	AG	152 (43.8)	179 (50.7)	166 (47.2)	0.79 (0.57-1.09)	0.16	974.7	0.85 (0.61-1.19)	0.61	967.1
	GG	60 (17.3)	49 (13.9)	59 (16.8)	1.14 (0.72-1.78)			0.98 (0.63-1.52)		
	Dominantni									
	AA	135 (38.9)	125 (35.4)	127 (36.1)	1.00			1.00		
	AG+GG	212 (61.1)	228 (64.6)	225 (63.9)	0.86 (0.63-1.17)	0.34	975.4	0.89 (0.65-1.21)	0.44	965.5
	Recesivni									
	AA+AG	287 (82.7)	304 (86.1)	293 (83.2)	1.00			1.00		
	GG	60 (17.3)	49 (13.9)	59 (16.8)	1.30 (0.86-1.96)	0.21	974.8	1.07 (0.72-1.59)	0.74	966
	Overdominantni									
	AA+GG	195 (56.2)	174 (49.3)	186 (52.8)	1.00			1.00		
	AG	152 (43.8)	179 (50.7)	166 (47.2)	0.76 (0.56-1.02)	0.067 [‡]	973	0.86 (0.64-1.16)	0.32	965.1
	Log-aditivni									
	-	-	-	-	1.00 (0.81-1.24)	0.99	976.3	0.96 (0.78-1.19)	0.73	966
rs4705342										
	Kodominantni									
	TT	280 (80.9)	276 (78.2)	290 (82.6)	1.00			1.00		

TC	61 (17.6)	71 (20.1)	61 (17.4)	0.85 (0.58-1.24)	0.67	976.1	1.06 (0.71-1.57)	0.031*	957.2
CC	5 (1.4)	6 (1.7)	0 (0)	0.82 (0.25-2.72)			NA (0.00-NA)		
Dominantni									
TT	280 (80.9)	276 (78.2)	290 (82.6)	1.00			1.00		
TC+CC	66 (19.1)	77 (21.8)	61 (17.4)	0.85 (0.58-1.22)	0.37	974.1	1.14 (0.77-1.68)	0.51	961.7
Recesivni									
TT+TC	341 (98.5)	347 (98.3)	351 (100)	1.00			1.00		
CC	5 (1.4)	6 (1.7)	0 (0)	0.85 (0.26-2.80)	0.79	974.9	NA (0.00-NA)	0.0088*	955.3
Overdominantni									
TT+CC	285 (82.4)	282 (79.9)	290 (82.6)	1.00			1.00		
TC	61 (17.6)	71 (20.1)	61 (17.4)	0.85 (0.58-1.24)	0.4	974.2	1.04 (0.70-1.54)	0.86	962.1
Log-aditivni									
-	-	-	-	0.86 (0.62-1.20)	0.38	974.2	1.23 (0.85-1.77)	0.28	960.9

† vrednosti podešene za razlike u starosti bolesnika

‡ statistički trend značajnosti

*statistički značajni rezultati su boldovani

Skraćenice: KP- karcinom prostate; BPH- benigna hiperplazija prostate; OR- odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacijski kriterijum.

4.5.2. Rezultati analize asocijacije genetičkih varijanti u genima *KLK3*, *VAMP8* i *MDM4*, a koje menjaju mesta vezivanja mikroRNK, sa rizikom za razvoj KP

Distribucije genotipova genetičkih varijanti rs1058205, rs1010 i rs4245739 u grupama bolesnika sa KP i BPH kao i u kontrolnoj grupi grupisane prema odgovarajućim testiranim genetičkim modelima prikazane su u Tabeli 4.6. Za sve tri analizirane genetičke varijante ustanovljeno je prisustvo Hardy-Vajnborgove raznoteže u kontrolnoj grupi ($P=0.09$ za varijantu rs1058205, $P=0.52$ za varijantu rs1010 i $P=0.8$ za genetičku varijantu rs4245739).

Za sve tri odabrane genetičke varijante u populaciji Srbije manje učestali alel je alel C. Poređenjem distribucija genotipova i učestalosti alela ni za jednu genetičku varijantu koja menja mesto vezivanja mikroRNK nije ustanovljena statistički značajna asocijacija sa rizikom za razvoj KP u populaciji Srbije.

Tabela 4.6. Analiza asocijacije genetičkih varijanti u genima *KLK3*, *VAMP8* i *MDM4*, a koje menjaju mesto vezivanja mikroRNK sa rizikom za razvoj KP

SNV	Genetički model	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj zdravih kontrola (%)	Broj bolesnika sa BPH (%)	PCa vs kontrole			PCa vs BPH		
					OR (95% CI) [†]	<i>P</i> vrednost [†]	AIC	OR (95% CI) [†]	<i>P</i> vrednost [†]	AIC
rs1058205										
	Kodominantni									
	TT	249 (70.3)	262 (70.8)	265 (74.2)	1.00			1.00		
	CT	95 (26.8)	93 (25.1)	81 (22.7)	1.07 (0.76-1.49)	0.6	1008	1.19 (0.84-1.68)	0.61	982.6
	CC	10 (2.8)	15 (4)	11 (3.1)	0.69 (0.30-1.57)			1.00 (0.42-2.42)		
	Dominantni									
	TT	249 (70.3)	262 (70.8)	265 (74.2)	1.00			1.00		
	CT+CC	105 (29.7)	108 (29.2)	92 (25.8)	1.02 (0.74-1.40)	0.92	1007	1.17 (0.84-1.63)	0.36	980.8
	Recesivni									
	TT+CT	344 (97.2)	355 (96)	346 (96.9)	1.00			1.00		
	CC	10 (2.8)	15 (4)	11 (3.1)	0.68 (0.30-1.54)	0.35	1006.2	0.96 (0.40-2.31)	0.93	981.6
	Overdominantni									
	TT+CC	259 (73.2)	277 (74.9)	276 (77.3)	1.00			1.00		
	CT	95 (26.8)	93 (25.1)	81 (22.7)	1.09 (0.78-1.52)	0.63	1006.8	1.19 (0.84-1.68)	0.32	980.6
	Log-aditivni									
	-	-	-	-	0.97 (0.74-1.27)	0.81	1007	1.12 (0.84-1.49)	0.44	981
rs1010										
	Kodominantni									
	TT	124 (34.9)	119 (32.7)	118 (33.1)	1.00			1.00		
	CT	161 (45.4)	184 (50.5)	184 (51.7)	0.84 (0.61-1.17)	0.34	1000.3	0.83 (0.60-1.16)	0.14	979.8
	CC	70 (19.7)	61 (16.8)	54 (15.2)	1.11 (0.72-1.70)			1.25 (0.81-1.95)		
	Dominantni									
	TT	124 (34.9)	119 (32.7)	118 (33.1)	1.00			1.00		
	CT+CC	231 (65.1)	245 (67.3)	238 (66.8)	0.91 (0.67-1.24)	0.54	1000.1	0.93 (0.68-1.27)	0.64	981.5
	Recesivni									
	TT+CT	285 (80.3)	303 (83.2)	302 (84.8)	1.00			1.00		
	CC	70 (19.7)	61 (16.8)	54 (15.2)	1.22 (0.84-1.79)	0.30	999.4	1.40 (0.94-2.07)	0.095 [‡]	979
	Overdominantni									
	TT+CC	194 (54.6)	180 (49.5)	172 (48.3)	1.00			1.00		
	CT	161 (45.4)	184 (50.5)	184 (51.7)	0.81 (0.61-1.09)	0.17	998.6	0.77 (0.57-1.04)	0.088 [‡]	978.8
	Log-aditivni									
	-	-	-	-	1.02 (0.83-1.25)	0.87	1000.4	1.07 (0.86-1.32)	0.55	981.4
rs4245739										
	Kodominantni									

AA	198 (56.2)	182 (51)	204 (57.3)	1.00				1.00		
AC	131 (37.2)	144 (40.3)	122 (34.3)	0.84 (0.62-1.15)	0.32	987.2		1.10 (0.80-1.51)	0.53	978.1
CC	23 (6.5)	31 (8.7)	30 (8.4)	0.69 (0.39-1.22)				0.79 (0.44-1.41)		
Dominantni										
AA	198 (56.2)	182 (51)	204 (57.3)	1.00				1.00		
AC+CC	154 (43.8)	175 (49)	152 (42.7)	0.82 (0.61-1.10)	0.18	985.6		1.04 (0.77-1.40)	0.79	977.3
Recesivni										
AA+AC	329 (93.5)	326 (91.3)	326 (91.6)	1.00				1.00		
CC	23 (6.5)	31 (8.7)	30 (8.4)	0.74 (0.42-1.29)	0.28	986.3		0.76 (0.43-1.34)	0.34	976.5
Overdominantni										
AA+CC	221 (62.8)	213 (59.7)	234 (65.7)	1.00				1.00		
AC	131 (37.2)	144 (40.3)	122 (34.3)	0.89 (0.65-1.20)	0.43	986.8		1.13 (0.83-1.54)	0.43	976.7
Log-aditivni										
-	-	-	-	0.84 (0.66-1.06)	0.13	985.2		0.98 (0.77-1.24)	0.85	977.3

† rezultati podešeni za razlike u starosti bolesnika

‡ Statistički trend značajnosti

Skraćenice: KP- karcinom prostate; BPH- benigna hiperplazija prostate; OR- odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacijski kriterijum.

4.6. Rezultati analize asocijacije odabranih genetičkih varijanti sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara i sa rizikom za progresiju KP

4.6.1. Rezultati analize asocijacije genetičkih varijanti u regulatornim regionima gena *miR-34b/c*, *miR-378* i *miR-143/145* sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara i rizikom za progresiju KP

Poređenjem distribucija genotipova između bolesnika sa serumskim vrednostima PSA $10\text{ng/ml} \leq \text{PSA} < 20\text{ ng/ml}$ i $\text{PSA} < 10\text{ ng/ml}$, ređe učestali alel G genetičke varijante rs1076064 povećavao je rizik za veće vrednosti PSA po dominantnom genetičkom modelu ($P_{\text{dom}}=0.032$; $\text{OR}_{\text{dom}}=1.89$, 95%CI 1.05-3.41) (Tabela 4.7). Ostale analizirane genetičke varijante nisu pokazale asocijaciju sa navedenim standardnim prognostičkim parametrom (Prilog A).

Tabela 4.7. Asocijacija genetičke varijante rs1076064 sa serumskim vrednostima PSA

Genetički model	PSA<10 ng/ml(%)	10 ng/ml≤ PSA< 20 ng/ml(%)	PSA>20 ng/ml(%)	10 ng/ml≤ PSA< 20 ng/ml vs PSA<10 ng/ml		
				OR (95% CI) [†]	P vrednost [†]	AIC
rs1076064						
Kodominantni						
AA	45 (45.9)	30 (30.6)	59 (39.9)	1.00		
AG	36 (36.7)	49 (50)	65 (43.9)	2.00 (1.06-3.76)	0.091 [‡]	273.3
GG	17 (17.4)	19 (19.4)	24 (16.2)	1.68 (0.75-3.74)		
Dominantni						
AA	45 (45.9)	30 (30.6)	59 (39.9)	1.00		
AG + GG	53 (54.1)	68 (69.4)	89 (60.1)	1.89 (1.05-3.41)	0.032*	271.4
Recesivni						
AA + AG	81 (82.7)	79 (80.6)	124 (83.8)	1.00		
GG	17 (17.4)	19 (19.4)	24 (16.2)	1.16 (0.56-2.40)	0.69	275.9
Overdominantni						
AA + GG	62 (63.3)	49 (50)	83 (56.1)	1.00	0.074 [‡]	272.8
AG	36 (36.7)	49 (50)	65 (43.9)	1.68 (0.95-2.99)		
Log-aditivni						
-	-	-	-	1.39 (0.94-2.05)	0.1	273.3

[†] vrednosti podešene za razlike u starosti bolesnika

*statistički značajni rezultati su boldovani

Skraćenice: OR- odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacioni kriterijum.

Kada su upoređivane distribucije genotipova kod bolesnika sa različitim vrednostima GS, statistička značajnost nije dobijena ni za jednu analiziranu genetičku varijantu. Statistički trend dobijen je poređenjem distribucija genotipova između bolesnika $\text{GS} = 7$ i $\text{GS} < 7$ za asocijaciju ređe učestalog alela G genetičke varijante rs1076064 sa višim vrednostima GS ($P_{\text{dom}}=0.082$). Dodatno, poređenjem učestalosti genotipova bolesnika sa $\text{GS} > 7$ i bolesnika sa $\text{GS} = 7$ za istu genetičku varijantu dobijen je statistički trend asocijacije suprotnog smera: ređe učestao alel G smanjivao je šansu za veće vrednosti GS ($P_{\text{dom}}=0.09$ i $P_{\text{log-aditivni}}=0.081$) (Tabela 4.8).

Tabela 4.8. Asocijacija genetičke varijante rs1076064 sa Glison skorom

Genetički model	GS<7 (%)	GS=7 (%)	GS>7 (%)	GS>7vsGS<7			GS>7vsGS=7			GS=7vsGS<7		
				OR (95% CI) [†]	<i>P</i> vrednost [†]	AIC	OR (95% CI) [†]	<i>P</i> vrednost [†]	AIC	OR (95% CI) [†]	<i>P</i> vrednost [†]	AIC
rs1076064												
Kodominantni												
AA	83 (40.7)	23 (29.5)	23 (44.2)	1.00			1.00			1.00		
AG	86 (42.2)	39 (50)	23 (44.2)	0.94 (0.48-1.82)	0.61	255.7	0.57 (0.26-1.24)	0.2	175.9	1.63 (0.90-2.96)	0.22	337
GG	35 (17.2)	16 (20.5)	6 (11.5)	0.62 (0.23-1.67)			0.42 (0.14-1.29)			1.65 (0.78-3.49)		
Dominantni												
AA	83 (40.7)	23 (29.5)	23 (44.2)	1.00			1.00			1.00		
AG+GG	121 (59.3)	55 (70.5)	29 (55.8)	0.84 (0.45-1.58)	0.6	254.4	0.53 (0.25-1.11)	0.09 [‡]	174.2	1.63 (0.93-2.86)	0.082 [‡]	335
Recesivni												
AA+AG	169 (82.8)	62 (79.5)	46 (88.5)	1.00			1.00			1.00		
GG	35 (17.2)	16 (20.5)	6 (11.5)	0.64 (0.25-1.63)	0.33	253.7	0.58 (0.21-1.62)	0.28	175.9	1.25 (0.64-2.41)	0.52	337.6
Overdominantni												
AA+GG	118 (57.8)	39 (50)	29 (55.8)	1.00			1.00			1.00		
AG	86 (42.2)	39 (50)	23 (44.2)	1.06 (0.57-1.98)	0.86	254.6	0.73 (0.35-1.50)	0.39	176.3	1.37 (0.81-2.31)	0.24	336.6
Log-aditivni												
-	-	-	-	0.82 (0.53-1.29)	0.39	253.9	0.63 (0.37-1.07)	0.081 [‡]	174	1.32 (0.92-1.89)	0.13	335.7

[†] vrednosti podešene za razlike u starosti bolesnika

[‡] statistički trend značajnosti

Skraćenice: OR- odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacioni kriterijum.

U analizama asocijacije odabranih genetičkih varijanti sa T kliničkim stadijumom tumora statistička značajnost dobijena je u slučaju genetičkih varijanti rs4938723 i rs1076064. Poređenjem raspodele genotipova između bolesnika sa T₁ i T₂ kliničkim stadijumom primarnog tumora, ređe učestao alel C genetičke varijante rs4938723 u genu *hsa-miR-34b/c* asociirao je sa nižom T kategorijom ($P_{\text{dom}}=0.0046$; OR=0.36, 95 % CI 0.17-0.76). Osim za dominantni genetički model, statistički značajna asocijacija genetičke varijante rs4938723 i nižeg T kliničkog stadijuma dobijena je i za kodominantni, overdominantni i log-aditivni genetički model ($P_{\text{codom}}=0.015$, $P_{\text{overdom}}=0.011$, $P_{\text{log-additive}}=0.037$). Poređenjem učestalosti genotipova između bolesnika sa T₃/T₄ i T₁, kao i između bolesnika sa T₃/T₄ i T₂ T-kliničkim stadijumom dobijen je trend značajnosti za asocijaciju genetičke varijante rs4938723 sa ovim standardnim prognostičkim parametrom bolesti. Dodatno, za ređe učestao alel genetičke varijante rs1076064 u genu *hsa-miR-378* takođe je ustanovljena statistički značajna asocijacija sa nižim T stadijumom bolesti poređenjem raspodele genotipova kod bolesnika sa T₃/T₄ i T₂ stadijumom primarnog karcinoma ($P_{\text{rec}}=0.0083$, OR=0.34, 95 % CI 0.14-0.81) (Tabela 4.9). Nijedna od analiziranih genetičkih varijanti u regulatorinim regionima gena za mikroRNK nije asociirala sa prisustvom udaljenih metastaza kod bolesnika sa KP (Prilog B).

Tabela 4.9. Asocijacija genetičkih varijanti rs1076064 i rs4938723 sa T kliničkim stadijumom karcinoma prostate

Genetički model	T1 (%)	T2 (%)	T3/T4 (%)	T2 vs T1			T3/T4 vs T1			T3/T4 vs T2		
				OR (95% CI) [†]	<i>P</i> vrednost [†]	AIC	OR (95% CI) [†]	<i>P</i> vrednost [†]	AIC	OR (95% CI) _‡	<i>P</i> vrednost _‡	AIC
rs4938723												
Kodominantni												
TT	11 (22.9)	75 (45.2)	30 (34.1)	1.00			1.00			1.00		
TC	30 (62.5)	69 (41.6)	42 (47.7)	0.34 (0.16-0.73)	0.015*	225.3	0.50 (0.21-1.15)	0.22	179.7	1.53 (0.86-2.70)	0.2	332.6
CC	7 (14.6)	22 (13.2)	16 (18.2)	0.46 (0.16-1.33)			0.82 (0.26-2.54)			1.82 (0.84-3.92)		
Dominantni												
TT	11 (22.9)	75 (45.2)	30 (34.1)	1.00			1.00			1.00		
TC+CC	37 (77.1)	91 (54.8)	58 (65.9)	0.36 (0.17-0.76)	0.0046*	223.8	0.56 (0.25-1.25)	0.15	178.6	1.60 (0.93-2.73)	0.085 [‡]	330.8
Recesivni												
TT+TC	41 (85.4)	144 (86.8)	72 (81.8)	1.00	0.81	231.7	1.00	0.59	180.4	1.00	0.3	332.7
CC	7 (14.6)	22 (13.2)	16 (18.2)	0.89 (0.35-2.24)			1.30 (0.49-3.44)			1.45 (0.72-2.93)		
Overdominantni												
TT+CC	18 (37.5)	97 (58.4)	46 (52.3)	1.00	0.011*	225.3	1.00	0.087 [‡]	177.8	1.00	0.34	332.8
TC	30 (62.5)	69 (41.6)	42 (47.7)	0.43 (0.22-0.83)			0.53 (0.26-1.10)			1.29 (0.77-2.17)		
Log-aditivni												
-	-	-	-	0.61 (0.38-0.97)	0.037*	227.4	0.83 (0.49-1.41)	0.5	180.3	1.38 (0.96-1.99)	0.085 [‡]	330.8
rs1076064												
Kodominantni												
AA	22 (44.9)	60 (36.4)	37 (42)	1.00			1.00			1.00		
AG	20 (40.8)	72 (43.6)	44 (50)	1.37 (0.68-2.77)	0.46	234.5	1.32 (0.62-2.80)	0.37	182.6	0.99 (0.57-1.72)	0.031*	327.9
GG	7 (14.3)	33 (20)	7 (8)	1.73 (0.67-4.50)			0.57 (0.17-1.86)			0.34 (0.14-0.85)		
Dominantni												
AA	22 (44.9)	60 (36.4)	37 (42)	1.00			1.00			1.00		
AG+GG	27 (55.1)	105 (63.6)	51 (58)	1.47 (0.77-2.81)	0.25	232.7	1.12 (0.55-2.28)	0.75	182.5	0.79 (0.46-1.33)	0.37	332.1
Recesivni												
AA+AG	42 (85.7)	132 (80)	81 (92)	1.00	0.38	233.2	1.00	0.22	181.1	1.00	0.0083*	325.9
GG	7 (14.3)	33 (20)	7 (8)	1.48 (0.61-3.59)			0.49 (0.16-1.52)			0.34 (0.14-0.81)		
Overdominantni												
AA+GG	29 (59.2)	93 (56.4)	44 (50)	1.00	0.65	233.8	1.00	0.29	181.5	1.00	0.33	331.9
AG	20 (40.8)	72 (43.6)	44 (50)	1.16 (0.61-2.24)			1.47 (0.72-3.00)			1.29 (0.77-2.17)		

Log-aditivni	-	-	-	1.33 (0.84-2.09)	0.21	232.5	0.91 (0.53-1.56)	0.74	182.5	0.69 (0.47-1.01)	0.052 [‡]	329.1
--------------	---	---	---	------------------	------	-------	------------------	------	-------	------------------	--------------------	-------

† vrednosti podešene za razlike u starosti bolesnika

‡ statistički trend značajnosti

*statistički značajni rezultati su boldovani

Skraćenice: OR- odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacioni kriterijum.

Nakon podele bolesnika u grupe na osnovu procenjenog rizika za progresiju KP prema kriterijumu koji preporučuje EAU, za ređe učestao alel G genetičke varijante rs1076064 ustanovljena je asocijacija sa agresivnijim KP (Tabela 4.10). Navedena asocijacija utvrđena je za veći broj genetičkih modela. Poređenjem učestalosti genotipova kod bolesnika sa visokim i bolesnika sa niskim rizikom za progresiju KP ($P_{\text{codom}}=0.017$, $P_{\text{dom}}=0.0068$, $P_{\text{overdom}}=0.011$, $P_{\text{log-additive}}=0.033$), kao i između bolesnika sa srednjim rizikom i niskim rizikom ($P_{\text{codom}}=0.0073$, $P_{\text{dom}}=0.0024$, $P_{\text{overdom}}=0.0073$, $P_{\text{log-additive}}=0.014$) pokazana je statistički značajna asocijacija ove genetičke varijante sa visokim rizikom za progresiju bolesti za veći broj genetičkih modela. U testovima koji su uključivali ostale genetičke varijante nisu dobijeni statistički značajni rezultati (Prilog C).

Tabela 4.10. Asocijacija genetičke varijante rs1076064 sa rizikom za progresiju bolesti

Genetički model	Nizak rizik (%)	Srednji rizik (%)	Visok rizik (%)	srednjivsnizak rizik			visokvsnizak rizik			visokvssrednji rizik		
				OR (95% CI) [†]	<i>P</i> vrednost [†]	AIC	OR (95% CI) [†]	<i>P</i> Vrednost [†]	AIC	OR (95% CI) [†]	<i>P</i> vrednost [†]	AIC
rs1076064												
Kodominantni												
AA	15 (68.2)	37 (33.3)	76 (39)	1.00			1.00			1.00		
AG	4 (18.2)	53 (47.8)	87 (44.6)	5.44 (1.66-17.79)	0.0073*	117.5	4.52 (1.43-14.36)	0.017*	140.9	0.79 (0.47-1.34)	0.6	402.6
GG	3 (13.6)	21 (18.9)	32 (16.4)	2.85 (0.74-11.01)			2.21 (0.59-8.23)			0.75 (0.38-1.49)		
Dominantni												
AA	15 (68.2)	37 (33.3)	76 (39)	1.00			1.00			1.00		
AG+GG	7 (31.8)	74 (66.7)	119 (61)	4.32 (1.62-11.56)	0.0024*	116.1	3.53 (1.36-9.14)	0.0068*	139.7	0.78 (0.48-1.28)	0.32	400.6
Recesivni												
AA+AG	19 (86.4)	90 (81.1)	163 (83.6)	1.00	0.54	124.9	1.00	0.71	146.9	1.00	0.63	401.4
GG	3 (13.6)	21 (18.9)	32 (16.4)	1.48 (0.40-5.46)			1.27 (0.35-4.56)			0.86 (0.47-1.59)		
Overdominantni												
AA+GG	18 (81.8)	58 (52.2)	108 (55.4)	1.00			1.00			1.00	0.56	401.2
AG	4 (18.2)	53 (47.8)	87 (44.6)	4.15 (1.32-13.10)	0.0073*	118.1	3.75 (1.22-11.58)	0.011*	140.5	0.87 (0.54-1.39)		
Log-aditivni												
-	-	-	-	2.39 (1.14-5.03)	0.014*	119.2	2.09 (1.02-4.29)	0.033*	142.5	0.86 (0.61-1.19)	0.35	400.7

[†] vrednosti podešene za razlike u starosti bolesnika

*statistički značajni rezultati su boldovani

Skraćenice: OR- odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacijski kriterijum.

4.6.2. Rezultati analize asocijacija genetičkih varijanti u genima *KLK3*, *VAMP8* i *MDM4*, a koje menjaju mesta vezivanja mikroRNK, sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara i rizikom za progresiju bolesti

Kada je analizirana asocijacija genetičke varijanta rs1010 u genu *VAMP8* sa inicijalnim serumskim vrednostima PSA nije dobijen nijedan statistički značajan rezultat (Prilog D). S druge strane, za ređe učestao alel genetičke varijante rs1058205 u genu *KLK3* poređenjem raspodele genotipova između bolesnika sa vrednostima PSA >20 ng/ml i PSA<10 ng/ml dobijena je značajna asocijacija alela C sa nižim vrednostima PSA ($P_{\text{rec}}=0.038$; $\text{OR}_{\text{rec}}=0.20$, 95%CI 0.04-1.05) (Tabela 4.10). Suprotni rezultati dobijeni su za asocijaciju ređe učestalog alela C genetičke varijante rs4245739 i serumskih vrednosti PSA. Analizom raspodele genotipova u grupama bolesnika sa vrednostima PSA 10-20 ng/ml i PSA<10 ng/ml alel C genetičke varijante rs4245739 povećavao je rizik bolesnika sa KP da imaju veće vrednosti ovog standardnog prognostičkog parametra ($P_{\text{dom}}=0.026$ i $P_{\text{codom}}=0.026$). Vrednost AIK skora bila je identična za oba genetička modela. Kada su učestalosti genotipova upoređene između bolesnika sa vrednostima PSA>20 ng/ml i PSA<10 ng/ml, za genetičku varijantu rs4245739 ustanovljen je i trend statističke asocijacije sa povišim vrednostima PSA u navedenom poređenju ($P_{\text{log-additive}}=0.052$, $\text{OR}_{\text{log-additive}}=1.54$, 95%CI 0.99-2.39; $P_{\text{dom}}=0.078$; $\text{OR}_{\text{dom}}=1.61$, 95%CI 0.94-2.75). Genetički modeli koji su najbolje opisivali taj trend asocijacije bili su log-aditivni i dominantni (Tabela 4.11).

Poređenjem učestalosti genotipova bolesnika sa $\text{GS}=7$ i $\text{GS}<7$, ređe učestao alel C genetičke varijante rs1010 asociirao je sa većim GS. Statistička značajnost dobijena je za recesivni i log-aditivni genetički model ($P_{\text{rec}}=0.036$ i $P_{\text{log-additive}}=0.024$). Slično, poređenjem raspodele genotipova između bolesnika sa $\text{GS}>7$ i bolesnika u ostalim, nižim kategorijama GS, ređe učestao alel C genetičke varijante rs4245739 značajno je povećavao rizik za veće vrednosti ovog prognostičkog parametra. Statistička značajnost dobijena je za više različitih genetičkih modela, sa najmanjom vrednošću AIK skora u oba poređenja za dominantni genetički model asocijacije (Tabela 4.12).

Za sve tri analizirane genetičke varijante koje menjaju mesta vezivanja mikroRNK utvrđena je asocijacija sa kliničkim stadijumom bolesti. Alel C genetičke varijante rs1058205 pokazao se protektivnim kada je reč o progresiji karcinoma u više T kliničke stadijume bolesti. Ovakav smer asocijacije ustanovljen je poređenjem distribucija genotipova bolesnika u grupama sa T_2 i T_1 , kao i u grupama sa T_3/T_4 i T_1 stadijumom. Najmanja vrednost AIC skora dobijena je za overdominantni model (Tabela 4.13). Analizom asocijacije genetičke varijante rs1010 sa kliničkim stadijumom primarnog KP, ustanovljen je suprotan doprinos ređe učestalog alela C ove genetičke varijante. Poređenjem raspodela genotipova u grupama bolesnika sa T_3/T_4 i T_2 stadijumom, heterozigotni i homozigotni genotip CC ove genetičke varijante povećavali su rizik za progresiju bolesti u viši T stadijum. Genetički model koji je imao najmanje vrednosti AIK skora i koji je najbolje opisivao ovu asocijaciju bio je recesivni genetički model ($P_{\text{rec}}=0.017$; $\text{OR}_{\text{rec}}=2.08$, 95%CI 1.14-3.81). U isto vreme i ređe učestao alel C genetičke varijante rs4245739 značajno je asociirao sa višim kliničkim stadijumima bolesti. U analizi razlika u učestalosti genotipova između bolesnika sa T stadijumom T_3/T_4 i bolesnika sa stadijumom T_1 , recesivni genetički model najbolje je opisivao doprinos alela C ove varijante rs4245739 višem T stadijumu bolesti ($P_{\text{rec}}=0.033$; $\text{OR}_{\text{rec}}=6.28$, 95%CI 0.77-50.85). Statistička značajnost dobijena je i za kodominantni genetički model u ovom poređenju ($P_{\text{codom}}=0.044$) (Tabela 4.13).

Suprotno ovim rezultatima, nijedna od odabranih genetičkih varijanti u genima *KLK3*, *VAMP8* i *MDM4* nije asociirala sa pojavom udaljenih metastaza (Prilog E). Kada je analizirana njihova asocijacija sa rizikom za progresiju bolesti takođe nije utvrđena nijedna statistički značajna asocijacija (Prilog F). Statistički trend asocijacije dobijen je za asocijaciju alela C genetičke

varijante rs4245739 sa agresivnošću KP. Poređenjem bolesnika sa visokim rizikom i bolesnika sa niskim rizikom, kao i bolesnika sa srednjim rizikom i onih sa niskim rizikom za progresiju bolesti, primećen je trend asocijacije ove genetičke varijante sa agresivnijim KP. Log-aditivni genetički model najbolje je opisivao uočeni trend asocijacije (Tabela 4.14).

Tabela 4.11. Asocijacija genetičkih varijanti rs1058205 i rs4245739 sa serumskim vrednostima PSA

Genetički model	PSA<10 ng/ml(%)	10 ng/ml≤ PSA< 20 ng/ml(%)	PSA>20 ng/ml(%)	PSA>20 ng/ml vsPSA<10 ng/ml			PSA>20 ng/ml vs10 ng/ml≤ PSA<20 ng/ml			10 ng/ml≤ PSA< 20 ng/ml vsPSA<10 ng/ml		
				OR (95% CI) [†]	<i>P</i> vrednost [†]	AIC	OR (95% CI) [†]	<i>P</i> vrednost [†]	AIC	OR (95% CI) [†]	<i>P</i> vrednost [†]	AIC
rs1058205												
Kodominantni												
TT	68 (68)	68 (67.3)	111 (74)	1.00			1.00			1.00		
CT	26 (26)	31 (30.7)	37 (24.7)	0.79 (0.43-1.45)	0.088 [‡]	329.4	0.70 (0.39-1.24)	0.43	340.3	1.17 (0.63-2.18)	0.28	282.3
CC	6 (6)	2 (2)	2 (1.3)	0.19 (0.04-0.99)			0.60 (0.08-4.39)			0.32 (0.06-1.66)		
Dominantni												
TT	68 (68)	68 (67.3)	111 (74)	1.00	0.18	330.5	1.00	0.2	338.4	1.00	0.98	282.9
CT + CC	32 (32)	33 (32.7)	39 (26)	0.68 (0.38-1.20)			0.69 (0.40-1.21)			1.01 (0.56-1.83)		
Recesivni												
TT + CT	94 (94)	99 (98)	148 (98.7)	1.00	0.038[*]	327.9	1.00	0.68	339.8	1.00	0.13	280.6
CC	6 (6)	2 (2)	2 (1.3)	0.20 (0.04-1.05)			0.66 (0.09-4.82)			0.31 (0.06-1.57)		
Overdominantni												
TT + CC	74 (74)	70 (69.3)	113 (75.3)	1.00	0.6	331.9	1.00	0.23	338.6	1.00	0.5	282.5
CT	26 (26)	31 (30.7)	37 (24.7)	0.85 (0.47-1.55)			0.71 (0.40-1.25)			1.24 (0.67-2.30)		
Log-aditivni												
-	-	-	-	0.64 (0.39-1.04)	0.069 [‡]	328.9	0.71 (0.43-1.19)	0.2	338.4	0.88 (0.53-1.45)	0.62	282.7
rs4245739												
Kodominantni												
AA	65 (65)	50 (50)	82 (55)	1.00			1.00			1.00		
AC	31 (31)	43 (43)	55 (36.9)	1.50 (0.85-2.62)	0.15	330.1	0.79 (0.46-1.35)	0.67	339.4	1.84 (1.01-3.34)	0.076 [‡]	278
CC	4 (4)	7 (7)	12 (8.1)	2.52 (0.76-8.40)			1.01 (0.37-2.74)			2.45 (0.67-8.96)		
Dominantni												
AA	65 (65)	50 (50)	82 (55)	1.00	0.078 [‡]	328.8	1.00	0.45	337.6	1.00	0.026[*]	276.2
AC + CC	35 (35)	50 (50)	67 (45)	1.61 (0.94-2.75)			0.82 (0.49-1.37)			1.91 (1.08-3.38)		
Recesivni												
AA + AC	96 (96)	93 (93)	137 (92)	1.00	0.18	330.1	1.00	0.83	338.2	1.00	0.3	280.1
CC	4 (4)	7 (7)	12 (8.1)	2.17 (0.66-7.11)			1.11 (0.42-2.95)			1.93 (0.54-6.87)		
Overdominantni												
AA + CC	69 (69)	57 (57)	94 (63.1)	1.00	0.25	330.6	1.00	0.37	337.4	1.00	0.073 [‡]	277.9
AC	31 (31)	43 (43)	55 (36.9)	1.38 (0.79-2.39)			0.79 (0.47-1.33)			1.70 (0.95-3.05)		
Log-aditivni												
-	-	-	-	1.54 (0.99-2.39)	0.052 [‡]	328.1	0.90 (0.60-1.35)	0.61	338	1.71 (1.06-2.77)	0.026[*]	276.2

† rezultati podešeni za razlike u starosti bolesnika

‡ statistički trend značajnosti

*statistički značajni rezultati su boldovani

Skraćenice: OR- odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacijski kriterijum.

Tabela 4.12. Asocijacija genetičkih varijanti rs1010 i rs4245739 sa vrednostima Glison skora

Genetički model	GS<7 (%)	GS=7 (%)	GS>7 (%)	GS>7vsGS<7			GS>7vsGS=7			GS=7vsGS<7		
				OR (95% CI)†	P vrednost†	AIC	OR (95% CI)†	P vrednost†	AIC	OR (95% CI)†	P vrednost†	AIC
rs1010												
Kodominantni												
TT	77 (37.2)	22 (26.8)	18 (34)	1.00			1.00			1.00		
CT	93 (44.9)	36 (43.9)	26 (49.1)	1.14 (0.57-2.27)	0.93	259.9	0.86 (0.38-1.94)	0.28	181	1.34 (0.73-2.48)	0.071‡	347.2
CC	37 (17.9)	24 (29.3)	9 (17)	1.03 (0.41-2.55)			0.46 (0.17-1.26)			2.26 (1.12-4.55)		
Dominantni												
TT	77 (37.2)	22 (26.8)	18 (34)	1.00			1.00			1.00		
CT+CC	130 (62.8)	60 (73.2)	35 (66)	1.11 (0.58-2.12)	0.76	258	0.70 (0.33-1.50)	0.36	180.7	1.61 (0.91-2.82)	0.095‡	347.7
Recesivni												
TT+CT	170 (82.1)	58 (70.7)	44 (83)	1.00			1.00			1.00		
CC	37 (17.9)	24 (29.3)	9 (17)	0.95 (0.42-2.16)	0.91	258.1	0.51 (0.21-1.21)	0.12	179.1	1.91 (1.05-3.45)	0.036*	346.1
Overdominantni												
i												
TT+CC	114 (55.1)	46 (56.1)	27 (50.9)	1.00			1.00			1.00		
CT	93 (44.9)	36 (43.9)	26 (49.1)	1.13 (0.61-2.09)	0.7	257.9	1.19 (0.59-2.41)	0.63	181.3	0.95 (0.57-1.59)	0.85	350.4
Log-aditivni												
-	-	-	-	1.03 (0.67-1.60)	0.88	258.1	0.69 (0.43-1.13)	0.14	179.4	1.50 (1.05-2.13)	0.024*	345.4
rs4245739												
Kodominantni												
AA	125 (60.7)	44 (54.3)	19 (36.5)	1.00			1.00			1.00		
AC	68 (33)	31 (38.3)	29 (55.8)	3.15 (1.61-6.17)	0.0028*	246.8	2.29 (1.07-4.87)	0.091‡	177.5	1.31 (0.76-2.26)	0.6	348
CC	13 (6.3)	6 (7.4)	4 (7.7)	1.96 (0.57-6.80)			1.83 (0.44-7.54)			1.31 (0.47-3.65)		
Dominantni												
AA	125	44 (54.3)	19 (36.5)	1.00	8e-04*	245.4	1.00	0.03*	175.6	1.00	0.31	346

AC+CC	(60.7)												
Recesivni	82 (39.3)	37 (45.7)	33 (63.5)	2.94 (1.54-5.61)			2.22 (1.07-4.62)			1.31 (0.78-2.20)			
AA+AC	193 (93.7)	75 (92.6)	48 (92.3)	1.00	0.82	256.5	1.00	0.81	180.2	1.00	0.75	347	
CC	13 (6.3)	6 (7.4)	4 (7.7)	1.15 (0.35-3.75)			1.18 (0.31-4.55)			1.18 (0.43-3.22)			
Overdominantni													
AA+CC	138 (67)	50 (61.7)	23 (44.2)	1.00	0.0011*	245.8	1.00	0.043*	176.1	1.00	0.38	346.3	
AC	68 (33)	31 (38.3)	29 (55.8)	2.88 (1.52-5.48)			2.09 (1.02-4.30)			1.27 (0.74-2.17)			
Log-aditivni													
-	-	-		1.93 (1.20-3.13)	0.0071*	249.3	1.71 (0.96-3.06)	0.066‡	176.9	1.21 (0.81-1.83)	0.35	346.2	

† vrednosti podešene za razlike u starosti bolesnika

‡ statistički trend značajnosti

*statistički značajni rezultati su boldovani

Skraćenice: OR- odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacioni kriterijum.

Tabela 4.13. Asocijacija genetičkih varijanti rs1058205, rs1010 i rs4245739 sa T kliničkim stadijumom KP

Genetički model	T1 (%)	T2 (%)	T3/T4(%)	T2 vs T1			T3/T4 vs T1			T3/T4 vs T2		
				OR (95% CI) [†]	<i>P</i> vrednost [†]	AIC	OR (95% CI) [†]	<i>P</i> vrednost [†]	AIC	OR (95% CI) [†]	<i>P</i> vrednost [†]	AIC
rs1058205												
Kodominantni												
TT	25 (51)	128 (75.7)	64 (71.1)	1.00			1.00			1.00		
TC	23 (46.9)	37 (21.9)	22 (24.4)	0.33 (0.17-0.66)	0.0069*	227.6	0.36 (0.17-0.78)	0.022*	178.8	1.19 (0.65-2.19)	0.57	341.4
CC	1 (2)	4 (2.4)	4 (4.4)	0.83 (0.09-7.73)			1.67 (0.18-15.83)			2.00 (0.48-8.28)		
Dominantni												
TT	25 (51)	128 (75.7)	64 (71.1)	1.00			1.00			1.00		
TC+CC	24 (49)	41 (24.3)	26 (28.9)	0.35 (0.18-0.69)	0.0024*	226.3	0.42 (0.20-0.87)	0.018*	178.9	1.27 (0.71-2.26)	0.42	339.9
Recesivni												
TT+TC	48 (98)	165 (97.6)	86 (95.6)	1.00	0.86	235.5	1.00	0.41	183.8	1.00	0.37	339.8
CC	1 (2)	4 (2.4)	4 (4.4)	1.22 (0.13-11.25)			2.40 (0.26-22.22)			1.92 (0.47-7.86)		
Overdominantni												
TT+CC	26 (53.1)	132 (78.1)	68 (75.6)	1.00			1.00			1.00		
TC	23 (46.9)	37 (21.9)	22 (24.4)	0.33 (0.17-0.66)	0.0016*	225.6	0.36 (0.17-0.75)	0.0064*	177	1.15 (0.63-2.12)	0.64	340.3
Log-aditivni												
-	-	-	-	0.45 (0.25-0.81)	0.0086*	228.7	0.57 (0.31-1.07)	0.08 [‡]	181.4	1.28 (0.79-2.08)	0.32	339.6
rs1010												
Kodominantni												
TT	16 (32.6)	58 (34.1)	31 (34.4)	1.00			1.00			1.00		
CT	24 (49)	83 (48.8)	32 (35.6)	1.00 (0.49-2.06)	0.97	238	0.71 (0.31-1.58)	0.23	183.5	0.72 (0.40-1.31)	0.033*	336.6
CC	9 (18.4)	29 (17.1)	27 (30)	0.91 (0.36-2.32)			1.56 (0.59-4.13)			1.74 (0.88-3.45)		
Dominantni												
TT	16 (32.6)	58 (34.1)	31 (34.4)	1.00			1.00			1.00		
CT+CC	33 (67.3)	112 (65.9)	59 (65.6)	0.98 (0.49-1.93)	0.95	236.1	0.94 (0.45-1.98)	0.87	184.4	0.99 (0.58-1.69)	0.96	341.4
Recesivni												
TT+CT	40 (81.6)	141 (82.9)	63 (70)	1.00	0.82	236	1.00	0.13	182.2	1.00	0.017*	335.8
CC	9 (18.4)	29 (17.1)	27 (30)	0.91 (0.40-2.09)			1.90 (0.80-4.47)			2.08 (1.14-3.81)		
Overdominantni												
TT+CC	25 (51)	87 (51.2)	58 (64.4)	1.00	0.91	236.1	1.00	0.14	182.3	1.00	0.039*	337.2
CT	24 (49)	83 (48.8)	32 (35.6)	1.04 (0.55-1.97)			0.59 (0.29-1.20)			0.58 (0.34-0.98)		
Log-aditivni												
-	-	-	-	0.96 (0.61-1.52)	0.86	236	1.19 (0.75-1.88)	0.46	183.9	1.26 (0.89-1.79)	0.19	339.7

rs4245739

Kodominantni												
AA	25 (51)	99 (58.9)	51 (56.7)	1.00			1.00			1.00		
AC	23 (46.9)	58 (34.5)	29 (32.2)	0.61 (0.32-1.19)	0.14	233.3	0.62 (0.30-1.28)	0.044*	180.2	0.97 (0.55-1.70)	0.45	340.1
CC	1 (2)	11 (6.5)	10 (11.1)	2.78 (0.34-22.72)			5.12 (0.62-42.48)			1.77 (0.70-4.43)		
Dominantni												
AA	25 (51)	99 (58.9)	51 (56.7)	1.00			1.00			1.00		
AC+CC	24 (49)	69 (41.1)	39 (43.3)	0.70 (0.37-1.34)	0.28	234.1	0.80 (0.40-1.62)	0.53	184.1	1.10 (0.65-1.84)	0.73	339.6
Recesivni												
AA+AC	48 (98)	157 (93.5)	80 (88.9)	1.00			1.00			1.00		
CC	1 (2)	11 (6.5)	10 (11.1)	3.41 (0.43-27.27)	0.18	233.4	6.28 (0.77-50.85)	0.033*	179.9	1.78 (0.73-4.38)	0.21	338.1
Overdominantni												
AA+CC	26 (53.1)	110 (65.5)	61 (67.8)	1.00			1.00			1.00		
AC	23 (46.9)	58 (34.5)	29 (32.2)	0.57 (0.30-1.10)	0.096‡	232.5	0.53 (0.26-1.09)	0.086‡	181.5	0.90 (0.52-1.55)	0.71	339.6
Log-aditivni												
-	-	-	-	0.89 (0.53-1.51)	0.68	235.1	1.10 (0.63-1.91)	0.74	184.3	1.18 (0.79-1.75)	0.42	339.1

† vrednosti podešene za razlike u starosti bolesnika

‡ statistički trend značajnosti

*statistički značajne vrednosti su boldovane

Skraćenice: OR- odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacioni kriterijum.

Tabela 4.14. Asocijacija genetičke varijante rs4245739 sa rizikom za progresiju KP

Genetički model	Nizak rizik (%)	Srednji rizik (%)	Visok rizik (%)	srednjivsnizak rizik			visokvsnizak rizik			visokvssrednji rizik		
				OR (95% CI) [†]	<i>P</i> vrednost [†]	AIC	OR (95% CI) [†]	<i>P</i> Vrednost [†]	AIC	OR (95% CI) [†]	<i>P</i> vrednost [†]	AIC
rs4245739												
Kodominantni												
AA	16 (72.7)	63 (55.3)	109 (55.6)	1.00			1.00			1.00		
AC	6 (27.3)	44 (38.6)	71 (36.2)	1.87 (0.68-5.17)	0.13	124.3	1.79 (0.67-4.83)	0.091 [‡]	144.5	0.95 (0.58-1.55)	0.79	408.9
CC	0 (0)	7 (6.1)	16 (8.2)	NA (0.00-NA)			NA (0.00-NA)			1.33 (0.51-3.44)		
Dominantni												
AA	16 (72.7)	63 (55.3)	109 (55.6)	1.00			1.00			1.00		
AC+CC	6 (27.3)	51 (44.7)	87 (44.4)	2.16 (0.79-5.95)	0.12	124	2.18 (0.81-5.81)	0.11	144.7	1.00 (0.63-1.60)	0.99	407.3
Recesivni												
AA+AC	22 (100)	107 (93.9)	180 (91.8)	1.00			1.00			1.00		
CC	0 (0)	7 (6.1)	16 (8.2)	NA (0.00-NA)	0.11	123.8	NA (0.00-NA)	0.066 [‡]	143.9	1.36 (0.54-3.44)	0.51	406.9
Overdominantni												
AA+CC	16 (72.7)	70 (61.4)	125 (63.8)	1.00			1.00			1.00		
AC	6 (27.3)	44 (38.6)	71 (36.2)	1.67 (0.61-4.61)	0.31	125.3	1.58 (0.59-4.23)	0.35	146.4	0.92 (0.57-1.49)	0.73	407.2
Log-aditivni												
-	-	-	-	2.21 (0.87-5.62)	0.073 [‡]	123.1	2.22 (0.91-5.40)	0.055 [‡]	143.6	1.05 (0.73-1.53)	0.78	407.3

[†] rezultati su podešeni za razlike u starosti bolesnika

[‡] statistički trend značajnosti

Skraćenice: OR- odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacioni kriterijum.

5. Diskusija

Karcinom prostate i dalje predstavlja jedan od najvećih izazova savremene onkologije. Procenjuje se da će 2020. godine u SAD broj novoobolelih dostići 200.000, a da će od posledica KP umreti preko 30.000 muškaraca. Sa 21% od ukupnog broja novodijagnostikovanih malignih bolesti, KP je na prvom mestu po učestalosti ispred karcinoma pluća i kolona. I pored visoke incidence, u poslednje dve decenije, opada smrtnost od ove maligne bolesti. Svake godine prosečno 4% manje muškaraca umire od KP. Razlog tome leži u ranoj dijagnostici i boljim modalitetima lečenja KP (171). Smanjenje stope smrtnosti koja se beleži u mnogim razvijenim zemljama sveta nije registrovano i u Republici Srbiji. U periodu od 1991. do 2010. godine, stopa smrtnosti rasla je u proseku 2.2% godišnje (172). Projekcije za narednih deset godina pokazuju dalji porast incidence i smanjenje stope smrtnosti od KP u svetu. Nažalost, Srbija nije u grupi zemalja za koje se previđa smanjenje stope smrtnosti od ove maligne bolesti u narednih deset godina (173).

Post-mortem studije rađene na osnovu obdukcionih nalaza muškaraca (bez obzira na uzrok smrti) pokazale su da polovina muškaraca u životnoj dobi od 50 do 59 godina poseduje histopatološki dokaz o postojanju KP. U starijoj životnoj dobi ovaj broj raste do 80% kod muškaraca starijih od 80 godina. Rezultati ovih studija daju i predikciju da bi samo njih 3,8% umrlo od ove bolesti. KP se razvija izuzetno sporo i može imati neznatan uticaj na kvalitet života ili smrtnost bolesnika. Samo relativno mali procenat svih dijagnostikovanih KP (oko 10% prema istraživanjima sa Harvard Univerziteta), agresivno se proteže izvan kapsule prostate. To je razlog što je najveći izazov u dijagnostici precizna diskriminacija latentnih (indolentnih) od agresivnih formi KP (174). Postoje procene da se preko 60% bolesnika sa ranodijagnostikovanom KP podleže agresivnoj formi hirurškog lečenja umesto terapiji aktivnog praćenja iako većina tih KP pripada indolentnim i lokalizovanim formama bolesti (175). I pored brojnih studija i povećanog interesa naučne javnosti još uvek ne postoje precizni dijagnostički i prognostički parametri za preciznu diskriminaciju indolentnih od agresivnih formi KP.

Od uvođenja PSA testa 90tih godina prošlog veka u dijagnostiku KP, zemlje Zapadne hemisfere beleže stalni pad u boju fatalnih ishoda u lečenju ovog maligniteta. Procenjuje se da samo rana detekcija KP korišćenjem PSA skrininga može dovesti do smanjenja stope smrtnosti za 20% (176). PSA je organ-specifičan marker i on zapravo predstavlja ukupnu količinu totalnog PSA (tPSA), kako onu u slobodnoj formi tako i onu vezanu za inhibitore u serumu muškaraca. Povećanje serumskih vrednosti PSA može biti posledica i benignih bolesti kao što je BPH ili hronični prostatitis. Višedecenijsko praćenja kliničke upotrebe PSA testa je pokazalo naročito nisku specifičnost i senzitivnost ovog markera u granicama od 4 do 10 ng/ml. Zato se ove vrednosti PSA nazivaju dijagnostička siva zona (eng. *diagnostic gray zone*) i nisu od naročite koristi u diferencijalnoj dijagnostici benignih stanja prostate i KP. Dodatno, procenjuje se da 15% bolesnika sa klinički značajnim vrednostim Glison skora ($[GS] \geq 7$) tokom inicijalne dijagnostike imaju serumsku vrednost PSA ispod 4 ng/ml. To je bio razlog što se poslednjih godina ulažu naporu u poboljšanje senzitivnosti i specifičnosti PSA testa. To se naročito odnosi na pokušaje uvođenja u dijagnostičke procedure nekoliko derivata PSA: slobodni PSA (fPSA); procenat slobodnog PSA (%fPSA) koji nije vezan za inhibitore u odnosu na vrednost tPSA; gustina PSA (eng. *PSA density*) koja predstavlja količnik serumskih vrednosti tPSA i zapremine prostate; i brzina PSA (eng. *PSA velocity*) kojom se izražava promena vrednosti tPSA u određenom vremenu. Istraživanja su pokazala da se fPSA sintetiše u formi neaktivnog prekursora PSA (proPSA). U serumu se detektuju 3 od 7 izoformi ([-2], [-4], i [-5/-7]) od kojih je [-2]proPSA (p2PSA) najstabilnija. Poslednjih deset godina traju naporu da se klinički validira značaj serumskih vrednosti p2PSA i njegovih derivata p2PSA/fPSA (%p2PSA) i PHI (eng. *Prostate Health Index*, PHI). PHI predstavlja matematički algoritam čija se vrednost dobija izračunavanje matematičke jednačine

(p2PSA/fPSA)· \sqrt{t} PSA (177, 178). Od svih derivata PSA dozvolu za kliničku primenu za sada ima samo PHI (179). Istraživanja o značaju PSA derivata u dijagnostici i praćenju KP rađena je i kod bolesnika iz Srbije (180, 181). Međutim, i pored brojnih kliničkih studija i uočenih limitacija, nivo serumske vrednosti PSA i dalje ostaje jedini standardni prognostički parametar KP u dijagnostici i praćenju biohemijske progresije bolesti.

Dosadašnje korišćenje standardnih dijagnostičkih parametara KP (PSA test i klinički stadijum bolesti po TNM klasifikaciji) ima vrlo ograničen efekat na odabir terapijskog pristupa kod ranodijagnostikovanih KP (aktivno praćenje *versus* hirurško lečenje). To se naročito odnosi na lokalizovane KP (klinički stadijum tumora T1-2) kod muškaraca u mlađoj životnoj dobi. I pored unapređenja hirurških tehnika (laparaskopska ili robotom potpomognuta radikalna prostatektomija) moguće postoperativne komplikacije (inkontinencija i impotencija) značajno utiču na kvalitet života bolesnika (182). Američko istraživanje PIVOT (eng. *The Prostate Cancer Intervention Versus Observation Trial*, PIVOT) pokazalo je da kod bolesnika do 75 godina starosti sa serumskim vrednostima PSA < 50ng/ml i tumorom koji je na osnovu TNM klasifikacije opisan kao lokalizovan (T1-2NxM0) radikalno lečenje nema povećan efekat na preživljavanje u odnosu na bolesnike koji su bili podvrgnuti aktivnom praćenju bolesti (183). Suprotno ovim rezultatima, rezultati studije iz Velike Britanije koja je za cilj imala desetogodišnje praćenje bolesnika sa lokalizovanim KP pokazala je da smrtnost od KP niska za sve modalitete lečenja, ali da je učestalost progresije bolesti i metastaziranja bila niža u grupi bolesnika koji su podvrgnuti lečenju u odnosu na grupu bolesnika kod kojih je sprovedeno aktivno praćenje (184).

Za sada jedini standardni prognostički parametar koji opisuje biološku prirodu KP je GS. Koncept Glisonovog sistema ocenjivanja je jednostavan jer se fokusira isključivo na arhitekturu tumora. Međutim, ovaj sistem klasifikacije potpuno ignoriše sve druge morfološke karakteristike tumorskih ćelija koje mogu imati prognostički značaj kao što su pre svega izmene na nivou jedra, interakcija epitelnih ćelija i ćelija strome i prisustvo nekroze ili mitoze. Uprkos svim naporima standardizacije, GS i dalje je podložan individualnim procenama patologa u sistema ocenjivanja. Određivanje GS na bioptiranom materijalu nosi dodatne rizike zbog prostorne heterogenosti i multifokalne prirode KP. I pored svih opisanih limitacija, GS određen analizom bioptiranog i postoperativno dobijenog tkiva prostate i dalje predstavlja jedini standardni prognostički parametar koji opisuje biološki potencijal KP (185).

Zbog opisanih nedostataka standardnih prognostičkih parametara, pažnja naučne javnosti je usmerena ka otkriću novih bioloških markera koji bi se prevashodno koristili za bolesnike sa KP kod kojih se kao terapijski pristup predlaže aktivno praćenje i to za procenu rizika od progresije bolesti. To se naročito odnosi na bolesnike sa niskim rizikom za progresiju bolesti procenjenu na onovu vrednosti standardnih prognostički parametara (pT1/2, GS 6, tri ili manje pozitivnih biopsija i vrednos serumskog PSA <10 ng/ml) (186).

Otkriće bioloških markera koji bi se koristili u dijagnostici i praćenju KP su tema brojnih eksperimentalnih studija. Do sada, najveći broj njih bio je usmeren na identifikaciju genetičkih markera (gena kandidata i genetičkih varijanti) koji bi se kao pomoćni ili kao standardni prognostički parametri koristili u proceni rizika za progresiju KP (187).

Genomi ljudi identični su 99%, što znači da razlike među ljudima, kada izuzmemo epigenetiku, potiču od preostalih 1% varijacija u sekvenci molekula DNK čoveka. Pored inserciono-delecionijskih varijanti (eng. *INsertion/DELetion*, INDEL's) i varijanti u broju uzastopnih ponovaka (eng. *Variable Number of Tandem Repeats*, VNTRs), većinu njih čine varijacije u pojedinačnom nukleotidu odnosno tačkaste genetičke varijante (eng. *Single Nucleotide Variants*, SNVs) (188). SNV su nerepetitivne, pojedinačne izmene sekvence DNK prvi put otkrivene 1978. godine u

klasteru β -globinskih gena (189). Od tada identifikovano je preko 30 miliona SNV u genomima ljudi, a procenjuje se da se na svakih 100-300 baznih parova javlja tačkasta genetička varijanta (188, 190, 191). Iako je većina SNV fenotipski „tihan“, neke od njih asociraju sa rizikom za brojne bolesti čoveka uključujući i maligne bolesti (192). Anotacijom većeg broja tačkastih genetičkih markera koji čine osobu podložnom nekom malignom oboljenju i/ili dovode do toga da isti klinički entitet varira od latentne do izuzetno agresivne forme, kao i identifikacijom epistatičkih interakcija tih novootkrivenih SNV omogućila bi se bolja stratifikacija bolesnika, a samim tim i bolji terapijski pristupi u lečenju malignih bolesti (193, 194).

Velika većina tačkastih genetičkih varijanti koje asociraju sa malignim bolestima proistekla je iz GWA studija u kojima se na velikom broju bolesnika i kontrola ispituje asocijacija preko milion različitih SNV sa brojnim ljudskim oboljenjima (195, 196). Iako je odavno poznata činjenica da neke SNV u kodirajućim regionima genoma doprinose razvoju malignih bolesti, mali broj njih identifikovan je u GWA studijama. Ono što je postalo jasno nakon prvih GWA studija je da je velika većina, gotovo 93% funkcionalnih SNV, zapravo u nekodirajućim regionima ljudskog genoma (197, 198). Velika većina tih SNV svoje efekte ostvaruje na regulaciju ekspresije gena i to na nivou inicijacije transkripcije, narušavanjem funkcije regulatornih regiona ili na post-transkripcionom nivou uključujući i fenomen RNK interferencije (198).

MikroRNK u većini slučajeva imaju dužinu od 19-22 nukleotida. Delovi zrele mikroRNK od drugog do osmog nukleotida čine region semena koji je ključan za prepoznavanje i vezivanje sa ciljnom iRNK i efekata do kojeg će doći nakon sparivanja sa ciljnim transkriptom (199). Iako je region semena najčešće u potpunosti sparen sa iRNK, ostali regioni mikroRNK trpe određenu fleksibilnost i ne moraju biti apsolutno komplementarno sparni sa ciljnim transkriptom (200). Procenjuje se da jedna mikroRNK može imati na stotine ciljnih iRNK (201). Ako bismo na ovom mestu napravili analogiju sa regulatornim proteinima transkripcije i njihovim kooperativnim vezivanjem za DNK u cilju regulacije genske ekspresije, veći broj različitih mikroRNK vezivanjem za svoje regulatorne elemente u okviru 3'UTR-a iRNK takođe fino podešava ekspresiju velikog broja gena, ali na post-transkripcionom nivou (202). Jedan od razloga zašto jedan mikroRNK može posedovati više ciljnih iRNK je svakako i u činjenici da pri-miRNK transkripti podležu procesu RNK editovanja (203). Kao što u kombinatornoj kontroli jedan regulatorni protein transkripcije u zavisnosti od konteksta i interakcije sa drugim regulatornim proteinima dovodi do aktivacije ili represije transkripcije, na sličan način jedna mikroRNK u zavisnosti konteksta ostalih vezanih mikroRNK za iste ciljne transkripte fino moduliše nivoe ekspresije gena (204).

Kako su naša znanja o organizaciji i građi ljudskog genoma rasla, nova klasa nekodirajućih RNK, mikroRNK, i genetičke varijante u genima koji ih kodiraju našli su se u fokusu istraživanja koje za temu imaju patogenezu mnogih bolesti čoveka (205). Još od prve studije Abelsona i saradnika koji su utvrdili da mutacija u mestu vezivanja miR-189 u genu *SLITRK1* (eng. *SLIT And NTRK Like Family Member 1*, *SLITRK1*) asocira sa Turetovim sindromom, otkriven je veliki broj SNV u genima za transkripte uključene u fenomen RNK interferencije (97, 206, 207). Neke od njih danas su poznati faktori rizika za razvoj bolesti. (208, 209). Do danas, postoje brojni eksperimentalni dokazi da su mikroRNK (promenama u sekvenci gena ili obrascima ekspresije) asocirane sa rizikom za razvoj i progresiju brojnih maligniteta, uključujući i KP (210). MikroRNK dele se na onkogene i tumor-supresorske u zavisnosti od toga da li utišavaju ekspresiju tumor-supresorskih ili onkogenih proteina. Međutim, sve je više eksperimentalnih dokaza da jedna mikroRNK može biti i onkogeni i tumor-supresorska, a u zavisnosti od tipa maligne ćelije (211). Istraživanja su pokazala da je obrazac ekspresije mikroRNK specifičan kako za tip malignog tumora tako i za stadijum progresije bolesti (212). Ova naučna saznanja čine ih idealnim genima kandidatima za istraživanje podložnosti razvoju i progresiji malignih oboljenja, s obzirom na to da male genetičke promene u sekvenci mikroRNK mogu imati širok fenotipski efekat (97).

Istraživanja su pokazala da su SNV u delovima genoma koji će dati zrelu mikroRNK, a posebno u regionu semena, retka i to kao rezultat selektivnog pritiska tokom evolucije da ti delovi gena ostanu što očuvaniji (213, 214). Funkcionalna važnost tih sekvenci doprinela je da se tokom evolucije frekvence “štetnih” alela u njima svedu na minimum. To je za posledicu dovelo do toga da je gustina SNV u genima za mikroRNK, pogotovu u regionu semena, kao i u mestima njihovog vezivanja manja kod ljudi. Sa aspekta molekularne epidemiologije, s obzirom da SNV u putu mikroRNK nisu toliko zastupljene kao u drugim delovima genoma, verovatnoća da imaju veći fenotipski efekat raste.

SNV u genima za mikroRNK ostvaruju efekte na sledeće načine: uticajem na nivo transkripcije primarnog transkripta mikroRNK, uticajem na način i nivo obrade pri-/pre-mikroRNK, i uticajem na samu interakciju između mikroRNK i iRNK (215). Većina studija gena kandidata koja je istraživala uticaj genetičkih varijanti u genima za mikroRNK na rizik za razvoj malignih tumora oslanjala se upravo na poznavanje funkcionalne veze između odabrane mikroRNK i njenih ciljnih iRNK (216).

Iako se procenjuje da postoji još dosta neidentifikovanih varijanti u putu mikroRNK, za mnoge od novootkrivenih varijanti preostaje da se ispituju njihovi efekti kako u različitim karcinomima tako i na različitim populacijama (217). Populacijske razlike u učestalosti ređe zastupljenih alela za neke od SNV i dalje nisu poznate. Takođe, neke alelske varijante SNV u genima za mikroRNK zastupljene su sa učestalošću većom od 1% samo u populacijama afričkog ili azijskog porekla (218). Većina studija asocijacije koje se bave uticajem SNV u genima za mikroRNK na razvoj i progresiju malignih bolesti, ograničena je na regione pre- i zrelih mikroRNK budući da su nam njihove sekvence poznate (97, 219). Sekvenca pri-miRNK zavisi od mesta početka transkripcije gena za mikroRNK. Za mnoge gene za mikroRNK još uvek nisu utvrđena mesta početka transkripcije odnosno promotori sa kojih počinje transkripcija ovih gena (220, 221). Takođe, nedovoljno je podataka o načinima regulacije ekspresije pojedinačnih gena za mikroRNK, potencijalnim regulatornim sekvencama, kao i alternativnim promotorima koji mogu biti aktivni u zavisnosti od tipa tkiva, stadijuma razvića i diferencijacije, ali i od patoloških izmena u tkivu kao što je maligna transformacija (222). Bolje upoznavanje regiona pri-miRNK je od velike važnosti s obzirom da se u tom regionu mogu „kritički“ potencijalno važne, a još uvek neistražene SNV koje bi doprinele boljem rasvetljavanju molekularne osnove nekih malignih tumora.

Sposobnost tačkastih genetičkih varijanti da utiču na fenotip konstantno se potvrđuje otkrivanjem sve većeg broja bolesti koje su asocirane sa ovim izmenama u genomu. Na sličan način kao što SNV u regionu semena može da izmeni način vezivanja neke mikroRNK, i SNV u ciljnim transkriptima odnosno SNV u mestima vezivanja mikroRNK mogu da dovedu ili do ukidanja već postojećeg ili do formiranja novog mesta vezivanja za neku mikroRNK, kao i do izmena u efikasnosti inhibicije posredstvom određene mikroRNK (223). Budući da je za regulaciju ekspresije gena sa mikroRNK ključno komplementarno bazno sparivanje, i najmanja promena u mestu vezivanja mikroRNK u 3'UTR-u iRNK može imati velike posledične efekte (219, 224). Još od prve studije Yu i saradnika u kojoj je analizirana asocijacija velikog broja SNV u mestima vezivanja mikroRNK sa malignim bolestima, ustanovljeno je da genetičke varijante ovog tipa asociraju sa različitim malignitetima (225, 226).

Da bi neka tačkasta genetička varijanta u mestu vezivanja mikroRNK zaista bila funkcionalna u kontekstu asocijacije sa malignim fenotipom potrebno je da zadovolji sledeće kriterijume: a) SNV mora asocirati sa rizikom za razvoj ili progresiju malignog tumora; b) mikroRNK na čije vezivanje utiče i transkript u kojem se nalazi moraju biti eksprimirani u tkivu u kojem dolazi do neoplastične transformacije; i c) alelska varijanta analizirane SNV mora uticati na vezivanje mikroRNK i

posledično dovoditi do izmenjene ekspresije transkripta (97). Biranjem gena kandidata čiji su proteinski produkti važni za funkcionisanje neizmenjenih ili maligno transformisanih ćelija određenog tkiva jedan je od načina da se identifikuju takve interakcije. Jedna od prvih takvih studija bila je na karcinomu kolona i genu *CD86* (227). SNV rs17281995 u 3'UTR-u gena *CD86* uticala je na vezivanje pet različitih mikroRNK, dok je ređe učestao alel te varijante asociirao sa rizikom za razvoj karcinoma kolona. Od tada veliki je broj studija istraživao uticaj SNV u mestima vezivanja mikroRNK na razvoj malignih bolesti (226, 228).

Od oko 120000 poznatih SNV koji se nalaze u 3'UTR-ovima gena, za oko 17% njih smatra se da ukidaju postojeće mesto vezivanja za neku mikroRNK, dok je za 8.6% SNV predviđeno da kreiraju novo mesto vezivanja (229). Jedno od saznanja koje je proisteklo nakon prvih GWA studija je da su varijante u regulatornim regionima gena snažnije asociirane sa razvojem malignih bolesti od nesinonimnih SNV u kodirajućim delovima genoma (59). Kao takve, varijante u 3'UTR-ovima gena, a koje utiču na vezivanje mikroRNK mogle bi značajno doprineti razumevanju genetičke osnove malignih tumora.

Iako je u studijama gena kandidata moguće utvrditi efekat pojedinačnih SNV na rizik za razvoj nekog malignog tumora, kumulativni efekat većeg broja nasleđenih SNV u genima za mikroRNK mogao bi još više povećati taj rizik. U prilog tome govori podatak da je povećan rizik za razvoj karcinoma jednjaka i karcinoma bešike primećen kod osoba koje su imale veći broj SNV u genima za mikroRNK i genima za proteine uključene u njihovu obradu i sazrevanje (130). Jedan od prihvaćenih genetičkih modela nastanka malignih bolesti je da veći broj genetičkih varijanti niske penetrabilnosti u brojnim genima podložnosti učestvuje u njihovom nastanku i progresiji (230). Veliki broj tih gena i genetičkih varijanti u njima još uvek nije otkriven. S obzirom da se GWA studijama može objasniti nešto manje od 30% genetičke komponente u nastanku KP, a imajući u vidu efekte mikroRNK na regulaciju genske ekspresije, kao idealni geni kandidati za istraživanje dodatnih markera rizika za razvoj i progresiju KP nameće se ova klasa malih nekodirajućih RNK (75). Dosadašnje asocijacije brojnih SNV iz puta mikroRNK sa različitim malignim bolestima predstavljaju potvrdu njihove funkcionalnosti i njihovog potencijalnog korišćenja kao budućih biomarkera raznih malignih oboljenja (144, 231). Njihova validacija u većem broju studija genetičkih asocijacija neophodna je kako bi se ispitao stvarni efekat na populacijama različitog etničkog porekla.

Među najviše istraživanim mikroRNK u kontekstu kancerogeneze su članovi mikroRNK iz miR-34 familije, policistronska mikroRNK koja se prepisuje sa klastera gena *hsa-miR-143/145*, kao i miR-378. Da su ove mikroRNK uključene u sve faze nastanka i progresije malignih bolesti ukazale su studije koje su analizirale kako razlike u nivoima njihove ekspresije, tako i u nivoima ekspresije njihovih ciljnih iRNK u neizmenjenim i u maligno transformisanim tkivima. Dodatno, eksperimentalnim utišavanjem ili stimulisanjem njihove ekspresije, praćeni su efekti koje ostvaruju na proces neoplastične transformacije (232).

Imajući u vidu tumor-supresorske uloge miR-34b/c, miR-378 i miR-143/145 u KP i potencijalne efekte genetičkih varijanti rs4938723, rs1076064 i rs4704342 u regulatornim regionima ovih mikroRNK na nivoe transkripcije i/ili njihovu obradu, kao i nedovoljnu istraženost njihovog efekta u procesu neoplastične transformacije tkiva prostate, cilj je bio detaljnije ispitivanje njihove asocijaciju sa rizikom za razvoj i progresiju KP (233-235).

Jedna od najviše izučavanih genetičkih varijanti sa potencijalnim efektom na nivo ekspresije članova familije miR-34 je SNV rs4938723. Ova genetička varijanta nalazi se uzvodno od regiona koji kodira zajednički pri-miRNK transkript miR-34b i miR-34c i potencijalno utiče na proces njihove biogeneze ostvarujući efekat na nivo transkripcije primarnog transkripta. Prema *in silico*

predviđanjima, genetička varijanta rs4938723 nalazi se u okviru CpG ostrvca promotora gena *hsa-miR-34b/c* gde utiče i na vezivanje regulatornih proteina transkripcije iz porodice GATA za taj region (167). Funkcionalna važnost ove genetičke varijante pokazana je u eksperimentima sa luciferaznim reporterskim esejem na ćelijskoj liniji embrionalnih ćelija bubrega HEK₂₉₃T gde je primećena povećana luciferazna aktivnost vektora koji su u svojoj sekvenci posedovali alel T genetičke varijante rs4938723 u odnosu na vektore sa alelom C u sekvenci (236).

Do danas, ova genetička varijanta analizirana je u preko 25 studija slučajeva i kontrola kod različitih malignih bolesti dajući međusobno suprotstavljene rezultate. Velika većina tih studija rađena je u populacijama azijskog porekla, a meta-analiza iz 2019. godine upućuje na to da je ova genetička varijanta asocirana sa rizikom za razvoj hepatocelularnog karcinoma, karcinoma debelog creva, skvamoznog karcinoma jednjaka i akutne limfoblastne leukemije (237). Potencijalna asocijacija ove genetičke varijante sa rizikom za razvoj i progresiju KP do sada je rađena samo u jednoj studiji iz Irana (138). Genetička varijanta rs4938723 nije prethodno istražena u KP ni na jednoj populaciji evropskog porekla.

U istraživanju Hashemi-a i saradnika genetička varijanta rs4938723 asocirala je sa rizikom za razvoj KP i to po nekoliko različitih genetičkih modela (138). U studiji genetičke asocijacije sprovedenoj u okviru ove teze ta genetička varijanta nije asocirala sa rizikom za razvoj KP kod bolesnika iz populacije Srbije. Uočene razlike između ova dva istraživanja predstavljaju mogući rezultat prisustva etničkih razlika, koje se ogledaju i u razlici u frekvencama alela ove genetičke varijante u populaciji Srbije i populaciji Irana. Još jedno od objašnjenja za međusobno suprotstavljene rezultate ovih studija je i razlika u veličini uzorka na kojem je vršeno ispitivanje (138). Grupa bolesnika sa KP, ali i kontrolna grupa dva puta je bila manja u studiji Hashemi-a i saradnika. Sa druge strane, u iranskoj studiji nije pokazana asocijacija genetičke varijante rs4938723 ni sa jednim standardnim prognostičkim parametrom KP. Slično tim nalazima, genetička varijanta rs4938723 ni u našoj populaciji nije asocirala sa inicijalnim serumskim vrednostima PSA bolesnika kao ni sa vrednostima GS karcinoma. Za razliku od tih rezultata, ređe učestali alel C ove genetičke varijante, statistički značajno je asocirao sa nižim T kliničkim stadijumima karcinoma kod bolesnika iz naše populacije. Iako je jedan od mogućih razloga za ovakav rezultat i mali broj bolesnika u pojedinačnim grupama formiranim nakon stratifikacije bolesnika na osnovu njihovog T kliničkog stadijuma, primećene diskrepance između ove dve studije mogu se delimično objasniti i različitim sistemima gradiranja tumora s obzirom na to da je u ovoj studiji korišćen klinički, a u studiji Hashemi-a i saradnika patološki stadijum karcinoma (138).

Genetička varijanta rs1076064 nalazi se 222 bp uzvodno od regiona koji kodira za *pre-miR-378*. S obzirom na poziciju ove genetičke varijante u odnosu na predikovano mesto početka transkripcije miR-378, predloženi efekat ovog SNV je uticaj na nivo transkripcije i/ili obradu pri-miR-378 (168). U pokušaju da se testira efekat genetičke varijante rs1076064 sprovedena je studija na neoplastično transformisanim ćelijskim linijama grlića materice (HeLa), pluća (A549) i hepatocita (HepG2) u kojoj je pokazano da konstrukti vektora sa alelom G ove genetičke varijante uzrokuju višu aktivnost promotora u poređenju sa rezultatima aktivnosti luciferaznog eseja za konstrukte u kojima se nalazio alel A (168). Istovremeno, pozicija ove genetičke varijante odgovara mestu vezivanja onkogeno c-MYC za koji je pokazano da istovremeno učestvuje i u regulaciji ekspresije miR-378 i gena *PPARGC1B* (eng. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-GAMMA, Coactivator 1, Beta*; *PPARGC1B*) u čijem se intronu nalazi gen ove mikroRNK (169). Na potencijalnu regulatornu funkciju regiona lociranog uzvodno od sekvence koja kodira *pre-miR-378*, a u kojoj se nalazi genetička varijanta rs1076064 upućuje i identifikacija potencijalnog intronskog promotora *miR-378* u okviru tog regiona (238).

U studiji koja je uključivala bolesnike sa hepatocelularnim karcinomom iz populacije Kine genetička varijanta rs1076064 smanjivala je rizik za razvoj tog maligniteta, i dodatno, asocijala sa boljim preživljavanjem kod bolesnika koji su posedovali alel G ove genetičke varijante (168). Ista istraživačka grupa prethodno je ovu genetičku varijantu dovela u vezu sa preživljavanjem kod bolesnika sa sitnoćelijskim karcinomom pluća (239). Kasnije je utvrđena asocijacija ove genetičke varijante i sa ranijim postavljanjem dijagnoze karcinoma pankreasa (240). Asocijacija rs1076064 sa rizikom za razvoj KP-a nije do sada testirana. Ipak njen potencijalan funkcionalni značaj na ekspresiju miR-378 koja je i sama izmenjena u KP u potpunosti opravdava uključivanje te genetičke varijante u ovu studiju. Dodatno, prethodno je ustanovljeno da smanjen nivo ekspresije miR-378 ne samo da asociira sa povišenim vrednostima PSA skora i višim GS, nego i sa kraćim preživljavanjem hirurški lečenih bolesnika sa agresivnom formom KP (241).

U ovoj tezi nije pokazana asocijacija genetičke varijante rs1076064 sa rizikom za razvoj KP iako je alel G ove genetičke varijante asocirao sa višim vrednostima serumskog PSA kada su upoređene distribucije genotipova kod bolesnika sa srednjim i niskim vrednostima serumskog PSA. Poređenjem frekvenci genotipova kod bolesnika sa kliničkim stadijumom T₃/T₄ i bolesnika sa kliničkim stadijumom T₂, ređe učestali alel G ove genetičke varijante asocirao je i sa nižim kliničkim stadijumom bolesti. Različiti smerovi asocijacije sa različitim prognostičkim parametrima delimično se mogu objasniti i malim brojem bolesnika u pojedinim grupama nakon odgovarajuće stratifikacije bolesnika. Osim asocijacija sa vrednostima PSA i T kliničkog stadijuma primarnog karcinoma, trend statističke značajnosti dobijen je i poređenjem distribucija genotipova u različitim grupama bolesnika formiranim na osnovu vrednosti GS. Dodatno, nakon stratifikacije bolesnika u grupe na osnovu rizika za progresiju bolesti, alel G genetičke varijante rs1076064 asocirao je sa agresivnijim formama KP u našoj populaciji. Dobijeni rezultat ipak treba pažljivo tumačiti budući da je grupa sa niskim rizikom za progresiju KP uključivala relativno mali broj bolesnika. S obzirom na to da su ovi rezultati prve studije asocijacije genetičke varijante rs1076064 i KP, nije moguće poređenje sa rezultatima studija slučajeva i kontrola u drugim populacijama.

I genetička varijanta rs4705342, kao i prethodne dve, nalazi se uzvodno od regiona koji kodira *pre-miR-143/145*. Pretpostavljen mehanizam dejstva ove genetičke varijante sličan je kao i za rs1076064, a to je uticaj na nivo transkripcije i/ili obradu pri-miRNK. Luciferaznim reporterskim esejem pokazan je efekat alelskih varijanti ove SNV u hepatocelularnom karcinomu i u KP (143, 170). Istovremeno, pokazano je da prisustvo alela C ove genetičke varijante povećava afinitet vezivanja proteinskog kompleksa NF-kB (eng. *Nuclear Factor Kappa-B*, NF-kB) za njegovo mesto vezivanja (170).

Za ovu genetičku varijantu prethodno je ustanovljena asocijacija sa rizikom za skvamozni karcinom grlića materica kod žena iz populacije Kine (242). SNV rs4705342 dodatno je bila asociirana i sa rizikom za relaps karcinoma dojke kod žena iz populacije Irana (243). Suprotno ovim rezultatima, u populaciji Han Kineza ova genetička varijanta nije pokazivala asocijaciju sa rizikom za hepatocelularni karcinom (244). U jedinoj prethodnoj studiji sprovedenoj u KP, alel C ove genetičke varijante ostvarivao je protektivni efekat na razvoj tumora prostate (143). Suprotno tim rezultatima, u studiji sprovedenoj u okviru ove disertacije alel C povećavao je rizik za razvoj KP kod bolesnika iz populacije Srbije. Uočena asocijacija dobijena je poređenjem distribucije genotipova između bolesnika sa KP i bolesnika sa BPH. Izostanak ove asocijacije kada je vršeno poređenje frekvenci genotipova između bolesnika sa KP i zdravih kontrola može se objasniti činjenicom da je grupa bolesnika sa BPH daleko homogenija i klinički bolje okarakterisana, što opravdava njeno uključivanje u ovu studiju kao grupu superkontrola. Razlike između ove i studije Chu i saradnika dodatno se mogu objasniti i razlikama u selekciji kontrolne grupe (143). Za potrebe ovog istraživanja, kontrolnu grupu činili su zdravi muškarci, dok su kontrolnu grupu u studiji Chu-a i saradnika činili muškarci bez znakova malignih bolesti regrutovani tokom pružanja zdravstvenih

usluga u istoj bolnici u kojoj su regrutovani bolesnici sa KP. I stratifikacija bolesnika u grupe na osnovu kliničko-patoloških nalaza razlikovala se između ove i prethodne studije, što je potencijalan razlog za izostanak potvrde asocijacije rs4705342 sa standardnim prognostičkim parametrima u našoj studiji. Takođe, i statistička obrada dobijenih rezultata razlikuje se između ove dve studije, budući da je u radu Chu i saradnika distribucija genotipova umesto između različitih grupa bolesnika sa KP poređena između grupa bolesnika sa KP i zdravih kontrola (143).

Među varijantama u mestima vezivanja mikroRNK za iRNK najviše istraživanim u kontekstu malignih bolesti svakako je varijanta rs4245739 u 3'UTR-u gena *MDM4* (245). Istovremeno, varijante u sekvenci gena *KLK3*, poput rs1058205, prepoznate su kao kandidati za studije genetičke asocijacije u KP s obzirom na funkcionalnu važnost proteinskog produkta kodiranog ovim genom, a to je PSA. Osim što je važan serumski biomarker u dijagnostici i praćenju KP, PSA ima ulogu u proteolitičkoj degradaciji i remodelovanju ekstracelularnog matriksa tkiva prostate što doprinosi ekstrakapsularnoj invaziji tumora (146). Obe navedene genetičke varijante nalaze se među varijantama sa statistički najznačajnijim asocijacijama u poslednjoj velikoj studiji koja je ispitala uticaj varijanti u mestima vezivanja mikroRNK sa KP. U toj istoj studiji koja je uključivala 22301 bolesnika sa KP i 22320 kontrola, Stegeman i saradnici identifikovali su još jednu, novu genetičku varijantu koja je pokazivala izuzetno snažnu asocijaciju sa agresivnošću KP, SNV rs1010 u 3'UTR-u gena *VAMP8* (127). Istovremeno, u dve studije, Stegeman i saradnici funkcionalno su okarakterisali sve tri genetičke varijante i identifikovane su mikroRNK na čije vezivanje utiču njihove alelske varijante (127, 145). Ova istraživanja pružila su dodatnu potporu pretpostavljenoj ulozi varijanti u mestima vezivanja mikroRNK kako u razvoju, tako i u svim fazama progresije KP. Imajući sve to u vidu, kao i funkcionalni značaj miRSNP-ova u biologiji karcinoma uopšte, nametnulo se pitanje da li genetičke varijante rs1058205, rs1010, i rs4245739 doprinose riziku za razvoj i progresiju KP i kod bolesnika iz populacije Srbije.

Budući da je genetička varijanta rs1058205 u studiji Stegemana i saradnika identifikovana kao jedna od 22 genetičke varijante koje su pokazivale asocijaciju sa rizikom za razvoj KP, ali i kao varijanta koja je najznačajnije asociirala sa agresivnošću KP među više od 2000 analiziranih varijanti, ona je i funkcionalno analizirana (127). Ova genetička varijanta nalazi se u 3'UTR-u gena *KLK3* i prema *in silico* analizama predviđeno je da kreira nova mesta vezivanja za tri mikroRNK: miR-3162-5p, miR-219-1-3p i miR-4278. Upotrebom luciferaznog reporterskog eseja eksperimentalno je potvrđeno da miR-3165-5p ima veći afinitet vezivanja za alel T genetičke varijante rs1058205. Dodatno, snižen nivo kako proteina tako i iRNK gena *KLK3* detektovan je u ćelijama koje su bile homozigotne za alel T ove genetičke varijante i prekomerno eksprimirale miR-3162-5p (127).

Rezultati ove teze su u suprotnosti sa nalazima Stegemana i saradnika kada je reč o asocijaciji genetičke varijante rs1058205 sa rizikom za KP (127). U našoj populaciji ova genetička varijanta nije doprinosila riziku za razvoj tumora prostate. Ovaj rezultat takođe je u suprotnosti sa zaključcima meta-analize Dinga i saradnika prema kojoj je genetička varijanta rs1058205 faktor rizika za razvoj KP-a (247). Istovremeno, u ovoj studiji ustanovljena je asocijacija ređe učestalog alela ove SNV sa nižim vrednostima PSA kod bolesnika sa KP. Takva asocijacija za alel C i vrednost PSA dobijena je u studiji sprovedenoj u populaciji Amerikanaca evropskog porekla (150). U pomenutoj studiji, kao i u studiji Stegemana i saradnika, i u daljim istraživanjima sprovedenim na švedskoj populaciji, alel C genetičke varijante rs1058205 asociirao je sa nižim vrednostima PSA kod kontrolnih subjekata (127, 148). U studiji Bensena i saradnika rs1058205 asociirala je sa vrednostima PSA kod bolesnika sa KP afroameričkog porekla (147). Uzimajući u obzir vezu između varijante rs1058205 u genu *KLK3* i serumske vrednosti PSA kao i važnost PSA kao standardnog dijagnostičkog i prognostičkog parametra KP, treba imati na umu da ova genetička varijanta može imati implikacije prilikom određivanja vrednosti PSA, potencijalno izistkujući

korekcije referentnih vrednosti u zavisnosti od prisutnog genotipa (127). Ustanovljena korelacija između genetičke varijante rs1058205 i vrednosti PSA dovodi do zaključka, da osim njenog efekta kroz vezivanje miR-3162-5p za alel T ove varijante, postoje i neki drugi mehanizmi kojima ova varijanta dovodi do smanjenja vrednosti PSA, s obzirom da je u svim ustanovljenim asocijacijama alel C asociirao sa sniženim vrednostima ovog biomarkera.

Slično nalazima za asocijaciju ove genetičke varijante i nivoa serumske vrednosti PSA, alel C asociirao je i sa nižim kliničkim stadijumom primarnog tumora, dok za ostala poređenja nije dobijena statistička značajnost u okviru rezultata ove teze. U najvećoj do sada studiji asocijacije varijanti u mestima vezivanja mikroRNK u okviru ciljnih iRNK i KP, Stegeman i saradnici nisu analizirali potencijalnu asocijaciju ove genetičke varijante sa kliničkim stadijumom bolesti određenim po TNM sistemu klasifikacije (127). Međutim, u njihovom istraživanju alel C genetičke varijante rs1058205 asociirao je sa manje agresivnom formom bolesti. Iako u ovom istraživanju nije utvrđena takva asocijacija sa agresivnošću KP, treba istaći da su se kriterijumi stratifikacije bolesnika u grupe na osnovu rizika za progresiju tumora razlikovali između ove i studije Stegemana i saradnika (127). Istovremeno u rezultatima studije sprovedene u populaciji bolesnika iz Kine, genotip TT genetičke varijante rs1058205 asociirao je sa srednjim do visokim rizikom za progresiju KP (149). Ipak, u toj studiji poređenje učestalosti genotipova vršeno je između bolesnika podeljenih u grupe na osnovu rizika za progresiju i kontrola, dok je u ovoj studiji asocijacija genetičke varijante rs1058205 sa rizikom za progresiju analizirana poređenjem raspodela genotipova između grupa bolesnika sa različitim rizikom za progresiju bolesti. Dodatno, u studiji Chena i saradnika u populaciji Kine, nije analiziran uticaj svih alelskih varijanti ove genetičke varijante na rizik za progresiju, s obzirom da su sva poređenja vršena za osobe sa TT i TC genotipovima (149). I u istraživanju Bensa i saradnika, genetička varijanta rs1058205 asociirala je sa rizikom za progresiju KP, ali samo kod bolesnika afroameričke populacije (147). Takva asocijacije nije dobijena za Amerikanace evropskog porekla. Iako je u ovoj i pomenutoj studiji sistem stratifikacije bolesnika na osnovu rizika za progresiju tumora bio sličan, Bensen i saradnici nisu pronašli statistički značajnu asocijaciju rs1058205 i veličine primarnog tumora koji je procenjivan TNM sistemom, iako je u toj studiji ona asociirala sa GS kod bolesnika iz populacije evropskih Amerikanaca (147). Međutim, statistički testovi i parametri asocijacije razlikovali su se između naše studije i pomenute studije Bensa i saradnika.

Druga najznačajnije asociirana miRSNP sa rizikom za razvoj i progresiju KP u studiji Stegemana i saradnika je genetička varijanta rs1010 u genu *VAMP8* (127). *VAMP8* pripada porodici solubilnih receptorskih proteina osetljivih na N-etilmaleimid (eng. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptors*, SNAREs) koji imaju važnu ulogu u fuzionisanju ćelijskih membrana. Ovaj integralni membranski protein učestvuje u sekreciji, transportu, endocitozi vezikula kao i u fagocitozi, dok njegova uloga u procesu neoplastične transformacije još uvek nije poznata (247). Prema pojedinim hipotezama, *VAMP8* doprinosi Varburgovom efektu, važnom metaboličkom koraku koji se dešava tokom procesa maligne transformacije, uključujući i onu u tkivu prostate (152). Prethodno, genetičke varijante u genu *VAMP8* nisu istraživane u kontekstu malignih bolesti. Studija Stegema i saradnika prva je koja je anotirala tu varijantu asociiranu sa rizikom za progresiju tumora prostate (127). Dodatno, za SNV rs1010 utvrđeno je da se nasleđuje vezano zajedno sa još jednom genetičkom varijantom čija je asocijacija sa KP utvrđena u GWA studiji (61).

Funkcionalna karakterizacija genetičke varijante rs1010 otkrila je da rede učestao alel smanjuje afinitet vezivanja miR-370-5p za 3'UTR iRNK gena *VAMP8* što je predviđeno *in silico* i potvrđeno eksperimentalno (127). Statistički trend asocijacije dobijen je u analizi potencijalne korelacije genotipova ove varijante sa nivoom ekspresije transkripta. Predloženi mehanizam u osnovi potencijalne uloge ove varijante u molekularnoj osnovi KP je kroz uticaj na vezivanje miR-370-5p

za koju je potvrđeno da je i sama prekomerno eksprimirana u tumoru prostate (127). U okviru ove teze nije pronađena asocijacija genetičke varijante rs1010 sa rizikom za razvoj KP kod bolesnika iz populacije Srbije, a neslaganja između ovih i rezultata Stegeman i saradnika potencijalno mogu biti i posledica etničkih razlika između populacija ispitanika uključenih u ove dve studije.

Sa druge strane, za genetičku varijantu rs1010 ustanovljene su neke značajne asocijacije sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara kod bolesnika sa KP u našoj populaciji. Alel C ove varijante asociirao je sa višim vrednostima GS. Dodatno, posle stratifikacije bolesnika u grupe na osnovu vrednosti T kliničkog stadijuma primarnog karciona i poređenja učestalosti genotipova između bolesnika u grupi T₃/T₄ sa grupom bolesnika T₂, alel C ove varijante asociirao je i sa višim T kategorijama. Ove rezultate nije moguće uporediti sa prethodnim s obzirom da u istraživanju Stegema i saradnika nije vršena korelacija genetičke varijante rs1010 ni sa jednim standardnim prognostičkim parametrom osim serumske vrednosti PSA (127). Sa druge strane, rezultati ova dva istraživanja o asocijaciji genetičke varijante rs1010 sa rizikom za progresiju KP takođe su diskordantni. Nalazi ove teze nisu potvrdili asocijaciju rs1010 sa rizikom za progresiju tumora, iako primećena asocijacija alela C sa višim GS i višim vrednostima kliničkog stadijuma KP upućuje na to da navedeni alel doprinosi riziku za progresiju KP.

Među genetičkim varijantama u mestima vezivanja mikroRNK odabranim za ovu studiju, rs4245739 je najviše istraživana, s obzirom na funkcionalni značaj proteina MDM4 u procesu neoplastične transformacije. Protein MDM4 heterodimerizacijom inaktivira protein P53 i utiče na signalnu transdukciju ovog tumor-supresora (248). Aktivnost proteina P53, drugačije nazvanog čuvarom genoma, ključna je za normalno funkcionisanje ćelije. Svojom aktivnošću navedeni tumor-supresorni protein kontroliše propagaciju ćelije kroz faze ćelijskog ciklusa i učestvuje u procesima odgovornima za indukciju ćelijskog umiranja po tipu apoptoze. Uz to, protein MDM4 interaguje i sa proteinom p21, inhibitorom ciklin zavisne kinaze čiji je poremećaj u ekspresiji asociiran sa višim nivoom proliferacije tumorskih ćelija KP-a. Vezivanjem za regulatorni protein transkripcije E2F1 (eng. *E2F transcription factor 1*, E2F1), MDM4 blokira njegovu transaktivaciju i indukuje promene u regulaciji ćelijskog ciklusa i apoptoze. Takođe, protein MDM4 blokira transaktivaciju proteina Smad3 (eng. *SMAD family member 3*, Smad3) i Smad4 (eng. *SMAD family member 4*, Smad4), komponenti puta prenosa signala transformišućeg faktora rasta β (eng. *Transforming growth factor β* , TGF β), dodatno promovirajući tumorski rast (248, 249).

Genetička varijanta rs4245739 nalazi se u 3'UTR-u gena *MDM4* i dovodi do formiranja novog mesta vezivanja za mikroRNK. Upotrebom luciferaznog reporterskog eseja pokazano je da miR-191-5p i miR-887 imaju veći afinitet vezivanja za alel C genetičke varijante rs4245739, implicirajući mehanizam kojim "netargetovani" alel A doprinosi riziku za razvoj KP-a (145). Slični rezultati dobijeni su i u studiji na karcinomu jajnika gde je takođe utvrđen alel-zavisni efekat na vezivanje miR-191-5p za iRNK MDM4 (250). Genetička varijanta rs4245739, iako prethodno identifikovana kao varijanta rizika za KP u GWA studiji, anotirana je kao varijanta sa efektom na vezivanje mikroRNK, ali neke druge potencijalne funkcionalne posledice supstitucije A>C takođe ne mogu biti isključene (62).

Osim GWAS vezanim za KP, u brojnim drugim studijama slučajeva i kontrola genetička varijanta rs4245739 asociirana je sa rizicima za razvoj sitnoćelijskog karcinoma pluća (eng. *small cell lung carcinoma*, SCLC), karcinoma dojke, skvamoznog karcinoma jednjaka (eng. *esophageal squamous cell carcinoma*, ESCC), karcinoma jajnika i ne-Hočkinovim limfomom (155-157, 250, 251). Sa druge strane, u pojedinim studijama asocijacije ova varijanta doprinosila je malo ili gotovo uopšte riziku za razvoj malignih bolesti (154, 159, 252-254). Razlike u rezultatima navedenih studija tiču se ne samo statističke značajnosti testiranih asocijacija varijante sa rizikom za razvoj maligniteta, već i alela koji doprinosi tom riziku. Na primer, u jednoj grupi studija, uključujući i one

vezane za KP, kao i meta-analizu koja se bavila asocijacijom varijante rs4245739 sa rizikom za razvoj malignih bolesti, ređe učestali alel C asociirao je sa smanjenim rizikom za razvoj bolesti (145, 158, 255). Sa druge strane, u pojedinim studijama, uključujući i GWAS, isti alel povećavao je rizik za razvoj karcinoma dojke (156, 256, 257). Ipak, u istraživanjima Gansma i saradnika u norveškoj populaciji, alel C genetičke varijante rs4245739 smanjivao je rizik za karcinom dojke, a slični rezultati dobijeni su i u jednoj studiji sprovedenoj u populaciji žena iz Kine (159, 258). Slično, u istraživanjima koja su razmatrala asocijaciju genetičke varijante rs4245739 sa rizikom za razvoj drugih maligne bolesti ili asocijaciju sa ishodom terapije dobijeni su međusobno suprotstavljeni rezultati o efektu iste alelske varijante. U studiji Wynendaele i saradnika, kod bolesnica sa karcinomom jajnika negativnih na estrogenski receptor, alel A genetičke varijante rs4245739 asociirao je sa češćim relapsom bolesti i sniženim tumor-specifičnim preživljavanjem (250). Suprotno tim nalazima, u studiji Gansma i saradnika, alel C genetičke varijante rs4245739 je bio taj koji je povećavao rizik za serozni karcinom jajnika (154).

Iako je ova genetička varijanta dosta istraživana u različitim malignim oboljenjima, njen doprinos riziku za razvoj i progresiju KP nije u potpunosti rasvetljen s obzirom da je samo nekoliko studija istraživalo moguću asocijaciju rs4245739 i KP-a. U okviru ove teze genetička varijanta rs4245739 nije asociirala sa rizikom za razvoj KP što je u suprotnosti sa rezultatima Stegemana i saradnika kao i rezultatima iCOGS GWAS (62, 145). Ipak, ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Gansma i saradnika prema kojima ova varijanta takođe nije statistički značajno asociirala sa rizikom za razvoj KP (159). Sa druge strane, alel C genetičke varijante rs4245739 statistički značajno je asociirao sa višim vrednostima PSA, većim GS kao i većim kliničkim stadijumom primarnog tumora prostate kod bolesnika iz populacije Srbije. Takođe, statistički trend asocijacije dobijen je i za asocijaciju ređe učestalog alela C sa višim rizikom za progresiju KP kod bolesnika iz naše populacije. Ovi rezultati značajno se razlikuju od onih dobijenih u studiji Stegemana i iCOGS GWAS kada je u pitanju asocijacija genetičke varijante rs4245739 sa serumskim vrednostima PSA i rizikom za progresiju KP (62, 145). Ipak kriterijumi selekcije bolesnika razlikovali su se između ove i navedenih studija. U istraživanju Gansma i saradnika, nije vršena analiza asocijacije ove genetičke varijante sa standardnim prognostičkim parametrima, kao ni sa rizikom za progresiju bolesti, te su tako naši rezultati o asocijaciji genetičke varijante rs4245739 sa vrednostima PSA, GS i T kliničkim stadijumom bolesti jedinstveni i nije ih moguće porediti sa rezultatima prethodnih studija (159).

Kada je u pitanju asocijacija genetičkih varijanti u mestima vezivanja mikroRNK, rezultati ove teze upućuju da su sve tri selektovane genetičke varijante značajno asociirane sa standardnim prognostičkim parametrima progresije bolesti. Neslaganja između ovih i rezultata drugih studija uglavnom se tiču asocijacija ovih varijanti sa rizikom za razvoj KP. Među razlozima za postojanje navedenih razlika svakako se ubrajaju razlike u genetičkoj strukturi testiranih populacija, ali i uticaj različitih spoljašnjih faktora na razvoj i progresiju KP. Jedna od ilustracija etničkih razlika jesu i značajne razlike u distribuciji alela sve tri testirane varijante u mestima vezivanja mikroRNK između populacija američkog, evropskog i azijskog porekla. Te razlike mogu uticati kako na snagu studija tako i na statističke parametre rizika. Dodatno, na rezultate može uticati i sam dizajn studija kao i način regrutovanja i selektovanja bolesnika i kontrolnih grupa. Kada je reč o proceni uticaja ovih genetičkih varijanti na rizik za progresiju bolesti, razlike u kriterijumima podele bolesnika u grupe dodatno mogu doprineti razlikama u rezultatima studija, a ne može se isključiti ni mogućnost da neke od ovih varijanti imaju uticaj specifičan za stadijum progresije bolesti.

Sa druge strane, kada je reč o asocijaciji potencijalno funkcionalnih genetičkih varijanti u regulatornim regionima gena za mikroRNK, nalazi ove teze upućuju da genetička varijanta rs4705342 u genu *pri-miR-143/145* asociira sa rizikom za razvoj KP kod bolesnika iz populacije Srbije. Istovremeno, za genetičku varijantu rs1076064 u genu *pri-miR-378* pokazana je asocijacija

sa rizikom za progresiju bolesti, dok rezultati asocijacije za genetičku varijantu rs4938723 u *pri-miR-34b/c* sugeriraju asocijaciju sa standardnim prognostičkim parametrima KP. Neslaganja u rezultatima ove i prethodnih studija asocijacije kada je reč o uticaju ovih genetičkih varijanti na rizik za razvoj i progresiju KP takođe mogu biti posledica etničkih razlika, ali i razlika u selekciji bolesnika i muškaraca kontrolne grupe.

Ipak, osnovno ograničenje rezultata ove teze je relativno mali broj ispitanika, iako je bio analiziran uzorak od preko 1000 bolesnika i kontrola. Broj ispitanika predstavlja potencijalni razlog što u ovom istraživanju neke od prethodnih asocijacija sa KP nisu validirane. Dodatno, nakon stratifikacije bolesnika u grupe na osnovu vrednosti prognostičkih parametara i rizika za progresiju bolesti, pojedine grupe uključivale su relativno mali broj bolesnika sa KP. Stoga, neophodna je pažljiva interpretacija dobijenih rezultata koji se odnose na asocijaciju analiziranih genetičkih varijanti sa vrednostima standardnih prognostičkih parametrima i rizikom za progresiju KP. Ipak, isti smer asocijacije genetičkih varijanti sa različitim parametrima progresije upućuju na to da odabrane varijante mogu biti od značaja prilikom procene agresivnosti tumora kod bolesnika iz naše populacije. Buduće studije, na većem uzorku od ovog, svakako će dodatno doprineti rasvetljavanju uloge genetičkih varijanti rs4938723, rs1076064, rs1058205, rs1010 i rs4245739 u molekularnoj osnovi KP, ali i omogućiti potvrdu asocijacija ustanovljenih u okviru ove teze. Replikativne studije slučajeva i kontrola kod bolesnika iz populacije Srbije, kao i uključivanje naših rezultata u buduće meta-analizu mogu dodatno potvrditi rezultate ustanovljenih asocijacija.

Ovaj doktorski rad predstavlja kontinuitet istraživanja naučne grupe PROSTATSERBIA koja je član Internacionalnog konzorcijuma *Prostate Cancer Association Group to Investigate Cancer Associated Alterations in the Genome (PRACTICAL)*. Do danas su publikovani rezultati radova koji su dizajnirane kao studije slučajeva i kontrola u grupama bolesnika iz populacije Srbije. U njima su ispitivane asocijacije SNV sa rizikom za razvoj i/ili progresiju KP i to SNV u kodirajućim (genu *NOS3*: -786T>C, -764A>G, -714G>T, -690C>T, -649G>A i 894G>T; SNV u proteinima RISC kompleksa: gen *DICER1* (rs3742330), gen *AGO2* (rs4961280), genu *TARBP2* (rs784567), genu *GEMIN4* (rs7813) i genu *GEMIN3* (rs197414)) i nekodirajućim delovima genoma: 19p13 (rs3787016); 8q24 (rs1447295, rs4242382, rs6983267, rs7017300, rs7837688, rs378854); 17q12 (rs3760511 i rs7501939). Studije asocijacije genetičkih varijanti u genima za mikroRNK sa KP obuhvatale su: *hsa-miR-146a* (rs2910164), *hsa-miR-499* (rs3746444), *hsa-miR-196a2* (rs11614913) i *hsa-miR-27a* (rs895819). (135, 137, 259-263).

Krajnji cilj svih ovih studija je identifikacija alela niske penetrabilnosti koji mogu svojim udruženim dejstvom imati efekat na rizik za razvoj i/ili progresiju KP. Nakon utvrđivanja njihovih statističkih epistatičkih interakcija možda ćemo biti u prilici da kreiramo algoritam baziran na panelu istraživanih SNV. Ovaj algoritam trebao bi da poseduje kliničku snagu za bolju stratifikaciju bolesnika sa KP u odnosu na rizik za razvoj ili progresiju bolesti. Takav algoritam bi naročito bio od pomoći tokom aktivnog praćenja bolesnika sa indolentnim i lokalno uznapredovalim KP.

Danas su zlatni standard u dijagnostici i lečenju KP određivanje serumske vrednosti PSA i biopsija prostate. U godinama koje dolaze očekuje se da će detekcija i kvantifikacija novih bioloških tumor markera (PHI, PSMA, mikroRNK, lncRNK i kružnih RNK) u krvi i/ili urinu bolesnika sa KP imati sve značajniju aplikativnu vrednost kako u dijagnostici tako i u aktivnom praćenju i lečenju KP (264, 265).

6. Zaključci

1. Nije utvrđena asocijacija genetičkih varijanti rs4938723 i rs1076064 u genima *hsa-miR-34b/c* i *hsa-miR-378* i varijanti u genima *KLK3*, *VAMP8* i *MDM4* sa rizikom za razvoj KP.
2. Za manje učestali alel C genetičke varijante rs4705342 u genu *hsa-miR-143/145* utvrđena je asocijacija sa povećanim rizikom za razvoj KP kod bolesnika iz populacije Srbije.
3. Utvrđena je asocijacija genetičke varijante rs4938723 u genu *hsa-miR34b/c* sa kliničkim stadijumom primarnog tumora.
4. Utvrđena je asocijacija genetičke varijante rs1076064 u genu *hsa-miR-378* sa serumskim vrednostima PSA i kliničkim stadijumom primarnog tumora.
5. Utvrđena je asocijacija genetičkih varijanti rs1058205, rs1010 i rs4245739 u genima *KLK3*, *VAMP8* i *MDM4* sa vrednostima različitih standardnih prognostičkih parametara KP. Ređe učestao alel C genetičke varijante rs1058205 asocira sa serumskim vrednostima PSA i kliničkim stadijumom primarnog tumora, dok ređe učestao alel C genetičke varijante rs1010 asocira sa vrednostima Glison skora i kliničkog stadijuma tumora. Ređe učestao alel C genetičke varijante rs4245739 asocira sa vrednostima sva tri standardna prognostička parametra KP kod bolesnika iz populacije Srbije.
6. Utvrđena je asocijacija genetičke varijante rs1076064 u genu *hsa-miR-378* sa rizikom za progresiju KP dok je za alel C genetičke varijante rs4245739 u genu *MDM4* dobijen statistički trend asocijacije sa povećanim rizikom za progresiju KP kod bolesnika iz populacije Srbije.

7. Literatura

1. To'o K. Prostate. In: Kamaya A, Wong-You-Cheong J, Sun Park H, Bhatt S, Lane B, Foster B, Vandermeer F, Sukumar S, Maturen K, Wasnik A. Diagnostic Ultrasound Abdomen and Pelvis. USA:Elsevier; 2016. pp.120-8.
2. Burns D, Lotan T. Muški genitalni sistem. In: Kumar V, Abbas A, Fausto N, Mitchell R. Robinsove osnove patologije. Osmo izdanje. Beograd:Data Status; 2010. pp. 687-710.
3. Coker TJ, Dierfeldt DM. Acute Bacterial Prostatitis: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician*. 2016; 93(2):114-20.
4. Bowen DK, Dielubanza E, Schaeffer AJ. Chronic bacterial prostatitis and chronic pelvic pain syndrome. *BMJ Clin Evid*. 2015; 2015. pii: 1802.
5. Mobley D, Feibus A, Baum N. Benign prostatic hyperplasia and urinary symptoms: Evaluation and treatment. *Postgrad Med*. 2015; 127(3):301-7.
6. Vukotić V. Tumori prostate. In: Živan Maksimović. Hirurgija za studente medicine. Beograd:Libri Medicorum; 2015. pp. 815-7.
7. American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2020. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2020. Poslednji pristup: 15. April 2020.
8. Institute of Public Health of Serbia "Dr Milan Jovanović Batut" Cancer incidence and mortality in Central Serbia. Cancer Registry of Central Serbia. Belgrade: 2015.
9. Moschini M, Carroll PR, Eggener SE, Epstein JI, Graefen M, Montironi R et al. Low-risk Prostate Cancer: Identification, Management, and Outcomes. *Eur Urol*. 2017; 72(2):238-49.
10. Loeb S, Bjurlin MA, Nicholson J, Tammela TL, Penson DF, Carter HB et al. Overdiagnosis and overtreatment of prostate cancer. *Eur Urol*. 2014; 65(6):1046-55.
11. Culig Z. Distinguishing indolent from aggressive prostate cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2014; 202:141-7.
12. Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, Cao X, Wang L, Dhanasekaran SM et al. Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nat Genet*. 2007; 39(1):41-51.
13. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol*. 2019; 10(2):63-89.
14. Zeng C, Wen W, Morgans AK, Pao W, Shu XO, Zheng W. Disparities by Race, Age, and Sex in the Improvement of Survival for Major Cancers: Results From the National Cancer Institute Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program in the United States, 1990 to 2010. *JAMA Oncol*. 2015; 1(1):88-96.
15. Kheirandish P, Chingwundoh F. Ethnic differences in prostate cancer. *Br J Cancer*. 2011; 105(4):481-5.
16. Williams H, Powell IJ. Epidemiology, pathology, and genetics of prostate cancer among African Americans compared with other ethnicities. *Methods Mol Biol*. 2009; 472:439-53.
17. Gann PH. Risk factors for prostate cancer. *Rev Urol*. 2002; 4(Suppl 5):S3-S10.
18. Salinas CA, Tsodikov A, Ishak-Howard M, Cooney KA. Prostate cancer in young men: an important clinical entity. *Nat Rev Urol*. 2014;11(6):317-23.
19. Lange EM, Salinas CA, Zuhlke KA, Ray AM, Wang Y, Lu Y et al. Early onset prostate cancer has a significant genetic component. *Prostate*. 2012;72(2):147-56.
20. Powell IJ. Epidemiology and pathophysiology of prostate cancer in African-American men. *J Urol*. 2007; 177(2):444-9.
21. Lynch HT, Kosoko-Lasaki O, Leslie SW, Rendell M, Shaw T, Snyder C et al. Screening for familial and hereditary prostate cancer. *Int J Cancer*. 2016; 138(11):2579-91.
22. Möller S, Mucci LA, Harris JR, Scheike T, Holst K, Halekoh U et al. The Heritability of Breast Cancer among Women in the Nordic Twin Study of Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016; 25(1):145-50.

23. Graff RE, Möller S, Passarelli MN, Witte JS, Skytthe A, Christensen K et al. Familial Risk and Heritability of Colorectal Cancer in the Nordic Twin Study of Cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2017; 15(8):1256-64.
24. Hjelmborg JB, Scheike T, Holst K, Skytthe A, Penney KL, Graff RE et al. The heritability of prostate cancer in the Nordic Twin Study of Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014; 23(11):2303-10.
25. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(8):3367-71.
26. Alberti C. Hereditary/familial versus sporadic prostate cancer: few indisputable genetic differences and many similar clinicopathological features. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2010; 14(1):31-41.
27. Giri VN, Beebe-Dimmer JL. Familial prostate cancer. *Semin Oncol.* 2016;43(5):560-565.
28. Kiciński M, Vangronsveld J, Nawrot TS. An epidemiological reappraisal of the familial aggregation of prostate cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 2011;6(10):e27130.
29. Ren ZJ, Cao DH, Zhang Q, Ren PW, Liu LR, Wei Q et al. First-degree family history of breast cancer is associated with prostate cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 2019; 19(1):871.
30. Kalish LA, McDougal WS, McKinlay JB. Family history and the risk of prostate cancer. *Urology* 2000; 56(5):803-6.
31. Beebe-Dimmer JL, Yee C, Cote ML, Petrucelli N, Palmer N, Bock C et al. Familial clustering of breast and prostate cancer and risk of postmenopausal breast cancer in the Women's Health Initiative Study. *Cancer* 2015; 121(8):1265-72.
32. Agalliu I, Karlins E, Kwon EM, Iwasaki LM, Diamond A, Ostrander EA et al. Rare germline mutations in the BRCA2 gene are associated with early-onset prostate cancer. *Br J Cancer* 2007; 97(6):826-31.
33. Samadder NJ, Smith KR, Wong J, Thomas A, Hanson H, Boucher K et al. Cancer Risk in Families Fulfilling the Amsterdam Criteria for Lynch Syndrome. *JAMA Oncol.* 2017; 3(12):1697-1701.
34. Bechis SK, Carroll PR, Cooperberg MR. Impact of age at diagnosis on prostate cancer treatment and survival. *J Clin Oncol.* 2011; 29(2):235-41.
35. Pinthus JH, Pacik D, Ramon J. Diagnosis of prostate cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2007; 175:83-99.
36. Naji L, Randhawa H, Sohani Z, Dennis B, Lautenbach D, Kavanagh , et al. Digital Rectal Examination for Prostate Cancer Screening in Primary Care: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Fam Med.* 2018; 16(2):149-154.
37. Adhyam M, Gupta AK. A Review on the Clinical Utility of PSA in Cancer Prostate. *Indian J Surg Oncol.* 2012; 3(2):120-9.
38. Ilic D, Djulbegovic M, Jung JH, Hwang EC, Zhou Q, Cleves A et al. Prostate cancer screening with prostate-specific antigen (PSA) test: a systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2018; 362:k3519.
39. Vanacore D, Boccellino M, Rossetti S, Cavaliere C, D'Aniello C, Di Franco R et al. Micrnas in prostate cancer: an overview. *Oncotarget* 2017; 8(30):50240-51.
40. Murray NP, Reyes E, Orellana N, Fuentealba C, Dueñas R. A comparative performance analysis of total PSA, percentage free PSA, PSA velocity, and PSA density versus the detection of primary circulating prostate cells in predicting initial prostate biopsy findings in Chilean men. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:676572.
41. Humphrey PA. Histopathology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017; 7(10). pii: a030411.
42. Gordetsky J, Epstein J. Grading of prostatic adenocarcinoma: current state and prognostic implications. *Diagn Pathol.* 2016;11:25.

43. Cheng L, Montironi R, Bostwick DG, Lopez-Beltran A, Berney DM. Staging of prostate cancer. *Histopathology* 2012; 60(1):87-117.
44. Litwin MS, Tan HJ. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA*. 2017; 317(24):2532-42.
45. Nguyen-Nielsen M, Borre M. Diagnostic and Therapeutic Strategies for Prostate Cancer. *Semin Nucl Med*. 2016; 46(6):484-90.
46. Pagliuca M, Buonerba C, Fizazi K, Di Lorenzo G. The Evolving Systemic Treatment Landscape for Patients with Advanced Prostate Cancer. *Drugs*. 2019; 79(4):381-400.
47. Droz JP, Aapro M, Balducci L, Boyle H, Van den Broeck T, Cathcart P et al. Management of prostate cancer in older patients: updated recommendations of a working group of the International Society of Geriatric Oncology. *Lancet Oncol*. 2014; 15(9):e404-14.
48. Schaid DJ. The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Hum Mol Genet*. 2004; 13 Spec No 1:R103-R121.
49. Jansson F, Drevin L, Frisell T, Stattin P, Bratt O, Akre O. Concordance of Non-Low-Risk Disease Among Pairs of Brothers With Prostate Cancer. *J Clin Oncol*. 2018; 36(18):1847-52.
50. Easton DF, Schaid DJ, Whittemore AS, Isaacs WJ. International Consortium for Prostate Cancer Genetics. Where are the prostate cancer genes?--A summary of eight genome wide searches. *Prostate* 2003; 57(4):261-9.
51. Goh CL, Eeles RA. Germline genetic variants associated with prostate cancer and potential relevance to clinical practice. In: Cuzick J, Thorat MA, editors. *Prostate Cancer Prevention*. Heidelberg, Germany: Springer; 2014. pp. 9–26.
52. Xu J, Dimitrov L, Chang BL, Adams TS, Turner AR, Meyers DA et al. A combined genomewide linkage scan of 1,233 families for prostate cancer-susceptibility genes conducted by the international consortium for prostate cancer genetics. *Am J Hum Genet*. 2005; 77(2):219-29.
53. Maier C, Herkommer K, Hoegel J, Vogel W, Paiss T. A genomewide linkage analysis for prostate cancer susceptibility genes in families from Germany. *Eur J Hum Genet*. 2005;13(3):352-60.
54. Witte JS, Suarez BK, Thiel B, Lin J, Yu A, Banerjee TK et al. Genome-wide scan of brothers: replication and fine mapping of prostate cancer susceptibility and aggressiveness loci. *Prostate* 2003; 57(4):298-308.
55. Chen R, Ren S, Sun Y. Genome-wide association studies on prostate cancer: the end or the beginning? *Protein Cell* 2013; 4(9):677-86.
56. Chang CQ, Yesupriya A, Rowell JL, Pimentel CB, Clyne M, Gwinn M et al . A systematic review of cancer GWAS and candidate gene meta-analyses reveals limited overlap but similar effect sizes. *Eur J Hum Genet*. 2014; 22(3):402-8.
57. Hunter DJ, Riboli E, Haiman CA, Albanes D, Altshuler D, Chanock SJ et al. A candidate gene approach to searching for low-penetrance breast and prostate cancer genes. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(12):977-85.
58. Perdomo HAG, Zapata-Copete JA, Sanchez A. Molecular alterations associated with prostate cancer. *Cent European J Urol*. 2018;71(2):168-176.
59. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007; 447(7145):661-78.
60. Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Berndt SI, Conti DV, Schumacher F, Han Y et al. A meta-analysis of 87,040 individuals identifies 23 new susceptibility loci for prostate cancer. *Nat Genet*. 2014; 46(10):1103-9.
61. Kote-Jarai Z, Olama AA, Giles GG, Severi G, Schleutker J, Weischer M et al. Seven prostate cancer susceptibility loci identified by a multi-stage genome-wide association study. *Nat Genet*. 2011; 43(8):785-91.

62. Eeles RA, Olama AA, Benlloch S, Saunders EJ, Leongamornlert DA, Tymrakiewicz M, et al. Identification of 23 new prostate cancer susceptibility loci using the iCOGS custom genotyping array. *Nat Genet.* 2013; 45(4):385-91, 391e1-2.
63. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature.* 2003; 426(6968):789-96.
64. Schierding W, Cutfield WS, O'Sullivan JM. The missing story behind Genome Wide Association Studies: single nucleotide polymorphisms in gene deserts have a story to tell. *Front Genet.* 2014; 5:39.
65. Huppi K, Pitt JJ, Wahlberg BM, Caplen NJ. The 8q24 gene desert: an oasis of non-coding transcriptional activity. *Front Genet.* 2012; 3:69.
66. Amundadottir LT, Sulem P, Gudmundsson J, Helgason A, Baker A, Agnarsson BA et al. A common variant associated with prostate cancer in European and African populations. *Nat Genet.* 2006; 38(6):652-8.
67. Schumacher FR, Feigelson HS, Cox DG, Haiman CA, Albanes D, Buring J et al. A common 8q24 variant in prostate and breast cancer from a large nested case-control study. *Cancer Res.* 2007; 67(7):2951-6.
68. Yeager M, Orr N, Hayes RB, Jacobs KB, Kraft P, Wacholder S et al. Genome-wide association study of prostate cancer identifies a second risk locus at 8q24. *Nat Genet.* 2007; 39(5):645-9.
69. Savage SA, Greene MH. The evidence for prostate cancer risk loci at 8q24 grows stronger. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(20):1499-501.
70. Wasserman NF, Aneas I, Nobrega MA. An 8q24 gene desert variant associated with prostate cancer risk confers differential *in vivo* activity to a MYC enhancer. *Genome Res.* 2010; 20(9):1191-7.
71. Gudmundsson J, Sulem P, Steinthorsdottir V, Bergthorsson JT, Thorleifsson G, Manolescu A et al. Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in TCF2 protects against type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2007; 39(8):977-83.
72. Thomas G, Jacobs KB, Yeager M, Kraft P, Wacholder S, Orr N et al. Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer. *Nat Genet.* 2008; 40(3):310-5.
73. Parikh H, Wang Z, Pettigrew KA, Jia J, Daugherty S, Yeager M et al. Fine mapping the KLK3 locus on chromosome 19q13.33 associated with prostate cancer susceptibility and PSA levels. *Hum Genet.* 2011; 129(6):675-85.
74. Buniello A, MacArthur JAL, Cerezo M, Harris LW, Hayhurst J, Malangone McMahon A et al. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47(D1):D1005-D1012.
75. Schumacher FR, Al Olama AA, Berndt SI, Benlloch S, Ahmed M, Saunders EJ et al. Association analyses of more than 140,000 men identify 63 new prostate cancer susceptibility loci. *Nat Genet.* 2018; 50(7):928-936.
76. Helfand BT, Catalona WJ, Xu J. A genetic-based approach to personalized prostate cancer screening and treatment. *Curr Opin Urol.* 2015; 25(1):53-58.
77. Farashi S, Kryza T, Clements J, Batra J. Post-GWAS in prostate cancer: from genetic association to biological contribution. *Nat Rev Cancer.* 2019; 19(1):46-59.
78. Eeles R, Ni Raghallaigh H. Men with a susceptibility to prostate cancer and the role of genetic based screening. *Transl Androl Urol.* 2018; 7(1):61-69.
79. Hsing AW, Chokkalingam AP. Prostate cancer epidemiology. *Front Biosci.* 2006; 11:1388-413.
80. Lindström S, Ma J, Altshuler D, Giovannucci E, Riboli E, Albanes D et al. A large study of androgen receptor germline variants and their relation to sex hormone levels and prostate cancer risk. Results from the National Cancer Institute Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95(9):E121-7.

81. Bennett CL, Price DK, Kim S, Liu D, Jovanovic BD, Nathan D et al. Racial variation in CAG repeat lengths within the androgen receptor gene among prostate cancer patients of lower socioeconomic status. *J Clin Oncol.* 2002;20(17):3599-604.
82. Price DK, Chau CH, Till C, Goodman PJ, Baum CE, Ockers SB et al. Androgen receptor CAG repeat length and association with prostate cancer risk: results from the prostate cancer prevention trial. *J Urol.* 2010; 184(6):2297-302.
83. Sun JH, Lee SA. Association between CAG repeat polymorphisms and the risk of prostate cancer: a meta-analysis by race, study design and the number of (CAG)_n repeat polymorphisms. *Int J Mol Med.* 2013; 32(5):1195-203.
84. Akinloye O, Gromoll J, Simoni M. Variation in CAG and GGN repeat lengths and CAG/GGN haplotype in androgen receptor gene polymorphism and prostate carcinoma in Nigerians. *Br J Biomed Sci.* 2011; 68(3):138-42.
85. Li X, Huang Y, Fu X, Chen C, Zhang D, Yan L et al. Meta-analysis of three polymorphisms in the steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 2 gene (SRD5A2) and risk of prostate cancer. *Mutagenesis* 2011; 26(3):371-83.
86. Li J, Mercer E, Gou X, Lu YJ. Ethnic disparities of prostate cancer predisposition: genetic polymorphisms in androgen-related genes. *Am J Cancer Res.* 2013; 3(2):127-51.
87. Saranyutanon S, Srivastava SK, Pai S, Singh S, Singh AP. Therapies Targeted to Androgen Receptor Signaling Axis in Prostate Cancer: Progress, Challenges, and Hope. *Cancers (Basel)* 2019;12(1).
88. Dianat SS, Margreiter M, Eckersberger E, Finkelstein J, Kuehas F, Herwig R et al. Gene polymorphisms and prostate cancer: the evidence. *BJU Int.* 2009; 104(11):1560-72.
89. Yang J, Gao W, Song NH, Wang W, Zhang JX, Lu P et al. The risks, degree of malignancy and clinical progression of prostate cancer associated with the MDM2 T309G polymorphism: a meta-analysis. *Asian J Androl.* 2012; 14(5):726–31.
90. Lu Y, Liu Y, Zeng J, He Y, Peng Q, Deng Y et al. Association of p53 codon 72 polymorphism with prostate cancer: an update meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014; 35(5):3997–4005.
91. Renner W, Langsenlehner U, Krenn-Pilko S, Eder P, Langsenlehner T. BCL2 genotypes and prostate cancer survival. *Strahlenther Onkol.* 2017; 193(6):466-471.
92. Holt SK, Kwon EM, Koopmeiners JS, Lin DW, Feng Z, Ostrander EA, et al. Vitamin D pathway gene variants and prostate cancer prognosis. *Prostate* 2010; 70(13):1448-60.
93. Tindall EA, Hayes VM, Petersen DC. Inflammatory genetic markers of prostate cancer risk. *Cancers (Basel)* 2010; 2(2):1198–220.
94. Chang Z, Zhou H, Liu Y. Promoter methylation and polymorphism of E-cadherin gene may confer a risk to prostate cancer: a meta-analysis based on 22 studies. *Tumour Biol.* 2014; 35(10):10503–13.
95. Chen Y, Li T, Yu X, Xu J, Li J, Luo D, Mo Z, Hu Y. The RTK/ERK pathway is associated with prostate cancer risk on the SNP level: a pooled analysis of 41 sets of data from case-control studies. *Gene* 2014; 534(2):286–97.
96. Zhang A, Zhang J, Kaipainen A, Lucas JM, Yang H. Long non-coding RNA: A newly deciphered "code" in prostate cancer. *Cancer Lett.* 2016; 375(2):323-30.
97. Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nature Reviews Cancer* 2010; 10:389–402.
98. Santos PB, Patel H, Henrique R, Félix A. Can epigenetic and inflammatory biomarkers identify clinically aggressive prostate cancer? *World J Clin Oncol.* 2020; 11(2):43-52.
99. Pasche B, Yi N. Candidate gene association studies: successes and failures. *Curr Opin Genet Dev.* 2010; 20(3):257-61.
100. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2):281-97.

101. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018; 9:402.
102. Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015; 87:3-14.
103. Vishnoi A, Rani S. MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. *Methods Mol Biol.* 2017; 1509:1-10.
104. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 2002; 21(17):4663-70.
105. Hrovatin K, Kunej T. Classification of miRNA-related sequence variations. *Epigenomics* 2018; 10(4):463-81.
106. Piletič K, Kunej T. MicroRNA epigenetic signatures in human disease. *Arch Toxicol.* 2016; 90(10):2405-19.
107. Bosutti A, Zanconati F, Grassi G, Dapas B, Passamonti S, Scaggiante B. Epigenetic and miRNAs Dysregulation in Prostate Cancer: The role of Nutraceuticals. *Anticancer Agents Med Chem.* 2016; 16(11):1385-1402.
108. Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(10):1712.
109. Takayama KI, Misawa A, Inoue S. Significance of microRNAs in Androgen Signaling and Prostate Cancer Progression. *Cancers (Basel)* 2017; 9(8).pii:E102.
110. Yan Z, Xiao Y, Chen Y, Luo G. Screening and identification of epithelial-to-mesenchymal transition-related circRNA and miRNA in prostate cancer. *Pathol Res Pract.* 2020; 216(2):152784.
111. Zhu Z, Wen Y, Xuan C, Chen Q, Xiang Q, Wang J et al. Identifying the key genes and microRNAs in prostate cancer bone metastasis by bioinformatics analysis. *FEBS Open Bio.* 2020; 10(4):674-688.
112. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol.* 2007;302(1):1-12.
113. Kanwal R, Plaga AR, Liu X, Shukla GC, Gupta S. MicroRNAs in prostate cancer: Functional role as biomarkers. *Cancer Lett.* 2017; 407:9-20.
114. Vanacore D, Boccellino M, Rossetti S, Cavaliere C, D'Aniello C, Di Franco R et al. Micromnas in prostate cancer: an overview. *Oncotarget.* 2017; 8(30):50240-51.
115. Xu P, Wu Q, Yu J, Rao Y, Kou Z, Fang G, Shi X, Liu W, Han H. A Systematic Way to Infer the Regulation Relations of miRNAs on Target Genes and Critical miRNAs in Cancers. *Front Genet.* 2020; 11:278.
116. Valera VA, Parra-Medina R, Walter BA, Pinto P, Merino MJ. microRNA Expression Profiling in Young Prostate Cancer Patients. *J Cancer* 2020; 11(14):4106-14.
117. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D155-D162.
118. Olena AF, Patton JG. Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol.* 2010;222(3):540-5.
119. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(9):2999-3004.
120. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015; 15(6):321-33.
121. Salzman DW, Weidhaas JB. SNPing cancer in the bud: microRNA and microRNA-target site polymorphisms as diagnostic and prognostic biomarkers in cancer. *Pharmacol Ther.* 2013; 137(1):55-63.
122. Slaby O, Bienertova-Vasku J, Svoboda M, Vyzula R. Genetic polymorphisms and microRNAs: new direction in molecular epidemiology of solid cancer. *J Cell Mol Med.* 2012; 16(1):8-21.

123. Mishra PJ, Bertino JR. MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. *Pharmacogenomics* 2009; 10(3):399-416.
124. Georges M, Coppieters W, Charlier C. Polymorphic miRNA-mediated gene regulation: contribution to phenotypic variation and disease. *Curr Opin Genet Dev.* 2007; 17(3):166-76.
125. Cipollini M, Landi S, Gemignani F. MicroRNA binding site polymorphisms as biomarkers in cancer management and research. *Pharmacogenomics Pers Med.* 2014; 7:173-91.
126. Yue M, Zhou D, Zhi H, Wang P, Zhang Y, Gao Y et al. MSDD: a manually curated database of experimentally supported associations among miRNAs, SNPs and human diseases. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(D1):D181-D5.
127. Stegeman S, Amankwah E, Klein K, O'Mara TA, Kim D, Lin HY et al. A Large-Scale Analysis of Genetic Variants within Putative miRNA Binding Sites in Prostate Cancer. *Cancer discovery.* 2015a; 5(4):368-79.
128. Deng N, Zhou H, Fan H, Yuan Y. Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. *Oncotarget* 2017; 8(66):110635-49.
129. Yang H, Dinney CP, Ye Y, Zhu Y, Grossman HB, Wu X. Evaluation of genetic variants in microRNA-related genes and risk of bladder cancer. *Cancer Res.* 2008;68(7):2530-7.
130. Ye Y, Wang KK, Gu J, Yang H, Lin J, Ajani JA et al. Genetic variations in microRNA-related genes are novel susceptibility loci for esophageal cancer risk. *Cancer Prev Res (Phila)* 2008; 1(6):460-9.
131. Hoffman AE, Zheng T, Yi C, Leaderer D, Weidhaas J, Slack F et al. microRNA miR-196a-2 and breast cancer: a genetic and epigenetic association study and functional analysis. *Cancer Res.* 2009; 69(14):5970-7.
132. Zeng Y, Cullen BR. Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J Biol Chem.* 2005; 280(30):27595-603.
133. Parlayan C, Ikeda S, Sato N, Sawabe M, Muramatsu M et al. Association analysis of single nucleotide polymorphisms in miR-146a and miR-196a2 on the prevalence of cancer in elderly Japanese: a case-control study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15:2101-7.
134. George GP, Gangwar R, Mandal RK, Sankhwar SN, Mittal RD. Genetic variation in microRNA genes and prostate cancer risk in North Indian population. *Mol Biol Rep.* 2011; 38(3):1609-15.
135. Nikolić Z, Savić Pavićević D, Vučić N, Cidilko S, Filipović N, Cerović S et al. Assessment of association between genetic variants in microRNA genes hsa-miR-499, hsa-miR-196a2 and hsa-miR-27a and prostate cancer risk in Serbian population. *Exp Mol Pathol.* 2015a; 99(1):145-50.
136. Nikolić ZZ, Savić Pavićević DL, Vučić NL, Romac SP, Brajušković GN. Association between a Genetic Variant in the hsa-miR-146a Gene and Cancer Risk: An Updated Meta-Analysis. *Public Health Genomics* 2015b;18(5):283-98.
137. Nikolić Z, Savić Pavićević D, Vučić N, Cerović S, Vukotić V, Brajušković G. Genetic variants in RNA-induced silencing complex genes and prostate cancer. *World J Urol.* 2017; 35(4):613-24.
138. Hashemi M, Danesh H, Bizhani F, Narouie B, Sotoudeh M, Nouralizadeh A et al. Pri-miR-34b/c rs4938723 polymorphism increased the risk of prostate cancer. *Cancer Biomark.* 2017; 18(2):155-9.
139. Xu B, Zhu Y, Tang Y, Zhang Z, Wen Q. Rs4938723 Polymorphism Is Associated with Susceptibility to Hepatocellular Carcinoma Risk and Is a Protective Factor in Leukemia, Colorectal, and Esophageal Cancer. *Med Sci Monit.* 2018; 24:7057-71.
140. Lei C, Du F, Sun L, Li T, Li T, Min Y et al. miR-143 and miR-145 inhibit gastric cancer cell migration and metastasis by suppressing MYO6. *Cell Death Dis.* 2017; 8(10):e3101.
141. Yoshino H, Seki N, Itesako T, Chiyomaru T, Nakagawa M, Enokida H. Aberrant expression of microRNAs in bladder cancer. *Nat Rev Urol.* 2013; 10(7):396-404.

142. Pagliuca A, Valvo C, Fabrizi E, di Martino S, Biffoni M, Runci D et al. Analysis of the combined action of miR-143 and miR-145 on oncogenic pathways in colorectal cancer cells reveals a coordinate program of gene repression. *Oncogene* 2013; 32(40):4806-13.
143. Chu H, Zhong D, Tang J, Li J, Xue Y, Tong N et al. A functional variant in miR-143 promoter contributes to prostate cancer risk. *Arch Toxicol.* 2016; 90(2):403-14.
144. Ding HX, Lv Z, Yuan Y, Xu Q. MiRNA Polymorphisms and Cancer Prognosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol.* 2018; 8:596.
145. Stegeman S, Moya L, Selth LA, Spurdle AB, Clements JA, Batra J. A genetic variant of MDM4 influences regulation by multiple microRNAs in prostate cancer. *Endocrine-related cancer* 2015b; 22(2):265-76.
146. Hong SK. Kallikreins as biomarkers for prostate cancer. *BioMed research international.* 2014; 2014:526341.
147. Bensen JT, Xu Z, Smith GJ, Mohler JL, Fontham ET, Taylor JA. Genetic polymorphism and prostate cancer aggressiveness: a case-only study of 1,536 GWAS and candidate SNPs in African-Americans and European-Americans. *The Prostate* 2013; 73(1):11-22.
148. Savblom C, Hallden C, Cronin AM, Sall T, Savage C, Vertosick EA et al. Genetic variation in KLK2 and KLK3 is associated with concentrations of hK2 and PSA in serum and seminal plasma in young men. *Clinical Chemistry* 2014; 60(3):490-9.
149. Chen C, Xin Z. Single-nucleotide polymorphism rs1058205 of KLK3 is associated with the risk of prostate cancer: A case-control study of Han Chinese men in Northeast China. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96(10):e6280.
150. Penney KL, Schumacher FR, Kraft P, Mucci LA, Sesso HD, Ma J et al. Association of KLK3 (PSA) genetic variants with prostate cancer risk and PSA levels. *Carcinogenesis* 2011; 32(6):853-9.
151. Wang CC, Shi H, Guo K, Ng CP, Li J, Gan BQ et al. VAMP8/endobrevin as a general vesicular SNARE for regulated exocytosis of the exocrine system. *Molecular biology of the cell* 2007; 18(3):1056-63.
152. Zhu D, Zhang Y, Lam PP, Dolai S, Liu Y, Cai EP et al. Dual role of VAMP8 in regulating insulin exocytosis and islet beta cell growth. *Cell Metabolism* 2012; 16(2):238-49.
153. Wang YS, Tzeng HT, Tsai CH, Cheng HC, Lai WW, Liu HS et al. VAMP8, a vesicle-SNARE required for RAB37-mediated exocytosis, possesses a tumor metastasis suppressor function. *Cancer Lett* 2018; 437:79-88.
154. Gansmo LB, Bjornslett M, Halle MK, Salvesen HB, Dorum A, Birkeland E et al. The MDM4 SNP34091 (rs4245739) C-allele is associated with increased risk of ovarian-but not endometrial cancer. *Tumour biology: the journal of the International Society for Onco developmental Biology and Medicine* 2016; 37(8):10697-702.
155. Gao F, Xiong X, Pan W, Yang X, Zhou C, Yuan Q et al. A Regulatory MDM4 Genetic Variant Locating in the Binding Sequence of Multiple MicroRNAs Contributes to Susceptibility of Small Cell Lung Cancer. *PloS one* 2015; 10(8):e0135647.
156. Garcia-Closas M, Couch FJ, Lindstrom S, Michailidou K, Schmidt MK, Brook MN, et al. Genome-wide association studies identify four ER negative-specific breast cancer risk loci. *Nature Genetics* 2013; 45(4):392-8, 398e391-2.
157. Zhou L, Zhang X, Li Z, Zhou C, Li M, Tang X et al. Association of a genetic variation in a miR-191 binding site in MDM4 with risk of esophageal squamous cell carcinoma. *PloS one.* 2013; 8(5):e64331.
158. Xu C, Zhu J, Fu W, Liang Z, Song S, Zhao Y et al. MDM4 rs4245739 A > C polymorphism correlates with reduced overall cancer risk in a meta-analysis of 69477 subjects. *Oncotarget* 2016; (44):71718-26.
159. Gansmo LB, Romundstad P, Birkeland E, Hveem K, Vatten L, Knappskog S, Lonning PE. MDM4 SNP34091 (rs4245739) and its effect on breast-, colon-, lung-, and prostate cancer risk. *Cancer medicine* 2015; 4(12):1901-7.

160. Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, van der Kwast T, et al. EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. *Eur Urol.* 2014; 65:124–37.
161. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
162. Didenko VV. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques* 2001; 31(5):1106-16, 1118, 1120-1.
163. Nagy A, Vitásková E, Černíková L, Křivda V, Jiřincová H, Sedlák K et al. Evaluation of TaqMan qPCR System Integrating Two Identically Labelled Hydrolysis Probes in Single Assay. *Sci Rep.* 2017; 7:41392.
164. Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006; 22:1928–9.
165. Horita N, Kaneko T. Genetic model selection for a case-control study and a meta-analysis. *Meta Gene.* 2015; 5:1-8.
166. Vrieze SI. Model selection and psychological theory: a discussion of the differences between the Akaike information criterion (AIC) and the Bayesian information criterion (BIC). *Psychol Methods* 2012; 17(2):228-43.
167. Xu Y, Liu L, Liu J, Zhang Y, Zhu J, Chen J et al. A potentially functional polymorphism in the promoter region of miR-34b/c is associated with an increased risk for primary hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2011; 128(2):412-7.
168. An J, Liu J, Liu L, Liu Y, Pan Y, Huang M et al. A genetic variant in primary miR-378 is associated with risk and prognosis of hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *PLoS One.* 2014; 9(4):e93707.
169. Feng M, Li Z, Aau M, Wong CH, Yang X, Yu Q. Myc/miR-378/TOB2/cyclin D1 functional module regulates oncogenic transformation. *Oncogene* 2011; 30(19):2242-51.
170. Yin X, Sun S, Zhao J, Yang J, Lei X, Xu C et al. Rs4705342 polymorphism is involved in the tumorigenesis of HBV positive HCC by altering the binding affinity of HBV induced NF-kB with the promoter region of microRNA-143. *J Cell Biochem.* 2018; 119(7):5233-42.
171. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020; 70(1):7-30.
172. Ilic M, Ilic I. Prostate cancer mortality in Serbia, 1991-2010: a joinpoint regression analysis. *J Public Health (Oxf)* 2016; 38(2):e63-e7.
173. Cai Q, Chen Y, Zhang D, Pan J, Xie Z, Xu C et al. Estimates of over-time trends in incidence and mortality of prostate cancer from 1990 to 2030. *Transl Androl Urol.* 2020; 9(2):196-209.
174. Grozescu T, Popa F. Prostate cancer between prognosis and adequate/proper therapy. *J Med Life* 2017; 10(1):5-12.
175. Olleik G, Kassouf W, Aprikian A, Hu J, Vanhuysse M, Cury F et al. Evaluation of New Tests and Interventions for Prostate Cancer Management: A Systematic Review. *J Natl Compr Canc Netw.* 2018; 16(11):1340-51.
176. Vis AN. Does PSA screening reduce prostate cancer mortality? *CMAJ.* 2002; 166(5):600-1.
177. Heidegger I, Klocker H, Pichler R, Pircher A, Prokop W, Steiner E et al. ProPSA and the Prostate Health Index as predictive markers for aggressiveness in low-risk prostate cancer-results from an international multicenter study. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2017; 20(3):271-5.
178. Abrate A, Lughezzani G, Gadda GM, Lista G, Kinzikeeva E, Fossati N et al. Clinical use of [-2]proPSA (p2PSA) and its derivatives (%p2PSA and Prostate Health Index) for the detection of prostate cancer: a review of the literature. *Korean J Urol.* 2014; 55(7):436-45.

179. Chistiakov DA, Myasoedova VA, Grechko AV, Melnichenko AA, Orekhov AN. New biomarkers for diagnosis and prognosis of localized prostate cancer. *Semin Cancer Bioll* 2018; 52(Pt 1):9-16.
180. Stojadinovic M, Vukovic I, Ivanovic M, Stojadinovic M, Milovanovic D, Pantic D et al. Optimal threshold of the prostate health index in predicting aggressive prostate cancer using predefined cost-benefit ratios and prevalence. *Int Urol Nephrol*. 2020; 52(5):893-901.
181. Vukovic I, Djordjevic D, Bojanic N, Babic U, Soldatovic I. Predictive value of [-2]prospa (p2psa) and its derivatives for the prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0ng/mL PSA range. *Int Braz J Urol*. 2017; 43(1):48-56.
182. Sebesta EM, Anderson CB. The Surgical Management of Prostate Cancer. *Semin Oncol*. 2017; 44(5):347-57.
183. Dalela D, Karabon P, Sammon J, Sood A, Löppenber B, Trinh QD et al. Generalizability of the Prostate Cancer Intervention Versus Observation Trial (PIVOT) Results to Contemporary North American Men with Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2017; 71(4):511-4.
184. Hamdy FC, Donovan JL, Lane JA, Mason M, Metcalfe C, Holding P et al. 10-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Localized Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2016; 375(15):1415-24.
185. Tolkach Y, Kristiansen G. The Heterogeneity of Prostate Cancer: A Practical Approach. *Pathobiology* 2018; 85(1-2):108-16.
186. Smits M, Mehra N, Sedelaar M, Gerritsen W, Schalken JA. Molecular biomarkers to guide precision medicine in localized prostate cancer. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017; 17(8):791-804.
187. Rebbeck TR. Prostate Cancer Genetics: Variation by Race, Ethnicity, and Geography. *Semin Radiat Oncol*. 2017; 27(1):3-10.
188. International HapMap Consortium. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 2007; 449(7164):851-61.
189. Kan YW, Dozy AM. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978; 75(11):5631-5.
190. Telenti A, Pierce LC, Biggs WH, di Iulio J, Wong EH, Fabani MM et al. Deep sequencing of 10,000 human genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113(42):11901-6.
191. Zhang C, Gao Y, Ning Z, Lu Y, Zhang X, Liu J et al. PGG.SNV: understanding the evolutionary and medical implications of human single nucleotide variations in diverse populations. *Genome Biol*. 2019; 20:215.
192. Erichsen HC, Chanock SJ. SNPs in cancer research and treatment. *Br J Cancer*. 2004; 90(4):747-51.
193. Claussnitzer M, Cho JH, Collins R, Cox NJ, Dermitzakis ET, Hurles ME et al. A brief history of human disease genetics. *Nature* 2020; 577(7789):179-189.
194. Matlak D, Szczurek E. Epistasis in genomic and survival data of cancer patients. *PLoS Comput Biol*. 2017; 13(7):e1005626.
195. Sud A, Kinnersley B, Houlston RS. Genome-wide association studies of cancer: current insights and future perspectives. *Nat Rev Cancer*. 2017; 17(11):692-704.
196. Buniello A, MacArthur JAL, Cerezo M, Harris LW, Hayhurst J, Malangone C, et al. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Res*. 2019; 47(D1):D1005-D1012.
197. Watanabe K, Taskesen E, van Bochoven A, Posthuma D. Functional mapping and annotation of genetic associations with FUMA. *Nat Commun*. 2017; 8(1):1826.
198. Zhang F, Lupski JR. Non-coding genetic variants in human disease. *Hum Mol Genet*. 2015; 24(R1):R102-10.

199. Kehl T, Backes C, Kern F, Fehlmann T, Ludwig N, Meese E, Lenhof HP et al. About miRNAs, miRNA seeds, target genes and target pathways. *Oncotarget* 2017; 8(63):107167-75.
200. Broughton JP, Lovci MT, Huang JL, Yeo GW, Pasquinelli AE. Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Mol Cell* 2016; 64(2):320-33.
201. Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA. *J Allergy Clin Immunol.* 2018; 141(4):1202-7.
202. Hobert O. Common logic of transcription factor and microRNA action. *Trends Biochem Sci.* 2004; 29(9):462-8.
203. Correia de Sousa M, Gjorgjieva M, Dolicka D, Sobolewski C, Foti M. Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(24):6249.
204. Hon LS, Zhang Z. The roles of binding site arrangement and combinatorial targeting in microRNA repression of gene expression. *Genome Biol.* 2007;8(8):R166.
205. Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med.* 2014; 20(8):460-9.
206. Abelson JF, Kwan KY, O'Roak BJ, Baek DY, Stillman AA, Morgan TM et al. Sequence variants in *SLITRK1* are associated with Tourette's syndrome. *Science* 2005; 310(5746):317-20.
207. Wu M, Jolicoeur N, Li Z, Zhang L, Fortin Y, L'Abbe D et al. Genetic variations of microRNAs in human cancer and their effects on the expression of miRNAs. *Carcinogenesis* 2008; 29(9):1710-6.
208. Wilkins OM, Titus AJ, Salas LA, Gui J, Eliot M, Butler RA, Sturgis EM et al. MicroRNA-Related Genetic Variants Associated with Survival of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2019; 28(1):127-36.
209. Malhotra P, Read GH, Weidhaas JB. Breast Cancer and miR-SNPs: The Importance of miR Germ-Line Genetics. *Noncoding RNA* 2019; 5(1).pii: E27.
210. Cochetti G, Rossi de Vermandois JA, Maulà V, Giulietti M, Cecati M, Del Zingaro M et al. Role of miRNAs in prostate cancer: Do we really know everything? *Urol Oncol.* 2020; 38(7):623-35.
211. Svoronos AA, Engelman DM, Slack FJ. OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer Res.* 2016; 76(13):3666-70.
212. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435(7043):834-8.
213. Saunders MA, Liang H, Li WH. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(9):3300-5.
214. Chen K, Rajewsky N. Natural selection on human microRNA binding sites inferred from SNP data. *Nat Genet.* 2006; 38(12):1452-6.
215. Slaby O, Bienertova-Vasku J, Svoboda M, Vyzula R. Genetic polymorphisms and microRNAs: new direction in molecular epidemiology of solid cancer. *J Cell Mol Med.* 2012; 16(1):8-21.
216. Guo Z, Shu Y, Zhou H, Zhang W. Identification of diagnostic and prognostic biomarkers for cancer: Focusing on genetic variations in microRNA regulatory pathways (Review). *Mol Med Rep.* 2016; 13(3):1943-52.
217. Yue M, Zhou D, Zhi H, Wang P, Zhang Y, Gao Y et al. MSDD: a manually curated database of experimentally supported associations among miRNAs, SNPs and human diseases. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(D1):D181-D185.
218. Quach H, Barreiro LB, Laval G, Zidane N, Patin E, Kidd KK et al. Signatures of purifying and local positive selection in human miRNAs. *Am J Hum Genet.* 2009; 84(3):316-27.
219. Cammaerts S, Strazisar M, De Rijk P, Del Favero J. Genetic variants in microRNA genes: impact on microRNA expression, function, and disease. *Front Genet.* 2015; 6:186.

220. Georgakilas G, Vlachos IS, Paraskevopoulou MD, Yang P, Zhang Y, Economides AN et al. microTSS: accurate microRNA transcription start site identification reveals a significant number of divergent pri-miRNAs. *Nat Commun.* 2014; 5:5700.
221. Liu Q, Wang J, Zhao Y, Li CI, Stengel KR, Acharya P et al. Identification of active miRNA promoters from nuclear run-on RNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45(13):e121.
222. Zhao Y, Wang F, Chen S, Wan J, Wang G. Methods of MicroRNA Promoter Prediction and Transcription Factor Mediated Regulatory Network. *Biomed Res Int.* 2017; 2017:7049406.
223. Liu C, Zhang F, Li T, Lu M, Wang L, Yue W et al. MirSNP, a database of polymorphisms altering miRNA target sites, identifies miRNA-related SNPs in GWAS SNPs and eQTLs. *BMC Genomics.* 2012;13:661.
224. Steri M, Idda ML, Whalen MB, Orrù V. Genetic variants in mRNA untranslated regions. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2018; 9(4):e1474.
225. Yu Z, Li Z, Jolicoeur N, Zhang L, Fortin F, Wang E, et al. Aberrant allele frequencies of the SNPs located in microRNA target sites are potentially associated with human cancers. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35:4535-41.
226. Yuan Y, Weidhaas JB. Functional microRNA binding site variants. *Mol Oncol.* 2019; 13(1):4-8.
227. Landi D, Gemignani F, Naccarati A, Pardini B, Vodicka P, Vodickova L et al. Polymorphisms within micro-RNA-binding sites and risk of sporadic colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2008; 29(3):579-84.
228. Preskill C, Weidhaas JB. SNPs in microRNA binding sites as prognostic and predictive cancer biomarkers. *Crit Rev Oncog.* 2013; 18(4):327-40.
229. Guo Z, Shu Y, Zhou H, Zhang W. Identification of diagnostic and prognostic biomarkers for cancer: Focusing on genetic variations in microRNA regulatory pathways (Review). *Mol Med Rep.* 2016; 13(3):1943-52.
230. Smyth C, Špakulová I, Cotton-Barratt O, Rafiq S, Tapper W, Upstill-Goddard R et al. Quantifying the cumulative effect of low-penetrance genetic variants on breast cancer risk. *Mol Genet Genomic Med.* 2015; 3(3):182-8.
231. Pipan V, Zorc M, Kunej T. MicroRNA Polymorphisms in Cancer: A Literature Analysis. *Cancers (Basel)* 2015; 7(3):1806-14.
232. Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 2014; 9:287-314.
233. Zhou P, Chen WG, Li XW. MicroRNA-143 acts as a tumor suppressor by targeting hexokinase 2 in human prostate cancer. *Am J Cancer Res.* 2015; 5(6):2056-63.
234. Chen QG, Zhou W, Han T, Du SQ, Li ZH, Zhang Z et al. MiR-378 suppresses prostate cancer cell growth through downregulation of MAPK1 in vitro and in vivo. *Tumour Biol.* 2016; 37(2):2095-103.
235. Fang LL, Sun BF, Huang LR, Yuan HB, Zhang S, Chen J et al. Potent Inhibition of miR-34b on Migration and Invasion in Metastatic Prostate Cancer Cells by Regulating the TGF- β Pathway. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(12).
236. Zhang S, Qian J, Cao Q, Li P, Wang M, Wang J et al. A potentially functional polymorphism in the promoter region of miR-34b/c is associated with renal cell cancer risk in a Chinese population. *Mutagenesis* 2014; 29(2):149-54.
237. Hashemi M, Moazeni-Roodi A, Bahari G, Taheri M, Ghavami S. Association between miR-34b/c rs4938723 polymorphism and risk of cancer: An updated meta-analysis of 27 case-control studies. *J Cell Biochem.* 2019; 120(3):3306-14.
238. Jiang X, Xue M, Fu Z, Ji C, Guo X, Zhu L et al. Insight into the effects of adipose tissue inflammation factors on miR-378 expression and the underlying mechanism. *Cell Physiol Biochem.* 2014; 33(6):1778-88.

239. Hu Z, Shu Y, Chen Y, Chen J, Dong J, Liu Y et al. Genetic polymorphisms in the precursor MicroRNA flanking region and non-small cell lung cancer survival. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 183(5):641-8.
240. Chen J, Wu X, Huang Y, Chen W, Brand RE, Killary AM et al. Identification of genetic variants predictive of early onset pancreatic cancer through a population science analysis of functional genomic datasets. *Oncotarget* 2016; 7(35):56480-90.
241. Avgeris M, Stravodimos K, Scorilas A. Loss of miR-378 in prostate cancer, a common regulator of KLK2 and KLK4, correlates with aggressive disease phenotype and predicts the short-term relapse of the patients. *Biol Chem.* 2014; 395(9):1095-104.
242. Liang Y, Sun R, Li L, Yuan F, Liang W, Wang L et al. A Functional Polymorphism in the Promoter of MiR-143/145 Is Associated With the Risk of Cervical Squamous Cell Carcinoma in Chinese Women: A Case-Control Study. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94(31):e1289.
243. Ghanbarpanah E, Kohan L, Mohammadianpanah M, Tahmasebi S. Association between mir-143 rs4705342 polymorphism and risk of recurrence in breast cancer patients. 13th International Congress on Breast Cancer, Tehran, Iran, 14-16 February 2018.
244. Li L, Pan X, Li Z, Bai P, Jin H, Wang T et al. Association between polymorphisms in the promoter region of miR-143/145 and risk of colorectal cancer. *Hum Immunol.* 2013; 74(8):993-7.
245. Moszynska A, Gebert M, Collawn JF, Bartoszewski R. SNPs in microRNA target sites and their potential role in human disease. *Open biology* 2017; 7(4).
246. Ding WH, Ren KW, Yue C, Zou JG, Zuo L, Zhang LF et al. Association between three genetic variants in kallikrein 3 and prostate cancer risk. *Bioscience reports* 2018; 38(6).
247. Zong H, Wang CC, Vaitheesvaran B, Kurland IJ, Hong W, Pessin JE. Enhanced energy expenditure, glucose utilization, and insulin sensitivity in VAMP8 null mice. *Diabetes.* 2011; 60(1):30-8.
248. Li Q, Lozano G. Molecular pathways: targeting Mdm2 and Mdm4 in cancer therapy. *Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research* 2013; 19(1):34-41.
249. Karni-Schmidt O, Lokshin M, Prives C. The Roles of MDM2 and MDMX in Cancer. *Annual review of pathology.* 2016; 11:617-44.
250. Wynendaele J, Bohnke A, Leucci E, Nielsen SJ, Lambertz I, Hammer S et al. An illegitimate microRNA target site within the 3' UTR of MDM4 affects ovarian cancer progression and chemosensitivity. *Cancer Research* 2010; 70(23):9641-9.
251. Fan C, Wei J, Yuan C, Wang X, Jiang C, Zhou C et al. The functional TP53 rs1042522 and MDM4 rs4245739 genetic variants contribute to Non-Hodgkin lymphoma risk. *PloS one* 2014; 9(9):e107047.
252. Hashemi M, Sanaei S, Hashemi SM, Eskandari E, Bahari G. Association of Single Nucleotide Polymorphisms of the MDM4 Gene With the Susceptibility to Breast Cancer in a Southeast Iranian Population Sample. *Clinical breast cancer* 2018; 18 (5):e883-e891.
253. Mohammad Khanlou Z, Pouladi N, Hosseinpour Feizi M, Pedram N. Lack of Associations of the MDM4 rs4245739 Polymorphism with Risk of Thyroid Cancer among Iranian-Azeri Patients: a Case-Control Study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention:APJCP.* 2017; 18(4):1133-8.
254. Pedram N, Pouladi N, Feizi MA, Montazeri V, Sakhinia E, Estiar MA. Analysis of the Association between MDM4 rs4245739 Single Nucleotide Polymorphism and Breast Cancer Susceptibility. *Clinical laboratory* 2016; 62(7):1303-8.
255. Zhai Y, Dai Z, He H, Gao F, Yang L, Dong Y et al. A PRISMA-compliant meta-analysis of MDM4 genetic variants and cancer susceptibility. *Oncotarget* 2016;7 (45):73935-44.

256. Purrington KS, Slager S, Eccles D, Yannoukakos D, Fasching PA, Miron P et al. Genome-wide association study identifies 25 known breast cancer susceptibility loci as risk factors for triple-negative breast cancer. *Carcinogenesis* 2014; 35(5):1012-9.
257. Stevens KN, Vachon CM, Couch FJ. Genetic susceptibility to triple-negative breast cancer. *Cancer Research* 2013; 73(7):2025-30.
258. Liu J, Tang X, Li M, Lu C, Shi J, Zhou L et al. Functional MDM4 rs4245739 genetic variant, alone and in combination with P53 Arg72Pro polymorphism, contributes to breast cancer susceptibility. *Breast cancer research and treatment* 2013; 140(1):151-7.
259. Branković A, Brajušković G, Nikolić Z, Vukotić V, Cerović S, Savić-Pavićević D et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and prostate cancer risk in Serbian population. *Int J Exp Pathol.* 2013; 94(6):355-61.
260. Nikolić ZZ, Brajušković GN, Pavićević DLj, Kojić AS, Vukotić VD, Tomović SM et al. Assessment of possible association between rs3787016 and prostate cancer risk in Serbian population. *Int J Clin Exp Med.* 2013; 6(1):57-66.
261. Branković AS, Brajušković GN, Mirčetić JD, Nikolić ZZ, Kalaba PB, Vukotić VD et al. Common variants at 8q24 are associated with prostate cancer risk in Serbian population. *Pathol Oncol Res.* 2013; 19(3):559-69.
262. Nikolić ZZ, Branković AS, Savić-Pavićević DL, Preković SM, Vukotić VD, Cerović SJ et al. Assessment of association between common variants at 17q12 and prostate cancer risk-evidence from Serbian population and meta--analysis. *Clin Transl Sci.* 2014; 7(4):307-13.
263. Nikolić ZZ, Savić Pavićević DLj, Vukotić VD, Tomović SM, Cerović SJ, Filipović N et al. Association between genetic variant in hsa-miR-146a gene and prostate cancer progression: evidence from Serbian population. *Cancer Causes Control.* 2014; 25(11):1571-5.
264. Liu J, Li Y, Yang D, Yang C, Mao L. Current state of biomarkers for the diagnosis and assessment of treatment efficacy of prostate cancer. *Discov Med.* 2019; 27(150):235243.
265. Ibrahim NH, Abdellateif MS, Thabet G, Kassem SH, El-Salam MA, El-Leithy AA et al. Combining PHI and miRNAs as Biomarkers in Prostate Cancer Diagnosis and Prognosis. *Clin Lab.* 2019; 65(7):10.

8. Prilozi

Prilog A. Asocijacija genetičkih varijanti rs4938723 i rs4705342 sa serumskim vrednostima PSA

Genetički model	PSA<10 ng/ml (%)	10 ng/ml≤ PSA< 20 ng/ml (%)	PSA>20 ng/ml (%)	PSA>20 ng/ml vs PSA<10 ng/ml			PSA>20 ng/ml vs 10 ng/ml≤ PSA< 20 ng/ml			10 ng/ml≤ PSA< 20 ng/ml vs PSA<10 ng/ml		
				OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC
rs4938723												
Kodominantni												
TT	38 (39.2)	33 (33.3)	56 (38.4)	1.00			1.00			1.00		
CT	42 (43.3)	56 (56.6)	70 (48)	1.09 (0.61-1.93)	0.79	325.7	0.73 (0.42-1.28)	0.42	333.6	1.52 (0.82-2.82)	0.16	274.2
CC	17 (17.5)	10 (10.1)	20 (13.7)	0.83 (0.38-1.82)			1.13 (0.47-2.71)			0.72 (0.29-1.79)		
Dominantni												
TT	38 (39.2)	33 (33.3)	56 (38.4)	1.00			1.00			1.00		
CT + CC	59 (60.8)	66 (66.7)	90 (61.6)	1.02 (0.59-1.74)	0.96	324.1	0.79 (0.46-1.36)	0.4	332.6	1.30 (0.72-2.33)	0.39	275.1
Recesivni												
TT + CT	80 (82.5)	89 (89.9)	126 (86.3)	1.00			1.00			1.00		
CC	17 (17.5)	10 (10.1)	20 (13.7)	0.80 (0.39-1.63)	0.54	323.7	1.36 (0.60-3.05)	0.46	332.8	0.56 (0.24-1.31)	0.18	274
Overdominant ni												
TT + CC	55 (56.7)	43 (43.4)	76 (52)	1.00			1.00			1.00		
CT	42 (43.3)	56 (56.6)	70 (48)	1.15 (0.68-1.94)	0.61	323.9	0.71 (0.42-1.19)	0.19	331.6	1.66 (0.94-2.93)	0.078	272.8
Log-aditivni												
-	-	-	-	0.95 (0.65-1.38)	0.78	324	0.95 (0.64-1.41)	0.8	333.3	0.99 (0.65-1.50)	0.95	275.9
rs4705342												
Kodominantni												
TT	77 (79.4)	82 (82)	118 (80.8)	1.00			1.00			1.00		
CT	20 (20.6)	16 (16)	25 (17.1)	0.86 (0.44-1.68)	0.19	321.4	1.10 (0.55-2.20)	0.96	336.1	0.77 (0.37-1.60)	0.21	276.2
CC	0 (0)	2 (2)	3 (2)	NA (0.00-NA)			1.05 (0.17-6.49)			NA (0.00-NA)		
Dominantni												
TT	77 (79.4)	82 (82)	118 (80.8)	1.00	0.92	322.8	1.00	0.79	334.1	1.00	0.69	277.1
CT + CC	20 (20.6)	18 (18)	28 (19.2)	0.97 (0.50-1.86)			1.09 (0.56-2.12)			0.87 (0.42-1.76)		
Recesivni												

TT + CT	97 (100)	98 (98)	143 (98)	1.00	0.077	319.6	1.00	0.97	334.1	1.00	0.11	274.7
CC	0 (0)	2 (2)	3 (2)	NA (0.00-NA)			1.03 (0.17-6.37)			NA (0.00-NA)		
Overdominant ni												
TT + CC	77 (79.4)	84 (84)	121 (82.9)	1.00	0.6	322.5	1.00	0.79	334.1	1.00	0.45	276.7
CT	20 (20.6)	16 (16)	25 (17.1)	0.84 (0.43-1.63)			1.10 (0.55-2.20)			0.75 (0.36-1.57)		
Log-aditivni												
-	-	-		1.09 (0.59-1.99)	0.79	322.7	1.07 (0.61-1.90)	0.81	334.1	0.98 (0.51-1.90)	0.96	277.3

Skraćenice: OR- odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacijski kriterijum.

Prilog B. Asocijacija genetičkih varijanti rs1076064, rs4938723 i rs4705342 sa prisustvom udaljenih metastaza

SNP	Genetički model	Bez metastaza M0 (%)	Prisustvo udaljenih metastaza M+ (%)	M+ vs M0		
				OR (95% CI) ^a	<i>P</i> vrednost _a	AIC
rs1076064						
	Kodominantni					
	AA	102 (38.6)	23 (45.1)	1.00		
	AG	117 (44.3)	23 (45.1)	0.87 (0.46-1.64)	0.36	284.8
	GG	45 (17.1)	5 (9.8)	0.49 (0.18-1.37)		
	Dominantni					
	AA	102 (38.6)	23 (45.1)	1.00		
	AG+GG	162 (61.4)	28 (54.9)	0.77 (0.42-1.40)	0.39	284.1
	Recesivni					
	AA+AG	219 (83)	46 (90.2)	1.00		
	GG	45 (17.1)	5 (9.8)	0.53 (0.20-1.40)	0.17	283
	Overdominantni					
	AA + GG	147 (55.7)	28 (54.9)	1.00		
	AG	117 (44.3)	23 (45.1)	1.03 (0.56-1.89)	0.92	284.9
	Log-aditivni					
	-	-	-	0.75 (0.48-1.17)	0.2	283.2
rs4938723						
	Kodominantni					
	TT	105 (39.8)	16 (31.4)	1.00		
	CT	121 (45.8)	28 (54.9)	1.52 (0.78-2.97)	0.45	285.3
	CC	38 (14.4)	7 (13.7)	1.21 (0.46-3.16)		
	Dominantni					
	TT	105 (39.8)	16 (31.4)	1.00		
	CT+CC	159 (60.2)	35 (68.6)	1.45 (0.76-2.75)	0.25	283.6
	Recesivni					
	TT+CT	226 (85.6)	44 (86.3)	1.00		
	CC	38 (14.4)	7 (13.7)	0.94 (0.40-2.25)	0.89	284.9
	Overdominantni					
	TT + CC	143 (54.2)	23 (45.1)	1.00		
	CT	121 (45.8)	28 (54.9)	1.44 (0.79-2.64)	0.23	283.4
	Log-aditivni					
	-	-	-	1.18 (0.76-1.82)	0.46	284.3
rs4705342						
	Kodominantni					
	TT	210 (79.5)	44 (88)	1.00		
	CT	50 (18.9)	6 (12)	0.57 (0.23-1.42)	0.22	280.3
	CC	4 (1.5)	0 (0)	0.00 (0.00-NA)		
	Dominantni					
	TT	210 (79.5)	44 (88)	1.00		
	CT+CC	54 (20.4)	6 (12)	0.53 (0.21-1.31)	0.15	279.2
	Recesivni					
	TT+CT	260 (98.5)	50 (100)	1.00		
	CC	4 (1.5)	0 (0)	0.00 (0.00-NA)	0.24	279.9
	Overdominantni					
	TT + CC	214 (81.1)	44 (88)	1.00		
	CT	50 (18.9)	6 (12)	0.58 (0.24-1.45)	0.22	279.8
	Log-aditivni					
	-	-	-	0.52 (0.22-1.25)	0.11	278.8

^a sve vrednosti su podešene za razlike u starostima

Skraćenice: OR- odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacijski kriterijum.

Prilog C. Asocijacija genetičkih varijanti rs4938723 i rs4705342 sa rizikom za progresiju KP

Genetički model	nizak rizik (%)	srednji rizik(%)	visok rizik (%)	srednji vs nizak rizik			visok vs nizak rizik			visok vs srednji rizik		
				OR (95% CI) ^a	<i>P</i> vrednost _a	AIC	OR (95% CI) ^a	<i>P</i> vrednost _a	AIC	OR (95% CI) ^a	<i>P</i> vrednost _a	AIC
rs4938723												
Kodominantni												
TT	9 (40.9)	40 (35.7)	72 (37.5)	1.00			1.00			1.00		
CT	12 (54.5)	57 (50.9)	90 (46.9)	1.07 (0.41-2.78)	0.43	126	0.94 (0.37-2.35)	0.27	145.8	0.86 (0.52-1.44)	0.69	401.6
CC	1 (4.5)	15 (13.4)	30 (15.6)	3.37 (0.39-28.96)			3.85 (0.47-31.86)			1.15 (0.55-2.40)		
Dominantni												
TT	9 (40.9)	40 (35.7)	72 (37.5)	1.00			1.00			1.00		
CT+CC	13 (59.1)	72 (64.3)	120 (62.5)	1.25 (0.49-3.18)	0.64	125.5	1.16 (0.47-2.86)	0.75	146.3	0.92 (0.56-1.50)	0.74	400.2
Recesivni												
TT+CT	21 (95.5)	97 (86.6)	162 (84.4)	1.00			1.00			1.00		
CC	1 (4.5)	15 (13.4)	30 (15.6)	3.25 (0.41-25.95)	0.2	124	4.00 (0.52-30.94)	0.11	143.8	1.25 (0.64-2.46)	0.52	399.9
Overdominantni												
TT+CC	10 (45.5)	55 (49.1)	102 (53.1)	1.00			1.00			1.00		
CT	12 (54.5)	57 (50.9)	90 (46.9)	0.86 (0.34-2.17)	0.76	125.6	0.73 (0.30-1.77)	0.48	145.9	0.83 (0.52-1.33)	0.44	399.7
Log-aditivni												
-	-	-	-	1.41 (0.68-2.91)	0.35	124.8	1.39 (0.71-2.72)	0.33	145.4	1.02 (0.72-1.44)	0.92	400.3
rs4705342												
Kodominantni												
TT	16 (72.7)	93 (83)	154 (79.8)	1.00			1.00			1.00		
CT	6 (27.3)	18 (16.1)	35 (18.1)	0.51 (0.18-1.50)	0.41	125.9	0.62 (0.22-1.69)	0.44	146.7	1.23 (0.65-2.32)	0.59	401.4
CC	0 (0)	1 (0.9)	4 (2.1)	NA (0.00-NA)			NA (0.00-NA)			2.40 (0.26-22.06)		
Dominantni												
TT	16 (72.7)	93 (83)	154 (79.8)	1.00			1.00			1.00		
CT+CC	6 (27.3)	19 (17)	39 (20.2)	0.54 (0.19-1.57)	0.27	124.5	0.68 (0.25-1.86)	0.47	145.8	1.29 (0.70-2.39)	0.41	399.7
Recesivni												
TT+CT	22 (100)	111 (99.1)	189 (97.9)	1.00			1.00			1.00		
CC	0 (0)	1 (0.9)	4 (2.1)	NA (0.00-NA)	0.55	125.3	NA (0.00-NA)	0.37	145.5	2.32 (0.25-21.22)	0.42	399.8
Overdominantni												
TT+CC	16 (72.7)	94 (83.9)	158 (81.9)	1.00			1.00			1.00		

CT	6 (27.3)	18 (16.1)	35 (18.1)	0.51 (0.17-1.48)			0.60 (0.22-1.65)			1.21 (0.64-2.28)		
Log-aditivni												
-	-	-	-	0.61 (0.22-1.65)	0.34	124.8	0.80 (0.33-1.98)	0.64	146.2	1.30 (0.75-2.27)	0.34	399.5

^a vrednosti podešene za razlike u starostima

Skraćenice: OR- odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacioni kriterijum.

Prilog D. Asocijacija genetičke varijante rs1010 sa vrednostima serumskog PSA

Genetički model	PSA<10 ng/ml (%)	10 ng/ml≤ PSA< 20 ng/ml (%)	PSA>20 ng/ml (%)	PSA>20 ng/ml vs PSA<10 ng/ml			PSA>20 ng/ml vs 10 ng/ml≤ PSA< 20 ng/ml			10 ng/ml≤ PSA< 20 ng/ml vs PSA<10 ng/ml		
				OR (95% CI) ^a	<i>P</i> vrednost _a	AIC	OR (95% CI) ^a	<i>P</i> vrednost _a	AIC	OR (95% CI) ^a	<i>P</i> vrednost _a	AIC
rs1010												
Kodominantni												
TT	37 (37)	33 (32.7)	52 (34.4)	1.00			1.00			1.00		
CT	45 (45)	45 (44.5)	70 (46.4)	1.06 (0.60-1.89)	0.93	335.1	1.00 (0.56-1.79)	0.8	342.6	1.07 (0.57-2.01)	0.69	284.2
CC	18 (18)	23 (22.8)	29 (19.2)	1.15 (0.55-2.41)			0.81 (0.40-1.64)			1.39 (0.64-3.04)		
Dominantni												
TT	37 (37)	33 (32.7)	52 (34.4)	1.00			1.00			1.00		
CT + CC	63 (63)	68 (67.3)	99 (65.6)	1.09 (0.64-1.86)	0.76	333.1	0.93 (0.55-1.60)	0.81	341	1.16 (0.65-2.09)	0.62	282.7
Recesivni												
TT + CT	82 (82)	78 (77.2)	122 (80.8)	1.00			1.00			1.00		
CC	18 (18)	23 (22.8)	29 (19.2)	1.11 (0.57-2.17)	0.75	333.1	0.81 (0.43-1.50)	0.5	340.6	1.34 (0.67-2.69)	0.4	282.2
Overdominantni												
TT + CC	55 (55)	56 (55.5)	81 (53.6)	1.00			1.00	0.75	341	1.00	0.83	282.9
CT	45 (45)	45 (44.5)	70 (46.4)	1.01 (0.60-1.70)	0.96	333.2	1.09 (0.65-1.81)			0.94 (0.54-1.65)		
Log-aditivni												
-	-	-	-	1.07 (0.75-1.54)	0.7	333.1	0.91 (0.64-1.29)	0.59	340.8	1.17 (0.80-1.71)	0.43	282.3

^a vrednosti podešene za razlike u starostima

Skraćenice: OR- odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacioni kriterijum.

Prilog E. Asocijacija genetičkih varijanti rs1010, rs1058205 i rs4245739
sa prisustvom udaljenih metastaza

SNP	Genetički model	Bez metastaza M0 (%)	Prisustvo udaljenih metastaza M+ (%)	M+ vs M0		
				OR (95% CI) ^a	<i>P</i> vrednost _a	AIC
rs1010						
	Kodominantni					
	TT	94 (34.7)	16 (31.4)	1.00		
	CT	124 (45.8)	22 (43.1)	1.05 (0.52-2.11)	0.64	288.5
	CC	53 (19.6)	13 (25.5)	1.44 (0.64-3.23)		
	Dominantni					
	TT	94 (34.7)	16 (31.4)	1.00		
	CT+CC	177 (65.3)	35 (68.6)	1.17 (0.61-2.22)	0.64	287.1
	Recesivni					
	TT+CT	218 (80.4)	38 (74.5)	1.00		
	CC	53 (19.6)	13 (25.5)	1.41 (0.70-2.82)	0.35	286.5
	Overdominantni					
	TT + CC	147 (54.2)	29 (56.9)	1.00		
	CT	124 (45.8)	22 (43.1)	0.90 (0.49-1.65)	0.74	287.3
	Log-aditivni					
	-	-	-	1.19 (0.79-1.79)	0.4	286.7
rs1058205						
	Kodominantni					
	TT	191 (70.7)	38 (74.5)	1.00		
	CT	72 (26.7)	11 (21.6)	0.77 (0.37-1.59)	0.68	288.2
	CC	7 (2.6)	2 (3.9)	1.45 (0.29-7.25)		
	Dominantni					
	TT	191 (70.7)	38 (74.5)	1.00		
	CT+CC	79 (29.3)	13 (25.5)	0.83 (0.42-1.65)	0.59	286.7
	Recesivni					
	TT+CT	263 (97.4)	49 (96.1)	1.00		
	CC	7 (2.6)	2 (3.9)	1.55 (0.31-7.67)	0.61	286.8
	Overdominantni					
	TT + CC	198 (73.3)	40 (78.4)	1.00		
	CT	72 (26.7)	11 (21.6)	0.76 (0.37-1.56)	0.45	286.4
	Log-aditivni					
	-	-	-	0.92 (0.51-1.65)	0.77	286.9
rs4245739						
	Kodominantni					
	AA	152 (56.5)	29 (56.9)	1.00		
	AC	98 (36.4)	19 (37.2)	1.01 (0.54-1.91)	0.95	288.5
	CC	19 (7.1)	3 (5.9)	0.83 (0.23-2.98)		
	Dominantni					
	AA	152 (56.5)	29 (56.9)	1.00		
	AC+CC	117 (43.5)	22 (43.1)	0.98 (0.54-1.80)	0.96	286.6
	Recesivni					
	AA+AC	250 (92.9)	48 (94.1)	1.00		
	CC	19 (7.1)	3 (5.9)	0.82 (0.23-2.89)	0.76	286.5
	Overdominantni					
	AA + CC	171 (63.6)	32 (62.8)	1.00		
	AC	98 (36.4)	19 (37.2)	1.03 (0.56-1.92)	0.92	286.6
	Log-aditivni					
	-	-	-	0.96 (0.59-1.56)	0.87	286.6

^a sve vrednosti su podešene za razlike u starostima

Skraćenice: OR- odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacijski kriterijum.

Prilog F. Asocijacija genetičkih varijanti rs1010, rs1058205 i rs4245739 sa rizikom za progresiju KP

Genetički model	nizak rizik (%)	srednji rizik (%)	visok rizik (%)	srednji vs nizak rizik			visok vs nizak rizik			visok vs srednji rizik		
				OR (95% CI) †	<i>P</i> vrednost †	AIC	OR (95% CI) †	<i>P</i> vrednost †	AIC	OR (95% CI) †	<i>P</i> vrednost †	AIC
rs1010												
Kodominantni												
TT	6 (27.3)	39 (33.9)	72 (36.4)	1.00			1.00			1.00		
CT	12 (54.5)	53 (46.1)	88 (44.4)	0.68 (0.23-2.01)	0.77	128.2	0.61 (0.22-1.71)	0.62	148.6	0.87 (0.52-1.48)	0.88	411.7
CC	4 (18.2)	23 (20)	38 (19.2)	0.89 (0.23-3.50)			0.80 (0.21-3.04)			0.91 (0.47-1.74)		
Dominantni												
TT	6 (27.3)	39 (33.9)	72 (36.4)	1.00	0.55	126.3	1.00	0.39	146.8	1.00	0.62	409.7
CT+CC	16 (72.7)	76 (66.1)	126 (63.6)	0.74 (0.26-2.05)			0.66 (0.25-1.76)			0.88 (0.54-1.44)		
Recesivni												
TT+CT	18 (81.8)	92 (80)	160 (80.8)	1.00	0.84	126.7	1.00	0.88	147.5	1.00	0.94	410
CC	4 (18.2)	23 (20)	38 (19.2)	1.13 (0.35-3.65)			1.09 (0.35-3.42)			0.98 (0.54-1.75)		
Overdominantni												
TT+CC	10 (45.5)	62 (53.9)	110 (55.6)	1.00	0.48	126.2	1.00	0.36	146.7	1.00	0.68	409.8
CT	12 (54.5)	53 (46.1)	88 (44.4)	0.72 (0.28-1.81)			0.66 (0.27-1.61)			0.91 (0.57-1.45)		
Log-aditivni												
-	-	-	-	0.91 (0.48-1.74)	0.78	126.6	0.86 (0.47-1.58)	0.64	147.3	0.94 (0.68-1.30)	0.71	409.9
rs1058205												
Kodominantni												
TT	15 (68.2)	80 (69.6)	139 (70.6)	1.00			1.00			1.00		
CT	7 (31.8)	31 (27)	52 (26.4)	0.84 (0.31-2.27)	0.45	127.1	0.78 (0.30-2.03)	0.44	147.7	0.90 (0.53-1.53)	0.9	410.9
CC	0 (0)	4 (3.5)	6 (3)	NA (0.00-NA)			NA (0.00-NA)			0.84 (0.23-3.09)		
Dominantni												
TT	15 (68.2)	80 (69.6)	139 (70.6)	1.00	0.92	126.7	1.00	0.79	147.3	1.00	0.66	408.9
CT+CC	7 (31.8)	35 (30.4)	58 (29.4)	0.95 (0.35-2.55)			0.88 (0.34-2.28)			0.89 (0.54-1.48)		
Recesivni												
TT+CT	22 (100)	111 (96.5)	191 (97)	1.00	0.23	125.2	1.00	0.24	146	1.00	0.82	409
CC	0 (0)	4 (3.5)	6 (3)	NA (0.00-NA)			NA (0.00-NA)			0.86 (0.24-3.16)		
Overdominantni												
TT+CC	15 (68.2)	84 (73)	145 (73.6)	1.00	0.66	126.5	1.00	0.55	147	1.00	0.71	409

CT	7 (31.8)	31 (27)	52 (26.4)	0.80 (0.30-2.15)			0.75 (0.29-1.94)			0.91 (0.53-1.54)		
Log-aditivni												
-	-	-	-	1.09 (0.45-2.64)	0.84	126.7	1.02 (0.44-2.37)	0.96	147.4	0.90 (0.59-1.40)	0.65	408.9
rs4245739												
Kodominantni												
AA	16 (72.7)	63 (55.3)	109 (55.6)	1.00			1.00			1.00		
AC	6 (27.3)	44 (38.6)	71 (36.2)	1.87 (0.68-5.17)	0.13	124.3	1.79 (0.67-4.83)	0.091 [‡]	144.5	0.95 (0.58-1.55)	0.79	408.9
CC	0 (0)	7 (6.1)	16 (8.2)	NA (0.00-NA)			NA (0.00-NA)			1.33 (0.51-3.44)		
Dominantni												
AA	16 (72.7)	63 (55.3)	109 (55.6)	1.00			1.00			1.00		
AC+CC	6 (27.3)	51 (44.7)	87 (44.4)	2.16 (0.79-5.95)	0.12	124	2.18 (0.81-5.81)	0.11	144.7	1.00 (0.63-1.60)	0.99	407.3
Recesivni												
AA+AC	22 (100)	107 (93.9)	180 (91.8)	1.00			1.00			1.00		
CC	0 (0)	7 (6.1)	16 (8.2)	NA (0.00-NA)	0.11	123.8	NA (0.00-NA)	0.066 [‡]	143.9	1.36 (0.54-3.44)	0.51	406.9
Overdominantni												
AA+CC	16 (72.7)	70 (61.4)	125 (63.8)	1.00			1.00			1.00		
AC	6 (27.3)	44 (38.6)	71 (36.2)	1.67 (0.61-4.61)	0.31	125.3	1.58 (0.59-4.23)	0.35	146.4	0.92 (0.57-1.49)	0.73	407.2
Log-aditivni												
-	-	-	-	2.21 (0.87-5.62)	0.073 [‡]	123.1	2.22 (0.91-5.40)	0.055 [‡]	143.6	1.05 (0.73-1.53)	0.78	407.3

[†] vrednosti podešene za razlike u starostima

[‡] statistički trend značajnosti

Skraćenice: OR- odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacijski kriterijum.

Biografija autora

Nevena S. Kotarac rođena je 29.08.1992. godine na Cetinju. Osnovne studije Molekularne biologije i fiziologije na Univerzitetu u Beogradu-Biološkom fakultetu upisala je školske 2011/2012 godine i završila u roku sa srednjom prosečnom ocenom 9.45. Školske 2015/2016 godine upisala je master studije na istom fakultetu, smer Molekularna biologija i fiziologija, modul Humana molekularna genetika. Master studije završila je u roku, sa prosečnom ocenom 10.00. Godine 2017. dobija nagradu Fondacije „Goran Ljubijankić“ za najbolji master rad iz oblasti molekularne biologije koji je urađen u institutima ili na univerzitetima u Srbiji i odbranjen u toku 2016. godine pod naslovom „Primena metode amplifikacije višestruko ligiranih proba u identifikaciji mikrodelecija i varijacija u broju kopija regiona AZF hromozoma Y kod muškaraca sa idiopatskim sterilitetom“. Godine 2016. upisuje doktorske studije na Univerzitetu u Beogradu-Biološkom fakultetu, studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota. Godine 2017. Nevena je birana u zvanje istraživač pripravnik, a 2020. godine u zvanje istraživač saradnik. Školske 2017/2018 i 2018/2019 bila je angažovana u realizaciji praktičnih vežbi na predmetu „Osnovi molekularne biologije“, obaveznom predmetu na drugoj godini osnovnih studija molekularne biologije, a od školske 2019/2020 angažovana je na vežbama iz predmeta „Molekularna genetika“, obaveznom predmetu na trećoj godini osnovnih studija Molekularne biologije i fiziologije. Do sada, kao prvi autor objavila je jedan rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21) i jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22). Koautor je jednog predavanja po pozivu sa skupa nacionalnog značaja štampanog u celini, kao i tri saopštenja sa skupova nacionalnog značaja.

Original article:

**ANALYSIS OF ASSOCIATION OF POTENTIALLY FUNCTIONAL
GENETIC VARIANTS WITHIN GENES ENCODING MIR-34B/C,
MIR-378 AND MIR-143/145 WITH PROSTATE CANCER IN
SERBIAN POPULATION**

Nevena Kotarac, Zorana Dobrijevic, Suzana Matijasevic, Dusanka Savic-Pavicevic,
Goran Brajuskovic*

Centre for Human Molecular Genetics, Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade,
Serbia

* Corresponding author: Goran Brajuskovic, Centre for Human Molecular Genetics, Faculty
of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia. Tel: +381 11 2639 100,
E-mail: brajuskovic@bio.bg.ac.rs

<http://dx.doi.org/10.17179/excli2019-1257>

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License
(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ABSTRACT

MiRNA-associated genetic variants occurring in regulatory regions can affect the efficiency of transcription and potentially modify pri-miRNA or pre-miRNA processing. Since miRNA-based mechanisms are shown to be involved in the pathogenesis of prostate cancer (PCa), the aim of the present study was to evaluate the effect of rs4938723, rs1076064 and rs4705343 occurring in regulatory regions of miR-34b/c, miR-143/145 and miR-378, respectively, on PCa risk and progression in Serbian population. We examined a total of 1060 subjects, of which 350 were patients with PCa, 354 were patients with benign prostatic hyperplasia (BPH), while 356 healthy volunteers were included in the control group. Genotyping of rs4938723, rs1076064 and rs4705343 was performed by using Taqman[®] SNP Genotyping Assays. Allele C of rs4705342 was found to increase the risk of PCa ($P=0.031$ for codominant model, $P=0.0088$ for recessive model). Rs1076064 minor allele G was found to associate with serum PSA score, as well as with PCa T category and disease aggressiveness. For rs4938723 minor allele C was shown to be associated with the lower PCa T category ($P_{\text{dom}}=0.0046$; OR=0.36, 95 % CI 0.17-0.76) in T2 vs. T1 comparison. Rs4705342 was identified as PCa susceptibility variant in Serbian population, while for rs1076064 and rs4938723 association with PCa progression parameters was found.

Keywords: Prostate cancer, miRNA, rs4938723, rs1076064, rs4705342, association study

INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is the most common cancer among men in Europe. Based on the most recent data from WHO and Eurostat databases, predicted mortality from PCa in Europe for 2018 was 77.000 deaths, which is about 7 % higher than observed in 2012 (Szeliski et al., 2018). In Serbia, PCa is the third most commonly diagnosed cancer in

men, according to the data obtained by the National Institute of Public Health. At the same time, in the period between 1991 and 2015, the upward trend of mortality was determined for major cancer types, with the largest increase in cancer mortality rates demonstrated for PCa (Institute of Public Health of Serbia “Dr Milan Jovanović Batut”, 2014). Striking statistics have led to

focusing attention of both medical practitioners and scientists on the improvements in diagnostic procedures and patient monitoring. Despite the recent advances in diagnostic procedures and therapeutic approaches, PCa still suffers from overdiagnosis and overtreatment and novel molecular markers are urgently needed for better management and risk stratification of patients (Loeb et al., 2014).

Among the genetic variants discovered as PCa susceptibility loci, most originated from genome-wide association studies while the others located within important tumor-suppressor genes or oncogenes involved in molecular basis of PCa were discovered through candidate-gene based approach (Nikolić et al., 2016). Recently, microRNA-related genes have emerged as novel candidates, due to accumulating evidence supporting the involvement of regulatory RNA species in PCa pathogenesis (Kanwal et al., 2017). MicroRNAs (miRNAs) are a class of small, evolutionarily conserved non-coding RNAs about ~23 nt in length that post-transcriptionally regulate gene expression. MicroRNAs regulate almost all basic cellular functions, from cell differentiation to cell cycle-arrest and apoptosis. At posttranscriptional level miRNAs negatively regulate protein expression of oncogenes or tumor-suppressive genes and could participate in carcinogenesis as either tumor-suppressor or oncogenic miRNAs (Felekkis et al., 2010). Therefore, genetic variants occurring in different constituents of miRNA network, from miRNA genes themselves to miRNA binding sites and miRNA-processing machinery, could potentially be implicated in molecular pathogenesis of PCa. MiRNA-associated genetic variants occurring in regulatory regions can affect the efficiency of transcription and, depending on their location relative to mature microRNA, potentially modify pri-miRNA or pre-miRNA processing. Also, variants changing the sequence of mature microRNA, as well as variants located in miRNA-binding site within mRNA, could influence the binding affinity, or even cre-

ate/destroy binding sites. Furthermore, genetic variants affecting processing machinery potentially disrupt proper maturation (Ryan, 2017). Based on these functional implications, case-control studies, as well as case-only studies among PCa patients, could lead to possible identification of miRNA-related variants associated with PCa susceptibility and/or progression risk. Any new molecular marker identified through this approach and validated in larger independent cohorts has potential to be implemented in diagnostic or prognostic algorithms aiming to facilitate identification of high-risk patients, as well as to improve the management of therapeutic process (Rupaimoole and Slack, 2017).

In our previous reports, we have investigated the association of common genetic variants within mature microRNAs with PCa risk and progression (Nikolic et al., 2014b, 2015). Furthermore, we have analyzed the potential effect of rs875919 located in the terminal loop of miR-27a precursor (Nikolic et al., 2015). These results encouraged us to further examine the impact of genetic variants with potential effect on microRNA function on the risk of PCa development and tumor aggressiveness. Among the novel candidate genetic variants for the present study is rs4938723, which lies within the potential regulatory region of pri-miR-34b/c and is previously reported to be related to higher risk of PCa (Hashemi et al., 2017). This potentially functional variant is associated with the risk of cervical, hepatocellular cancer (HCC), childhood acute lymphoblastic leukemia (AML), gastric cancer and esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) (Xu et al., 2018). Similarly, genetic variant rs1076064 which could affect the transcription and/or processing of pri-miR-378 is related to several types of cancer including breast cancer, renal cell cancer (RCC) and AML (Ding et al., 2018). However, to date, there are no reports regarding the impact of this variant on PCa risk. Since miR-143 and miR-145 are among the most commonly downregulated miRNAs in neoplasms such as gastric, urinary bladder, colorectal cancer, as well as

PCa, genetic variants potentially affecting the expression of their precursor have been investigated in multiple malignant diseases. Among a number of SNPs located within the potential regulatory region of miR-143/145 cluster, the effect on transcriptional actions was revealed for rs4705343 and rs4705342 (Wei et al., 2016, Sima et al., 2017). Also, a previous report suggests the association of genetic variant rs4705342 with PCa (Chu et al., 2016). Furthermore, a functional assay has shown the effect of rs4705342 on transcriptional regulation (Chu et al., 2016).

The association of genetic variants rs4705342 and rs4938723 with PCa was previously assessed in single studies conducted in populations of China and Iran, respectively. Therefore, the aim of the present study is to evaluate the effect of these genetic variants on PCa risk and progression in a population of European origin. Also, as far as we are aware, the present case-control study is the first one aiming to assess the possible association of a common cancer-related genetic variant rs1076064 with PCa.

MATERIAL AND METHODS

The study used peripheral blood samples obtained from the collections of DNA samples from the Center for Human Molecular Genetics. The collection consisted of patients treated in the period between 2008 and 2013 at Clinical Centre “Dr Dragiša Mišović Dedinje”, Belgrade, Serbia and Clinical Centre “Zvezdara”, Belgrade, Serbia (Brankovic et al., 2013a, b; Nikolic et al., 2014a, b, 2015). Research was conducted with the approval of ethics committees of these medical institutions. The study was done in accordance with the Helsinki Declaration.

This case-control study examined a total of 1060 subjects: 350 peripheral blood samples from patients with sporadic PCa, 354 samples from patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) as well as 356 buccal swab or peripheral blood samples from healthy control individuals. Controls were recruited after passing standard annual physical examination. PCa and BPH were diag-

nosed by means of standard clinical procedures which combined digital rectal examination (DRE), transrectal ultrasonography (TRUS), abdominal and pelvic ultrasound, serum prostate-specific antigen (PSA) level, bone scintigraphy and radiography, and finally prostate biopsy.

Patients with PCa were selected into groups based on the values of standard prognostic parameters: Prostate specific antigen (PSA) at diagnosis (PSA<10 ng/ml; 10 ng/ml≤ PSA< 20 ng/ml; PSA>20 ng/ml), Gleason score (GS) (GS<7; GS=7; GS>7) and T category, according to TNM staging (T1; T2; T3/T4). Also, three groups of patients with different risk of localized cancer progression were formed, according to criteria recommended by European Association of Urology (EAU) (Heidenreich et al., 2014). Groups were defined as low-risk (PSA<10 ng/ml, GS<7, and T category T1-T2a), intermediate-risk (PSA 10-20 ng/ml or GS=7 or T category T2b-T2c), and high-risk (PSA>20 ng/ml or GS>7 or T category T3/T4). Since patients with metastases were included in the study, the criteria were modified to include this subset into high risk group.

QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and Blood DNA Isolation Mini Kit, (Norgen Biotek Corp., Canada) were used for isolation of genomic DNA from peripheral blood and buccal swab samples, following the manufacturers' protocol. Genotyping of rs4938723, rs1076064 and rs4705342 was performed using Taqman® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Statistical analysis of SNPs associations was performed by using SNPStats software (Sole et al., 2006). Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was assessed using exact test implemented in SNPStats software. Allelic and genotypic associations were evaluated by unconditional logistic regression method with adjustment for age. Separate comparisons were done for five different genetic models: allelic (log-additive), codominant, dominant, recessive, and overdominant.

Odds ratio (OR) and its 95 % confidence intervals (95 % CI) were used as risk estimates. The best fitting models were determined by using Akaike information criterion (AIC). All tests were two-sided, and P value less than 0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS

Clinical and pathological characteristics of PCa patients are presented in Table 1. According to available data, the most frequently determined initial serum PSA scores among PCa patients were higher than 20 ng/ml. Also, over a half of PCa patients had GS=6 (54 %), as well as TNM T category T2 of primary cancer (55.1 %), while distant metastases were found in 16 % of PCa patients at diagnosis.

Table 1: Classification of patients with PCa based on the values of standard prognostic parameters of disease progression, presence of distant metastases and the risk of cancer progression.

Standard prognostic parameter	PCa patients; n (%)
PSA at diagnosis	
<10 ng/ml	98 (28.2)
10-20 ng/ml	100 (28.8)
>20 ng/ml	149 (42.9)
Gleason score	
4	7 (2.1)
5	15 (4.5)
6	182 (54)
7	80 (23.7)
8	31 (9.2)
9	19 (5.6)
10	3 (0.9)
TNM T categories	
T1	49 (16.1)
T2	168 (55.1)
T3/T4	88 (28.8)
Metastases	
Distant (M+)	51 (16)
Regional (N+) or not detected	267 (84)
Risk of progression (EAU/Heidenreich et al., 2014)	
Low	22 (6.6)
Medium	113 (34.1)
High	196 (59.2)

Abbreviations: PSA - prostate-specific antigen

Allele and genotype frequencies of rs4938723, rs1076064 and rs4705342 in PCa patients, BPH patients and healthy controls are summarized in Table 2. Genotype distributions among controls were consistent with Hardy-Weinberg equilibrium ($P=0.91$, $P=0.26$ and $P=0.6$, for rs4938723, rs1076064 and rs4705342, respectively).

In the comparison of genotype distributions and allele frequencies of tested genetic variants among PCa patients and healthy controls no statistically significant differences were found. Conversely, when comparing genotype distributions among PCa and BPH patients, allele C of rs4705342 was found to increase the risk of PCa ($P=0.031$ for codominant model, $P=0.0088$ for recessive model). The exact OR could not be calculated, since CC genotype was not found in BPH patients (Table 2).

By comparing genotype distributions among PCa patients with initial serum PSA scores $10 \text{ ng/ml} \leq \text{PSA} < 20 \text{ ng/ml}$ and $\text{PSA} < 10 \text{ ng/ml}$, rs1076064 minor allele G was found to confer the increased risk of higher PSA score under dominant genetic model ($P_{\text{dom}}=0.032$; $\text{OR}_{\text{dom}}=1.89$, 95%CI 1.05-3.41) (Table 3). The analysis of association between other analyzed genetic variants and the serum PSA scores did not show statistical significance for any genetic model tested (results not shown).

When genotype frequencies among PCa patients with different GSs were compared, statistical significance was not reached for any genetic variant tested. Nevertheless, the comparison of genotype distributions among PCa patients with $\text{GS} = 7$ and $\text{GS} < 7$ showed the statistical trend for the association between rs1076064 minor allele G and higher GS ($P=0.082$, for dominant genetic model). Statistical trend of association was also found in the comparison of rs1076064 genotype frequencies among PCa patients with $\text{GS} > 7$ and $\text{GS} = 7$, but with the opposite direction of the effect of minor allele G ($P_{\text{dom}}=0.09$ and $P_{\text{log-additive}}=0.081$) (Table 4).

Table 2: Association of genetic variants within genes encoding miR-34b/c, miR-378 and miR-143/145 with PCa risk

SNP	Genetic model	No of PCa patients (%)	No of controls (%)	No of BPH patients (%)	PCa vs controls			PCa vs BPH		
					OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC
rs4938723	Codominant				1.00			1.00		
	TT	129 (37.4)	138 (39.5)	134 (38.4)	1.10 (0.80-1.52)	0.84	969.7	1.02 (0.74-1.41)	0.95	960.9
	TC	169 (49)	164 (47)	170 (48.7)						
	CC	47 (13.6)	47 (13.5)	45 (12.9)	1.07 (0.67-1.71)			1.08 (0.67-1.74)		
	Dominant				1.00			1.00		
	TT	129 (37.4)	138 (39.5)	134 (38.4)	1.09 (0.81-1.49)	0.56	967.7	1.03 (0.76-1.41)	0.83	958.9
	TC+CC	216 (62.6)	211 (60.5)	215 (61.6)						
	Recessive				1.00			1.00		
	TT+TC	298 (86.4)	302 (86.5)	304 (87.1)	1.01 (0.66-1.56)	0.95	968	1.06 (0.68-1.65)	0.79	958.9
	CC	47 (13.6)	47 (13.5)	45 (12.9)						
Overdominant				1.00			1.00			
TT+CC	176 (51)	185 (53)	179 (51.3)	1.08 (0.80-1.46)	0.6	967.8	1.00 (0.74-1.35)	0.98	958.9	
TC	169 (49)	164 (47)	170 (48.7)							
Log-additive	-	-	-	1.05 (0.84-1.31)	0.66	967.8	1.03 (0.83-1.29)	0.77	958.9	
rs1076064	Codominant				1.00			1.00		
	AA	135 (38.9)	125 (35.4)	127 (36.1)	0.79 (0.57-1.09)	0.16	974.7	0.85 (0.61-1.19)	0.61	967.1
	AG	152 (43.8)	179 (50.7)	166 (47.2)						
	GG	60 (17.3)	49 (13.9)	59 (16.8)	1.14 (0.72-1.78)			0.98 (0.63-1.52)		
	Dominant				1.00			1.00		
	AA	135 (38.9)	125 (35.4)	127 (36.1)	0.86 (0.63-1.17)	0.34	975.4	0.89 (0.65-1.21)	0.44	965.5
	AG+GG	212 (61.1)	228 (64.6)	225 (63.9)						
	Recessive				1.00			1.00		
	AA+AG	287 (82.7)	304 (86.1)	293 (83.2)	1.30 (0.86-1.96)	0.21	974.8	1.07 (0.72-1.59)	0.74	966
	GG	60 (17.3)	49 (13.9)	59 (16.8)						
Overdominant				1.00			1.00			
AA+GG	195 (56.2)	174 (49.3)	186 (52.8)	0.76 (0.56-1.02)	0.067 ^b	973	0.86 (0.64-1.16)	0.32	965.1	
AG	152 (43.8)	179 (50.7)	166 (47.2)							
Log-additive	-	-	-	1.00 (0.81-1.24)	0.99	976.3	0.96 (0.78-1.19)	0.73	966	
rs4705342	Codominant				1.00			1.00		
	TT	280 (80.9)	276 (78.2)	290 (82.6)	0.85 (0.58-1.24)	0.67	976.1	1.06 (0.71-1.57)	0.031 [*]	957.2
	TC	61 (17.6)	71 (20.1)	61 (17.4)				NA (0.00-NA)		
	CC	5 (1.4)	6 (1.7)	0 (0)	0.82 (0.25-2.72)					
	Dominant				1.00			1.00		
	TT	280 (80.9)	276 (78.2)	290 (82.6)	0.85 (0.58-1.22)	0.37	974.1	1.14 (0.77-1.68)	0.51	961.7
	TC+CC	66 (19.1)	77 (21.8)	61 (17.4)						
	Recessive				1.00			1.00		
	TT+TC	341 (98.5)	347 (98.3)	351 (100)	0.85 (0.26-2.80)	0.79	974.9	NA (0.00-NA)	0.0088 [*]	955.3
	CC	5 (1.4)	6 (1.7)	0 (0)						
Overdominant				1.00			1.00			
TT+CC	285 (82.4)	282 (79.9)	290 (82.6)	0.85 (0.58-1.24)	0.4	974.2	1.04 (0.70-1.54)	0.86	962.1	
TC	61 (17.6)	71 (20.1)	61 (17.4)							
Log-additive	-	-	-	0.86 (0.62-1.20)	0.38	974.2	1.23 (0.85-1.77)	0.28	960.9	

^a adjusted for age^b statistical trend of significance^{*} statistically significant results are shown in bold

Abbreviations: PCa- prostate cancer; BPH- benign prostatic hyperplasia; OR- odds ratio; CI- confidence interval; AIC- Akaike information criteria

Table 3: Association of rs1076064 with initial serum PSA scores

Genetic model	PSA<10 ng/ml (%)	10 ng/ml≤ PSA< 20 ng/ml (%)	PSA>20 ng/ml (%)	PSA>20 ng/ml vs PSA<10 ng/ml			PSA>20 ng/ml vs 10 ng/ml≤ PSA< 20 ng/ml			10 ng/ml≤ PSA< 20 ng/ml vs PSA<10 ng/ml		
				OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC
rs1076064												
Codominant												
AA	45 (45.9)	30 (30.6)	59 (39.9)	1.00			1.00			1.00		
AG	36 (36.7)	49 (50)	65 (43.9)	1.39 (0.78-2.47)	0.53	329	0.68 (0.38-1.21)	0.34	333.4	2.00 (1.06-3.76)	0.091	273.3
GG	17 (17.4)	19 (19.4)	24 (16.2)	1.15 (0.54-2.41)			0.64 (0.30-1.36)			1.68 (0.75-3.74)		
Dominant												
AA	45 (45.9)	30 (30.6)	59 (39.9)	1.00			1.00			1.00		
AG + GG	53 (54.1)	68 (69.4)	89 (60.1)	1.31 (0.78-2.22)	0.31	327.2	0.67 (0.39-1.15)	0.14	331.4	1.89 (1.05-3.41)	0.032*	271.4
Recessive												
AA + AG	81 (82.7)	79 (80.6)	124 (83.8)	1.00			1.00			1.00		
GG	17 (17.4)	19 (19.4)	24 (16.2)	0.98 (0.49-1.95)	0.95	328.3	0.80 (0.41-1.56)	0.52	333.2	1.16 (0.56-2.40)	0.69	275.9
Overdominant												
AA + GG	62 (63.3)	49 (50)	83 (56.1)	1.00			1.00			1.00		
AG	36 (36.7)	49 (50)	65 (43.9)	1.34 (0.79-2.28)	0.28	327.1	0.79 (0.47-1.32)	0.37	332.8	1.68 (0.95-2.99)	0.074 ^b	272.8
Log-additive												
-	-	-	-	1.13 (0.79-1.62)	0.51	327.8	0.78 (0.54-1.12)	0.18	331.8	1.39 (0.94-2.05)	0.1	273.3

^a adjusted for age

^b statistical trend of significance

^c statistically significant results are shown in bold

Abbreviations: OR- odds ratio; CI- confidence interval; AIC- Akaike information criteria

Table 4: Association of rs1076064 with Gleason score

Genetic model	GS<7 (%)	GS=7 (%)	GS>7 (%)	GS>7 vs GS<7			GS>7 vs GS=7			GS=7 vs GS<7		
				OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC
rs1076064												
Codominant												
AA	83 (40.7)	23 (29.5)	23 (44.2)	1.00			1.00			1.00		
AG	86 (42.2)	39 (50)	23 (44.2)	0.94 (0.48-1.82)	0.61	255.7	0.57 (0.26-1.24)	0.2	175.9	1.63 (0.90-2.96)	0.22	337
GG	35 (17.2)	16 (20.5)	6 (11.5)	0.62 (0.23-1.67)			0.42 (0.14-1.29)			1.65 (0.78-3.49)		
Dominant												
AA	83 (40.7)	23 (29.5)	23 (44.2)	1.00			1.00			1.00		
AG+GG	121 (59.3)	55 (70.5)	29 (55.8)	0.84 (0.45-1.58)	0.6	254.4	0.53 (0.25-1.11)	0.09 ^b	174.2	1.63 (0.93-2.86)	0.082 ^b	335
Recessive												
AA+AG	169 (82.8)	62 (79.5)	46 (88.5)	1.00			1.00			1.00		
GG	35 (17.2)	16 (20.5)	6 (11.5)	0.64 (0.25-1.63)	0.33	253.7	0.58 (0.21-1.62)	0.28	175.9	1.25 (0.64-2.41)	0.52	337.6
Overdominant												
AA+GG	118 (57.8)	39 (50)	29 (55.8)	1.00			1.00			1.00		
AG	86 (42.2)	39 (50)	23 (44.2)	1.06 (0.57-1.98)	0.86	254.6	0.73 (0.35-1.50)	0.39	176.3	1.37 (0.81-2.31)	0.24	336.6
Log-additive												
-	-	-	-	0.82 (0.53-1.29)	0.39	253.9	0.63 (0.37-1.07)	0.081 ^b	174	1.32 (0.92-1.89)	0.13	335.7

^aadjusted for age

^bstatistical trend of significance

Abbreviations: OR- odds ratio; CI- confidence interval; AIC- Akaike information criteria

By comparing genotype frequencies among subgroups of PCa patients with TNM T categories T1 and T2, rs4938723 minor allele C was found to be associated with the lower category ($P_{\text{dom}}=0.0046$; $\text{OR}=0.36$, 95 % CI 0.17-0.76) (Table 5). Beside the best-fitting dominant genetic model, statistical significance was obtained for association between rs4938723 and PCa T category for codominant, overdominant and log-additive models ($P_{\text{codom}}=0.015$, $P_{\text{overdom}}=0.011$, $P_{\text{log-additive}}=0.037$). Also, statistical trend of significance was reached for the association between rs4938723 and the disease stage in the comparisons of genotype frequencies between PCa patients with T3/4 and T1 T categories, as well as between patients with T3/4 and T2. As for other genetic variants tested, minor allele G of rs1076064 was found to associate with the lower primary PCa stage, when comparing genotype distributions among patients stratified into groups with T3/4 and T2 T categories ($P_{\text{rec}}=0.0083$, $\text{OR}=0.34$, 95 % CI 0.14-0.81) (Table 5). Also, the genetic variants tested were not shown to be associated with the presence of distant metastases among PCa patients (results not shown).

When patients were stratified according to the risk of cancer progression, rs1076064 minor allele G was found to be associated with higher PCa aggressiveness (Table 6). Statistical significance was reached for multiple genetic models of association in the comparison of genotype frequencies among PCa patients with high-risk and low-risk disease ($P_{\text{codom}}=0.017$, $P_{\text{dom}}=0.0068$, $P_{\text{overdom}}=0.011$, $P_{\text{log-additive}}=0.033$), as well as among patients with medium-risk and low-risk disease ($P_{\text{codom}}=0.0073$, $P_{\text{dom}}=0.0024$, $P_{\text{overdom}}=0.0073$, $P_{\text{log-additive}}=0.014$). The lowest AIK score in both comparisons was determined for dominant genetic model.

DISCUSSION

Regulatory activities of non-coding RNA molecules have been extensively studied in the last decade, including their involvement in molecular pathogenesis of human malignancies.

Therefore, evidence obtained through these studies has accumulated to support the role of dysregulation of microRNA-based mechanisms in various phases of malignant transformation and metastasis (Ryan et al., 2010). Among the most extensively studied miRNAs in the context of human carcinogenesis are the members of miR-34 family, microRNAs transcribed from miR-143/145 cluster, as well as miR-378. Data indicating the importance of these microRNAs in the onset and progression of malignancies were obtained in the analyses of expression of both microRNAs and their targets in neoplastic and paired normal cells. Also, numerous studies aimed to functionally analyze potentially oncogenic or tumor-suppressive microRNAs through monitoring the effects of their experimental silencing and/or the augmentation of their expression on malignant phenotypes (Di Leva et al., 2014). Since genetic variants were found to affect miRNA transcription efficiencies and/or miRNA processing, target selection and target silencing efficiency, microRNA genes have been recognized as candidates for genetic association studies on human cancer, including PCa (Hayes et al., 2014). Since tumor-suppressive roles for miR-34b/c, miR-143/145 and miR-378 have been previously demonstrated in PCa (Zhou et al., 2015; Chen et al., 2016b; Fang et al., 2017), we speculated that genetic variants with the potential effect on their expression and/or processing could play significant roles in PCa development and/or progression.

One of the most studied genetic variants with the potential effect on the expression of miR-34 family members is rs4938723. This variant locates upstream of the region encoding the shared common pri-microRNA for mature miR-34b and miR-34c and is predicted to influence their biogenesis by affecting the transcription rate of precursor microRNAs. According to *in silico* analysis, rs4938723 resides within a CpG island of *hsa-miR-34b/c* gene and potentially influences the binding of GATA transcription factors to the regulatory region (Xu et al.,

Table 5: Association of rs1076064 and rs4938723 with the TNM categories of localized PCa

Genetic model	T1 (%)	T2 (%)	T3/T4 (%)	T2 vs T1			T3/T4 vs T1			T3/T4 vs T2		
				OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC
rs4938723												
Codominant												
TT	11 (22.9)	75 (45.2)	30 (34.1)	1.00			1.00			1.00		
TC	30 (62.5)	69 (41.6)	42 (47.7)	0.34 (0.16-0.73)	0.015*	225.3	0.50 (0.21-1.15)	0.22	179.7	1.53 (0.86-2.70)	0.2	332.6
CC	7 (14.6)	22 (13.2)	16 (18.2)	0.46 (0.16-1.33)			0.82 (0.26-2.54)			1.82 (0.84-3.92)		
Dominant												
TT	11 (22.9)	75 (45.2)	30 (34.1)	1.00			1.00			1.00		
TC+CC	37 (77.1)	91 (54.8)	58 (65.9)	0.36 (0.17-0.76)	0.0046*	223.8	0.56 (0.25-1.25)	0.15	178.6	1.60 (0.93-2.73)	0.085 ^b	330.8
Recessive												
TT+TC	41 (85.4)	144 (86.8)	72 (81.8)	1.00	0.81	231.7	1.00	0.59	180.4	1.00	0.3	332.7
CC	7 (14.6)	22 (13.2)	16 (18.2)	0.89 (0.35-2.24)			1.30 (0.49-3.44)			1.45 (0.72-2.93)		
Overdominant												
TT+CC	18 (37.5)	97 (58.4)	46 (52.3)	1.00	0.011*	225.3	1.00	0.087 ^b	177.8	1.00	0.34	332.8
TC	30 (62.5)	69 (41.6)	42 (47.7)	0.43 (0.22-0.83)			0.53 (0.26-1.10)			1.29 (0.77-2.17)		
Log-additive												
-	-	-	-	0.61 (0.38-0.97)	0.037*	227.4	0.83 (0.49-1.41)	0.5	180.3	1.38 (0.96-1.99)	0.085 ^b	330.8
rs1076064												
Codominant												
AA	22 (44.9)	60 (36.4)	37 (42)	1.00			1.00			1.00		
AG	20 (40.8)	72 (43.6)	44 (50)	1.37 (0.68-2.77)	0.46	234.5	1.32 (0.62-2.80)	0.37	182.6	0.99 (0.57-1.72)	0.031*	327.9
GG	7 (14.3)	33 (20)	7 (8)	1.73 (0.67-4.50)			0.57 (0.17-1.86)			0.34 (0.14-0.85)		
Dominant												
AA	22 (44.9)	60 (36.4)	37 (42)	1.00	0.25	232.7	1.00	0.75	182.5	1.00	0.37	332.1
AG+GG	27 (55.1)	105 (63.6)	51 (58)	1.47 (0.77-2.81)			1.12 (0.55-2.28)			0.79 (0.46-1.33)		
Recessive												
AA+AG	42 (85.7)	132 (80)	81 (92)	1.00	0.38	233.2	1.00	0.22	181.1	1.00	0.0083*	325.9
GG	7 (14.3)	33 (20)	7 (8)	1.48 (0.61-3.59)			0.49 (0.16-1.52)			0.34 (0.14-0.81)		
Overdominant												
AA+GG	29 (59.2)	93 (56.4)	44 (50)	1.00	0.65	233.8	1.00	0.29	181.5	1.00	0.33	331.9
AG	20 (40.8)	72 (43.6)	44 (50)	1.16 (0.61-2.24)			1.47 (0.72-3.00)			1.29 (0.77-2.17)		
Log-additive												
-	-	-	-	1.33 (0.84-2.09)	0.21	232.5	0.91 (0.53-1.56)	0.74	182.5	0.69 (0.47-1.01)	0.052 ^b	329.1

^a adjusted for age

^b statistical trend of significance

*statistically significant results are shown in bold

Abbreviations: OR- odds ratio; CI- confidence interval; AIC- Akaike information criteria

Table 6: Association of rs1076064 with the risk of cancer progression

Genetic model	low-risk (%)	intermediate-risk (%)	high-risk (%)	intermediate vs low-risk			high vs low-risk			high vs intermediate-risk		
				OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC
rs1076064												
Codominant												
AA	15 (68.2)	37 (33.3)	76 (39)	1.00			1.00			1.00		
AG	4 (18.2)	53 (47.8)	87 (44.6)	5.44 (1.66-17.79)	0.0073*	117.5	4.52 (1.43-14.36)	0.017*	140.9	0.79 (0.47-1.34)	0.6	402.6
GG	3 (13.6)	21 (18.9)	32 (16.4)	2.85 (0.74-11.01)			2.21 (0.59-8.23)			0.75 (0.38-1.49)		
Dominant												
AA	15 (68.2)	37 (33.3)	76 (39)	1.00			1.00			1.00		
AG+GG	7 (31.8)	74 (66.7)	119 (61)	4.32 (1.62-11.56)	0.0024*	116.1	3.53 (1.36-9.14)	0.0068*	139.7	0.78 (0.48-1.28)	0.32	400.6
Recessive												
AA+AG	19 (86.4)	90 (81.1)	163 (83.6)	1.00	0.54	124.9	1.00	0.71	146.9	1.00	0.63	401.4
GG	3 (13.6)	21 (18.9)	32 (16.4)	1.48 (0.40-5.46)			1.27 (0.35-4.56)			0.86 (0.47-1.59)		
Overdominant												
AA+GG	18 (81.8)	58 (52.2)	108 (55.4)	1.00	0.0073*	118.1	1.00	0.011*	140.5	1.00	0.56	401.2
AG	4 (18.2)	53 (47.8)	87 (44.6)	4.15 (1.32-13.10)			3.75 (1.22-11.58)			0.87 (0.54-1.39)		
Log-additive												
-	-	-	-	2.39 (1.14-5.03)	0.014*	119.2	2.09 (1.02-4.29)	0.033*	142.5	0.86 (0.61-1.19)	0.35	400.7

^a adjusted for age

^{*} statistically significant results are shown in bold

Abbreviations: OR- odds ratio; CI- confidence interval; AIC- Akaike information criteria

2011). The regulatory importance of this genetic variant was further augmented by the luciferase reporter gene assay results from human embryonic kidney 293 cells (293T cell line), showing the increased luciferase activity of the vector with the rs4938723 T allele relative to the vector with C allele (Zhang et al., 2014).

To date, over 25 case-control studies investigated this genetic variant and its association with cancer risk and progression, yielding contrasting results. The vast majority of these studies were conducted in Asian populations, and the most recent meta-analysis suggests the association of rs4938723 with hepatocellular (HCC) and colorectal cancer, esophageal squamous cell carcinoma, as well as acute lymphoblastic leukemia (Hashemi et al., 2019). According to the scientific literature database search, only one study conducted in Iranian population analyzed the potential association between genetic variant rs4938723 and PCa (Hashemi et al., 2017). Therefore, we aimed to conduct a case-control study on the association between rs4938723 and risk of PCa onset and/or progression, which would provide the first data on this issue in a European population.

Hashemi et al. found that this genetic variant associates with the risk of PCa under several genetic models tested (Hashemi et al., 2017). In contrast to these results, we found no evidence to support the association of rs4938723 with PCa susceptibility. The observed discrepancy may be due to differences in ethnic backgrounds, which are possibly reflected by the allele frequencies substantially differing between Serbian and Iranian populations. Another explanation for the inconsistent findings may be due to previous study's relatively small sample size, with about two times smaller number of PCa patients and controls compared to ours (Hashemi et al., 2017). On the other hand, Hashemi et al. found no statistically significant association of rs4938723 with clinical characteristics of their PCa patients, which is concordant with our results showing no evidence of correlation between rs4938723

genotypes and initial serum PSA score and GS. Nevertheless, in the present study, allele C was found to associate with the lower risk of localized PCa progression to the higher T category. Even though the number of PCa patients stratified to single TNM-stage based categories was relatively small in the present study, the difference between our results and the previously obtained in Iranian population could be attributed to the discordant staging system, since Hashemi et al. used pathological instead of clinical tumor staging (Hashemi et al., 2017).

Genetic variant rs1076064 locates 222 bp upstream from the region encoding the stem-loop precursor of miR-378. Due to its position regarding the predicted transcription start site (TSS) of miR-378, this genetic variant was suggested to potentially alter the expression of mature miR-378 through affecting the transcriptional rate and/or its processing of pri-miR-378. In an attempt to test such relation, a study conducted by An et al. (2014) has shown that G allele of rs1076064 exerts higher promoter activity than allele A in the luciferase reporter gene assay in multiple hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines. Furthermore, the position of this genetic variant corresponds to the c-Myc-binding site predicted by Feng et al., who also identified c-Myc as a regulator of the transcriptional unit containing both miR-378 and its host gene *PPARGC1B* (Feng et al., 2011). Recently, another study provided evidence to support the regulatory features of the sequence located upstream of the region encoding the stem-loop precursor of miR-378, containing the rs1076064 locus, by identifying a potential intronic promoter of miR-378 within this region (Jiang et al., 2014).

The study by An et al. demonstrated the decreased risk of HCC, as well as better prognosis, associated with rs1076064 allele G (An et al., 2014). The same research group previously found the association of rs1076064 with Non-Small Cell Lung Cancer patient survival (Hu et al., 2011). Also, this genetic variant was found to be associated with the age of diagnosis among pancreat-

ic cancer patients (Chen et al., 2016a). To our knowledge, the association of this genetic variant with PCa risk and progression was not previously tested. Still, its potential functional significance related to miR-378 expression regulation justifies the inclusion of rs1076064 in the present study, since miR-378 was found to be deregulated in PCa. Namely, Avgeris et al. found that miR-378 level was reduced in PCa compared to benign gland lesions (Avgeris et al., 2014). The same study also demonstrated that the down-regulation of miR-378 correlated with high GS and higher serum PSA levels and the ability of miR-378 to predict survival outcomes of actively treated patients (Avgeris et al., 2014).

Our result did not support the association of rs1076064 with PCa risk. On the other hand, minor allele G was found to associate with higher PSA score, as determined by comparing genotype frequencies between PCa patients with intermediate and low initial serum PSA scores. When comparing genotype distributions among patients stratified into groups with T3/4 and T2 TNM categories, minor allele G associated with lower T category. The opposing direction of association with different prognostic parameters could be explained by the relatively small number of patients within some groups after stratification. Beside these statistically significant associations, statistical trend was reached in comparison of rs1076064 genotype distributions among patients with different GSs. When patients were stratified according to the risk of cancer progression, rs1076064 minor allele G was found to be associated with higher PCa aggressiveness in Serbian population. Nevertheless, these results need to be taken with caution due to the small number of PCa patients included in the group with low risk for disease progression. Since our study provide unique data on the relation between rs1076064 and PCa, our results could not be compared with any previously obtained in other populations.

Another genetic variant included in the present study is rs4705342, located upstream

of the region encoding miR-143. Similarly as for rs1076064, this genetic variant was proposed to alter the expression of miR-143 by affecting the transcriptional rate and/or processing of pri-miR-143/145, which also serves as a precursor of miR-145, another important cancer-related microRNA. Through luciferase reporter gene assays, the effect of allelic variants of rs1076064 on miR-143 expression was shown in both HCC and PCa cell lines (Chu et al., 2016; Yin et al., 2018). Also, the presence of C allele was found to increase the affinity of NF- κ B for its binding site (Yin et al., 2018).

Liang et al. demonstrated that rs4705342 is associated with the risk of cervical squamous cell carcinoma in Chinese women (Liang et al., 2015). Also, this genetic variant was found to associate with the breast cancer recurrence among patients from Iran (Ghanbarpanah et al., 2018). In contrast to these results, rs4705342 was not confirmed as colorectal cancer susceptibility variant in Chinese Han population (Li et al., 2013). As for the PCa study conducted by Chu et al. found that this potentially functional genetic variant contributes PCa susceptibility in Chinese population. In this previous study, the protective effect was attributed to allele C (Chu et al., 2016). Conversely, our results support the association of rs4705342 minor allele C with the increased risk of developing PCa, as shown in the comparison of genotype distribution between PCa and BPH patients. The lack of statistical significance in the comparison of PCa patients and healthy controls can be explained by the far better clinical characterization of BPH patients, making them supercontrols in this type of research. Among the reasons for the observed discordances in the results of the present and the previous study could be the difference in ethnic backgrounds of study populations, as well as unmatched subject recruitment procedure. Namely, in our study, the control group consisted of healthy male subjects, while for the study by Chu et al. control subjects were defined as cancer-free and were recruited while seeking health care. Further-

more, our results did not replicate the association of rs4705342 with standard prognostic parameters of PCa found by Chu et al. (2016). Still, in this previous study, subgrouping of patients based on clinicopathological characteristics differed from ours. Also statistical testing was not matching, since genotype distributions in PCa patients subgroups were compared to controls and not to each other (Chu et al., 2016).

Even though over 1000 participants were included in this study, its main limitation is a relatively small sample size. Also, stratification of PCa patients according to standard prognostic parameters of PCa progression yielded several small subgroups. Therefore, caution should be taken when interpreting the results obtained in comparisons involving these small subgroups of patients. The observed discrepancies in results of previous studies and our present study could be explained by differences in ethnic origins, as well as in the recruitment of participants and genotyping procedures. In order to elucidate the association of the tested genetic variants with PCa and to verify our findings, further case-control studies with larger sample sizes and in different ethnicities are needed.

Even though this study has severe limitations, our results identified rs4705342 as PCa susceptibility variant in Serbian population. At the same time, for genetic variants rs1076064 and rs4938723 association with PCa progression parameters was found.

Acknowledgments

We would like to thank the following persons for their contribution to the research: Dr Vinka Vukotic, MD PhD and Dr Natasa Filipovic, MD from the Department of Urology, Clinical Centre “dr Dragiša Mišović”, Belgrade, Serbia, Dr Snezana Cerovic, MD PhD from the Institute of Pathology, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia and last but not least to Dr Sasa Tomovic, MD from Clinical Department of Surgery, Clinical Center “Zvezdara,” Belgrade, Serbia. The research was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Develop-

ment of the Republic of Serbia (Project no. 173016).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- An J, Liu J, Liu L, Liu Y, Pan Y, Huang M, et al. A genetic variant in primary miR-378 is associated with risk and prognosis of hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *PLoS One*. 2014;9:e93707.
- Avgeris M, Stravodimos K, Scorilas A. Loss of miR-378 in prostate cancer, a common regulator of KLK2 and KLK4, correlates with aggressive disease phenotype and predicts the short-term relapse of the patients. *Biol Chem*. 2014;395:1095-104.
- Brankovic A, Brajuskovic G, Nikolic Z, Vukotic V, Cerovic S, Savic-Pavicevic D, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and prostate cancer risk in Serbian population. *Int J Exp Pathol*. 2013a;94:355-61.
- Brankovic AS, Brajuskovic GN, Mircetic JD, Nikolic ZZ, Kalaba PB, Vukotic VD, et al. Common variants at 8q24 are associated with prostate cancer risk in Serbian population. *Pathol Oncol Res*. 2013b;19:559-69.
- Chen J, Wu X, Huang Y, Chen W, Brand RE, Killary AM, et al. Identification of genetic variants predictive of early onset pancreatic cancer through a population science analysis of functional genomic datasets. *Oncotarget*. 2016a;7:56480-90.
- Chen QG, Zhou W, Han T, Du SQ, Li ZH, Zhang Z, et al. MiR-378 suppresses prostate cancer cell growth through downregulation of MAPK1 in vitro and in vivo. *Tumour Biol*. 2016b;37:2095-103.
- Chu H, Zhong D, Tang J, Li J, Xue Y, Tong N, et al. A functional variant in miR-143 promoter contributes to prostate cancer risk. *Arch Toxicol*. 2016;90:403-14.
- Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:287-314.
- Ding HX, Lv Z, Yuan Y, Xu Q. MiRNA polymorphisms and cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis. *Front Oncol*. 2018;8:596.
- Fang LL, Sun BF, Huang LR, Yuan HB, Zhang S, Chen J, et al. Potent inhibition of miR-34b on migration and invasion in metastatic prostate cancer cells by regulating the TGF-beta pathway. *Int J Mol Sci*. 2017;18(12):2762.

- Felekis K, Touvana E, Stefanou C, Deltas C. miRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. *Hippokratia*. 2010;14:236-40.
- Feng M, Li Z, Aau M, Wong CH, Yang X, Yu Q. Myc/miR-378/TOB2/cyclin D1 functional module regulates oncogenic transformation. *Oncogene*. 2011;30:2242-51.
- Ghanbarpanah E, Kohan L, Mohammadianpanah M, Tahmasebi S. Association between miR-143 rs4705342 polymorphism and risk of recurrence in breast cancer patients. In: 13th International Congress on Breast Cancer, Tehran, Iran, 14-16 February 2018. Tehran, 2018.
- Hashemi M, Danesh H, Bizhani F, Narouie B, Sotoudeh M, Nouralizadeh A, et al. Pri-miR-34b/c rs4938723 polymorphism increased the risk of prostate cancer. *Cancer Biomark*. 2017;18:155-9.
- Hashemi M, Moazeni-Roodi A, Bahari G, Taheri M, Ghavami S. Association between miR-34b/c rs4938723 polymorphism and risk of cancer: An updated meta-analysis of 27 case-control studies. *J Cell Biochem*. 2019;120:3306-14.
- Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med*. 2014;20:460-9.
- Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, van der Kwast T, et al. EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. *Eur Urol*. 2014;65:124-37.
- Hu Z, Shu Y, Chen Y, Chen J, Dong J, Liu Y, et al. Genetic polymorphisms in the precursor MicroRNA flanking region and non-small cell lung cancer survival. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183:641-8.
- Institute of Public Health of Serbia “Dr Milan Jovanović Batut”. Cancer incidence and mortality in Central Serbia. Cancer Registry of Central Serbia. Belgrade, 2014.
- Jiang X, Xue M, Fu Z, Ji C, Guo X, Zhu L, et al. Insight into the effects of adipose tissue inflammation factors on miR-378 expression and the underlying mechanism. *Cell Physiol Biochem*. 2014;33:1778-88.
- Kanwal R, Plaga AR, Liu X, Shukla GC, Gupta S. MicroRNAs in prostate cancer: Functional role as biomarkers. *Cancer Lett*. 2017;407:9-20.
- Li L, Pan X, Li Z, Bai P, Jin H, Wang T, et al. Association between polymorphisms in the promoter region of miR-143/145 and risk of colorectal cancer. *Hum Immunol*. 2013;74:993-7.
- Liang Y, Sun R, Li L, Yuan F, Liang W, Wang L, et al. A functional polymorphism in the promoter of miR-143/145 is associated with the risk of cervical squamous cell carcinoma in chinese women: a case-control study. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94:e1289.
- Loeb S, Bjurlin MA, Nicholson J, Tammela TL, Penson DF, Carter HB, et al. Overdiagnosis and overtreatment of prostate cancer. *Eur Urol*. 2014;65:1046-55.
- Nikolic ZZ, Brankovic AS, Savic-Pavicevic DL, Prekovic SM, Vukotic VD, Cerovic SJ, et al. Assessment of association between common variants at 17q12 and prostate cancer risk-evidence from Serbian population and meta-analysis. *Clin Transl Sci*. 2014a;7:307-13.
- Nikolic ZZ, Savic Pavicevic D, Vukotic VD, Tomovic SM, Cerovic SJ, Filipovic N, et al. Association between genetic variant in hsa-miR-146a gene and prostate cancer progression: evidence from Serbian population. *Cancer Causes Control*. 2014b;25:1571-5.
- Nikolic Z, Savic Pavicevic D, Vucic N, Cidilko S, Filipovic N, Cerovic S, et al. Assessment of association between genetic variants in microRNA genes hsa-miR-499, hsa-miR-196a2 and hsa-miR-27a and prostate cancer risk in Serbian population. *Exp Mol Pathol*. 2015;99:145-50.
- Nikolić Z, Savić-Pavićević D, Brajušković G. Genetic association studies on prostate cancer. In: Mohan R (ed): Prostate cancer. Leading-edge diagnostic procedures and treatments (pp 145-77). Rijeka: InTech, 2016.
- Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16:203-22.
- Ryan BM. MicroRNAs in cancer susceptibility. *Adv Cancer Res*. 2017;135:151-71.
- Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer*. 2010;10:389-402.
- Sima X, Sun H, Zhou P, You C, Cai B. Association between functional polymorphisms in the promoter of the miR-143/145 cluster and risk of intracranial aneurysm. *Sci Rep*. 2017;7:43633.
- Sole X, Guino E, Valls J, Iñiesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22:1928-9.

Szeliski K, Adamowicz J, Gastecka A, Drewa T, Pokrywczynska M. Modern urology perspectives on prostate cancer biomarkers. *Centr Eur J Urol.* 2018; 71:420-6.

Wei YS, Xiang Y, Liao PH, Wang JL, Peng YF. An rs4705342 T>C polymorphism in the promoter of miR-143/145 is associated with a decreased risk of ischemic stroke. *Sci Rep.* 2016;6:34620.

Xu B, Zhu Y, Tang Y, Zhang Z, Wen Q. Rs4938723 Polymorphism is associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma risk and is a protective factor in leukemia, colorectal, and esophageal cancer. *Med Sci Monit.* 2018;24:7057-71.

Xu Y, Liu L, Liu J, Zhang Y, Zhu J, Chen J, et al. A potentially functional polymorphism in the promoter region of miR-34b/c is associated with an increased risk for primary hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 2011;128:412-7.

Yin X, Sun S, Zhao J, Yang J, Lei X, Xu C, et al. Rs4705342 polymorphism is involved in the tumorigenesis of HBV positive HCC by altering the binding affinity of HBV induced NF- κ B with the promoter region of microRNA-143. *J Cell Biochem.* 2018;119: 5233-42.

Zhang S, Qian J, Cao Q, Li P, Wang M, Wang J, et al. A potentially functional polymorphism in the promoter region of miR-34b/c is associated with renal cell cancer risk in a Chinese population. *Mutagenesis.* 2014;29:149-54.

Zhou P, Chen WG, Li XW. MicroRNA-143 acts as a tumor suppressor by targeting hexokinase 2 in human prostate cancer. *Am J Cancer Res.* 2015;5:2056-63.



Association of *KLK3*, *VAMP8* and *MDM4* Genetic Variants within microRNA Binding Sites with Prostate Cancer: Evidence from Serbian Population

Nevena Kotarac¹ · Zorana Dobrijevic¹ · Suzana Matijasevic¹ · Dusanka Savic-Pavicevic¹ · Goran Brajuskovic¹

Received: 22 January 2020 / Accepted: 10 June 2020
© Arányi Lajos Foundation 2020

Abstract

A growing number of studies have suggested that genetic variants affecting the micro-RNA-binding mechanisms (miRSNPs) constitute a promising novel class of biomarkers for prostate cancer (PCa) biology. Among the most extensively studied miRSNPs in the context of cancer is the variation rs4245739 in the *MDM4* gene, while a recent large-scale analysis revealed significant differences in genotype distributions between aggressive and non-aggressive disease for rs1058205 in *KLK3* and rs1010 in *VAMP8*. In this study, we examined a total of 1083 subjects for these three variants using Taqman® SNP Genotyping Assays. Three hundred and fifty-five samples of peripheral blood were obtained from patients with PCa and 358 samples from patients with benign prostatic hyperplasia (BPH). The control group consisted of 370 healthy volunteers. Comparisons of genotype distributions among PCa and BPH patients, as well as between PCa patients and healthy controls, yielded no evidence of association between the analyzed genetic variants and the risk of developing PCa. However, all three tested genetic variants have shown the association with the parameters of PCa progression. For *KLK3* variant rs1058205, minor allele C was found to associate with the lower serum PSA score in PCa patients (PSA > 20 ng/ml vs. PSA < 10 ng/ml comparison, Prec = 0.038; ORrec = 0.20, 95%CI 0.04–1.05). The obtained results point out the potential relevance of the tested genetic variants for the disease aggressiveness assessment.

Keywords miRSNPs · rs1058205 · rs1010 · rs4245739 · Prostate cancer

Introduction

Prostate cancer (PCa), the second most frequent malignancy in men worldwide, accounted 1.276.106 new cases and caused 358.989 deaths (6.7% of all deaths caused by cancer in men) in 2018 [1]. The well-established risk factor for PCa, apart from age and ethnicity, is family-history of the disease [2]. Rarely occurring but high-penetrant genetic variants, as well as commonly occurring low-risk variants, both contribute to genetic basis of PCa. Genome wide association studies (GWASs) have been invaluable in the discovery of these common variants associated with PCa susceptibility. In the largest PCa GWAS to date and the meta-analysis reported recently

[3], 63 novel PCa susceptibility loci were identified, which raised the total number of known loci from GWAS to around 170 (GWAS Catalog) [4]. However, these commonly occurring low-risk variants can explain only about 28.4% of the familial relative risk for PCa, suggesting that additional SNPs remain to be identified [3]. Another approach to the identification of novel PCa risk loci is through candidate-gene based studies, with plausible candidates emerging from the research of the molecular pathogenesis of malignant diseases. Therefore, microRNA-based mechanisms have been recognized as a promising field of carcinogenesis research, including the case-control studies focusing on genetic variants affecting the RNA interference process [5].

MicroRNAs (miRNA) are a class of trans-acting RNAs that bind to cis-regulatory elements in their target mRNAs and negatively regulate their expression either through degrading/destabilizing the mRNA or by inhibiting their translation [6]. Target selection is critically dependent on the sequence complementarity between the miRNA nucleotides

✉ Goran Brajuskovic
brajuskovic@bio.bg.ac.rs

¹ Centre for Human Molecular Genetics, Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

2–8, referred to as the miRNA seed site, and the miRNA-binding elements usually found on the 3'UTR of the mRNA. Because of the uniqueness and complexity of the miRNA-target recognition, genetic variants play an important role in the regulation of expression of miRNA targets, as well as in all the other aspects of miRNA biogenesis and function. There are two scenarios by which miRNA-related genetic variants are implicated in cancer etiology: variants creating a loss-of function or gain-of-function event [7]. The first scenario refers to the inhibition of the expression or the functional activity of a tumor-suppressive miRNAs, while the latter one presumes the opposite effects on the activity of oncogenic miRNAs. By both of these mechanisms, genetic variants related to miRNA functions may have profound effects on cancerogenesis. Direct effects of genetic variants on microRNA function are based on the alterations in pri-miRNA and pre-miRNA processing, as well as in mature RNA activities. Furthermore, genetic variants in regulatory regions may affect miRNA transcription rates, while those located in mRNAs may create or destroy a miRNA-binding site. Among the most extensively studied genetic variants are those located in the seed region or seed-complementary site, which are predicted to elicit cancer phenotype by severely affecting the target selection [8, 9].

In our previous reports, we investigated the association between genetic variants potentially affecting the transcriptional rate and/or processing of miRNA precursors and PCa risk [10–12]. The obtained results, suggesting the association between the analyzed variants and the risk of PCa onset and/or progression, encouraged us to further examine the novel candidate genetic variants with the potential effect on RNA interference, among which are variants located within microRNA binding sites. The role of this class of microRNA-related variants has been previously evaluated for the genes of biologic relevance for PCa [13, 14]. The most extensive study on this type of genetic variants, a recent large-scale analysis of 2169 microRNA single nucleotide polymorphisms (miRSNPs) and PCa risk and aggressiveness on 22,301 cases and 22,320 controls of European ancestry, revealed 22 miRSNPs associated with the risk of PCa [15]. The most significant differences in genotype distributions between aggressive and non-aggressive disease was reported for rs1058205 in *KLK3* and rs1010 in *VAMP8*. These genetic variants have also been functionally analyzed, revealing that *KLK3* variant rs1058205 creates a putative binding site for miR-3162-5p, whereas miR-370-5p was found to have a greater affinity for the *VAMP8* rs1010 A-allele. The same research group also reported *MDM4* genetic variant rs4245739 to be associated with PCa risk by creating a new miRNA-binding site for multiple miRNAs [16]. By using the reporter gene assay, it was found that miR-191-5p and miR-887 have a specific affinity for the rs4245739 C-allele, suggesting a mechanism by which the untargeted major allele A could associate with the increased risk of PCa [16].

KLK3 gene encodes the prostate specific antigen (PSA), a member of kallikrein family of serine proteases which is widely used as biomarker for PCa screening and monitoring the disease progression [17]. Therefore, variants located within this gene have been recognized as candidates for case-control and case-only studies on PCa even before the reported associations in the study by Stegeman et al. [15]. Namely, the genetic variant rs1058205, a tag SNP in the 3'-UTR of *KLK3* at the 19q13.33-locus, was previously associated with lower serum levels of PSA in African-American and Swedish men [18, 19]. Furthermore, contrasting results have been reported regarding the impact of this genetic variant on PCa susceptibility, suggesting its protective effect against PCa in at least some populations [20, 21].

Another genetic variant showed to be strongly associated with aggressive PCa by Stegeman et al. [15], rs1010 located in *VAMP8*, has not been previously analyzed in other cancers or validated in subsequent replication studies. The functional significance of *VAMP8* in the molecular basis of PCa remains relatively poorly understood. Still, this protein was found to be expressed in prostatic glandular epithelium [22], while it was also determined that it plays a complex role in glucose metabolism and energy expenditure which makes it a potential candidate for carcinogenesis research [23].

As for the *MDM4*, this oncogene negatively regulates p53 and several other tumor suppressor genes in PCa and in the range of malignant tumors. Therefore, the genetic variant rs4245739 in *MDM4* has been associated with the risk of various human cancers, including ovarian, breast and small cell lung cancer, as well as esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) [24–27]. The meta-analysis by Xu et al. [28] indicated that the rs4245739 A > C genetic variant tend to reduce the overall cancer risk, with the more prominent association in Asian populations. Conversely, Gansmo et al. [29] reported rs4245739 genetic variant to be associated with the reduced risk of breast cancer but not to be associated with either lung, colon cancer or PCa.

Considering the functional significance of the miRSNPs as potential diagnostic and prognostic biomarkers of PCa, as well as the previous contrasting findings on the effects of rs1058205 and rs4245739 on PCa in different ethnic populations, the aim of the present study is to analyze their impact on PCa susceptibility and aggressiveness in Serbian population. Since the number of case-control studies on this issue is relatively limited, we consider that performing the association study in another population of European origin would contribute to the better understanding of the effect of these genetic variants on PCa risk and progression. Furthermore, since the effect of rs1010 located in *VAMP8* on PCa risk and aggressiveness was shown in a single study, additional case-control studies are needed in order to provide further data on this issue, validate the obtained results and to elucidate the effect of this genetic variant [15]. Therefore, rs1010 was also chosen

for the analysis in the present study, focusing on the effects of genetic variants located in microRNA-binding sites on prostate carcinogenesis.

Material and Methods

This study used DNA samples obtained from the collections of the Center for Human Molecular Genetics. The collection consisted of patients treated in the period between 2008 and 2013 at Clinical Centre “Dr Dragiša Mišović Dedinje”, Belgrade, Serbia and Clinical Centre “Zvezdara”, Belgrade, Serbia. Research was conducted with the approval of ethics committees of these medical institutions (18–5309/29 and 01–1907/17). Written informed consent was obtained from all participants included in this study. Experiments were conducted in accordance with the Helsinki Declaration of 1975.

In this study we examined a total of 1083 subjects. Three hundred and fifty-five samples of peripheral blood were obtained from patients with PCa and 358 samples from patients with benign prostatic hyperplasia (BPH). The control group consisted of 370 healthy volunteers who gave samples of either buccal swabs or peripheral blood. The exclusion criteria for potential controls were the presence of any self-reported diseases and family history of PCa. After passing standard clinical examination, which includes measurement of prostate-specific antigen (PSA), digital rectal examination (DRE), transrectal ultrasonography (TRUS), bone scintigraphy and radiography and prostate biopsy patients were separated into 2 groups as BPH or PCa patients. TNM classification system was used to determine clinical stage of tumor, while hematoxylin and eosin-stained slides of paraffin-embedded prostate biopsy material were used to determine histological type of cancer and Gleason score (GS).

Patients with PCa were selected into groups based on the values of standard prognostic parameters: PSA at diagnosis (PSA < 10 ng/ml; 10 ng/ml ≤ PSA ≤ 20 ng/ml; PSA > 20 ng/ml), Gleason score (GS < 7; GS = 7; GS > 7) and clinical stage (T1; T2; T3/T4). Two groups of patients were formed based on the presence of distant metastases. According to criteria recommended by European Association of Urology (EAU), PCa patients were divided into three groups. PCa patients with PSA < 10 ng/ml, GS < 7, and clinical stage T1–T2a comprised low-risk group, while intermediate risk-group consisted of PCa patients with PSA 10–20 ng/ml or GS = 7 or clinical stage T2b–T2c. High-risk group of PCa patients was defined by PSA > 20 ng/ml or GS > 7 or clinical stage T3/T4. Patients with the presence of distant metastasis were automatically classified into high-risk group [30].

Genotyping of rs1010, rs1058205 and rs4245739 was performed by using Taqman® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Statistical analysis

of SNPs associations was performed by SNPStats software [31]. Hardy–Weinberg equilibrium was assessed by the exact test implemented in SNPStats software. Allelic and genotypic associations were evaluated by unconditional logistic regression method with adjustment for age. Separate comparisons were done for five different genetic models: allelic (log-additive), codominant, dominant, recessive and overdominant. Odds ratio (OR) and its 95% confidence intervals (95% CI) were used as risk estimates. The best-fitting models were determined by using Akaike information criterion (AIC).

Results

The available clinical and pathological data on PCa patients are shown in Table 1. According to the patient classification, most of the men diagnosed with PCa had initial serum PSA score higher than 20 ng/ml (42.9%), Gleason score 6 (53.8%) or 7 (24%), as well as T2 clinical stage of primary PCa (55%). Distant metastases were detected at diagnosis in about 16% of PCa patients included in the study.

Table 1 Classification of patients with PCa based on the values of standard prognostic parameters of disease progression, presence of distant metastases and the risk of cancer progression

Standard prognostic parameter	PCa patients; n (%)
PSA at diagnosis	
< 10 ng/ml	100 (28.4)
10–20 ng/ml	101 (28.7)
> 20 ng/ml	151 (42.9)
Gleason score	
4	7 (2)
5	16 (4.7)
6	184 (53.8)
7	82 (24)
8	31 (9.1)
9	19 (5.5)
10	3 (0.9)
TNM stage	
T1	49 (15.9)
T2	170 (55)
T3/T4	90 (29.1)
Metastases	
Distant (M+)	51 (15.8)
Regional (N+) or not detected	271 (84.2)
Risk of progression (EAU 2014)	
Low	22 (6.6)
Medium	115 (34.3)
High	198 (59.1)

Abbreviations: PSA prostate-specific antigen

Genotyping was successful in more than 98% of samples for all three genetic variants tested. The acquired genotyping data are presented in Table 2, suggesting the lack of deviations from HWE in the control group ($P = 0.09$, $P = 0.52$ and $P = 0.8$, for rs1058205, rs1010 and rs4245739, respectively). For all genetic variants included in this study, C allele was found to be minor allele in Serbian population. Comparisons of genotype distributions among PCa and BPH patients, as well as between PCa patients and healthy controls, yielded no evidence of association between the analyzed genetic variants and the risk of developing PCa (Table 2).

When analyzing the potential association of rs1010 with the initial PSA score among PCa patients, the obtained results were found to be statistically insignificant. However, the association of minor allele C of rs1058205 with the lower PSA score was determined by comparing genotype distributions between PCa patients with PSA > 20 ng/ml and PSA < 10 ng/ml ($P_{\text{rec}} = 0.038$; $\text{OR}_{\text{rec}} = 0.20$, 95%CI 0.04–1.05) (Table 3). In contrast with these results, minor allele C of rs4245739 was found to associate with higher initial serum PSA scores in PSA 10–20 ng/ml vs PSA < 10 ng/ml comparison, with the lowest AIC found for both dominant and log-additive model ($P = 0.026$ for both models). At the same time, statistical trend of significance was found for association of rs4245739 with serum PSA score under log-additive and dominant genetic models when genotype distributions among patients with PSA > 20 ng/ml and PSA < 10 ng/ml were compared ($P_{\text{log-additive}} = 0.052$, $\text{OR}_{\text{log-additive}} = 1.54$, 95%CI 0.99–2.39; $P_{\text{dom}} = 0.078$; $\text{OR}_{\text{dom}} = 1.61$, 95%CI 0.94–2.75) (Table 3).

By comparing genotype frequencies among PCa patients with $\text{GS} = 7$ and $\text{GS} < 7$, rs1010 minor allele C was shown to be associated with higher GS, with statistical significance being reached for recessive and log-additive genetic models ($P_{\text{rec}} = 0.036$ and $P_{\text{log-additive}} = 0.024$). Similarly, comparisons of rs4245739 genotype distributions among PCa patients with $\text{GS} > 7$ and patients within both lower GS score categories demonstrated the association of minor allele C with higher GS. The statistical significance was found for multiple genetic models tested, while the lowest AIC in both comparisons was shown for dominant model (Table 4).

The comparisons of rs1058205 genotype frequencies among PCa patients with T2 and T1 clinical stages, as well as with T3/4 and T1 stages, demonstrated the protective effect of minor allele C against primary PCa progression to higher TNM stage. In both tests, statistical significance of association was shown for multiple genetic models, while the lowest AIC score suggested the over-dominant being the best-fitting one (Table 5). When analyzing the association of rs1010 with TNM clinical stage of primary PCa, statistically significant results were obtained for multiple genetic models in the comparison of genotype distributions among patients with T3/4 and T2 stages. Nevertheless, the opposite direction of the

effect of heterozygous and CC homozygous genotype was determined, while the recessive model was found to be the best-fitting one, according to AIC score ($P_{\text{rec}} = 0.017$; $\text{OR}_{\text{rec}} = 2.08$, 95%CI 1.14–3.81). At the same time, C allele of rs4245739 associated with higher TNM clinical stage of primary PCa under recessive genetic model, as determined in T3/4 vs. T1 comparison ($P_{\text{rec}} = 0.033$; $\text{OR}_{\text{rec}} = 6.28$, 95%CI 0.77–50.85). Statistical significance was also reached for the association under codominant model, with the slightly higher AIC score ($P_{\text{codom}} = 0.044$) (Table 5).

Contrary to these results, the genetic variants tested in this study were not found to be associated with the presence of distant PCa metastases (results not shown). Also, tests of association with the risk of PCa progression yielded no statistical significance. Nevertheless, statistical trend was obtained for the association of rs4245739 minor allele C with higher PCa aggressiveness, as determined in both high-risk vs. low-risk, as well as in intermediate-risk vs. low-risk disease comparisons. The lowest AIC in these tests was determined for log-additive genetic model (Table 6).

Discussion

Single nucleotide variants (SNVs) are the most common source of variation within the human genome, with approximately 10 million identified so far, occurring every several hundred base pairs (every 100–300 nucleotides) [32]. Taking into account these results from the genomic sequencing project, researchers in the area of cancer genetics have focused on this type of genetic variants in their pursuit for the sources of heritability of malignant diseases. The vast majority of cancer-associated loci originated from genome-wide approach in the case-control study design, which was enabled by the technological improvements allowing the high-throughput SNV analyses. Even though the association of functional SNVs in gene coding regions with cancer is well known, it accounts for only a very small proportion of SNVs identified by GWAS. Namely, estimations are that 93% of functional SNPs in the GWAS catalogue are in the non-coding regions, having significant effects on gene expression by disrupting transcription regulatory sites or by affecting posttranscriptional events, including the binding of miRNAs [33].

MiRNAs are small non-coding RNAs (21–23 nt long) that negatively regulate protein expression, either by inhibiting the translation of the subsequent mRNA, or by inducing the transcript destabilization. Since regulation by miRNAs is dependent on base-pair complementarity, any slight change in the miRNA-binding site in the 3'-UTR of a mRNA can have profound downstream effects [34]. Not only that the genetic variant, even a small one as a SNV, could significantly reduce the binding affinity, but could also completely destroy the

Table 2 Association of genetic variants within genes *KLK3*, *VAMP8* and *MDM4* with PCa risk

SNP	Genetic model	No of PCa patients (%)	No of controls (%)	No of BPH patients (%)	PCa vs controls			PCa vs BPH		
					OR (95% CI) [†]	P value [†]	AIC	OR (95% CI) [†]	P value [†]	AIC
rs1058205										
Codominant										
	TT	249 (70.3)	262 (70.8)	265 (74.2)	1.00	0.6	1008	1.00	0.61	982.6
	CT	95 (26.8)	93 (25.1)	81 (22.7)	1.07			1.19		
	CC	10 (2.8)	15 (4)	11 (3.1)	0.69			1.00		
					(0.76–1.49)			(0.84–1.68)		
					(0.30–1.57)			(0.42–2.42)		
Dominant										
	TT	249 (70.3)	262 (70.8)	265 (74.2)	1.00	0.92	1007	1.00	0.36	980.8
	CT + CC	105 (29.7)	108 (29.2)	92 (25.8)	1.02			1.17		
					(0.74–1.40)			(0.84–1.63)		
Recessive										
	TT + CT	344 (97.2)	355 (96)	346 (96.9)	1.00	0.35	1006.2	1.00	0.93	981.6
	CC	10 (2.8)	15 (4)	11 (3.1)	0.68			0.96		
					(0.30–1.54)			(0.40–2.31)		
Overdominant										
	TT + CC	259 (73.2)	277 (74.9)	276 (77.3)	1.00	0.63	1006.8	1.00	0.32	980.6
	CT	95 (26.8)	93 (25.1)	81 (22.7)	1.09			1.19		
					(0.78–1.52)			(0.84–1.68)		
Log-additive										
	–	–	–	–	0.97	0.81	1007	1.12	0.44	981
					(0.74–1.27)			(0.84–1.49)		
rs1010										
Codominant										
	TT	124 (34.9)	119 (32.7)	118 (33.1)	1.00	0.34	1000.3	1.00	0.14	979.8
	CT	161 (45.4)	184 (50.5)	184 (51.7)	0.84			0.83		
	CC	70 (19.7)	61 (16.8)	54 (15.2)	1.11			1.25		
					(0.61–1.17)			(0.60–1.16)		
					(0.72–1.70)			(0.81–1.95)		
Dominant										
	TT	124 (34.9)	119 (32.7)	118 (33.1)	1.00	0.54	1000.1	1.00	0.64	981.5
	CT + CC	231 (65.1)	245 (67.3)	238 (66.8)	0.91			0.93		
					(0.67–1.24)			(0.68–1.27)		
Recessive										
	TT + CT	285 (80.3)	303 (83.2)	302 (84.8)	1.00	0.30	999.4	1.00	0.095 [‡]	979
	CC	70 (19.7)	61 (16.8)	54 (15.2)	1.22			1.40		
					(0.84–1.79)			(0.94–2.07)		
Overdominant										
	TT + CC	194 (54.6)	180 (49.5)	172 (48.3)	1.00	0.17	998.6	1.00	0.088 [‡]	978.8
	CT	161 (45.4)	184 (50.5)	184 (51.7)	0.81			0.77		
					(0.61–1.09)			(0.57–1.04)		
Log-additive										
	–	–	–	–	1.02	0.87	1000.4	1.07	0.55	981.4
					(0.83–1.25)			(0.86–1.32)		
rs4245739										
Codominant										
	AA	198 (56.2)	182 (51)	204 (57.3)	1.00			1.00		
	AC	131 (37.2)	144 (40.3)	122 (34.3)	0.84	0.32	987.2	1.10	0.53	978.1
	CC	23 (6.5)	31 (8.7)	30 (8.4)	0.69			0.79		
					(0.62–1.15)			(0.80–1.51)		
					(0.39–1.22)			(0.44–1.41)		
Dominant										
	AA	198 (56.2)	182 (51)	204 (57.3)	1.00	0.18	985.6	1.00	0.79	977.3
	AC + CC	154 (43.8)	175 (49)	152 (42.7)	0.82			1.04		
					(0.61–1.10)			(0.77–1.40)		
Recessive										
	AA+AC	329 (93.5)	326 (91.3)	326 (91.6)	1.00	0.28	986.3	1.00	0.34	976.5
	CC	23 (6.5)	31 (8.7)	30 (8.4)	0.74			0.76		
					(0.42–1.29)			(0.43–1.34)		
Overdominant										
	AA+CC	221 (62.8)	213 (59.7)	234 (65.7)	1.00	0.43	986.8	1.00	0.43	976.7
	AC	131 (37.2)	144 (40.3)	122 (34.3)	0.89			1.13		
					(0.65–1.20)			(0.83–1.54)		
Log-additive										
	–	–	–	–	0.84	0.13	985.2	0.98	0.85	977.3
					(0.66–1.06)			(0.77–1.24)		

Abbreviations: PCa prostate cancer, BPH benign prostatic hyperplasia, OR odds ratio, CI confidence interval, AIC Akaike information criteria

[†] adjusted for age

[‡] statistical trend of significance

Table 3 Association of rs1058205 and rs4245739 with the initial serum PSA scores

	Genetic model		PSA < 10 ng/ml (%)		10 ng/ml ≤ PSA < 20 ng/ml (%)		PSA > 20 ng/ml (%)		PSA > 20 ng/ml vs 10 ng/ml ≤ PSA < 20 ng/ml		10 ng/ml ≤ PSA < 20 ng/ml vs PSA < 10 ng/ml			
	n	n (%)	n	n (%)	n	n (%)	n	n (%)	OR (95% CI) [†]	P value [†]	AIC	OR (95% CI) [†]	P value [†]	AIC
rs1058205														
Codominant														
TT	68 (68)	68 (67.3)	111 (74)	111 (74)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
CT	26 (26)	31 (30.7)	37 (24.7)	37 (24.7)	0.79 (0.43–1.45)	0.088 [‡]	0.79 (0.43–1.24)	0.70 (0.39–1.24)	0.43	340.3	1.17 (0.63–2.18)	0.28	340.3	282.3
CC	6 (6)	2 (2)	2 (1.3)	2 (1.3)	0.19 (0.04–0.99)		0.60 (0.08–4.39)	0.60 (0.08–4.39)			0.32 (0.06–1.66)			
Dominant														
TT	68 (68)	68 (67.3)	111 (74)	111 (74)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
CT + CC	32 (32)	33 (32.7)	39 (26)	39 (26)	0.68 (0.38–1.20)	0.18	0.69 (0.40–1.21)	0.69 (0.40–1.21)	0.2	338.4	1.01 (0.56–1.83)	0.98	338.4	282.9
Recessive														
TT + CT	94 (94)	99 (98)	148 (98.7)	148 (98.7)	1.00	0.038*	1.00	1.00	0.68	339.8	1.00	0.13	339.8	280.6
CC	6 (6)	2 (2)	2 (1.3)	2 (1.3)	0.20 (0.04–1.05)		0.66 (0.09–4.82)	0.66 (0.09–4.82)			0.31 (0.06–1.57)			
Overdominant														
TT + CC	74 (74)	70 (69.3)	113 (75.3)	113 (75.3)	1.00	0.6	1.00	1.00	0.23	338.6	1.00	0.5	338.6	282.5
CT	26 (26)	31 (30.7)	37 (24.7)	37 (24.7)	0.85 (0.47–1.55)		0.71 (0.40–1.25)	0.71 (0.40–1.25)			1.24 (0.67–2.30)			
Log-additive	–	–	–	–	0.64 (0.39–1.04)	0.069 [‡]	0.71 (0.43–1.19)	0.71 (0.43–1.19)	0.2	338.4	0.88 (0.53–1.45)	0.62	338.4	282.7
rs4245739														
Codominant														
AA	65 (65)	50 (50)	82 (55)	82 (55)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
AC	31 (31)	43 (43)	55 (36.9)	55 (36.9)	1.50 (0.85–2.62)	0.15	1.01 (0.37–2.74)	0.79 (0.46–1.35)	0.67	339.4	1.84 (1.01–3.34)	0.076 [‡]	339.4	278
CC	4 (4)	7 (7)	12 (8.1)	12 (8.1)	2.52 (0.76–8.40)		1.01 (0.37–2.74)	1.01 (0.37–2.74)			2.45 (0.67–8.96)			
Dominant														
AA	65 (65)	50 (50)	82 (55)	82 (55)	1.00	0.078 [‡]	1.00	1.00	0.45	337.6	1.00	0.026*	337.6	276.2
AC + CC	35 (35)	50 (50)	67 (45)	67 (45)	1.61 (0.94–2.75)		0.82 (0.49–1.37)	0.82 (0.49–1.37)			1.91 (1.08–3.38)			
Recessive														
AA + AC	96 (96)	93 (93)	137 (92)	137 (92)	1.00	0.18	1.00	1.00	0.83	338.2	1.00	0.3	338.2	280.1
CC	4 (4)	7 (7)	12 (8.1)	12 (8.1)	2.17 (0.66–7.11)		1.11 (0.42–2.95)	1.11 (0.42–2.95)			1.93 (0.54–6.87)			
Overdominant														
AA + CC	69 (69)	57 (57)	94 (63.1)	94 (63.1)	1.00	0.25	1.00	1.00	0.37	337.4	1.00	0.073 [‡]	337.4	277.9
AC	31 (31)	43 (43)	55 (36.9)	55 (36.9)	1.38 (0.79–2.39)		0.79 (0.47–1.33)	0.79 (0.47–1.33)			1.70 (0.95–3.05)			
Log-additive	–	–	–	–	1.54 (0.99–2.39)	0.052 [‡]	0.90 (0.60–1.35)	0.90 (0.60–1.35)	0.61	338	1.71 (1.06–2.77)	0.026*	338	276.2

Abbreviations: OR odds ratio, CI confidence interval, AIC Akaike information criteria

[†] adjusted for age

[‡] statistical trend of significance

* statistically significant results are shown in bold

Table 4 Association of rs1010 and rs4245739 with Gleason score

Genetic model	GS < 7 (%)	GS = 7 (%)	GS > 7 (%)	GS > 7 vs GS < 7			GS > 7 vs GS = 7			GS = 7 vs GS < 7		
				OR (95% CI) [†]	P value [†]	AIC	OR (95% CI) [†]	P value [†]	AIC	OR (95% CI) [†]	P value [†]	AIC
rs1010												
Codominant												
TT	77 (37.2)	22 (26.8)	18 (34)	1.00			1.00			1.00		
CT	93 (44.9)	36 (43.9)	26 (49.1)	1.14 (0.57–2.27)	0.93	259.9	0.86 (0.38–1.94)	0.28	181	1.34 (0.73–2.48)	0.071 [‡]	347.2
CC	37 (17.9)	24 (29.3)	9 (17)	1.03 (0.41–2.55)			0.46 (0.17–1.26)			2.26 (1.12–4.55)		
Dominant												
TT	77 (37.2)	22 (26.8)	18 (34)	1.00	0.76	258	1.00	0.36	180.7	1.00	0.095 [‡]	347.7
CT+CC	130 (62.8)	60 (73.2)	35 (66)	1.11 (0.58–2.12)			0.70 (0.33–1.50)			1.61 (0.91–2.82)		
Recessive												
TT+CT	170 (82.1)	58 (70.7)	44 (83)	1.00	0.91	258.1	1.00	0.12	179.1	1.00	0.036*	346.1
CC	37 (17.9)	24 (29.3)	9 (17)	0.95 (0.42–2.16)			0.51 (0.21–1.21)			1.91 (1.05–3.45)		
Overdominant												
TT+CC	114 (55.1)	46 (56.1)	27 (50.9)	1.00	0.7	257.9	1.00	0.63	181.3	1.00	0.85	350.4
CT	93 (44.9)	36 (43.9)	26 (49.1)	1.13 (0.61–2.09)			1.19 (0.59–2.41)			0.95 (0.57–1.59)		
Log-additive												
–	–	–	–	1.03 (0.67–1.60)	0.88	258.1	0.69 (0.43–1.13)	0.14	179.4	1.50 (1.05–2.13)	0.024*	345.4
rs4245739												
Codominant												
AA	125 (60.7)	44 (54.3)	19 (36.5)	1.00			1.00			1.00		
AC	68 (33)	31 (38.3)	29 (55.8)	3.15 (1.61–6.17)	0.0028*	246.8	2.29 (1.07–4.87)	0.091 [‡]	177.5	1.31 (0.76–2.26)	0.6	348
CC	13 (6.3)	6 (7.4)	4 (7.7)	1.96 (0.57–6.80)			1.83 (0.44–7.54)			1.31 (0.47–3.65)		
Dominant												
AA	125 (60.7)	44 (54.3)	19 (36.5)	1.00	8e-04*	245.4	1.00	0.03*	175.6	1.00	0.31	346
AC+CC	82 (39.3)	37 (45.7)	33 (63.5)	2.94 (1.54–5.61)			2.22 (1.07–4.62)			1.31 (0.78–2.20)		
Recessive												
AA+AC	193 (93.7)	75 (92.6)	48 (92.3)	1.00	0.82	256.5	1.00	0.81	180.2	1.00	0.75	347
CC	13 (6.3)	6 (7.4)	4 (7.7)	1.15 (0.35–3.75)			1.18 (0.31–4.55)			1.18 (0.43–3.22)		
Overdominant												
AA+CC	138 (67)	50 (61.7)	23 (44.2)	1.00	0.0011*	245.8	1.00	0.043*	176.1	1.00	0.38	346.3
AC	68 (33)	31 (38.3)	29 (55.8)	2.88 (1.52–5.48)			2.09 (1.02–4.30)			1.27 (0.74–2.17)		
Log-additive												
–	–	–	–	1.93 (1.20–3.13)	0.0071*	249.3	1.71 (0.96–3.06)	0.066 [‡]	176.9	1.21 (0.81–1.83)	0.35	346.2

Abbreviations: OR odds ratio, CI confidence interval, AIC Akaike information criteria

[†] adjusted for age

[‡] statistical trend of significance

* statistically significant results are shown in bold

microRNA-binding site or create a new one [34]. Furthermore, since the first large-scale analysis focused on the potential cancer associated SNVs in miRNA-binding sites by Yu et al. [35], many genetic variants of this type were found to associate with various human malignancies.

Among the most extensively studied miRSNPs in the context of cancer is the variation rs4245739 in the 3'UTR of the *MDM4* gene [33]. At the same time, sequence alteration in the *KLK3* gene has been recognised as a candidate for genetic association studies regarding PCa, due the functional significance of PSA expressed from *KLK3* gene. Namely, besides being the serum biomarker of PCa, PSA is involved in the

proteolytic breakdown of the extracellular matrix in PCa tumorigenesis, which contributes to tumour invasion and metastasis [17]. Both of these genetic variants were among the major hits of a recent large-scale study on genetic variants located within microRNA-binding sites potentially associated with PCa. The mentioned study, performed by Stegeman et al. [15], also identified a novel PCa-susceptibility locus within the *VAMP8* gene. More importantly, all three genetic variants have been functionally characterized, providing potential mechanism of action and the evidence that miRSNPs could play significant roles in PCa development and progression [15, 16]. Having all this in mind, as well as the importance

Table 5 Association of rs1058205, rs1010 and rs4245739 with the clinical stage of localized PCa

Genetic model	T1 (%)	T2 (%)	T3/T4(%)	T2 vs T1			T3/T4 vs T1			T3/T4 vs T2		
				OR (95% CI) †	P value †	AIC	OR (95% CI) †	P value †	AIC	OR (95% CI) †	P value †	AIC
rs1058205												
Codominant												
TT	25 (51)	128 (75.7)	64 (71.1)	1.00			1.00			1.00		
TC	23 (46.9)	37 (21.9)	22 (24.4)	0.33 (0.17–0.66)	0.0069*	227.6	0.36 (0.17–0.78)	0.022*	178.8	1.19 (0.65–2.19)	0.57	341.4
CC	1 (2)	4 (2.4)	4 (4.4)	0.83 (0.09–7.73)			1.67 (0.18–15.83)			2.00 (0.48–8.28)		
Dominant												
TT	25 (51)	128 (75.7)	64 (71.1)	1.00	0.0024*	226.3	1.00	0.018*	178.9	1.00	0.42	339.9
TC+CC	24 (49)	41 (24.3)	26 (28.9)	0.35 (0.18–0.69)			0.42 (0.20–0.87)			1.27 (0.71–2.26)		
Recessive												
TT+TC	48 (98)	165 (97.6)	86 (95.6)	1.00	0.86	235.5	1.00	0.41	183.8	1.00	0.37	339.8
CC	1 (2)	4 (2.4)	4 (4.4)	1.22 (0.13–11.25)			2.40 (0.26–22.22)			1.92 (0.47–7.86)		
Overdominant												
TT+CC	26 (53.1)	132 (78.1)	68 (75.6)	1.00	0.0016*	225.6	1.00	0.0064*	177	1.00	0.64	340.3
TC	23 (46.9)	37 (21.9)	22 (24.4)	0.33 (0.17–0.66)			0.36 (0.17–0.75)			1.15 (0.63–2.12)		
Log-additive	–	–	–	0.45 (0.25–0.81)	0.0086*	228.7	0.57 (0.31–1.07)	0.08‡	181.4	1.28 (0.79–2.08)	0.32	339.6
rs1010												
Codominant												
TT	16 (32.6)	58 (34.1)	31 (34.4)	1.00			1.00			1.00		
CT	24 (49)	83 (48.8)	32 (35.6)	1.00 (0.49–2.06)	0.97	238	0.71 (0.31–1.58)	0.23	183.5	0.72 (0.40–1.31)	0.033*	336.6
CC	9 (18.4)	29 (17.1)	27 (30)	0.91 (0.36–2.32)			1.56 (0.59–4.13)			1.74 (0.88–3.45)		
Dominant												
TT	16 (32.6)	58 (34.1)	31 (34.4)	1.00	0.95	236.1	1.00	0.87	184.4	1.00	0.96	341.4
CT+CC	33 (67.3)	112 (65.9)	59 (65.6)	0.98 (0.49–1.93)			0.94 (0.45–1.98)			0.99 (0.58–1.69)		
Recessive												
TT+CT	40 (81.6)	141 (82.9)	63 (70)	1.00	0.82	236	1.00	0.13	182.2	1.00	0.017*	335.8
CC	9 (18.4)	29 (17.1)	27 (30)	0.91 (0.40–2.09)			1.90 (0.80–4.47)			2.08 (1.14–3.81)		
Overdominant												
TT+CC	25 (51)	87 (51.2)	58 (64.4)	1.00	0.91	236.1	1.00	0.14	182.3	1.00	0.039*	337.2
CT	24 (49)	83 (48.8)	32 (35.6)	1.04 (0.55–1.97)			0.59 (0.29–1.20)			0.58 (0.34–0.98)		
Log-additive	–	–	–	0.96 (0.61–1.52)	0.86	236	1.19 (0.75–1.88)	0.46	183.9	1.26 (0.89–1.79)	0.19	339.7
rs4245739												
Codominant												
AA	25 (51)	99 (58.9)	51 (56.7)	1.00			1.00			1.00		
AC	23 (46.9)	58 (34.5)	29 (32.2)	0.61 (0.32–1.19)	0.14	233.3	0.62 (0.30–1.28)	0.044*	180.2	0.97 (0.55–1.70)	0.45	340.1
CC	1 (2)	11 (6.5)	10 (11.1)	2.78 (0.34–22.72)			5.12 (0.62–42.48)			1.77 (0.70–4.43)		
Dominant												
AA	25 (51)	99 (58.9)	51 (56.7)	1.00	0.28	234.1	1.00	0.53	184.1	1.00	0.73	339.6
AC+CC	24 (49)	69 (41.1)	39 (43.3)	0.70 (0.37–1.34)			0.80 (0.40–1.62)			1.10 (0.65–1.84)		
Recessive												
AA+AC	48 (98)	157 (93.5)	80 (88.9)	1.00	0.18	233.4	1.00	0.033*	179.9	1.00	0.21	338.1
CC	1 (2)	11 (6.5)	10 (11.1)									

Table 5 (continued)

Genetic model	T1 (%)	T2 (%)	T3/T4(%)	T2 vs T1			T3/T4 vs T1			T3/T4 vs T2		
				OR (95% CI) †	P value †	AIC	OR (95% CI) †	P value †	AIC	OR (95% CI) †	P value †	AIC
				3.41 (0.43–27.27)			6.28 (0.77–50.85)			1.78 (0.73–4.38)		
Overdominant AA+CC	26 (53.1)	110 (65.5)	61 (67.8)	1.00	0.096‡	232.5	1.00	0.086‡	181.5	1.00	0.71	339.6
AC	23 (46.9)	58 (34.5)	29 (32.2)	0.57 (0.30–1.10)			0.53 (0.26–1.09)			0.90 (0.52–1.55)		
Log-additive –	–	–	–	0.89 (0.53–1.51)	0.68	235.1	1.10 (0.63–1.91)	0.74	184.3	1.18 (0.79–1.75)	0.42	339.1

Abbreviations: OR odds ratio, CI confidence interval, AIC Akaike information criteria

† adjusted for age

‡ statistical trend of significance

* statistically significant results are shown in bold

of miRSNPs for cancer aetiology, we questioned the effect of rs1058205, rs1010, and rs4245739 on the risk for PCa development and progression in Serbian population.

Since Stegeman et al. [15] identified rs1058205 as one of the 22 variants associated with the PCa risk, as well as one of the variants with the most significant effect on PCa

aggressiveness among the tested miRSNPs, they also conducted the functional analysis. This genetic variant is located within the region encoding the 3'-UTR of *KLK3* mRNA and was predicted to be functional, potentially creating an aberrant miRNA-binding site for miR-3162-5p, miR-219-1-3p and miR-4278. Therefore, reporter vector assay was used to test

Table 6 Association of rs4245739 with the risk of cancer progression

Genetic model	low-risk (%)	intermediate-risk (%)	high-risk (%)	intermediate vs low-risk			high vs low-risk			high vs intermediate-risk		
				OR (95% CI) †	P value †	AIC	OR (95% CI) †	P value †	AIC	OR (95% CI) †	P value †	AIC
rs4245739												
Codominant												
AA	16 (72.7)	63 (55.3)	109 (55.6)	1.00			1.00			1.00		
AC	6 (27.3)	44 (38.6)	71 (36.2)	1.87 (0.68–5.17)	0.13	124.3	1.79 (0.67–4.83)	0.091‡	144.5	0.95 (0.58–1.55)	0.79	408.9
CC	0 (0)	7 (6.1)	16 (8.2)	NA (0.00-NA)			NA (0.00-NA)			1.33 (0.51–3.44)		
Dominant												
AA	16 (72.7)	63 (55.3)	109 (55.6)	1.00	0.12	124	1.00	0.11	144.7	1.00	0.99	407.3
AC + CC	6 (27.3)	51 (44.7)	87 (44.4)	2.16 (0.79–5.95)			2.18 (0.81–5.81)			1.00 (0.63–1.60)		
Recessive												
AA+AC	22 (100)	107 (93.9)	180 (91.8)	1.00	0.11	123.8	1.00	0.066‡	143.9	1.00	0.51	406.9
CC	0 (0)	7 (6.1)	16 (8.2)	NA (0.00-NA)			NA (0.00-NA)			1.36 (0.54–3.44)		
Overdominant												
AA+CC	16 (72.7)	70 (61.4)	125 (63.8)	1.00	0.31	125.3	1.00	0.35	146.4	1.00	0.73	407.2
AC	6 (27.3)	44 (38.6)	71 (36.2)	1.67 (0.61–4.61)			1.58 (0.59–4.23)			0.92 (0.57–1.49)		
Log-additive –	–	–	–	2.21 (0.87–5.62)	0.073‡	123.1	2.22 (0.91–5.40)	0.055‡	143.6	1.05 (0.73–1.53)	0.78	407.3

Abbreviations: OR odds ratio, CI confidence interval, AIC Akaike information criteria

† adjusted for age

‡ statistical trend of significance

the results of in silico analysis, revealing that the miR-3162-5p has specific affinity for the rs1058205 T-allele. Protein, as well as mRNA levels of *KLK3*, were also found to be decreased in the presence of over-expressed miR-3162-5p in cells homozygous for T allele.

Our results are in contrast to those obtained by Stegeman et al. [15], since we obtained no evidence of association between rs1058205 and PCa susceptibility. This observation also contrasts the reported association between this genetic variant and PCa risk in the meta-analysis by Ding et al. [36]. Still, in the present study, C allele was associated with the lower serum PSA score among patients with PCa, which is consistent with the results obtained by Penney et al. [21] in their Caucasian American subjects. Still, their association of rs1058205 with the serum PSA score was determined in control subjects, similarly as in the study by Stegeman et al. [15], as well as in the study conducted by Savblom et al. [19] in Swedish population. Furthermore, Bensen et al. [18] showed association between rs1058205 and serum PSA level in their African-American PCa patients. Given the relationship between *KLK3* rs1058205 and serum PSA score, as well as the importance of this standard prognostic and diagnostic parameter of PCa, it should be noted that rs1058205 may have implications for PSA-based diagnostics and management protocols, potentially requiring genotype-dependent adjustments of PSA ranges [15]. The detected correlations potentially reflect the effect of rs1058205 on the regulation of PSA expression by regulatory factors other than miR-3162-5p, since this microRNA requires T allele for inhibitory action, while C allele was found to associate with the reduced serum PSA score in previous and the present studies.

Similarly with the finding concerning serum PSA score, we found that the rs1058205 minor allele C associates with lower clinical stage of primary tumour, while for the other tested associations statistical significance was not reached. Stegeman et al. [15] did not perform the test of association between genetic variants and TNM stages of primary PCa, while they observed for the *KLK3* rs1058205 allele-C a strong association with the nonaggressive disease. Our results seem to contradict these previous ones, but the criteria for aggressive PCa differed in the present study and the one conducted by Stegeman et al. [15]. Also, Chen, Xin [20] reported the TT genotype of rs1058205 to be associated with moderate to high-risk PCa in Chinese men. Still, they compared genotype frequencies in their control group and in the groups of PCa patients classified according to the risk of disease progression, while we made comparisons in a case-only manner. Also, they compared just TC and TT genotype counts, excluding the individuals with CC genotype and, therefore, not performing the allelic association estimates. Another previous study, conducted by Bensen et al. [18], suggested that rs1058205 is associated with the PCa aggressiveness, but the statistically significant results were obtained in their group of African-

American patients, while such association was not determined for European-Americans. In their analysis, they used a similar disease aggressiveness classification system as we did in the present study. In contrast to our results, they found no associations between rs1058205 and TNM stage, while this genetic variant was shown to associate with Gleason score in European-American group of PCa patients [18].

The other most significant association with PCa susceptibility and aggressiveness in the study by Stegeman et al. [15] was found for rs1010 in *VAMP8* gene. *VAMP8* belongs to the family of soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptors (SNAREs), essential proteins for fusion of cellular membranes. This integral membrane protein is involved in granule secretion, vesicle trafficking, endocytosis and phagocytosis [37], while its direct function in carcinogenesis is not yet known. Potentially, *VAMP8* could attribute to the Warburg effect, an important feature of malignant transformation, including the one that occurs in prostatic glandular epithelium [23]. To date, genetic variants in *VAMP8* have not been investigated for their relation with human cancer, except for the study by Stegeman et al. [15]. Also, this genetic variant is in strong LD with a previous PCa susceptibility GWAS hit [38].

The functional characterization of rs1010 showed that the minor allele C of this genetic variant lowers the affinity of the miR-370-5p for its binding site, as predicted in silico and confirmed through reporter assay. Also, rs1010 showed a statistical trend of significance when genotype correlation with transcript expression was evaluated [15]. Therefore, the mechanism underlying the potential involvement of rs1010 in the genetic basis of PCa was proposed to rely on the action of microRNA miR-370-5p, previously found to be overexpressed in PCa tumours [15]. However, in our study, we did not find any association between rs1010 and the risk of developing PCa, which could reflect the potential differences in ethnic backgrounds between the study groups included in the present study and the previous one.

At the same time, rs1010 minor allele C was not found to associate with the higher Gleason score in the present study. Furthermore, when comparing genotype distributions among patients stratified into groups with T3/4 and T2 TNM categories, the same direction of association with clinical stage of primary PCa was determined. We could not compare these results with the data from other studies, since Stegeman et al. [15] did not examine the effect of rs1010 on the values of standard prognostic parameters of PCa, other than serum PSA score. Both of the studies did not show the relation of rs1010 with the serum PSA levels, while for the association of this genetic variant with PCa aggressiveness discordant results were obtained. That is, we did not show the association of rs1010 with the risk of PCa progression, but the association with Gleason score and the clinical stage of disease could still suggest that the minor C allele has contributive effect on the disease aggressiveness.

Among the three genetic variants chosen for the analysis in the present study, rs4245739 has been the most extensively studied to date, due to the functional significance of MDM4 for malignant transformation process. The MDM4 protein plays a major role in P53 tumour suppressor pathway through negatively regulating its function [39]. Maintaining the correct levels of P53 is pivotal to a cell, as P53 is a crucial protein for maintenance of genomic stability and control of the cell growth and apoptosis. Furthermore, MDM4 interacts with p21, a cyclin-dependent kinase inhibitor whose deregulation is associated with the higher proliferation rate in PCa. By binding to the transcription factor E2F1, MDM4 represses its transactivation and induces the changes in the regulation of cell cycle and apoptosis. Also, MDM4 inhibits the transactivation of Smad3 and Smad4, components of TGF-beta signalling, by which it further exhibits the promoting activity on tumour growth [39, 40].

The genetic variant rs4245739 locates at the 3'UTR of *MDM4* and is found to create the illegitimate miRNA-binding site. By using the reporter gene assays, Stegeman et al. [16] have shown that miR-191-5p and miR-887 have specific affinity for rs4245739 C-allele, presenting a mechanism by which the untargeted A-allele may be associated with the increased risk of PCa. Previously, Wynendaele et al. [41] have obtained the similar results in their experiments involving ovarian cancer cells, also demonstrating the allele-specific effects on the *MDM4* mRNA targeting by miR-191-5p. Therefore, this genetic variant, identified as a PCa susceptibility locus in GWA study [42], has been annotated as microRNA-binding site variant, but other functional consequences of this A > C substitution cannot be ruled out.

Besides GWAS on PCa, various other case-control studies have also associated rs4245739 with the susceptibility to specific types of cancer, such as ovarian, breast cancer, ESCC, SCLC and non-Hodgkin lymphoma [25–27, 41, 43]. Still, different studies have found this variant to have weak or almost no effect on cancer risk in their case-control comparisons [24, 29, 44–46]. Inconsistences in the results of these studies investigating the association between rs4245739 and cancer risk are found regarding not just the statistical significance of the tested association, but also regarding the susceptibility allele. For example, some studies, including those on PCa and also meta-analyses on the association with cancer risk in general, have reported the minor allele C of rs4245739 to be associated with the decreased cancer risk [16, 28, 47]. On the contrary, a study by Garcia-Closas et al. [26] reported the same allelic variant to be associated with the increased breast cancer risk, which is consistent with the previous data from the other breast cancer GWASs [48, 49]. Still, Gansmo et al. [29] have shown the reduced risk of breast cancer to be associated with rs4245739 allele C in their Norwegian case-control study, which matches the results Liu et al. [50] have obtained in Chinese population. Other reports regarding the

association of rs4245739 with susceptibility to the specific type of cancer and the disease outcomes have shown the opposite effects of the same allelic variant. For instance, Wynendaele et al. [41] reported A-allele of rs4245739 in patients with ovarian cancer not expressing the estrogen receptor to be associated with increased risk of recurrence and increased risk of tumour-related deaths. Contrary to these findings, Gansmo et al. [24] showed C-allele of rs4245739 to be associated with increased risk of serious ovarian cancer.

Even though rs4245739 is a widely studied genetic variant in terms of many cancers, its role in PCa development and progression remains relatively poorly investigated, with only several studies aiming to elucidate its relation to PCa. In the present study, we found no evidence of association between rs4245739 and the risk of PCa, which is in contrast with the findings of Stegeman et al. [16], as well as with the results of iCOGS GWAS [42]. Still, our results match the ones by Gansmo et al. [29], who found the association of rs4245739 with PCa risk to be statistically insignificant. Furthermore, in our study, minor allele C was found to associate with higher PSA, higher GS, as well as with higher clinical stage of the tumour. In line with these findings, we also observed a statistical trend for the association of rs4245739 C-allele and higher PCa aggressiveness. Since Stegeman et al. [16] and iCOGS GWAS [42] also evaluated the association of this genetic variant with serum PSA score, as well as with disease aggressiveness, we can conclude that our results significantly differ from theirs. Still, the criteria for the evaluation of disease aggressiveness in our and the previous studies were discordant. On the other hand, Gansmo et al. [29] did not provide any data on the potential association of rs4245739 with the values of standard prognostic parameters of PCa, or with the risk of PCa progression. For these reasons, our results on potential association of genetic variant rs4245739 with Gleason score and clinical stages of primary PCa could not be compared with any previously obtained results from other populations.

According to the results of the present study, all three tested genetic variants have shown the association with the parameters of PCa progression. Still, discordances with the previous results were detected, which mainly refer to the lack of association with PCa susceptibility. Among the reasons for such disparity are potential differences in the genetic background of the tested populations, as well as in the environmental factors affecting the PCa development and progression. As an illustration of the ethnic differences, according to genetic variant databases, the distributions of the alleles of these three genetic variants are quite different between populations of European, Asian and African descent. This could affect the power of the specific studies and have consequence on the risk estimates. Also, the results could be affected by the study design and the participant recruitment criteria. As for the associations between the tested genetic variants and the PCa aggressiveness parameters, the differences in subgrouping criteria could have

attributed to the discordances in the obtained results, together with the potential stage-specific effects of these genetic variants. Still, the main limitation of our study is its sample size, even though more than 1000 participants were included. This could have resulted in the lack of ability to validate the previously detected associations with PCa susceptibility. Furthermore, the number of PCa patients in several subgroups was small, which suggests that the obtained results should be interpreted with caution. Still, the same direction of association of the tested genetic variants with different parameters of PCa progression point out their relevance for the disease aggressiveness assessment. However, future studies with larger sample sizes in populations of different origin are needed to better clarify the potential association of genetic variants rs1058205, rs1010 and rs4245739 with PCa.

Acknowledgments The research was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Project no. 173016).

Authors' Contributions N.K. performed genetic analysis and wrote the manuscript. Z.D. performed the statistical analysis and reviewed the manuscript. S.M. supported genetic analysis. D.S.P. and GB reviewed the manuscript.

Funding Information The study was financially supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Contract no. 451-03-68/2020-14/ 200178).

Data Availability The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interests The authors declare that there is no conflict of interests.

References

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68(6):394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Eeles R, Ni Raghallaigh H (2018) Men with a susceptibility to prostate cancer and the role of genetic based screening. *Translat Androl Urol* 7(1):61–69. <https://doi.org/10.21037/tau.2017.12.30>
- Schumacher FR, Al Olama AA, Berndt SI, Benlloch S, Ahmed M, Saunders EJ, Dadaev T, Leongamornlert D, Anokian E, Cieza-Borrella C, Goh C, Brook MN, Sheng X, Fachal L, Dennis J, Tyrer J, Muir K, Lophatananon A, Stevens VL, Gapstur SM, Carter BD, Tangen CM, Goodman PJ, Thompson IM Jr, Batra J, Chambers S, Moya L, Clements J, Horvath L, Tilley W, Risbridger GP, Gronberg H, Aly M, Nordstrom T, Pharoah P, Pashayan N, Schleutker J, Tammela TLJ, Sipeky C, Auvinen A, Albanes D, Weinstein S, Wolk A, Hakansson N, West CML, Dunning AM, Burnet N, Mucci LA, Giovannucci E, Andriole GL, Cussenot O, Cancel-Tassin G, Koutros S, Beane Freeman LE, Sorensen KD, Orntoft TF, Borre M, Maehle L, Grindedal EM, Neal DE, Donovan JL, Hamdy FC, Martin RM, Travis RC, Key TJ, Hamilton RJ, Fleshner NE, Finelli A, Ingles SA, Stern MC, Rosenstein BS, Kerns SL, Ostrer H, Lu YJ, Zhang HW, Feng N, Mao X, Guo X, Wang G, Sun Z, Giles GG, Southey MC, MacInnis RJ, FitzGerald LM, Kibel AS, Drake BF, Vega A, Gomez-Caamano A, Szulkin R, Eklund M, Kogevinas M, Llorca J, Castano-Vinyals G, Penney KL, Stampfer M, Park JY, Sellers TA, Lin HY, Stanford JL, Cybulski C, Wokolorczyk D, Lubinski J, Ostrander EA, Geybels MS, Nordestgaard BG, Nielsen SF, Weischer M, Bisbjerg R, Roder MA, Iversen P, Brenner H, Cuk K, Holleczeck B, Maier C, Luedeke M, Schnoeller T, Kim J, Logothetis CJ, John EM, Teixeira MR, Paulo P, Cardoso M, Neuhausen SL, Steele L, Ding YC, De Ruyck K, De Meerleer G, Ost P, Razack A, Lim J, Teo SH, Lin DW, Newcomb LF, Lessel D, Gamulin M, Kulis T, Kaneva R, Usmani N, Singhal S, Slavov C, Mitev V, Parliament M, Claessens F, Joniau S, Van den Broeck T, Larkin S, Townsend PA, Aukim-Hastie C, Gago-Dominguez M, Castela JE, Martinez ME, Roobol MJ, Jenster G, van Schaik RHN, Menegaux F, Truong T, Koudou YA, Xu J, Khaw KT, Cannon-Albright L, Pandha H, Michael A, Thibodeau SN, McDonnell SK, Schaid DJ, Lindstrom S, Turman C, Ma J, Hunter DJ, Riboli E, Siddiq A, Canzian F, Kolonel LN, Le Marchand L, Hoover RN, Machiela MJ, Cui Z, Kraft P, Amos CI, Conti DV, Easton DF, Wiklund F, Chanock SJ, Henderson BE, Kote-Jarai Z, Haiman CA, Eeles RA, Profile S, Australian Prostate Cancer B, Study I, Canary PI, Breast, Prostate Cancer Cohort C, Consortium P, Cancer of the Prostate in S, Prostate Cancer Genome-wide Association Study of Uncommon Susceptibility L, Genetic A, Mechanisms in Oncology /Elucidating Loci Involved in Prostate Cancer Susceptibility C (2018) Association analyses of more than 140,000 men identify 63 new prostate cancer susceptibility loci. *Nat Genet* 50(7):928–936. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0142-8>
- Buniello A, MacArthur JAL, Cerezo M, Harris LW, Hayhurst J, Malangone C, McMahon A, Morales J, Mountjoy E, Sollis E, Suveges D, Vrousou O, Whetzel PL, Amode R, Guillen JA, Riat HS, Trevanion SJ, Hall P, Junkins H, Flicek P, Burdett T, Hindorf LA, Cunningham F, Parkinson H (2019) The NHGRI-EBI GWAS catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Res* 47(D1):D1005–D1012. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1120>
- Wilk G, Braun R (2018) regQTLs: single nucleotide polymorphisms that modulate microRNA regulation of gene expression in tumors. *PLoS Genet* 14(12):e1007837. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007837>
- Vishnoi A, Rani S (2017) MiRNA biogenesis and regulation of diseases: an overview. *Methods Mol Biol* 1509:1–10. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6524-3_1
- Salzman DW, Weidhaas JB (2013) SNPping cancer in the bud: microRNA and microRNA-target site polymorphisms as diagnostic and prognostic biomarkers in cancer. *Pharmacol Ther* 137(1):55–63. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.08.016>
- Cipollini M, Landi S, Gemignani F (2014) MicroRNA binding site polymorphisms as biomarkers in cancer management and research. *Pharmacogen Personal Med* 7:173–191. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S61693>
- Yuan Y, Weidhaas JB (2019) Functional microRNA binding site variants. *Mol Oncol* 13(1):4–8. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12421>
- Kotarac N, Dobrijevic Z, Matijasevic S, Savic-Pavicevic D, Brajkusovic G (2019) Analysis of association of potentially functional genetic variants within genes encoding miR-34b/c, miR-378 and miR-143/145 with prostate cancer in Serbian population. *EXCLI J* 18:515–529. <https://doi.org/10.17179/excli2019-1257>

11. Nikolic Z, Savic Pavicevic D, Vucic N, Cidilko S, Filipovic N, Cerovic S, Vukotic V, Romac S, Brajskovic G (2015) Assessment of association between genetic variants in microRNA genes hsa-miR-499, hsa-miR-196a2 and hsa-miR-27a and prostate cancer risk in Serbian population. *Exp Mol Pathol* 99(1):145–150. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.06.009>
12. Nikolic ZZ, Savic Pavicevic DL, Vukotic VD, Tomovic SM, Cerovic SJ, Filipovic N, Romac SP, Brajskovic GN (2014) Association between genetic variant in hsa-miR-146a gene and prostate cancer progression: evidence from Serbian population. *Cancer Causes Cont: CCC* 25(11):1571–1575. <https://doi.org/10.1007/s10552-014-0452-9>
13. Hughes L, Ruth K, Rebbeck TR, Giri VN (2013) Genetic variation in IL-16 miRNA target site and time to prostate cancer diagnosis in African-American men. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 16(4):308–314. <https://doi.org/10.1038/pcan.2013.36>
14. Liu J, Huang J, He Y, Liu J, Liao B, Liao G (2014) Genetic variants in the integrin gene predicted microRNA-binding sites were associated with the risk of prostate cancer. *Mol Carcinog* 53(4):280–285. <https://doi.org/10.1002/mc.21973>
15. Stegeman S, Amankwah E, Klein K, O'Mara TA, Kim D, Lin HY, Permeth-Wey J, Sellers TA, Srinivasan S, Eeles R, Easton D, Kote-Jarai Z, Amin Al Olama A, Benlloch S, Muir K, Giles GG, Wiklund F, Gronberg H, Haiman CA, Schleutker J, Nordestgaard BG, Travis RC, Neal D, Pharoah P, Khaw KT, Stanford JL, Blot WJ, Thibodeau S, Maier C, Kibel AS, Cybulski C, Cannon-Albright L, Brenner H, Kaneva R, Teixeira MR, Consortium P, Australian Prostate Cancer B, Spurdle AB, Clements JA, Park JY, Batra J (2015) A large-scale analysis of genetic variants within putative miRNA binding sites in Prostate Cancer. *Cancer Discov* 5(4):368–379. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-1057>
16. Stegeman S, Moya L, Selth LA, Spurdle AB, Clements JA, Batra J (2015) A genetic variant of MDM4 influences regulation by multiple microRNAs in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 22(2):265–276. <https://doi.org/10.1530/ERC-15-0013>
17. Hong SK (2014) Kallikreins as biomarkers for prostate cancer. *Biomed Res Int* 2014:526341–526310. <https://doi.org/10.1155/2014/526341>
18. Bensen JT, Xu Z, Smith GJ, Mohler JL, Fontham ET, Taylor JA (2013) Genetic polymorphism and prostate cancer aggressiveness: a case-only study of 1,536 GWAS and candidate SNPs in African-Americans and European-Americans. *Prostate* 73(1):11–22. <https://doi.org/10.1002/pros.22532>
19. Savblom C, Hallden C, Cronin AM, Sall T, Savage C, Vertosick EA, Klein RJ, Giwercman A, Lilja H (2014) Genetic variation in *KLK2* and *KLK3* is associated with concentrations of hK2 and PSA in serum and seminal plasma in young men. *Clin Chem* 60(3):490–499. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.211219>
20. Chen C, Xin Z (2017) Single-nucleotide polymorphism rs1058205 of *KLK3* is associated with the risk of prostate cancer: a case-control study of Han Chinese men in Northeast China. *Medicine* 96(10):e6280. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000006280>
21. Penney KL, Schumacher FR, Kraft P, Mucci LA, Sesso HD, Ma J, Niu Y, Cheong JK, Hunter DJ, Stampfer MJ, Hsu SI (2011) Association of *KLK3* (PSA) genetic variants with prostate cancer risk and PSA levels. *Carcinogenesis* 32(6):853–859. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr050>
22. Wang CC, Shi H, Guo K, Ng CP, Li J, Gan BQ, Chien Liew H, Leinonen J, Rajaniemi H, Zhou ZH, Zeng Q, Hong W (2007) *VAMP8*/endobrevin as a general vesicular SNARE for regulated exocytosis of the exocrine system. *Mol Biol Cell* 18(3):1056–1063. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-10-0974>
23. Zhu D, Zhang Y, Lam PP, Dolai S, Liu Y, Cai EP, Choi D, Schroer SA, Kang Y, Allister EM, Qin T, Wheeler MB, Wang CC, Hong WJ, Woo M, Gaisano HY (2012) Dual role of *VAMP8* in regulating insulin exocytosis and islet beta cell growth. *Cell Metab* 16(2):238–249. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.07.001>
24. Gansmo LB, Bjornstlett M, Halle MK, Salvesen HB, Dorum A, Birkeland E, Hveem K, Romundstad P, Vatten L, Lonning PE, Knappskog S (2016) The *MDM4* SNP34091 (rs4245739) C-allele is associated with increased risk of ovarian-but not endometrial cancer. *Tumour Biol* 37(8):10697–10702. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-4940-2>
25. Gao F, Xiong X, Pan W, Yang X, Zhou C, Yuan Q, Zhou L, Yang M (2015) A regulatory *MDM4* genetic variant locating in the binding sequence of multiple MicroRNAs contributes to susceptibility of small cell lung Cancer. *PLoS One* 10(8):e0135647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135647>
26. Garcia-Closas M, Couch FJ, Lindstrom S, Michailidou K, Schmidt MK, Brook MN, Orr N, Rhee SK, Riboli E, Feigelson HS, Le Marchand L, Buring JE, Eccles D, Miron P, Fasching PA, Brauch H, Chang-Claude J, Carpenter J, Godwin AK, Nevanlinna H, Giles GG, Cox A, Hopper JL, Bolla MK, Wang Q, Dennis J, Dicks E, Howat WJ, Schoof N, Bojesen SE, Lambrechts D, Broeks A, Andrulis IL, Guenel P, Burwinkel B, Sawyer EJ, Hollestelle A, Fletcher O, Winqvist R, Brenner H, Mannermaa A, Hamann U, Meindl A, Lindblom A, Zheng W, Devillee P, Goldberg MS, Lubinski J, Kristensen V, Swerdlow A, Anton-Culver H, Dork T, Muir K, Matsuo K, Wu AH, Radice P, Teo SH, Shu XO, Blot W, Kang D, Hartman M, Sangrajrang S, Shen CY, Southey MC, Park DJ, Hammet F, Stone J, Veer LJ, Rutgers EJ, Lophatananon A, Stewart-Brown S, Siriwanarangsarn P, Peto J, Schrauder MG, Ekici AB, Beckmann MW, Dos Santos SI, Johnson N, Warren H, Tomlinson I, Kerin MJ, Miller N, Marme F, Schneeweiss A, Sohn C, Truong T, Laurent-Puig P, Kerbrat P, Nordestgaard BG, Nielsen SF, Flygjer H, Milne RL, Perez JJ, Menendez P, Muller H, Arndt V, Stegmaier C, Lichtner P, Lochmann M, Justenhoven C, Ko YD, Gene EI, breast CN, Muranen TA, Aittomaki K, Blomqvist C, Greco D, Heikkinen T, Ito H, Iwata H, Yatabe Y, Antonenkova NN, Margolin S, Kataja V, Kosma VM, Hartikainen JM, Balleine R, kConFab I, Tseng CC, Berg DV, Stram DO, Neven P, Dieudonne AS, Leunen K, Rudolph A, Nickels S, Flesch-Janys D, Peterlongo P, Peissel B, Bernard L, Olson JE, Wang X, Stevens K, Severi G, Baglietto L, MClean C, Coetzee GA, Feng Y, Henderson BE, Schumacher F, Bogdanova NV, Labreche F, Dumont M, Yip CH, Taib NA, Cheng CY, Shrubsole M, Long J, Pylkas K, Jukkola-Vuorinen A, Kauppila S, Knight JA, Glendon G, Mulligan AM, Tollenaar RA, Seynaeve CM, Kriege M, Hooning MJ, van den Ouweland AM, van Beurden CH, Lu W, Gao YT, Cai H, Balasubramanian SP, Cross SS, Reed MW, Signorello L, Cai Q, Shah M, Miao H, Chan CW, Chia KS, Jakubowska A, Jaworska K, Durda K, Hsiung CN, Wu PE, Yu JC, Ashworth A, Jones M, Tessier DC, Gonzalez-Neira A, Pita G, Alonso MR, Vincent D, Bacot F, Ambrosone CB, Bandera EV, John EM, Chen GK, Hu JJ, Rodriguez-Gil JL, Bernstein L, Press MF, Ziegler RG, Millikan RM, Deming-Halverson SL, Nyante S, Ingles SA, Waisfisz Q, Tsimiklis H, Makalic E, Schmidt D, Bui M, Gibson L, Muller-Myhok B, Schmutzler RK, Hein R, Dahmen N, Beckmann L, Aaltonen K, Czene K, Irwanto A, Liu J, Turnbull C, Familial Breast Cancer S, Rahman N, Meijers-Heijboer H, Uitterlinden AG, Rivadeneira F, Australian Breast Cancer Tissue Bank I, Olswood C, Slager S, Pilarski R, Ademuyiwa F, Konstantopoulou I, Martin NG, Montgomery GW, Slamon DJ, Rauh C, Lux MP, Jud SM, Bruning T, Weaver J, Sharma P, Pathak H, Tapper W, Gerty S, Durcan L, Trichopoulos D, Tumino R, Peeters PH, Kaaks R, Campa D, Canzian F, Weiderpass E, Johansson M, Khaw KT, Travis R, Clavel-Chapelon F, Kolonel LN, Chen C, Beck A, Hankinson SE, Berg CD, Hoover RN, Lissowska J, Figueroa JD, Chasman DI, Gaudet MM, Diver WR, Willett WC, Hunter DJ, Simard J, Benitez J, Dunning AM, Sherman ME, Chenevix-Trench G, Chanock SJ, Hall P, Pharoah PD, Vachon C, Easton

- DF, Haiman CA, Kraft P (2013) Genome-wide association studies identify four ER negative-specific breast cancer risk loci. *Nat Genet* 45(4):392–398, 398e391–392. <https://doi.org/10.1038/ng.2561>
27. Zhou L, Zhang X, Li Z, Zhou C, Li M, Tang X, Lu C, Li H, Yuan Q, Yang M (2013) Association of a genetic variation in a miR-191 binding site in MDM4 with risk of esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One* 8(5):e64331. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064331>
 28. Xu C, Zhu J, Fu W, Liang Z, Song S, Zhao Y, Lyu L, Zhang A, He J, Duan P (2016) MDM4 rs4245739 A > C polymorphism correlates with reduced overall cancer risk in a meta-analysis of 69477 subjects. *Oncotarget* 7(44):71718–71726. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12326>
 29. Gansmo LB, Romundstad P, Birkeland E, Hveem K, Vatten L, Knappskog S, Lønning PE (2015) MDM4 SNP34091 (rs4245739) and its effect on breast-, colon-, lung-, and prostate cancer risk. *Cancer Med* 4(12):1901–1907. <https://doi.org/10.1002/cam4.555>
 30. Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, van der Kwast T, Mason M, Matveev V, Wiegel T, Zattoni F, Mottet N, European Association of U (2014) EAU guidelines on prostate cancer. part 1: Screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. *Eur Urol* 65 (1):124–137. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.09.046>
 31. Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V (2006) SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22(15):1928–1929. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl268>
 32. Preskill C, Weidhaas JB (2013) SNPs in microRNA binding sites as prognostic and predictive cancer biomarkers. *Crit Rev Oncog* 18(4):327–340. <https://doi.org/10.1615/critrevoncog.2013007254>
 33. Moszynska A, Gebert M, Collawn JF, Bartoszewski R (2017) SNPs in microRNA target sites and their potential role in human disease. *Open Biol* 7(4):170019. <https://doi.org/10.1098/rsob.170019>
 34. Pelletier C, Weidhaas JB (2010) MicroRNA binding site polymorphisms as biomarkers of cancer risk. *Expert Rev Mol Diagn* 10(6):817–829. <https://doi.org/10.1586/erm.10.59>
 35. Yu Z, Li Z, Jolicœur N, Zhang L, Fortin Y, Wang E, Wu M, Shen SH (2007) Aberrant allele frequencies of the SNPs located in microRNA target sites are potentially associated with human cancers. *Nucleic Acids Res* 35(13):4535–4541. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm480>
 36. Ding WH, Ren KW, Yue C, Zou JG, Zuo L, Zhang LF, Bai Y, Okada A, Yasui T, Mi YY (2018) Association between three genetic variants in kallikrein 3 and prostate cancer risk. *Biosci Rep* 38(6). <https://doi.org/10.1042/BSR201811151>
 37. Zong H, Wang CC, Vaitheesvaran B, Kurland IJ, Hong W, Pessin JE (2011) Enhanced energy expenditure, glucose utilization, and insulin sensitivity in VAMP8 null mice. *Diabetes* 60(1):30–38. <https://doi.org/10.2337/db10-0231>
 38. Kote-Jarai Z, Olama AA, Giles GG, Severi G, Schleutker J, Weischer M, Campa D, Riboli E, Key T, Gronberg H, Hunter DJ, Kraft P, Thun MJ, Ingles S, Chanock S, Albanes D, Hayes RB, Neal DE, Hamdy FC, Donovan JL, Pharoah P, Schumacher F, Henderson BE, Stanford JL, Ostrander EA, Sorensen KD, Dork T, Andriole G, Dickinson JL, Cybulski C, Lubinski J, Spurdle A, Clements JA, Chambers S, Aitken J, Gardiner RA, Thibodeau SN, Schaid D, John EM, Maier C, Vogel W, Cooney KA, Park JY, Cannon-Albright L, Brenner H, Habuchi T, Zhang HW, Lu YJ, Kaneva R, Muir K, Benlloch S, Leongamornlert DA, Saunders EJ, Tymrakiewicz M, Mahmud N, Guy M, O'Brien LT, Wilkinson RA, Hall AL, Sawyer EJ, Dadaev T, Morrison J, Deamaley DP, Horwich A, Huddart RA, Khoo VS, Parker CC, Van As N, Woodhouse CJ, Thompson A, Christmas T, Ogden C, Cooper CS, Lophatananon A, Southey MC, Hopper JL, English DR, Wahlfors T, Tammela TL, Klarskov P, Nordestgaard BG, Roder MA, Tybjaerg-Hansen A, Bojesen SE, Travis R, Canzian F, Kaaks R, Wiklund F, Aly M, Lindstrom S, Diver WR, Gapstur S, Stern MC, Corral R, Virtamo J, Cox A, Haiman CA, Le Marchand L, Fitzgerald L, Kolb S, Kwon EM, Karyadi DM, Orntoft TF, Borre M, Meyer A, Serth J, Yeager M, Berndt SI, Marthick JR, Patterson B, Wokolorczyk D, Batra J, Lose F, McDonnell SK, Joshi AD, Shahabi A, Rinckleb AE, Ray A, Sellers TA, Lin HY, Stephenson RA, Farnham J, Muller H, Rothenbacher D, Tsuchiya N, Narita S, Cao GW, Slavov C, Mitev V, Easton DF, Eeles RA, Oncology UKGPCSCBAoUSSo, Uk ProtecT Study Collaborators TAPCB, Consortium P (2011) Seven prostate cancer susceptibility loci identified by a multi-stage genome-wide association study. *Nat Genet* 43(8):785–791. <https://doi.org/10.1038/ng.882>
 39. Li Q, Lozano G (2013) Molecular pathways: targeting Mdm2 and Mdm4 in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 19(1):34–41. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0053>
 40. Karni-Schmidt O, Lokshin M, Prives C (2016) The roles of MDM2 and MDMX in Cancer. *Annu Rev Pathol* 11:617–644. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012414-040349>
 41. Wynendaele J, Bohnke A, Leucci E, Nielsen SJ, Lambertz I, Hammer S, Sbrzesny N, Kubitzka D, Wolf A, Gradhand E, Balschun K, Braicu I, Sehoul J, Darb-Esfahani S, Denkert C, Thomssen C, Hauptmann S, Lund A, Marine JC, Bartel F (2010) An illegitimate microRNA target site within the 3' UTR of MDM4 affects ovarian cancer progression and chemosensitivity. *Cancer Res* 70(23):9641–9649. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0527>
 42. Eeles RA, Olama AA, Benlloch S, Saunders EJ, Leongamornlert DA, Tymrakiewicz M, Ghousaini M, Luccarini C, Dennis J, Jugurnauth-Little S, Dadaev T, Neal DE, Hamdy FC, Donovan JL, Muir K, Giles GG, Severi G, Wiklund F, Gronberg H, Haiman CA, Schumacher F, Henderson BE, Le Marchand L, Lindstrom S, Kraft P, Hunter DJ, Gapstur S, Chanock SJ, Berndt SI, Albanes D, Andriole G, Schleutker J, Weischer M, Canzian F, Riboli E, Key TJ, Travis RC, Campa D, Ingles SA, John EM, Hayes RB, Pharoah PD, Pashayan N, Khaw KT, Stanford JL, Ostrander EA, Signorello LB, Thibodeau SN, Schaid D, Maier C, Vogel W, Kibel AS, Cybulski C, Lubinski J, Cannon-Albright L, Brenner H, Park JY, Kaneva R, Batra J, Spurdle AB, Clements JA, Teixeira MR, Dicks E, Lee A, Dunning AM, Baynes C, Conroy D, Maranian MJ, Ahmed S, Govindasami K, Guy M, Wilkinson RA, Sawyer EJ, Morgan A, Deamaley DP, Horwich A, Huddart RA, Khoo VS, Parker CC, Van As NJ, Woodhouse CJ, Thompson A, Dudderidge T, Ogden C, Cooper CS, Lophatananon A, Cox A, Southey MC, Hopper JL, English DR, Aly M, Adolfsson J, Xu J, Zheng SL, Yeager M, Kaaks R, Diver WR, Gaudet MM, Stern MC, Corral R, Joshi AD, Shahabi A, Wahlfors T, Tammela TL, Auvinen A, Virtamo J, Klarskov P, Nordestgaard BG, Roder MA, Nielsen SF, Bojesen SE, Siddiq A, Fitzgerald LM, Kolb S, Kwon EM, Karyadi DM, Blot WJ, Zheng W, Cai Q, McDonnell SK, Rinckleb AE, Drake B, Colditz G, Wokolorczyk D, Stephenson RA, Teerlink C, Muller H, Rothenbacher D, Sellers TA, Lin HY, Slavov C, Mitev V, Lose F, Srinivasan S, Maia S, Paulo P, Lange E, Cooney KA, Antoniou AC, Vincent D, Bacot F, Tessier DC, Initiative CO-CRUG-E, Australian Prostate Cancer B, Oncology UKGPCSCBAoUSSo, Collaborators UKPS, Consortium P, Kote-Jarai Z, Easton DF (2013) Identification of 23 new prostate cancer susceptibility loci using the iCOGS custom genotyping array. *Nat Genet* 45(4):385–391, 391e381–382. <https://doi.org/10.1038/ng.2560>
 43. Fan C, Wei J, Yuan C, Wang X, Jiang C, Zhou C, Yang M (2014) The functional TP53 rs1042522 and MDM4 rs4245739 genetic variants contribute to non-Hodgkin lymphoma risk. *PLoS One* 9(9):e107047. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107047>
 44. Hashemi M, Sanaei S, Hashemi SM, Eskandari E, Bahari G (2018) Association of Single Nucleotide Polymorphisms of the MDM4 Gene with the susceptibility to breast Cancer in a southeast

- Iranian population sample. *Clin Breast Cancer* 18(5):e883–e891. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.01.003>
45. Mohammad Khanlou Z, Pouladi N, Hosseinpour Feizi M, Pedram N (2017) Lack of associations of the MDM4 rs4245739 polymorphism with risk of thyroid Cancer among Iranian-Azeri patients: a case-control Study. *Asian Pac J Cancer Prevent: APJCP* 18(4): 1133–1138. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.4.1133>
46. Pedram N, Pouladi N, Feizi MA, Montazeri V, Sakhinia E, Estiar MA (2016) Analysis of the association between MDM4 rs4245739 single nucleotide polymorphism and breast Cancer susceptibility. *Clin Lab* 62(7):1303–1308. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2016.151128>
47. Zhai Y, Dai Z, He H, Gao F, Yang L, Dong Y, Lu J (2016) A PRISMA-compliant meta-analysis of MDM4 genetic variants and cancer susceptibility. *Oncotarget* 7(45):73935–73944. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12558>
48. Purrington KS, Slager S, Eccles D, Yannoukakos D, Fasching PA, Miron P, Carpenter J, Chang-Claude J, Martin NG, Montgomery GW, Kristensen V, Anton-Culver H, Goodfellow P, Tapper WJ, Rafiq S, Gerty SM, Durcan L, Konstantopoulou I, Fostira F, Vratimos A, Apostolou P, Konstanta I, Kotoula V, Lakis S, Dimopoulos MA, Skarlos D, Pectasides D, Fountzilas G, Beckmann MW, Hein A, Ruebner M, Ekici AB, Hartmann A, Schulz-Wendtland R, Renner SP, Janni W, Rack B, Scholz C, Neugebauer J, Andergassen U, Lux MP, Haerberle L, Clarke C, Pathmanathan N, Rudolph A, Flesch-Janys D, Nickels S, Olson JE, Ingle JN, Olswold C, Slettedahl S, Eckel-Passow JE, Anderson SK, Visscher DW, Cafourek VL, Sicotte H, Prodduturi N, Weiderpass E, Bernstein L, Ziogas A, Ivanovich J, Giles GG, Baglietto L, Southey M, Kosma VM, Fischer HP, Network G, Reed MW, Cross SS, Deming-Halverson S, Shrubsole M, Cai Q, Shu XO, Daly M, Weaver J, Ross E, Klemp J, Sharma P, Torres D, Rudiger T, Wolfing H, Ulmer HU, Forsti A, Khoury T, Kumar S, Pilarski R, Shapiro CL, Greco D, Heikkila P, Aittomaki K, Blomqvist C, Irwanto A, Liu J, Pankratz VS, Wang X, Severi G, Mannermaa A, Easton D, Hall P, Brauch H, Cox A, Zheng W, Godwin AK, Hamann U, Ambrosone C, Toland AE, Nevanlinna H, Vachon CM, Couch FJ (2014) Genome-wide association study identifies 25 known breast cancer susceptibility loci as risk factors for triple-negative breast cancer. *Carcinogenesis* 35(5):1012–1019. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt404>
49. Stevens KN, Vachon CM, Couch FJ (2013) Genetic susceptibility to triple-negative breast cancer. *Cancer Res* 73(7):2025–2030. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1699>
50. Liu J, Tang X, Li M, Lu C, Shi J, Zhou L, Yuan Q, Yang M (2013) Functional MDM4 rs4245739 genetic variant, alone and in combination with P53 Arg72Pro polymorphism, contributes to breast cancer susceptibility. *Breast Cancer Res Treat* 140(1):151–157. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2615-x>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Невена С. Котарац _____

Број индекса _____ M3003/2016 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Студија асоцијације гена за микроРНК (*MIR34*, *MIR143*, *MIR145* и *MIR378*) и гена за одржавање ткивне хомеостазе са карцином простате

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

Потпис аутора

У Београду, 24.06.2020.



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Невена С. Котарац

Број индекса М3003/2016

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Студија асоцијације гена за микроРНК (*MIR34*, *MIR143*, *MIR145* и *MIR378*) и гена за одржавање ткивне хомеостазе са карцином простате

Ментор проф. др Горан Брајушковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

У Београду, 24.06.2020



Изјава о коришћењу

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

Студија асоцијације гена за микроРНК (*MIR34*, *MIR143*, *MIR145* и *MIR378*) и гена за одржавање ткивне хомеостазе са карцином простате

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 24.06.2020.



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 прерада.** 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 прерада.** 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.