

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Martina M. Bosić

**EKSPRESIJA PROTEINA VISOKE MOBILNOSTI
GRUPE A (HMGA) I NJIHOVIH MODULATORA U
KERATINOCITNOJ INTRAEPIDERMALNOJ
NEOPLAZIJI I INVAZIVNOM
PLANOCELULARNOM KARCINOMU KOŽE**

doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Martina M. Botic

**EXPRESSION OF HIGH MOBILITY GROUP A
(HMGA) PROTEINS AND THEIR MODULATORS
IN KERATINOCYTIC INTRAEPIDERMAL
NEOPLASIA AND INVASIVE SQUAMOUS CELL
CARCINOMA OF THE SKIN**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

Mentor:

Prof. dr Dimitrije Brašanac

Institut za patologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

1. Prof. dr Jasmina Marković Lipkovski, Institut za patologiju Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

2. Doc. dr Milica Labudović-Borović, Institut za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

3. Doc. dr Slaviša Đuričić, Katedra za patologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Banja Luci

Doktorska disertacija je u celini urađena u Institut za patologiju i Institutu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Istraživanja u sklopu ove disertacije predstavljaju deo integralnih aktivnosti planiranih i sprovedenih u okviru dva projekta: projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja republike Srbije „Molekulski prognostički markeri i epigenetska kontrola u tumorima kože i regije glave i vrata“ (projekat br. 175026) i projekta “MedSAP Research Network” sponzorisanog od strane ambasade Sjedinjenih Američkih Država u Beogradu (broj SRB100-15-GR-355).

ZAHVALNICA

Tokom izrade ove disertacije sam naučila da su za dobro istraživanje u medicini neophodni timski rad, istrajnost, strpljenje i optimizam. Nailazeći na mnoge prepreke i poteškoće tokom istraživanja naučila sam da tražim pomoć kolega, ali i da je prihvatim onda kada mi je potrebna.

Hvala mom mentoru, prof. dr Dimitriju Brašancu, koji mi je pružio priliku da se bavim naučno-istraživačkim radom u patologiji još u studentskim danima. Sloboda koju mi je dao da samostalno kreiram i uz njegovu pomoć sprovedem do kraja ovo istraživanje je najveći poklon koji jedan mentor može dati svom doktorandu.

Zahvaljujem se prof. dr Jasmini Marković-Lipkovski, doc. dr Milici Labudović-Borović i doc. dr Neli Puškaš koje su mi nesebično omogućile uslove da sprovedem istraživanje do kraja i koje su mi davale korisne sugestije tokom izrade ove disertacije.

Veliko hvala mojoj kolegini i velikom prijatelju dr sci. med. Sanji Ćirović koja me je uvela u čarobni svet laboratorijskih istraživanja, bila oslonac i optimista u teškim trenucima i radovala se svakom mom uspehu zajedno sa mnom.

Zahvaljujem se i dr Jeleni Stojković-Filipović, dr Ivanu Zaletelu, molekularnom biologu Nedi Drndarević, mom studentu Marku Baroviću i Danici Radojičić na vremenu koje su izdvojili da mi pomognu kada mi je to bilo potrebno.

Na kraju, beskrajnu zahvalnost dugujem mojim roditeljima, Božani i Milošu, i sestri Gorani koji su me naučili da budem vredna i istrajna i da probleme sagledavam iz više uglova. Hvala vam na podršci i ljubavi koju ste mi dali u teškim, kao i u trenucima radosti.

EKSPRESIJA PROTEINA VISOKE MOBILNOSTI GRUPE A (HMGA) I NJIHOVIH MODULATORA U KERATINOCITNOJ INTRAEPIDERMALNOJ NEOPLAZIJI I INVAZIVNOM PLANOCELULARNOM KARCINOMU KOŽE

REZIME:

Uvod: Skvamocelularni karcinom kože (engl. Squamous cell carcinoma, SCC) je drugi najčešći maligni tumor kože. Solarna tj. aktinična keratoza (AK) i in situ SCC, odnosno Bowen-ova bolest (engl. Bowen's disease, BD) predstavljaju intraepidermalnu proliferaciju neoplastičnih / displastičnih keratinocita. Iako bi AK, BD i SCC mogli predstavljati različite stadijume iste bolesti samo mali broj AK progredira u SCC. Molekularni mehanizmi ove progresije nisu u potpunosti razjašnjeni. Proteini visoke mobilnosti grupe A1a/1b i A2 (High mobility group protein A1a/1b i A2, HMGA1a/1b i HMGA2) i njihovi modulatori protein arginin metiltransferaze (PRMT1 i PRMT6), p300 i p300/CBP udruženi faktor (p300/CBP associated factor, PCAF) imaju ulogu transkripcionih faktora i posttranslacionih modulatora, te bi mogli imati ulogu u kancerogenezi epidermalnih tumora.

Ciljevi: Cilj studije bio je da se utvrde razlike u ekspresiji HMGA1a/1b i HMGA2 proteina i njihovih modulatora PRMT1, PRMT6, p300 i PCAF između AK, BD i SCC, u in situ lezijama klasifikovanim kao keratinocitna intraepidermalna neoplazija (KIN), kao i u odnosu na prognostičke parametre SCC kože (dimenzije, debljina, dubina invazije i gradus tumora).

Materijal i metode: Istraživanje je sprovedeno na 90 AK, 50 BD i 167 slučajeva SCC kože, među kojima je bilo 57 dobro, 55 srednje i 55 slabo diferentovanih tumora. Ekspresija HMGA1a/1b, HMGA2, PRMT1, PRMT6, p300 i PCAF proteina je ispitivana imunohistohemijski. Analizirani su broj pozitivnih ćelija tj. obim ekspresije (semikvantitativno) i distribucija imunopozitivnosti.

Rezultati: Ekspresija HMGA1a/1b je češće bila prisutna u SCC nego u AK i BD, kao i u dobro i srednje diferentovanim SCC. U najvećem broju ispitanih slučajeva obim ekspresije je bio nizak, te nije postojala razlika između AK, BD i SCC, kao ni u odnosu na gradus KIN lezija i prognostičke parametre SCC kože.

Nizak obim HMGA2 ekspresije je bio češći u AK i BD nego u SCC, dok je difuzna distribucija pozitivnih ćelija bila češća u SCC nego u AK i BD. Nizak obim je bio češći u KIN1 nego u KIN2 i KIN3 lezijama, dok je difuzna distribucija je bila češća u KIN1 i KIN3 nego u KIN2. Difuzna distribucija HMGA2 ekspresije je bila češća u slabo diferentovanim tumorima, dok nije bilo razlike u obimu ekspresije u odnosu prognostičke parametre SCC kože.

Ekspresija PRMT1 u BD i SCC je bila visoka i difuzna u poređenju sa AK. Obim PRMT1 ekspresije nije bio udružen sa prognostičkim parametrima SCC kože, dok je difuzna distribucija je bila odlika srednje i slabo diferentovanih tumora. Ekspresija PRMT6 je uglavnom bila umerena i visoka u AK, BD i SCC. Difuzna distribucija je bila češća u BD nego u AK ili SCC. Visoka ekspresija PRMT6 je bila karakteristika slabo diferentovanih SCC, a difuzna distribucija imunopozitivnosti, kao dominantan obrazac, uočena je u srednje i slabo diferentovanim SCC, kao i tumorima debljim od 6 mm.

Jedarna ekspresija p300 je bila viša u SCC nego u AK i BD, dok je citoplazmatska ekspresija bila češće odsutna. Difuzna jedarna ekspresija p300 je bila češća u BD i SCC nego u AK, kao i u srednje i slabo diferentovanim SCC kože, tumorima debljim od 6 mm i sa invazijom potkožnog masnog tkiva i dubljih struktura. Gubitak jedarne ekspresije PCAF je bio češći u SCC kože nego u AK i BD. Citoplazmatska ekspresija PCAF je bila prisutna u većini AK, BD i SCC, ali je njena distribucija bila difuzna u BD i SCC u poređenju sa AK, kao i u slabo diferentovanim u poređenju sa dobro i srednje diferentovanim SCC kože. Ekspresija PCAF nije bila povezana sa dijametrom, debljinom i dubinom invazije SCC kože.

Prisustvo ekspresije HMGA1a/1b i njeno povišena ekspresija su bili udruženi sa visokom ekspresijom PRMT1 u SCC kože, ali ne i u AK i BD. Ekspresija HMGA1a/1b

nije bila udružena sa ekspresijom PRMT6 i p300 u AK, BD i SCC kože. Umerena, a naročito visoka ekspresija HMGA2 su bile udružene sa visokom ekspresijom p300 u AK, ali ne i BD i SCC.

Zaključak: Rezultati našeg istraživanja ukazuju da bi povišena jedarna ekspresija HMGA1a/1b, HMGA2, PRMT1, PRMT6 i p300, kao i gubitka jedarne i prisustvo citoplazmatske ekspresije PCAF mogle imati ulogu u nastanku invazivnog SCC kože. Naši rezultati ukazuju i na nešto manji značaj ovih proteina u progresiji SCC kože. Jedarna ekspresija HMGA2, PRMT1, PRMT6 i p300, kao i citoplazmatska ekspresije PCAF bi mogle imati značaj u dediferencijaciji tumora, dok je p300 povezan i sa drugim parametrima progresije (debljinom i dubinom invazije) SCC kože. Udružena ekspresija HMGA2 i p300 bi mogla imati ulogu u nastanku invazivnog SCC kože, a udružena ekspresija HMGA1a/1b i PRMT1 u njenoj progresiji. Dalja molekularno-genetska istraživanja na kulturama tumorskih ćelija i životinjskim ksenograft modelima mogu da pomognu u rasvetljavanju uloge i potencijalne povezanosti ovih proteina u nastanku i progresiji SCC kože.

Ključne Reči: solarna keratoza; planocelularni karcinom kože; proteini visoke mobilnosti grupe A; PRMT; p300; PCAF.

Naučna oblast: Molekularna medicina; patologija.

Uža naučna oblast: Dermatopatologija.

EXPRESSION OF HIGH MOBILITY GROUP A (HMGA) PROTEINS AND THEIR MODULATORS IN KERATINOCYTIC INTRAEPIDERMAL NEOPLASIA AND INVASIVE SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE SKIN

ABSTRACT:

Introduction: Cutaneous squamous cell carcinoma (SCC) is the second most common malignant cutaneous tumour. Actinic keratosis (AK) and in situ SCC (also known as Bowen's disease, BD) represent intraepidermal proliferation of neoplastic / dysplastic keratinocytes. Although AK, BD and SCC could represent different stages of the same disease, only small number of AK will progress to SCC. Molecular mechanisms of this progression are not fully understood. High mobility group Aa/1b and A2 proteins (HMGA1a/1b and HMGA2), as well as their modulators protein arginin methyltransferases (PRMT1 and PRMT6), p300 and p300/CBP associated factor (PCAF) act as transcriptional factors and posttranslational modulators. Thus they could play important role in cancerogenesis of epidermal tumors.

Aims: The aim of study was to evaluate differences in expression of HMGA1a/1b and HMGA2 proteins and their modulators PRMT1, PRMT6, p300 and PCAF between AK, BD and SCC, in situ lesions classified as keratinocytic intraepidermal neoplasia (KIN), as well as in relation to prognostic parameters of cutaneous SCC (tumor diameter, thickness, level of invasion and its differentiation).

Material and methods: In this study, 90 AK, 50 BD and 167 cases of cutaneous SCC, among which 57 well, 55 moderately and 55 poorly differentiated tumors, were included. Expression of HMGA1a/1b, HMGA2, PRMT1, PRMT6, p300 and PCAF proteins was evaluated using immunohistochemical means. Number of positive cells (level of immunopositivity, evaluated in a semiquantitative manner) and distribution of positive cells were examined.

Results: HMGA1a/1b expression was often present in SCC compared to AK and BD, as well as in well- and moderately differentiated SCC. In most of the cases level of

expression was low, and no difference was between AK, BD and SCC. Also, no relation was found with different KIN lesions or prognostic parameters of cutaneous SCC.

Low level of HMGA2 expression was frequent in AK and BD compared to SCC, where diffuse distributions were frequently found. Low expression was frequent in KIN1 compared to KIN2 and KIN3, but diffuse pattern was often present in KIN1 and KIN3. Diffuse pattern was also often in poorly differentiated tumors, while no differences in the level of expression were found in relation to prognostic parameters of cutaneous SCC.

PRMT1 expression in BD and SCC was found to be high and diffuse compared to AK. The level of PRMT1 expression was not associated with SCC prognostic parameters. Diffuse distribution pattern was frequent in moderately and poorly differentiated tumors. PRMT6 expression was mostly moderate and high in AK, BD and SCC. Diffuse distribution pattern was characteristic of BD rather than AK or SCC. High expression of PRMT6 was associated with poorly differentiated SCC. Diffuse distribution was dominant pattern of PRMT6 expression in moderately and poorly differentiated tumors, and in SCC thicker than 6 mm ($p=0.020$).

The level of p300 nuclear expression was higher in SCC than in AK and BD, while cytoplasmic expression was often absent. Diffuse nuclear expression of p300 was often in BD and SCC compared to AK, as well as in moderately- and poorly differentiated SCC, tumors thicker than 6 mm, and in SCC that invaded subcutaneous fat tissue or deeper tissues. Loss of nuclear expression of PCAF was more frequent in SCC than in AK and BD. Cytoplasmic expression of PCAF was present in most of AK, BD and SCC, but its distribution was often diffuse in BD and SCC compared to AK, likewise it was in poorly differentiated SCC compared to well- and moderately differentiated tumors. PCAF expression was not associated with SCC diameter, its thickness or level of invasion.

Presence of HMGA1/a/1b expression and its high expression were associated with high expression of PRMT1 in SCC, but not in AK and BD. HMGA1a/1b expression was not associated with the expression of PRMT6 and p300 in AK, BD or SCC. Moderate and

especially high expression of HMGA2 was associated with high expression of p300 in AK, but not BD or SCC.

Conclusion: The results of our research suggest that increased expression of HMGA1a/1b, HMGA2, PRMT1, PRMT6 and p300, as well as loss of nuclear and gain of cytoplasmic PCAF expression could play an important role in the development of invasive SCC of the skin. Our results imply their somewhat less important role in the progression of cutaneous SCC. Nuclear expression of HMGA2, PRMT1, PRMT6 and p300, and cytoplasmic expression of PCAF could be important in the process of dedifferentiation in SCC, while p300 is associated with other parameters of SCC progression (thickness and the level of invasion). Co-expression of HMGA2 and p300 could play important role in the development of invasive SCC, while co-expression of HMGA1a/1b and PRMT1 could be important for its progression. Further molecular and genetic studies on cell cultures and animal xenograft models could help to elucidate potential role and mutual relationship of these proteins in the development and the progression of cutaneous SCC.

Keywords: actinic keratosis; squamous cell carcinoma of the skin; HMGA; PRMT; p300; PCAF.

Scientific field: Molecular medicine; Pathology.

Special scientific field: Dermatopathology.

Sadržaj:

1	UVOD	1
1.1	Kliničke i histopatološke karakterisitke aktinične keratoze	1
1.1.1	Keratinocitna intraepidermalna neoplazija	3
1.2	Kliničke i histopatološke karakterisitke planocelularnog karcinoma kože	4
1.3	Klinički tok i terapija kod pacijenata sa AK i SCC	6
1.4	Molekulsko-patološke odlike aktinične keratoze i planocelularnog karcinoma kože	9
1.5	Struktura hromatina i epigenetska regulacija transkripcije gena	10
1.6	HMGA familija protein	12
1.6.1	Mehanizam dejstva HMGA proteina	13
1.6.2	Regulacija transkripcije HMGA gena i posttranslacione modifikacije HMGA proteina	14
1.6.3	Uloga HMGA proteina u razvoju tkiva i organa	16
1.6.4	Uloga HMGA proteina u kancerogenezi i ekspresija u humanim tumorima	17
1.6.5	Dijagnostički značaj HMGA1 i HMGA2	21
1.7	Protein arginin metiltransferaze	22
1.7.1	PRTM1	24
1.7.2	PRTM6	26
1.8	Acetil-transferaze p300 i PCAF	27
2	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	29
3	MATERIJAL I METODE	30
3.1	Uzorak	30

3.2 Tkivni mikroniz	30
3.3 Imunohistohemijsko bojenje	31
3.4 Analiza imunohistohemijskog bojenja	34
3.4.1 Analiza HMGA1a/1b imunohistohemijskog bojenja	34
3.4.2 Analiza HMGA2 imunohistohemijskog bojenja	35
3.4.3 Analiza PRMT1 imunohistohemijskog bojenja	35
3.4.4 Analiza PRMT6 imunohistohemijskog bojenja	35
3.4.5 Analiza p300 imunohistohemijskog bojenja	36
3.4.6 Analiza PCAF imunohistohemijskog bojenja	36
3.4.7 Analiza E-kaderin, MMP9 i vimentin imunohistohemijskog bojenja	36
3.5 Dvostruko imunofluorescentno bojenje	37
3.6 Statistička analiza	38
4 REZULTATI	39
4.1 Ekspresija HMGA proteina	39
4.1.1 Ekspresija HMGA1a/1b proteina	39
4.1.2 Ekspresija HMGA2 proteina	42
4.2 Ekspresija PRMT proteina	45
4.2.1 Ekspresija PRMT1	45
4.2.2 Ekspresija PRMT6	48
4.3 Ekspresija acetil transferaza p300 i PCAF	52
4.3.1 Ekspresija p300	52
4.3.2 Ekspresija PCAF	56
4.4 Uporedna analiza ekspresije HMGA proteina i njihovih regulatora	60

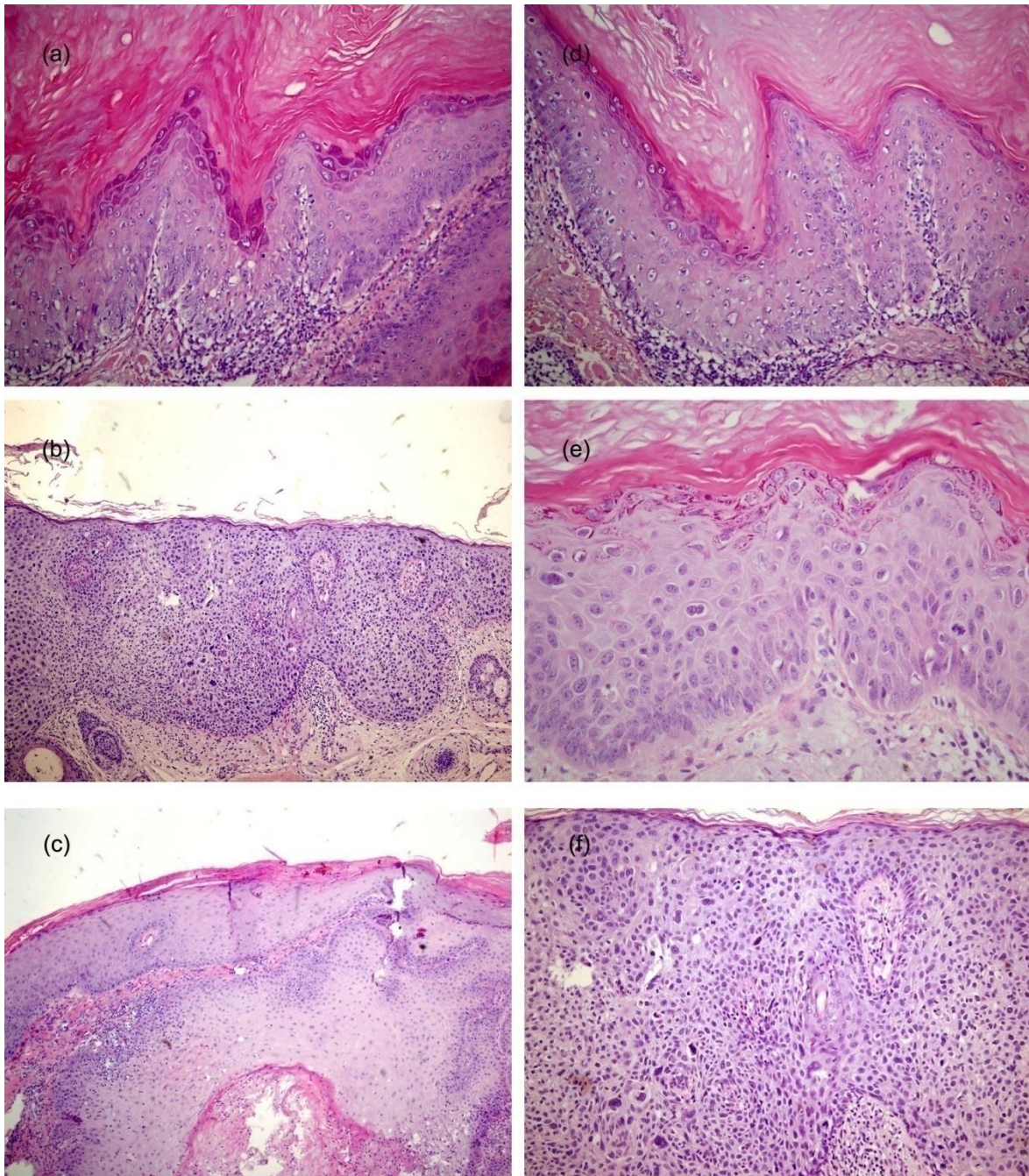
4.4.1	Uporedna analiza ekspresije HMGA1a/1b i PRMT1	60
4.4.2	Uporedna analiza ekspresije HMGA1a/1b i PRMT6	63
4.4.3	Uporedna analiza ekspresije HMGA1a/1b i p300	64
4.4.4	Uporedna analiza ekspresije HMGA2 i p300	64
5	DISKUSIJA	66
6	ZAKLJUČCI	76
7	LITERATURA	79

1 UVOD

1.1 Kliničke i histopatološke karakteristike aktinične keratoze

Aktinična keratoza (AK) je tumorska lezija kože koja predstavlja početnu fazu u razvoju planocelularnog karcinoma (engl. squamous cell carcinoma, SCC) kože (1). Učestalost AK je dvostruko veća kod muškaraca nego kod žena mlađih od 50 godina, ali je kod starijih učestalost među polovima skoro izjednačena (2). Pojava AK je češća kod starijih osoba; čak 80% osoba starijih od 70 godina ima AK (2). AK su često multiple promene, veličine do 1 cm, lokalizovane obično na delovima kože izloženim suncu (lice, dorzum šake, ramena, poglavina kod ćelavih) (3). AK može imati izgled eritematozne makule ili papule, ređe plaka, sa telangiektazijama ili adherentnom skvamom na površini (3). Klinički nalaz je često identičan kao u SCC, te je biopsija neophodna za histopatološku potvrdu prirode lezije (3).

Histološki izgled AK je obično jasan (Slika 1a.). Epidermis može biti normalne debljine, zadebljao (akantotičan) ili atrofičan, sa manje ili više izraženom parakeratozom i hipogranulozom. Ćelijska atipija se karakteriše uvećanjem ćelija, prisustvom vezikuloznih ili hiperhromatičnih jedara, poremećajem polarnosti jedara i povećanjem jedarno-citoplazmatskog odnosa. Ćelijska atipija je inicijalno prisutna u bazalnom sloju epiderma, a potom zahvata i više slojeve. Ukoliko je prisutna celom debljinom epiderma, takva lezija se naziva planocelularnim karcinomom in situ tj. Bowen-ovom bolešću (engl. Bowen's disease, skr. BD) (Slika 1b.) (4). Dermis je i u AK i BD izmenjen u smislu varijabilnog prisustva solarne elastoze i inflamatornog infiltrata sačinjenog od limfocita i histiocita, ređe plazmocita (4). Opisano je sedam glavnih histoloških tipova AK (hipertrofični, atrofični, bovenoidni, akantolitični, proliferativni, lihenoidni i pigmentovani tip), ali određivanje tipa AK nema klinički značaj (3). Pored klasičnog histološkog izgleda postoje i svetloćelijska, pagetoidna i pigmentovana varijanta, za koje je neophodna imunohistohemijska potvrda(5)



Slika 1. Histološki izgled AK (a), BD (b) i SCC (c), kao i različitog stepena keratinocitne intraepidermalne neoplazije KIN1 (d), KIN2 (e) i KIN3 (f).

1.1.1 Keratinocitna intraepidermalna neoplazija

Aktinična keratoza je ranije smatrana prekanceroznom ili premalignom lezijom kože, iako se ćelije SCC i AK ne mogu razlikovati histološki. Kako u biološkom i genetskom smislu AK i SCC predstavljaju delove spektra jedne iste bolesti, Cockerell je predložio novu nomenklaturu za AK i BD i reklasifikaciju u tri gradusa keratinocitne intraepidermalne neoplazije (KIN1-3), analogno cervikalnoj intraepitelnoj neoplaziji (CIN) (Tabela1, Slika 1d-f) (1). Nedostatak ovako predložene klasifikacije jeste što, pored histoloških kriterijuma, zahteva primenu i kliničkih kriterijuma, koji nisu uvek dostupni patologu (6). Takođe, drugi istraživači smatraju da prelaz iz KIN1 u invazivni SCC kože nije nužno postepen i da se ne odvija uvek preko KIN2 i KIN3. Naime, uočeni su slučajevi lezija sa jasnom invazijom derma tumorskim ćelijama, a da istovremeno nije postojala ćelijska atipija celom debljinom epidermisa (4).

Tabela 1. Kriterijumi za gradiranje keratinocitne intraepidermalne neoplazije

Kriterijumi		
Gradus	Klinički	Histološki kriterijumi
I	Ravna, ružičasta makula na solarno oštećenoj koži, bez neravnina i hiperkeratoze	Fokalna atipija bazalnih keratinocita donje trećine epidermisa Fokalna atipija keratinocita najmanje dve donje trećine epidermisa; fokalna hiperkeratoza, naizmenična orto- i parakeratoza uz adneksalnih struktura; naglašena akantoza i protruzije keratinocita u gornji deo papilarnog dermisa; prisustvo mitozu i u suprabazalnim slojevima epidermisa
II	Ružičasta do crvena papula ili plak, varijabilno indurirana, sa hiperkeratozom na površini	Difuzna proliferacija atipičnih keratinocita celom debljinom epidermisa; Parakeratoza, akantoza, papilomatoza; Zahvatanje adneksalnih struktura
III	Crveni indurirani plak sa skvamom na površini nastao na koži oštećenoj suncem; može biti pigmentovana	

1.2 Kliničke i histopatološke karakteristike planocelularnog karcinoma kože

Broj novoprijavljenih slučajeva SCC kože varira u različitim delovima sveta od 8,9 / 100 000 stanovnika u Hrvatskoj do čak 1000-2000 /do 100 000 stanovnika u Australiji (7,8). Ovakve razlike se objašnjavaju različitim stilovima života, izloženosti različitim dozama UV zračenja usled različite geografske pozicije i stepena oštećenja ozonskog omotača, ali i usled različite efikasnosti u vođenju tumorskih registara (7,8). SCC kože je i do pet puta češći kod muškaraca nego kod žena (7). Ovaj tumor je češći kod osoba starijih od 60 godina, a naročito starijih od 80 godina, dok se retko javlja kod mlađih od 45 godina (8,9). Kutani SCC je, kao i AK, najčešće lokalizovan na područjima kože izloženim suncu (lice, pogravina, dorzumi šaka) (8), ali i na područjima hroničnih ulceracija, opekotina, infekcije humanim papiloma virusom (HPV) i hroničnog izlaganja hemijskim kancerogenima (arsen, duvan, psoralen) (7). Klinički izgled SCC kože je varijabilan. On može imati izgled induriranih papula ili plakova sa skvamom na površini, ali i biti i razmekšan, ulcerisan, pa čak i hemoragičnog izgleda. Veličina tumora može biti manja od 1 cm, ali i veća od 5 cm (10).

Patohistološka dijagnoza se obično postavlja uobičajenim hematoksilin-eozin bojenjem (Slika 1c), a ređe su potrebne dodatne imunohistohemijske analize. Tumor je sačinjen od plaža atipičnih keratinocita koje infiltruju dermis ili dublja tkiva (8). Pored klasične varijante SCC postoje i posebni histološki tipovi (verukozni, vretenastoćelijski, dezmozoplastični, adenoskvamozni i akantolitički tip), ali za razliku od AK, određivanje histološkog tipa ima klinički značaj. Naime, verukozni karcinom ima nizak metastatski potencijal, dok poslednja četiri tipa imaju značajno veći rizik za nastanak recidiva i metastaza (4,8). Stepent diferentovanosti tj. gradus SCC se određuje po najslabije diferentovanoj komponenti tumora (11). TNM stadijum SCC kože se određuje prema 7-om izdanju Američkog Udruženog komiteta za rak (engl. American Joint Committee on Cancer, AJCC) iz 2010. godine (Tabele 2-3) (12). Elementi na osnovu kojih se određuje pT stadijum su dimenzija i debljina tumora, dubina invazije, prisustvo invazije koštanih struktura i nerava, prisustvo slabo- ili nediferentovanog tumora, kao i posebne lokalizacije tumora (uho i usna). Međutim, ova klasifikacija je kritikovana od strane pojedinih

dermatologa i patologa da nije dovoljno dobra u smislu predviđanja ishoda i prognoze, te su predložene njene izmene kojima bi se klasifikacija vršila prema stepenu rizika za nastanak metastaza (Tabela 4.) (13,14).

Tabela 2. TNM klasifikacija stadijuma SCC kože prema 7. izdanju AJCC iz 2010.

TNM klasifikacija	Kriterijumi
T stadijum	
Tx	Primarni tumor se ne može odrediti
T0	Nema dokaza o postojanju primarnog tumora
Tis	Karcinom in situ
T1	Širina tumora u najvećem horizontalnom dijametru ≤ 2 cm + 0-1 faktor rizika*
T2	Širina tumora u najvećem horizontalnom dijametru ≤ 2 cm + 2-5 faktora rizika ILI Širina tumora u najvećem horizontalnom dijametru > 2 cm
T3	Infiltracija kostiju lica ili lobanje
T4	Infiltracija kostiju skeleta ili baze lobanje
N stadijum	
Nx	Regionalni limfni čvorovi se ne mogu odrediti
N0	Nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
N1	Solitarna, ipsilateralna metastaza u limfnom čvoru, maksimalnog promera ≤ 3 cm
N2a	Solitarna, ipsilateralna metastaza u limfnom čvoru, maksimalnog promera > 3 cm do maksimalno 6 cm
N2b	Multiple, ipsilateralne metastaze u limfnom čvoru, sveukupnog dijametra ≤ 6 cm
N2c	Multiple, bilateralne ili kontralateralne metastaze u limfnom čvoru, sveukupnog dijametra ≤ 6 cm
N3	Metastaze u limfnom čvoru, dijametar > 6 cm
M stadijum	
M0	Nema udaljenih metastaza
M1	Prisustvo udaljenih metastaza

*Faktori rizika uključuju debljinu tumora (> 2 mm), invazija retikularnog dermisa i dubljih struktura, prisustvo perineuralne invazije, posebne lokalizacije (usna, ušna školjka), stepen diferencijacije (slabo- i nediferentovani tumori)

Tabela 3. Kriterijumi za određivanje opšteg kliničkog stadijuma SCC kože

Stadijum	T	N	M
0	In situ	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0 ili N1	M0
	T1 ili T2	N1	M0
IV	T1, T2 ili T3	N2	M0
	Bilo koji T	N3	M0
	T4	Bilo koji N	M0
	Bilo koji T	Bilo koji N	M1

Tabela 4. Predložene izmene AJCC klasifikacije

Podela rizika	Kriterijumi
cT	
Nizak rizik	Širina tumora u najvećem horizontalnom dijametru ≤ 2 cm
Visok rizik	Širina tumora u najvećem horizontalnom dijametru > 2 cm
pT	
Bez rizika	Debljina tumora ≤ 2 mm
Nizak rizik	Debljina tumora > 2 mm i ≤ 6 mm
Visok rizik	Debljina tumora > 6 mm
Dodatni faktori visokog rizika	Imunosupresija Dezmoplastični ili slabo diferentovani tip Lokalizacija na ušnoj školjci

1.3 Klinički tok i terapija kod pacijenata sa AK i SCC

Mali broj AK pređe u invazivni SCC. Godišnji rizik kod pacijenata kod kojih prethodno ne postoji podatak o nemelanomskim malignim tumorima kože (engl. non-melanoma skin cancer, NMSC) je 0,075%, dok je taj rizik nešto veći, 0,89%, kod pacijenata sa već ranije dijagnostikovanim NMSC (15). AK može da regredira u 18 do čak 74% (u zavisnosti od perioda praćenja) uz smanjenje izloženosti UV zračenju. Ipak, 15-53% takvih AK će recidivirati (15). Studije koje su ispitivale uticaj zaštite od sunca su pokazale da se broj AK može smanjiti uz adekvatne mere zaštite, dok se u suprotnom njihov broj povećava (15).

Prognoza kod pacijenata sa kutanim SCC je odlična u poređenju sa SCC drugih lokalizacija. Recidivi nastaju u 4,6% pacijenata u periodu od 10 godina, nodalne metastaze u 3,7%, a 2,1% pacijenata umre (8). Najveći broj recidiva (65%) nastaje u toku prve godine od operacije, a nakon šest godina nema pojave recidiva (12). Rizik za nastanak recidiva i nodalnih metastaza je veći ukoliko tumor nije hirurški adekvatno uklonjen (8). Pored toga, 30-50% pacijenata u narednih pet godina dobije SCC kože na drugoj lokalizaciji. SCC kože ima nizak metastatski potencijal; rizik je 3-5% tokom perioda od pet godina (8). Pojava metastaza je češća kod pacijenata sa sledećim kliničkim i histološkim faktorima rizika:

- dijametar tumora >2 cm - u 9% pacijenata nastaju metastaze
- debljina tumora >6 mm - u 16% pacijenata nastaju metastaze
- prisustvo nediferentovanog ili dezmoplastičnog tipa - u 7-12% pacijenata nastaju metastaze
- prisustvo perineuralne invazije – u 35% pacijenata nastaju nodalne metastaze, a u 15% udaljene metastaze
- lokalizacija na usni (5%) ili uhu (10%)
- imunosupresija – rizik za nastanak metastaza je 5-10 puta veći (8,16).

Postoji nekoliko vidova terapije AK. Kiretaža i elektrokoagulacija dovode do termalnog oštećenja i ožiljavanja, te ne predstavljaju najbolji izbor. Kriohirurgija je najčešće korišćena i naročito pogodna za retke i dobro ograničene promene, dok je dermoabrazija najpogodnija u tretmanu multiplih AK. Hirurška ekscizija se preporučuje samo u onim slučajevima kada AK ima izgled čvrste, keratinizovane papule ili postoji sumnja na invaziju dermisa. laserski tretman je naročito pogodan u slučajevima AK koje se nisu povukle nakon drugih vidova terapije ili kod AK na licu (3). Farmakoterapijski tretmani mogu biti topikalni čiji je cilj hemijsko oštećenje kože ili stimulacija imunskog odgovora (primena 5-Fluorouracila, Imikvimoda, kombinacije doklofenaka i hijaluronske kiseline, hemijskih pilinga sačinjenih od tri-hlor-sirćetne kiseline, alfa-hidroksi-kiselina i fenola). Primena retinoida je moguća topikalno ili peroralno, često u kombinaciji sa drugim vidovima terapije. Najsavremeniji vid terapije je fotodinamska terapija, koja podrazumeva

primenu topikalnog leka i selektivnog zračenja lezije svetlošću talasne dužine 600-700 nm(3).

Za razliku od terapije AK prva metoda terapije SCC kože jeste hirurška ekscizija, standardna ili Mohs mikrografska (8). Standardna hirurška ekscizija se izvodi sa minimalnom resekcionom marginom od 5 mm i zahvatanjem samo potkožnog masnog tkiva (pod uslovom da dublja tkiva nisu infiltrisana). Preporučena širina resekcionih margina zavisi od debljine tumora (Tabela 5.), te se dalje u terapijskom toku razmatra dodatna hirurška ekscizija ili primena drugih terapijskih modaliteta (8). Mohs mikrografska hirurška ekscizija podrazumeva intraoperativnu mikroskopsku evaluaciju svežih smrznutih preseka, sa ciljem što veće poštode tkiva. Ovakav vid terapije zahteva visoko obučene stručnjake, ali ne daje značajno bolje rezultate u smislu pojave recidiva i metastaza u odnosu na standardni vid hirurške ekscizije. Ona se preporučuje u onim regijama gde bi široka ekscizija izazvala veće estetske i funkcionalne defekte (centralni deo lica, usne, uši) (8).

Tabela 5. Preporučena širina resekcionih margina u hirurškoj eksciziji SCC kože

Nivo rizika	Debljina tumora	Širina resekcionih margina
Minimalan	≤2 mm	5 mm
Nizak	2.01-6 mm	5-10 mm*
Visok	>6 mm	10mm

*Ukoliko posotji prisustvo dodatnih faktora rizika (dimenzije tumora >2 cm, visok histološki gradus, lokalizacija na usni ili uhu, prisustvo perineuralne invazije, recidiva ili imunosupresije) tretira se kao da je tumor visokog rizika

Zračna terapija ima ulogu u tretmanu inoperabilnih tumora (samostalno ili kao adjuvantna terapija) i velikih tumora na specifičnim regijama (lice) (8). Stavovi koji se tiču biopsije stražarskih (sentinel) limfnih čvorova kod pacijenata sa SCC kože nisu još uvek usaglašeni. Kod pacijenata sa tumorom u T1 stadijumu se takve metastaze obično ne nalaze, ali kod pacijenata u T4 stadijumu one su prisutne i u do 60% slučajeva (8). Lokalno uznapredovala i metastatska bolest može se tretirati hirurški (u slučaju metastaza u prolazu - in transit metastaze), zračnom terapijom (u cilju smanjenja bola ili zaustavljanja krvarenja) ili hemioterapijski (najčešće kombinovanom primenom derivata platine, 5-

fluorouracila, velomicina, metotreksata ili drugih lekova). Međutim, ne postoje jasni hemioterapijski protokoli za lečenje ovakvih pacijenata. U novije vreme primenjuju se inhibitori receptora za epidermalni faktor rasta (engl. Epidermal growth factor receptor, EGFR) kakav je cetuksimab. Do sada nije bilo randomizovanih kliničkih studija primene ovih lekova kod pacijenata sa metastazama SCC kože, za razliku od SCC drugih lokalizacija (8).

Pacijenti sa dijagnostikovanim SCC kože se dalje moraju kontrolisati. Pregled cele kože je neophodno sprovesti jednom godišnje. Kod pacijenata sa faktorima rizika palpacija mesta ekscizije primarnog tumora i regionalnih limfnih nodusa se vrši na svaka tri meseca u prve dve godine, zatim na šest meseci u toku tri godine, a potom jednom godišnje. U slučaju uznapredovale lokoregionalne bolesti, obavezan je ultrazvučni pregled drenirajućih limfnih čvorova svaka tri meseca (8).

1.4 Molekulsko-patološke odlike aktinične keratoze i planocelularnog karcinoma kože

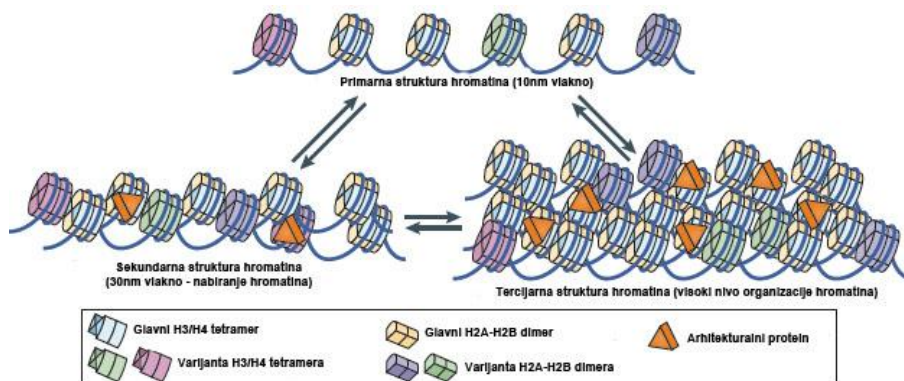
AK se odlikuje manje kompleksnim promenama kariotipa nego SCC(17), ali su studije genske ekspresije pokazale da se AK i SCC značajno razlikuju u ekspresiji svega devet gena (18). Mutacije *p53* i *H-Ras* gena su prisutne i u AK i u SCC i smatra se da predstavljaju rani događaj u kancerogenezi u koži indukovanoj UV zracima (19,20). Poremećaj funkcije *p53* i *H-Ras* proteina dovode do nestabilnosti genoma i ozbiljnih izmena regulacije ćelijskog ciklusa i disfunkcije telomera (17). Jedan od mehanizama izmenjene regulacije ćelijskog ciklusa jeste i smanjena ekspresija *p16*. Međutim, smanjena ekspresija je samo jednim delom posledica hromozomskih aberacija i delecije hromozoma 9p. Epigenetski posredovana inaktivacija *p16^{INK4}* gena je manje ispitana (17).

Nastanak invazivnog SCC omogućen je poremećajem ćelijske adhezije, sticanjem migratornog potencijala i invazivnosti tumorskih ćelija. Smanjena adhezija u SCC kože je posledica smanjene ekspresije E-kaderina, koja je u AK i BD barem delimično očuvana (21). Invazivni kapacitet tumorskih ćelija SCC je jednim delom omogućen produkcijom

enzima matriksnih metaloproteinaza (MMP), koja je u AK i BD odsutna ili vrlo niska (22,23).

1.5 Struktura hromatina i epigenetska regulacija transkripcije gena

Dezoksiribonukleinska kiselina (DNK) humanog genoma je u jedru organizovan u složen nukleoproteinski kompleks, tj. hromatin. Osnovnu jedinicu građe hromatina čini nukleozom sačinjen od 147 baznih parova DNK obmotanih oko histonskog jezgra (Slika 2). Histonsko jezgro je oktamer sačinjen od po dva molekula histona H2A, H2B, H3 i H4 (Slika 3.). Prostorni odnos histona u nukleozomu, kao i odnos više nukleozoma određuje gustinu hromatina i mogućnost transkripcije DNK (24,25). Enzimske modifikacije histona i DNK (tzv. epigenetske modifikacije) menjaju njihov prostorni odnos i regulišu ne samo transkripciju DNK, već i njenu replikaciju i popravku oštećenja (24,26). Enzimske modifikacije histona obuhvataju (de)acetilaciju, metilaciju, fosforilaciju i ubikvitinaciju, a omogućene su dejstvom velikog broja enzima na različitim reziduama aminokiselina različitih histona (Tabela 6.) (26–30).



Slika 2. Pojednostavljena šema strukture nukleozoma i hromatina (Modifikovano prema Luger K. et al. Nat Rev Mol Cell Biol 2012).

Tabela 6. Tipovi enzimskih modifikacija histona

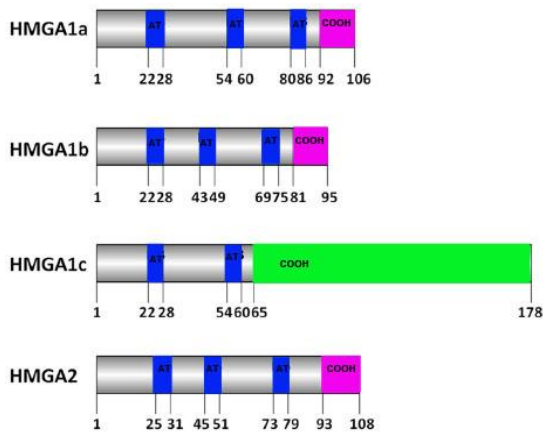
Tip modifikacije	Enzimi	Histoni i rezidue na kojima se odvija modifikacija	
(de)Acetilacija	Acetil transferaze		
	HAT1	H4 (K5, K12)	
	CBP/P300	H3 (K14, K18), H4 (K5, K8), H2A (K5), H2B (K12, K15)	
	PCAF	H3 (K9, K14, K18)	
	TIP60	H4 (K5, K8, K12, K16), H3 K14	
	HB01	H4 (K5, K8, K12)	
	Deacetilaze		
	SirT2	H4K6	
	Metilacija	Lizin-metilacija	
		SUV39H1, SUV39H2, G9a, ESET/SETDB1, EuHMTase/GLP, CLL8, SpClr4, RIZ1	H3K9
MLL1-5, SET1A, SET1B, ASH1		H3K4	
EZH2		H3K27	
SET2, NSD1, SYMD2		H3K36	
DOT1		H3K79	
Pr-SET 7/8, SUV4 20H1, SUV420H2		H4K20	
Lizin-demetilacija			
LSD1		H3K4	
JHDM1a, JHDM1b		H3K36	
JHDM2a, JHDM2b, JMJD2B, JMJD2D		H3K9	
JMJD2A/JHDM3A, JMJD2C/GASC1		H3 (K9, K36)	
Arginin-metilacija			
PRMT1		H4R3	
PRMT4/CARM1		H4R3, H3 (R2, R17, R26)	
PRMT5		H3R8, H4R3	
PRMT6		H3 (R2, R42)	
PRMT7		H2A, H4R3	
Fosforilacija		Serin/Treonin kinaze	

	Haspin	H3T3
	MSK1, MSK2	H3S28
	CKII	H4S1
	Mst1	H2BS14
Ubikvitinacija	Ubikvitilaze	
	Bmi/Ring1A	H2AK119
	RNF20/RNF40	H2BK120

Pored histona, u građi hromatina učestvuju i drugi nehistski proteini (Slika 2), koji neenzimskim, odnosno elektrostatskim interakcijama sa DNK i histonima učestvuju u regulaciji transkripcije DNK. Takvi proteini se nazivaju i arhitekturnim proteinima, a jedan deo njih čini familija proteina visoke mobilnosti grupe A (engl. High mobility group A, HMGA) (31,32). Arginin metilaze PRMT1 i PRMT6, kao i acetil-transferaze p300 i PCAF, pored enzimskih modifikacija histona, imaju i ulogu enzimskih regulatora HMGA proteina (33). Usled toga je odnos HMGA proteina, arginin metilaza i acetil transferaza u epigenetskoj kontroli genske ekspresije složen.

1.6 HMGA familija proteina

Proteini visoke mobilnosti (engl. High mobility group, HMG) su nehistski visoko fosforilisani proteini hromatina, male molekulske mase, koji se odlikuju visokom elektroforetskom pokretljivošću na poliakrilamidnim gelovima, po čemu su i dobili ime. HMG familija se sastoji od tri potfamilije sa karakterističnom funkcionalnom proteinskom sekvencom: HMGA, HMGB i HMGN (ranije nazvane HMGI/Y, HMG1/2 i HMG14/17) (31,34). *HMGA1* gen se nalazi na hromozomu 6p21, a gen *HMGA2* (ranije nazvan *HMGI/C*) na hromozomu 12q14-15. Alternativnim isecanjem *HMGA1* iRNK nastaju tri izoforme: HMGA1a (107 aminokiselina, 11,7kDa), HMGA1b (96 aminokiselina, 10,6kDa) i HMGA1c (179 aminokiselina, 19,7kDa) (slika 3). HMGA1b nastaje unutrašnjom delecijom 33 bazna para *HMGA1a* transkripta, te je za 11 aminokiselina kraći od HMGA1a, a ostatak sekvence im je identičan. HMGA1c nastaje korišćenjem nekanonskih mesta za isecanje, te sa HMGA1a ima zajedničkih samo prvih 65 aminokiselina (31,34).



Slika 3. Struktura HMGA proteina: HMGA1c ima dva DNK-vezujuća domena tj. AT-kuke (označeni plavom bojom), dok ostali imaju tri; HMGA1c ima drugačiji i značajno duži karboksi tj. COOH kraj (u HMGA1c označen zeleno, a u ostalim roza bojom). Modifikovano prema Ozturk et al. Front Cell Dev Biol 2014.

1.6.1 Mehanizam dejstva HMGA proteina

Proteini HMGA potfamilije sadrže konzervirane domene koje čini ponovljena sekvenca aminokiselina (Pro-Arg-Gly-Arg-Pro). Ovi domeni omogućavaju prepoznavanje i vezivanje za segmente bogate adeninom i timinom u kraćem navoju DNK, te se nazivaju AT-kuke (engl. AT-hooks) (Slika 4.), usled čega je ova potfamilija i dobila ime (31,34–36). Interakcijom AT-hook domena i DNK nastaju njene konformacione (alosterne) promene, koje imaju efekat na regulaciju inducibilne genske ekspresije (31,34,35). Razmak između AT-hook domena je različit među članovima familije, a sekvenca trećeg AT-hook domena se razlikuje između HMGA1a/1b i HMGA2 proteina (Slika 3) (37,38). Ovo za posledicu ima selektivnost pojedinih HMGA proteina za određene delove DNK. HMGA proteini se mogu vezivati za slobodne krajeve DNK ili iRNK usled čega učestvuju u procesu (ne)homologih rekombinacija DNK u normalnim i tumorskim ćelijama i procesu alternativnog isecanja iRNK (37). HMGA proteini imaju i svojstvo da mehanički istisnu histon H1 iz regiona hromatina u koje su regrutovani, te omoguće pristup histon-acetil-transferazama, koje potom enzimskim modifikacijama histona destabilišu jezgro nukleozoma i aktiviraju transkripciju (31). Dodatno, HMGA proteini ostvaruju interakcije sa multiproteinskim kompleksom transkripcionih faktora i AT-bogatim regionima

promotorskih regiona DNK (engl. enhanceosom), te menjaju konformaciju DNK i afinitet transkripcionih faktora za vezivanje za DNK, čime olakšavaju pristup i enzimskim transkripcionim kompleksima (37,39).

Pored regulacije transkripcije, HMGA proteini imaju bitnu ulogu i u regulaciji popravke oštećene DNK isecanjem nukleotida (engl. Nucleotid excision repair, NER) i isecanjem baza (engl. Base excision repair, BER), kao i popravke dvolančanih prekida DNK (engl. Double strand break repair, DSBR). Ova funkcija je omogućena osobinom vezivanja za deformisane delove DNK (prelomljene delove, petlje, izbočine, kao i delove sa nesparenim bazama). Prekomerna ekspresija HMGA inhibira popravku oštećenja na DNK koja nastaju dejstvom UV zračenja. Popravka ovih oštećenja NER-om je onemogućena usled otežanog pristupa enzima NER-a, ali i inhibicijom transkripcije gena tih enzima (npr. Xeroderma pigmentosum A (XPA), DNK ligaze III ili BRCA1) (36).

1.6.2 Regulacija transkripcije *HMGA* gena i posttranslacione modifikacije HMGA proteina

Struktura *HMGA* gena i regulacija njegove ekspresije su veoma složene. Usled postojanja četiri različita startna mesta za transkripciju, kao i više mesta za vezivanje različitih transkripcionih faktora (c-myc, MYCN, HIF-1, Gli, itd.), regulacija transkripcije *HMGA* gena nije dovoljno istražena (37). Pokazano je da SP1 ima ulogu u bazalnoj aktivnosti promotora *HMGA1* gena u embrionalnim ćelijama bubrega, a da mutirani Ras ima ulogu u povišenoj ekspresiji *HMGA1* u ćelijama karcinoma debelog creva (40). Ekspresija *HMGA2* proteina je regulisana pomoću miRNK let-7b, koja predstavlja represor *HMGA2* gena (38).

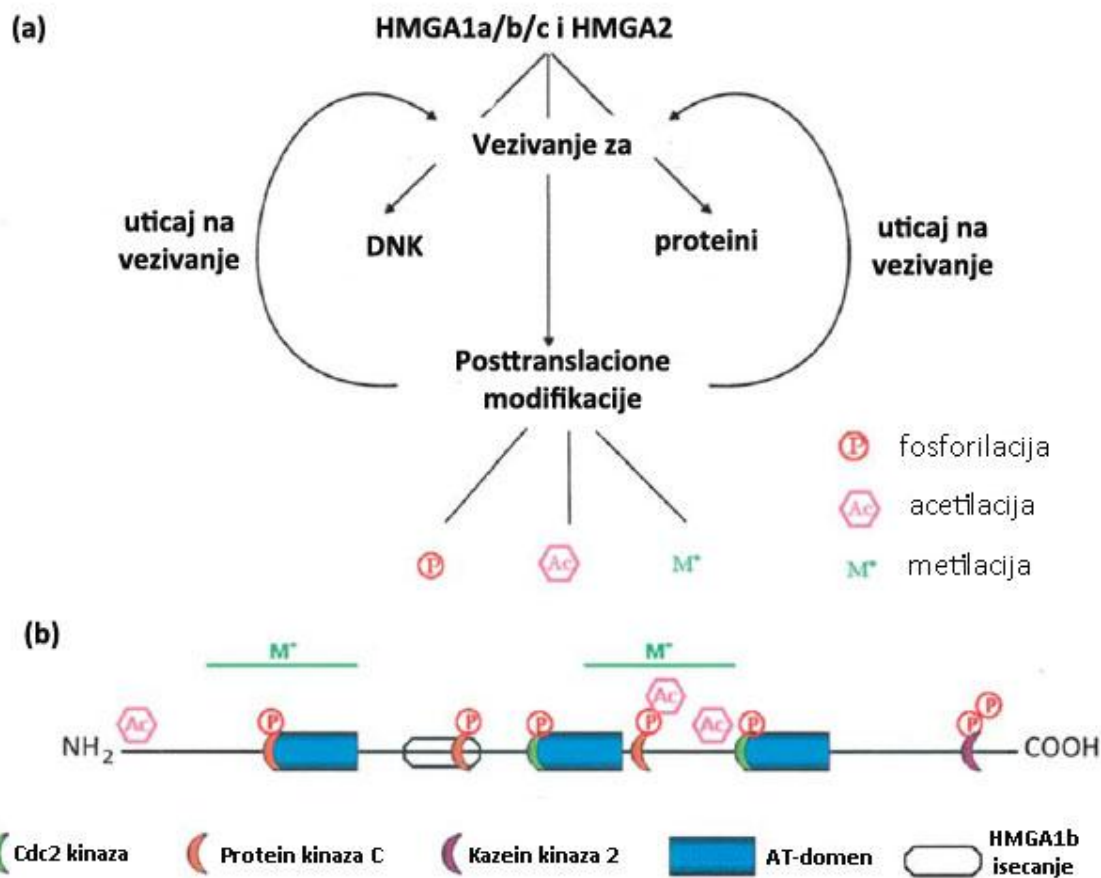
Posttranslacione modifikacije (fosforilacija, metilacija, acetilacija) predstavljaju značajan vid regulacije aktivnosti HMGA proteina (Tabela 7, Slika 4). Fosforilacija i acetilacija se odvijaju kako na AT-hook domenima, tako i na C-terminalnom domenu, dok se metilacija vrši isključivo na AT-hook domenima (33,39). Fosforilacija uglavnom ima inhibicioni efekat na vezivanje za DNK, a ostvaruje se pomoću cdc2 (engl. cell-cycle-dependent, cdc), HIPK2 (engl. homeodomain-interacting protein kinase-2), PKC (engl. protein kinase C),

ATM (ataxia-telangiectasia mutated) i Nek2 kinaza (33,39,41,42) Acetilacija HMGA1 proteina može imati dvojak efekat na transkripciju. CBP- posredovana acetilacija dovodi do destabilizacije enhanceosoma i inhibicije transkripcije INF- β gena, dok acetilacija posredovana PCAF-om stabilise enhanceosom, sprečava CBP-acetilaciju HMGA1a i aktivira transkripciju (33,39). PRMT6 posredovana metilacija se odvija na drugom AT-hook domenu HMGA1a, ali njen efekat još uvek nije jasan. Metilacija posredovana PRMT1 proteinom je pokazana u in vitro uslovima, ali njeno postojanje u humanim ćelijama nije još uvek dokazano (43,44). Pored regulatorne uloge, posttranslacione modifikacije mogu biti i konstitutivne. Takva fosforilacija HMGA proteina se odvija na C-terminalnom kraju (pomoću CK2 (engl. casein kinase 2) kinaze), a acetilacija na N-terminalnom kraju (31). Međusobni odnos HMGA proteina i p300 i PCAF je složen i višesmeran. Acetilacija HMGA1 posredovana PCAF-om stabilise enhanceosom, sprečava CBP-acetilaciju HMGA1a i aktivira transkripciju (33,39). U kulturama ćelija karcinoma pankreasa pokazano je da HMGA2 reguliše ekspresiju p300 i PCAF, kao i stepen acetilacije histona H3K9 i H3K27 (45).

Tabela 7. Tipovi posttranslacionih modifikacija HMGA proteina, enzimi i tip HMGA proteina i mesta modifikacije

Tip PTM i enzim	Tip HMGA i mesto modifikacije
Fosforilacija	
Cdc2	HMGA1a (Thr-52, Thr-77) HMGA2 (Ser-43, Ser-58)
HIPK2	HMGA1a (Ser-35, Thr-52, Thr-77)
PKC	HMGA1a (Ser-43, Ser-63)
ATM	HMGA1b (Ser-87)
Nek2	HMGA2*
Acetilacija	
CBP	HMGA1a (Lys-64)
PCAF	HMGA1a (Lys-70)
Metilacija	
PRMT6	HMGA1a (Arg-25, Arg-59)

*nije tačno identifikovano mesto modifikacije



Slika 4. Šematski prikaz tipova posttranslacionih modifikacija HMGA proteina i njihovog uticaja (a), kao i mesta na kojima se odvijaju (b). Modifikovano prema Cleynen and Van de Ven Int J Oncol 2008.

1.6.3 Uloga HMGA proteina u razvoju tkiva i organa

HMGA proteini su visoko ekspimirani u toku embriogeneze. Međutim u kasnijim fazama razvoja njihova ekspresija postaje manja. HMGA1 je prisutan samo u pojedinim organima sva tri klicina lista, dok je ekspresija HMGA2 ograničena samo na mezenhimalna tkiva. U adultnim organizmima ekspresija oba proteina je vrlo niska i smatra se da je povezana sa održavanjem stem-ćelijskog fenotipa (34,35). HMGA1 proteini u embrionalnim stem ćelijama regulišu diferencijaciju ćelija hematopoeze. Homozigotna delecija HMGA gena u ovim ćelijama dovodi do redukcije broja makrofaga, ćelija mijeloidne loze i T-limfocita, dok su razvoj megakariocitne i eritroidne loze poremećeni su smeru ranije i ubrzane

diferencijacije (46). Ekspresija HMGA1 i HMGA2 proteina je niska u spermatogonijama testisa miševa, ali je zato visoka u spermatocitama i spermatidama (u kojima je ekspresija nešto niža nego u spermatocitima). U humanom testisu jedarna ekspresija HMGA1 je ograničena na spermatogonije i primarne spermatocite, a ekspresija HMGA2 na sekundarne spermatocite (47). Homozigotna delecija HMGA2 gena kod miševa dovodi do poremećaja spermatogeneze i to ne samo u smislu bloka sazrevanja, uglavnom na nivou spermatogonija, već i poremećaja morfologije polnih ćelija u svim fazama sazrevanja (48). Ekspresija *Hmga2* iRNK u embrionima miševa od početne visoke i, uglavnom, difuzne ekspresije opada sa stadijumima razvoja, te postaje lokalizovana, uglavnom u proliferišućim tkivima (epitel žlezda u razvoju i kripta tankog creva) (49). HMGA2 nije neophodan za inicijalni razvoj pulmonalnog endoderma iz endodermalne cevi, kao ni za grananje, ali jeste za adekvatnu diferencijaciju distalnih epitelih elemenata pluća. Naime, homozigotna delecija *Hmga2* dovodi do povišene proliferacije, naročito u mezenhimu pluća embriona, te povećanja apoptoze i poremećene diferencijacije distalnog epitela (50).

1.6.4 Uloga HMGA proteina u kancerogenezi i ekspresija u humanim tumorima

HMGA1 protein je uključen u stem-ćelijsko reprogramiranje tumorskih ćelija, njihovu dediferencijaciju sa posledičnim agresivnim biološkim ponašanjem nekoliko humanih malignih tumora (gliomi, karcinomi dojke i pankreasa) (43,51–55). Na mišjim modelima je pokazano da je u hemijski indukovanim tumorima kože prisutna povišena ekspresija HMGA1a i HMGA1b proteina, kao i da ta ekspresija korelira sa stepenom ćelijske atipije i neoplastičnih promena (56). Eksperimenti na miševima koji su homozigoti ili heterozigoti za deleciju HMGA1 gena su pokazala i da je ta delecija protektivni faktor u nastanku benignih i malignih epidermalnih tumora u modelima hemijske kancerogeneze. Takođe, u istim eksperimentima je pokazano da je ekspresija HMGA2 povišena samo u malignim, ali ne i benignim indukovanim tumorima, odnosno da je indukcija ekspresije HMGA2 nastaje kasnije nego indukcija ekspresije HMGA1 u ovim modelima (57).

HMGA1 i HMGA2 imaju bitnu ulogu u nastanku i progresiji različitih tumora. Mehanizmi kojima tu ulogu ostvaruju su različiti i uključuju uticaj na kontrolu proliferacije ćelija,

indukciju fenotipa matičnih ćelija, nastanak epitelno-mezenhimne transformacije (EMT), kao i na mehanizme popravke oštećene DNK. U ćelijama karcinoma želuca HMGA1, za razliku od HMGA2, omogućava proliferaciju tumorskih ćelija. Ova funkcija HMGA1 je regulisana Wnt/ β -katenin signalnim putem, odnosno jedarnom lokalizacijom β -katenina i aktivacijom transkripcionog faktora c-myc (58). Međutim, u ćelijama trostruko-negativnih karcinoma dojke, upravo aktivacija Wnt/ β -katenin signalnog puta dovodi do ekspresije HMGA2 i proliferacije tumorskih ćelija (59). Pokazana je i inverzna korelacija ekspresije let-7 miRNK, kao generalnog represora genske ekspresije, i ekspresije HMGA1 i HMGA2 u retinoblastomima, kao (60). U seroznim karcinomima jajnika ekspresija HMGA2 je bila u pozitivnoj korelaciji sa Nestinom, kao markerom matičnih ćelija i sa kladinom-7, kao markerom EMT (61). Nastanak EMT u HMGA2 pozitivnim ćelijama karcinoma pankreasa i SCC jezika je najverovatnije posredovan pozitivnom regulacijom Snail-a (62,63). Ekspresija HMGA2 je, takođe, značajno veća u ćelijama glioblastoma koje su eksprimirale CD133 kao marker stem ćelija. HMGA2 omogućava invazivni potencijal i veći kapacitet za samoobnavljanjem ćelija glioblastoma u kulturi, ali ne utiče na proliferaciju ovih ćelija. Takođe, tumori sa većom HMGA2 ekspresijom pokazuju agresivnije biološko ponašanje na ksenograft modelima (64). U kolorektalnim karcinomima je pokazano da je ekspresija HMGA2 česta u tumorskim pupoljcima i tumorskim ćelijama u invadiranim limfnim i krvnim sudovima, čak i ako je sam tumor bio negativan. Ovakav nalaz ukazuje na značaj HMGA2 u razvoju invazivnog kapaciteta tumorskih ćelija (65). Ekspresija HMGA2 u ćelijama karcinoma debelog creva u kulturi smanjuje sposobnost popravke dvolančanih prekida DNK, usled čega je povećana osetljivost ovih ćelija na zračenje (66).

Ekspresija HMGA1 je ispitivana u više različitih humanih tumora. Povišena ekspresija u odnosu na normalna tkiva uočena je u CIN1-3 i invazivnom SCC grlića materice (67), hepatocelularnom karcinomu (engl. hepatocellular carcinoma, HCC) jetre (68), papilarnim i folikularnim karcinomima štitaste žlezde (69), adenokarcinomima ekstrahepatičnih bilijarnih duktusa (70), kolorektalnim karcinomima (71,72), karcinomima pluća (73,74), želuca (58,75), jajnika (76,77), pankreasa (55,78–80) i dojke (81,82), kao i u retinoblastomima (60), neuroendokrinim tumorima (NET) digestivnog trakta (83),

adenomima hipofize (84) i gliomima mozga (53). U SCC jednjaka nije postojala razlika u ekspresiji HMGA1 (iRNK ili proteina) u odnosu na normalna tkiva. Iako je obim imunopozitivnosti bio varijabilan u normalnom i tumorski izmenjenom tkivu jednjaka, više od polovine oba tipa uzoraka je imalo ekspresiju u više od 50% ćelija. Sa druge strane, ekspresija HMGA1 u adenokarcinomima jednjaka je bila značajno visoka i nije bilo negativnih slučajeva (85). Pokazana je i viša ekspresija HMGA1 u pojedinim karcinomima u odnosu na odgovarajuće benigne tumore ili displazije. Veća ekspresija je uočena u kolorektalnim karcinomima u poređenju sa adenomima (72), u karcinomima želuca u poređenju sa adenomima (86), u karcinomima pankreasa u poređenju sa pankreasnom intraepitelnom neoplazijom (PanIN) (80), u adenokarcinomima ekstrahepatičnih bilijarnih puteva u poređenju sa adenomima (70), u invazivnom SCC grlića materice u poređenju sa CIN lezijama (67), kao i u glioblastomima u poređenju sa gliomima nižeg gradusa (53). Ekspresija HMGA1 je bila češća u PanIN višeg gradusa (PanIN2 i PanIN3) (80), odnosno viša u adenomima želuca visokog gradusa (72). U CIN1-3 je, takođe, uočeno povećanje ekspresije sa progresijom displazije (67). Interesantan je nalaz imunoekspresije HMGA1 u oralnoj leukoplakiji bez ili sa displazijom i u normalnoj oralnoj sluznici. Larsson i saradnici su uočili da je ekspresija najviša u zdravoj sluznici, kao i da je veća od ekspresije u oralnoj leukoplakiji. Ipak, ekspresija u oralnoj leukoplakiji bez displazije je bila značajno manja nego u normalnoj sluznici ili leukoplakiji sa displazijom (87). Ekspresija HMGA1 je korelirala sa histološkim gradusom retinoblastoma i karcinoma pluća i pankreasa (55,60,73), zatim sa veličinom HCC jetre (68), kao i većom invazivnošću kolorektalnih karcinoma, karcinoma želuca, retinoblastoma i adenoma hipofize (merena dubinom invazije ili invazijom okolnih organa) (60,72,84,86). Udruženost ekspresije HMGA1 i limfovaskulne ili perineuralne invazije je bila češća u HCC jetre, kolorektalnom i karcinomu želuca (68,72,86). Prisustvo nodalnih metastaza bilo je udruženo sa visokom ekspresijom u kolorektalnim i karcinomima želuca (72,86). Ekspresija HMGA1 (proteina ili iRNK) bi mogla imati prognostički značaj u HCC jetre, uvealnemu melanomu, adenokarcinomu pluća, karcinomu želuca i ampularne regije pankreasa, bilo kao prediktor kraćeg preživljavanja ili pojave recidiva (68,74,80,86,88).

Ekspresija HMGA2 je, takođe, ispitivana u više različitih tumora. Povišena ekspresija u odnosu na normalna tkiva uočena je u papilarnom i folikularnom karcinomu štitaste žlezde (89), glioblastomima dece i odraslih (64), NSCLC (90), SCC usne duplje, jezika i jednjaka (63,85,91), adenokarcinomu ekstrahepatičnih bilijarnih puteva (70), kao i u karcinomima pankreasa (55), dojke (92) i nazofarinksa (93). Pokazana je i viša ekspresija HMGA2 u pojedinim malignim tumorima u odnosu na odgovarajuće benigne tumore, displaziju ili reaktivnu atipiju epitela. Ekspresija HMGA2 je značajno veća u primarnim i metastatskim melanomima kože nego u melanocitnim nevusima (94), u karcinomima štitaste žlezde nego u adenomima (89), kao i u adenokarcinomima ekstrahepatičnih bilijarnih duktusa nego u adenomima (70). Ekspresija HMGA2 je korelirala sa agresivnijim biološkim ponašanjem pojedinih tumora. Imunopozitivnost je bila češća u karcinomima dojke većih dimenzija (59), kao i u karcinomima ekstrahepatičnih bilijarnih puteva koji su se klinički prezentovali kao velike tumorske mase (70). HMGA2 imunopozitivni intrahepatični holangiokarcinomi se odlikuju infiltrativnim rastom prema tkivu jetre (95). Ekspresija HMGA2 korelira i sa slabijom diferentovanošću i višim nuklearnim gradusom karcinoma dojke (92). Ekspresija HMGA2 pozitivno korelira sa pojavom nodalnih ili udaljenih metastaza melanoma kože (94), SCC usne duplje (91) i u karcinoma nazofarinksa i dojke (naročito trostruko negativnih) (59,92,93). Korelacija ekspresije HMGA2 i pojave nodalnih i udaljenih metastaza u kolorektalnim karcinomima je dala interesantne rezultate. HMGA2 imunopozitivnost u tumorskim ćelijama u invadiranim limfovaskulnim sudovima, ali ne i u samom primarnom tumoru, korelira sa prisustvom nodalnih metastaza, dok je ekspresija u primarnom tumoru udružena sa pojavom udaljenih metastaza (65,66). Opisana je i korelacija ekspresije HMGA2 sa kliničkim stadijumom kod pacijenata sa seroznim karcinomom jajnika i karcinomima nazofarinka (61,93). Ekspresija HMGA2 je nepovoljan prognostički parametar kod pacijenata sa melanomom (94), kolorektalnim karcinomom (66), intrahepatičnim holangiokarcinomom (95), krupnoćelijskim karcinomom pluća (96), SCC jezika i usne duplje (63,91), kao i karcinomom dojke i nazofarinksa (92,93).

1.6.5 Dijagnostički značaj HMGA1 i HMGA2

Genske analize, kao i imunohistohemijsko ispitivanje ekspresije HMGA proteina bi mogli imati i dijagnostički značaj. Analizom mezenhimalnih tumora donjeg genitalnog trakta uočeno je prisustvo balansiranih translokacija koje su zahvatale *HMGA2* gen u trećini agresivnih angiomijsoma (AAM). U jednom slučaju genitalnog lejomiona (od 15) bila je prisutna nebalansirana translokacija *HMGA2*, dok u drugim mezenhimalnim tumorima nisu uočeni rearanžmani koji su obuhvatali ovaj gen. Ushodna transkripciona regulacija *HMGA2* je uočena u u trećini slučajeva AAM sa translokacijom, dok u svim ostalim mezenhimalnim tumorima ona nije bila prisutna. U dva slučaja AAM je preciziran translokacioni partner i detektovana je t(1;12)(p32;q15) (97). Kompleksna genska preuređenja koja uključuju i *HMGA2* su uočena u intravaskulnoj lejomiomatozi i obuhvataju amplifikacije i povećanje broja kopija gena uz centromerne prekide. Takođe, pozitivna ekspresija *HMGA2* je uočena uglavnom u slučajevima koji se odlikuju translokacijom *HMGA2* i 14q24 (98). Amplifikacija 5'-netransliranog regiona i eksona 1-3 *HMGA2*, kao i imunoekspresija *HMGA2* su bili češći u liposarkomima iz grupe atipični lipomatozni tumor / dobro diferentovani liposarkom, ali nije zanemarljiv ni procenat dediferentovanih liposarkoma sa ovakvim nalazom. Nalaz ovakvih genskih izmena, kao i prisustvo amplifikacija u 3'-netransliranom regionu *HMGA2* su povoljan prognostički parametar jer su udruženi sa kasnijom pojavom recidiva (99). Metodom fluorescentne in situ hibridizacije (FISH) uočena su preuređenja *HMGA2* gena u tumorima pljuvačnih žlezda. U 3 od 8 karcinoma nastalih iz pleomorfno adenoma uočena su nebalansirana preuređenja tj. centromerna amplifikacija, telomerna amplifikacija ili oba tipa preuređenja. U de novo karcinomima nisu uočeni rearanžmani U pleomorfnim adenomima uočena je delecija telomernih regiona *HMGA2*, dok je u tumorima koji su histološki slični ova aberacija bila odsutna (100).

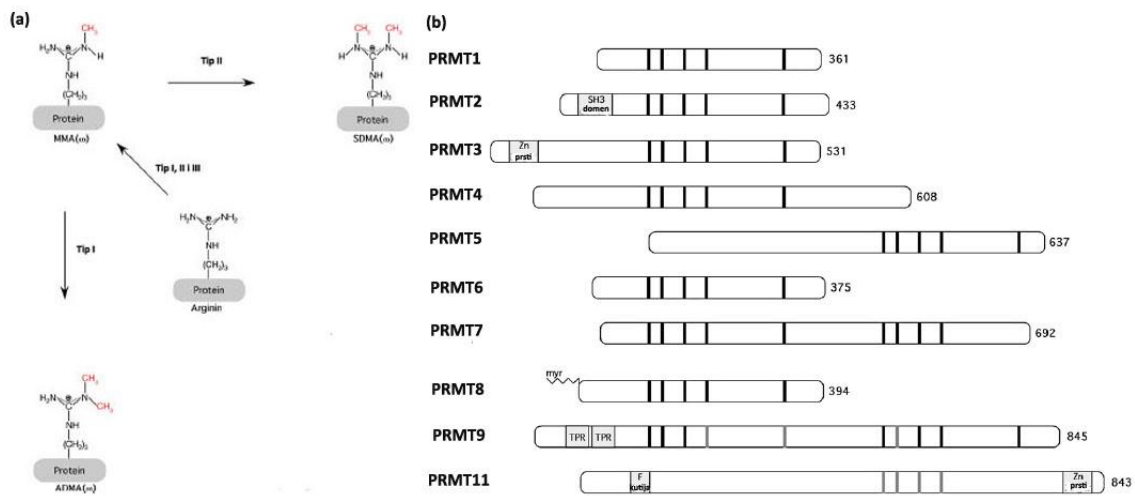
Prisustvo ekspresije *HMGA1* i *HMGA2* u dubokim i dermatofibromima (DF) sa širenjem u potkožno masno tkivo bi moglo imati primenu u razlikovanju ovih tumora od dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP), kao lokalno agresivnog tumora sa metastatskim potencijalom. Ekspresija *HMGA1* je odsutna ili slaba u DFSP, a *HMGA2* je

odsutan u skoro svim slučajevima (101). Ekspresija HMGA1 i HMGA2 (proteina i iRNK) je ispitivana u intratubularnoj neoplaziji germinativnih ćelija postpubertalnih testisa (engl. intratubular germ cell tumor, ITGCT), seminomima, embrionalnim karcinomima epitelnoj ili mezenhimalnoj komponenti teratoma i u yolk sac tumorima. Koekspresija ova dva proteina bi mogla sugerisati na prisustvo embrionalnog karcinoma, ekspresija samo HMGA1 na prisustvo seminoma, dok bi ekspresija samo HMGA2 ukazivala na prisustvo yolk sac tumora (47). Visoka ekspresija HMGA1 je odlika adenokarcinoma jednjaka, za razliku od SCC jednjaka, u kojima se uočava visoka ekspresija HMGA2 (85). Iako je ekspresija HMGA1 i HMGA2 uočena u reaktivnoj atipiji epitela ekstrahepatičnih bilijarnih duktusa, istovremena ekspresija oba proteina se u ovim lezijama nikada ne viđa, za razliku od adenokarcinoma. Takođe, ko-ekspresija ovih proteina je retka i u adenomima bilijarnih duktusa (70). Visoka ekspresija HMGA2 je odlika SCC pluća i ređe je prisutna u ostalim histološkim tipovima tumora pluća (96).

1.7 Protein arginin metiltransferaze

Protein arginin metil-transferaze (engl. Protein arginine methyltransferases, PRMT) su jedni od najznačajnijih enzima koji vrše posttranslacione modifikacije proteina u ćeliji. PRMT familija se odlikuje prisustvom visoko konzerviranog katalitičkog domena dužine 310 aminokiselina, kojim se vrši modifikacija rezidua arginina. Moguć je nastanak tri tipa metilovanog arginina: mono-metil-arginin (MMA), simetrični di-metil-arginin (SDMA) i asimetrični di-metil-arginin (ADMA) (slika 5a.) (27,102). U humanim ćelijama je otkriveno 11 članova ove familije (PRMT1-11), ali za PRMT2, 10 i 11 još uvek nije pokazano da mogu da vrše metilaciju arginina (27). Tip I PRMT (PRMT1, PRMT3, PRMT4[CARM1], PRMT6 i PRMT8) katalizuju nastanak MMA i ADMA, tip II PRMT5 i PRMT7) nastanak MMA i SDMA, dok tip II (PRMT7) katalizuju samo nastanak MMA (slika 5b) (27,102). PRMT proteini (kao i njihove izoforme) su tkivno specifični, a neki od njih su lokalizovani samo u određenim delovima ćelije (Tabela 8) (102–104). Takođe, PRMT proteini imaju veliki broj molekularnih partnera, ali su oni specifični za pojedine članove PRMT familije (102). Ulogu u epigenetskoj kontroli genske ekspresije ostvaruju samo pojedini i to modifikacijom specifičnih histona: PRMT1 (H4R3), PRMT4

(H3R2,17,26,128,129,131,134), PRMT5 (H3R8,43), PRRMT6 (H3R2,42, H4R3, H2AR3), PRMT7 (H2A, H43), PRMT8 (H4), PRMT9 (H2A, H4) (27,29,30). PRMT epigenetski kontrolu vrši i metilacijom HMGA1a proteina, na drugom AT-hook domenu, ali je još uvek nepoznato da li ta modifikacija ima inhibitorni ili aktivatorni efekat (43,44).



Slika 5. PRMT u humanim ćelijama: (a) šema tipova metilacije arginina u humanim ćelijama; (b) šematski predstavljena struktura 10 PRMT u humanim ćelijama (katalitički domen je obeležen sa četiri poprečne crte i PRMT7 i 9 ih imaju po dva). (modifikovano prema Bedford and Clark Molecular Cell 2009.)

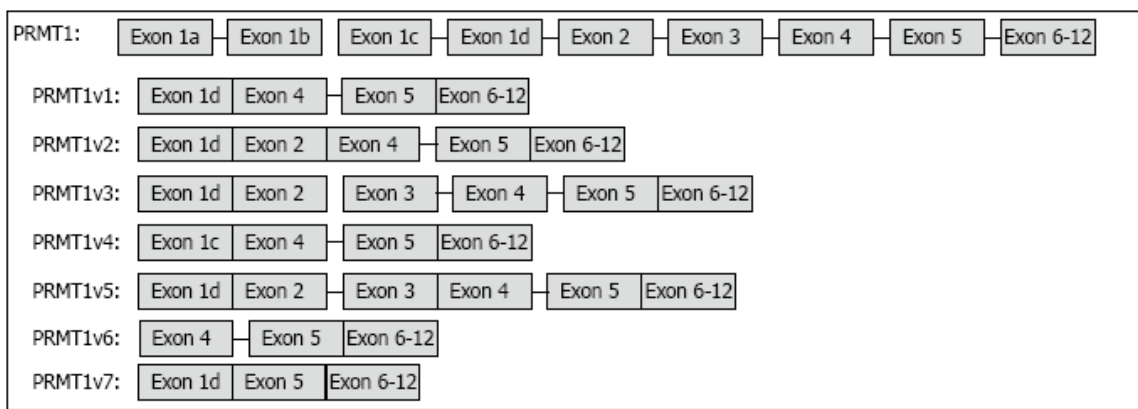
Tabela 8. Tkivna specifičnost PRMT proteina i ćelijska lokalizacija

PRMT	Tkivna specifičnost	Ćelijska lokalizacija
PRMT1		
PRMT1v1	Ubikvitaran (naročito bubreg, jetra, pluća, skeletni mišići, slezina)	Dominantno jedro
PRMT1v2	Ubikvitaran (naročito bubreg, jetra, pankreas)	Dominantno citoplazma
PRMT1v3	Ubikvitaran	Jedro i citoplazma
PRMT1v4	Srce	Jedro i citoplazma
PRMT1v5	Pankreas	Jedro i citoplazma
PRMT1v6	Nije prisutan u normalnim tkivima	Jedro i citoplazma
PRMT1v7	Srce i skeletni mišići	Dominantno jedro
PRMT2		
PRMT2		Dominantno jedro, isključujući jedarce
PRMT2L2		Dominantno citoplazma
PRMT2α		Dominantno jedro, isključujući jedarce
PRMT2β		Jedro (isključujući jedarce) i citoplazma
PRMT2γ		Dominantno jedro, isključujući jedarce
PRMT3		Dominantno citoplazma
PRMT4		Dominantno jedro
PRMT5		Jedro i citoplazma
PRMT6	Ubikvitaran	Dominantno jedro
PRMT7		
PRMT7α		Jedro i citoplazma
PRMT7β		Dominantno citoplazma
PRMT8	mozak	Ćelijska membrana
PRMT9		Nije definisana
PRMT10		Nije definisana
PRMT11		Nije definisana

1.7.1 PRMT1

PRMT1 protein je prvi identifikovani član PRMT familije i odgovoran je za većinu metilacije arginina u ćelijama sisara (105). Transkripcijom gena koji se nalazi na hromozomu 19 i alternativnim isecanjem primarnog transkripta nastaje sedam izoformi (PMT1v1-7) (Slika 6.). Izoforme proteina su dužine od 37,7-40,5 kD i razlikuju se u sastavu na N-terminalnom kraju proteina, dok im je C-terminalni kraj identičan (104).

Analizom iRNK uočeno je da za pojedine forme postoji specifična ćelijska lokalizacija, da su pojedine forme ubikvitarni ili tkivno specifične (Tabela 8.), ali i da se pojedine forme mogu de novo javiti u maligno transformisanim tkivima (106–108). PRMT1 je protein sa visokom mobilnošću između jedra i citoplazme. Međutim, nemaju sve izoforme nuklearni lokalizacioni signal u svojoj sekvenci (osim PRMTv2, koja ima nuklearni eksportni signal), te njihova mobilnost zavisi od interakcije sa njihovim supstratima (109).



Slika 6. Izoforme PRMT1 proteina nastale alternativnim isecanjem primarnog transkripta i kombinacijom različitih eksona (prema Baldwin et al. World J Biol Chem 2014.)

PRMT1 je epigenetski regulator genske ekspresije, ali i ima i indirektnu ulogu jer vrši metilaciju niza transkripcionih faktora. PRMT1-posredovana di-metilacija arginina 3 u histonu H4 (H4R3) je modifikacija histona udružena sa genskom aktivacijom (103). Interakcija PRMT1 i transkripcionih faktora može imati različit efekat na ekspresiju ciljnih gena. Interakcija sa RUNX1 i BRCA1 ima aktivacioni, dok interakcija sa E2F-a i Twist1 transkripcionim faktorima ima represorni efekat (110–113). PRMT1-posredovane posttranslacione modifikacije se odvijaju i na proteinima citosola i ćelijske membrane, kakav je Axin. PRMT1 je zbog brojnih molekularnih partnera uključen u regulaciju ćelijskog ciklusa i apoptoze (preko E2F-1 i SRSF1), ćelijske adhezije i invazivnosti tumorskih ćelija (preko Axina, Twist1 i E-cadherina), popravke oštećene DNK (preko BRCA1, p53 i MRE11) i stabilnosti telomera (111,112,114–119). Dvojna uloga PRMT1 u očuvanju epitelnih karakteristika, odnosno u indukciji epitelno-mezenhimne transformacije (EMT) je posebno interesantna. Metilacija Axina u normalnoj ćeliji stabilizuje Axin, te

membranska lokalizacija β -katenina i E-kaderina, ćelijska adhezija i epitelne karakteristike ostaju očuvane (115). Međutim, PRMT1 aktivira Twist1, koji potom vrši direktnu represiju *E-kaderin* gena, usled čega se indukuje EMT i povećava pokretljivost i invazivnost normalnih epitelnih ćelija i tumorskih ćelija karcinoma bronha (112). U ćelijama karcinoma dojke v1 i v2 izoforme PRMT1 dovode do povećane pokretljivosti ćelija, ali samo v2 izoforma indukuje i povećanu invazivnost. Mehanizam kojim ove izoforme ovo čine nije u potpunosti jasan. S obzirom da nema promena u nivou ekspresije *E-kaderin* gena i E-kaderin proteina, pretpostavlja se da v2 izoforma ovakav efekat ostvaruje primarno pomoću fosforilacije β -katenina (120).

U većini do sada ispitanih humanih karcinoma (karcinom debelog creva, dojke, urotela, pankreasa, jednjaka i želuca) ekspresija PRMT1 je bila povećana (104,121–126). Takođe, povećana ekspresija prisutna je i u akutnoj limfoblastnoj leukemiji (114).

1.7.2 PRMT6

PRMT6 gen se nalazi na hromozomu 1, ali, za razliku od PRMT1, nema alternativnog isecanja primarnog transkripta i postoji samo jedna forma proteina. Takođe, PRMT6 sadrži nuklearni lokalizacioni signal u sekvenci, te njegov transport u ćeliji ne zavisi od drugih supstrata. Protein je lokalizovan isključivo u jedru, gde i ostvaruje svoje uloge (109). Imunohistohemijskim ispitivanjima uočeno je da, iako je ubikvitaran u tkivima, njegova ekspresija u većini tkiva vrlo niska, osim u melanocitima (127–129).

PRMT6 je, kao i PRMT1, epigenetski regulator genske ekspresije. Međutim, dimetilacija arginina 2 u histonu H3 (H3R2) je udružena sa genskom represijom, dok je manje ispitivana dimetilacija arginina 42 (H3R42) u istom histonu udružena sa genskom aktivacijom (28–30). Indirektna uloga PRMT6 u genskoj regulaciji posredovana metilacijom transkripcionih faktora je manje ispitana. Metilacija NF- κ B ima aktivacioni efekat na ovaj transkripcioni faktor i aktivira transkripciju gena za IL-6 (130). Modifikacija HMGA1a proteina obavlja se na drugom AT-hook domenu, ali njen efekat još uvek nije jasan (43,44).

PRMT6 je zbog brojnih molekularnih partnera uključen u regulaciju više procesa u ćeliji. On ima represivni efekat na ekspresiju p53 i inhibitora ciklin zavisnih kinaza (p16, p21, p57), te ima pozitivan efekat na ćelijski ciklus i proliferaciju, a negativan na starenje ćelije (128,131–135). PRMT6 inhibira ekspresiju MMP, te ima negativan efekat na motilitet i invazivnost tumorskih ćelija (135). Iako je PRMT6 represor ekspresije p53 i na taj način ima negativan uticaj na p53-posredovanu aktivaciju ćelijskih mehanizama za popravku DNK, on metilacijom DNK polimeraze β aktivira popravku DNK BER mehanizmom (136,137).

Ekspresija PRMT6 je do sada ispitivana u manjem broju humanih tumora. Ekspresija PRMT6 je snižena u melanomu, dok je u urotelnom i karcinomu prostate ona povećana. Rezultati ispitivanja ekspresije u karcinomu dojke su bili neusaglašeni (125,127–129,138).

1.8 Acetil-transferaze p300 i PCAF

p300 i p300/CBP-udruženi faktor (engl. p300/CBP associated factor, PCAF) su proteini iz grupe lizin acetil transferaza. Inicijalno su otkriveni zbog svoje histon acetil transferazne funkcije, ali je potom uočeno da, pored histona, oni imaju niz drugih ciljnih molekula (139). p300 acetiluje sva četiri tipa histona jezgra nukleozoma, dok je PCAF selektivan za histon H3. Oba proteina neutrališu pozitivno naelektrisanje u histonima, smanjuju njihovo vezivanje za DNK i omogućavaju pristup DNK transkripcionim faktorima i enzimima transkripcije, te aktiviraju transkripciju gena (139–142). Međutim, p300 je, za razliku od PCAF, nezamenljiv kada je u pitanju acetilacija histona H3 i aktivacija transkripcije (143).

Ciljni molekuli p300 i PCAF su i brojni drugi proteini, uključujući različite transkripcione faktore. Usled toga ovi enzimi su uključeni u regulaciju ćelijskog ciklusa, apoptoze i ćelijske diferencijacije (139,141,144). p300 i PCAF igraju značajnu ulogu u diferencijaciji normalnih keratinocita i očuvanju epitelnih karakteristika u tumorskim ćelijama. Tokom diferencijacije keratinocita p300 je lokalizovan u jedru, dok se lokalizacija PCAF u ćeliji menja. U bazalnom sloju epiderma, kao i u ranim fazama diferencijacije keratinocita u ćelijskim kulturama PCAF je prisutan u citoplazmi, dok je ekspresija u jedru prisutna u suprabazalnim keratinocitima i kasnim fazama diferencijacije

ćelija u kulturi (145). U tumorskim ćelijama PCAF pozitivno reguliše ekspresiju E-kaderina i negativno korelira sa nastankom epitelno-mezenhimne transformacije (146). Međutim, uloga p300 u očuvanju epitelnih karakteristika tumorskih ćelija, odnosno u epitelno-mezenhimnoj transformaciji, nije potpuno jasna i može biti različita u zavisnosti od tipa tumorskih ćelijskih kultura na kojima je ispitivanje vršeno (146–149).

Ekspresija p300 i PCAF je ranije ispitivana u nekoliko tipova humanih karcinoma. Visoka ekspresija p300 je uočena u karcinomima dojke, prostate, nazofarinksa, debelog creva, hepatocelularnom karcinomu i u SCC usne duplje, larinksa i jednjaka (149–160). Porast ekspresije p300 korelira sa stepenom progresije CIN (158). Visoka ekspresija p300 je ranije uočena u SCC kože, u poređenju sa normalnim epidermisom, ali nije ispitivana u AK i BD (161). Ekspresija PCAF je bila smanjena u poređenju sa normalnim tkivom u SCC jednjaka i intestinalnom tipu karcinoma želuca (162,163). Genetska ispitivanja su pokazala da su mutacije PCAF u humanim karcinomima retke, a ako su i prisutne nemaju efekat na ekspresiju proteina (164,165). Translokacije i delecije hromozoma 22 u humanim solidnim tumorima često obuhvataju region u kome se nalazi p300 gen, ali su mutacije u ovom genu retke. Ukoliko su i prisutne, mutacije *p300* gena retko imaju efekat na ekspresiju proteina, dok su epigenetske promene (pre svega gubitak metilacije promotorskog regiona) značajnije u kancerogenezi (141,151,166).

Međusobni odnos HMGA proteina i p300 i PCAF je složen i višesmeran. Acetilacija HMGA1 posredovana PCAF-om stabilise enhanceosom, sprečava CBP-acetilaciju HMGA1a i aktivira transkripciju (33,39). U kulturama ćelija karcinoma pankreasa pokazano je da HMGA2 reguliše ekspresiju p300 i PCAF, kao i stepen acetilacije histona H3K9 i H3K27 (45).

2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

CILJEVI ISTRAŽIVANJA:

1. Ispitati ekspresiju HMGA1a/1b, HMGA2, PRMT1, PRMT6, PCAF i p300/CBP u aktiničnoj keratozi, Bowen-ovoj bolesti i invazivnom planocelularnom karcinomu kože.
2. Analizirati ispoljavanje HMGA proteina i njihovih modulatora u in situ lezijama klasifikovanim kao keratinocitna intraepidermalna neoplazija (KIN).
3. Utvrditi korelacije ekspresije HMGA proteina i njihovih modulatora sa prognostičkim parametrima planocelularnog karcinoma kože – dimenzije, dubina invazije, debljina i gradus tumora.
4. Proceniti različite načine evaluacije imunohistohemijskog bojenja i ekspresije HMGA proteina i njihovih modulatora u odnosu na tip lezije i prognostičke parametre.

3 MATERIJAL I METODE

3.1 Uzorak

Za analizu i izradu tkivnog mikroniza inicijalno je odabrano 360 uzoraka pacijenata kojima je dijagnostikovana AK, BD ili SCC u Institutu za patologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu u periodu od 2002. do 2012. godine. Usled gubitka tkiva prilikom izrade tkivnog mikroniza i serijskog sečenja parafinskih kalupa za izradu imunohistohemijskih preparata finalno su analizirani uzorci 307 pacijenata. Kliničke karakteristike (pol, starost i lokalizacija) ispitivanog uzorka su prikazane u tabeli 9. Maksimalno je analizirano 90 AK, 50 BD i 167 slučajeva SCC kože. Među SCC kože bilo je 57 dobro, 55 srednje i 55 slabodiferentovanih tumora. Dijametar SCC je bio ≤ 20 mm u 105 slučajeva i > 20 mm u 62 slučaja. Debljina SCC je bila ≤ 2 mm u 6 slučajeva, > 2 mm i ≤ 6 mm u 116 slučajeva, i > 6 mm u 45 slučajeva. Zbog gubitka materijala tokom serijskog sečenja i imunohistohemijskog bojenja za pojedine markere je analiziran manji broj slučajeva, što precizno navedeno u odgovarajućim poglavljima rezultata za svaki marker.

Tabela 9. Kliničke karakteristike pacijenata u ispitivanom uzorku

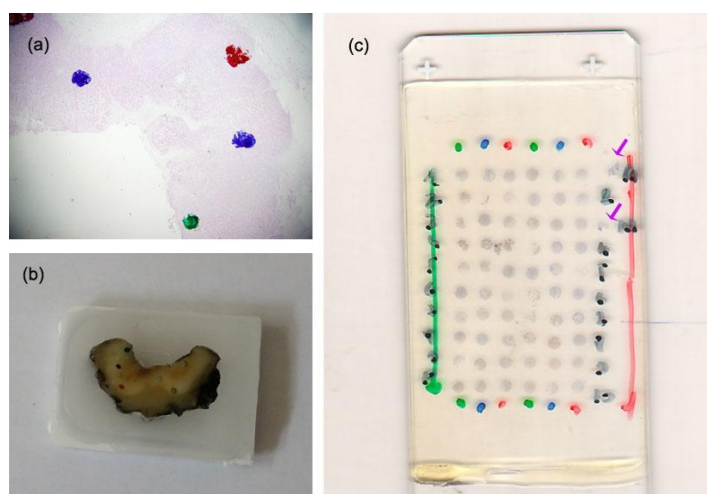
Kliničke karakteristike		AK	BD	SCC	Ukupno
Pol (n [%])	Muški	59 (65,6)	27 (54,0)	108 (64,7)	194 (63,2)
	Ženski	31 (34,4)	23 (46,0)	59 (35,3)	113 (36,8)
Starost (godine)	Srednja vrednost	71,8	72,6	73,7	73,0
	Minimum-Maksimum	44-91	36-100	31-99	31-100
Lokalizacija (n [%])	Glava i vrat	75 (83,3)	24 (48,0)	122 (73,1)	221 (72,0)
	Trup	6 (6,7)	14 (28,0)	9 (5,4)	29 (9,4)
	Ekstremiteti	9 (10,0)	12 (24,0)	36 (21,6)	57 (18,6)

Skraćenice: n, broj slučajeva; AK, solarna keratoza; BD, Bowen-ova bolest; SCC, planocelularni karcinom kože.

3.2 Tkivni mikroniz

Pločice sa originalnim presecima bojenim hematoksilinom i eozinom su pregledane i flomasterom sa tri boje su obeležena tri različita područja; u slučaju SCC njegov periferni, površni i centralni deo (Slika 7a). Potom su na osnovu toga obeležena područja u

originalnim (tzv. davalac) parafinskim kalupima (Slika 7b). Dalje su manuelno, iglom promera 1,2 mm, izvučeni tkivni cilindri, koji su preneti u novi (tzv. primalac) parafinski kalup u kome je formiran tkivni mikroniz (TMN) (Slika 7c). U svakom kalupu postojala su po tri cilindra za svaki slučaj, ukupno 60 uzoraka po TMN kalupu. Pored toga, recipijentni kalupi su sadržali i tkivne cilindre iz kalupa sa uzorcima limfnog čvora, crvuljka i testisa, koji su služili za orijentaciju tkivnog mikroniza, kao i za kontrolu imunohistohemijskog bojenja.



Slika 7. Principi izrade TMN: Originalna hematoksilin-eozin bojena pločica (a) je obeležena na tri različita mesta plavom, crvenom i zelenom tačkom. Na osnovu pločice obeležavani su parafinski kalupi tačkama istih boja (b). Na tim mestima su iz kalupa vađeni cilindri i prenošeni u TMN parafinske kalupe, iz kojih su sečeni preseci i bojeni metodom imunohistohemije (c), a orijentacija je bila moguća pronalazenjem cilindara kontrolnih tkiva na kraju prvog i trećeg red (označeno ljubičastim strelicama).

3.3 Imunohistohemijsko bojenje

Za imunohistohemijsko bojenje su sečeni serijski preseci debljine 5 μ m iz parafinskih kalupa sa TMN i nanošeni na pločice sa dodatnim adhezivnim svojstvima. Pločice sa tkivnim presecima su potom sušene na temperaturi od 60°C tokom 2h. Uzorci su deparafinisani u rastvoru ksilola u trajanju od 20 min, a potom hidratirani u etanolu opadajuće koncentracije (100%, 96%, 70%) u trajanju od 2x4 min, nakon čega su ostavljeni u destilovanoj vodi tokom 5 min.

Specifični uslovi demaskiranja antigena i inkubacije antitela za pojedinačna antitela su prikazani u Tabeli 10. Demaskiranje antigena vršeno je toplotom, u vodenom kupatilu, u različitim rastvorima, u zavisnosti od vrste ispitivanog antigena i primenjenog antitela, u trajanju od 30 min. Nakon hlađenja i ispiranja u destilovanoj vodi, vršeno je blokiranje endogene peroksidaze u 3% rastvoru vodonik peroksida u trajanju od 15 min. Potom je za pojedina antitela vršeno blokiranje nespecifičnog vezivanja primarnog antitela rastvorom govedeg, odnosno magarećeg seruma. Inkubacija uzoraka sa primarnim antitelom vršena je na sobnoj temperaturi u trajanju od 60 minuta ili na 4°C preko noći. Nakon ispiranja, reakcija primarnih zečjih i mišjih antitela je vizuelizovana primenom Ultravision LP sistema za detekciju (Lab Vision, Thermo Scientific, Fremont, CA, USA). Za vizuelizaciju reakcije kozjeg antitela korišćen je ImmunoCruz™ goat ABC Staining System (sc-2023, Santa Cruz Biotechnology CA, USA). Kao hromogen je korišćen 3,3'-diaminobenzidin (DAB), a kontrastiranje je vršeno primenom Mayer-ovog hematoksilina. Nakon dehidratisanja u etanolu rastućih koncentracija (70%, 96%, 100%) i ksilolu u trajanju od 2,5 min, pločice su pokrivane DPX medijumom i pokrovnim staklima.

Tabela 10. Uslovi demaskiranja i inkubacije primarnih antitela

Antigen	Poreklo, klonalnost i klon antitela	Proizvođač	Demaskiranje antigena	Blokiranje nespecifičnog vezivanja	Razblaženje	Uslovi inkubacije
HMGA1a/1b	Kozje, pk ab109706	Abcam, Cambridge, MA, USA	Citratni pufer (10mM, pH 6,0)	1,5 % MS, ST 30 min	3,75µg/ml	ST, 60 min
HMGA2	Zečje, pk ab52039	Abcam, Cambridge, MA, USA	Citrakonična kiselina 1:2000	1% GS, ST 20 min	1:400	ST, 60 min
PRMT1	Zečje, mk ab92299	Abcam, Cambridge, MA, USA	Citratni pufer (10mM, pH 6,0)	Ne	1:200	ST, 60 min
PRMT6	Zečje, pk ab93877	Abcam, Cambridge, MA, USA	EDTA (pH 8,0)	1% GS, ST 20 min	1:200	ST, 60 min
p300	Zečje, pk sc-584	Santa Cruz Biotechnology CA, USA	Citrakonična kiselina (1:2000)	1% GS, ST 20 min	1:800	ST, 60 min
PCAF	Mišje, mk sc-13124	Santa Cruz Biotechnology CA, USA	EDTA (pH 8,0)	1% GS, ST 20 min	1:200	ST, 60 min
E-kaderin	Mišje, mk NCH-38	DAKO, Glostrup, Denmark	Citratni pufer (10mM, pH 6,0)	Ne	1:50	ST, 60 min
MMP9	Zečje, pk HPA001238	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA	Citratni pufer (10mM, pH 6,0)	Ne	1:50	4°C, 24h
Vimentin	Mišje, mk 3B4	DAKO, Glostrup, Denmark	Citratni pufer (10mM, pH 6,0)	Ne	1:50	ST, 60 min

Skraćenice: mk, monoklonalno; pk, poliklonalno; MS, magareći serum; GS, goveđi serum; ST, sobna temperatura.

Kontrola imunohistohemijskog bojenja vršena je analizom unutrašnjih odnosno spoljašnjih pozitivnih i negativnih kontrola. Odgovarajuće kontrole za pojedinačne antigene su prikazane u Tabeli 11.

Tabela 11. Kontrole imunohistohemijskog bojenja

Antigen	Pozitivna kontrola	Negativna kontrola
HMGA1a/1b	Testis (germinativne ćelije)	Limfni čvor
HMGA2	Testis (germinativne ćelije)	Limfni čvor
PRMT1	Testis (germinativne ćelije) Crvuljak (epitel) Limfni čvor (germinativni centar limfnog folikula)	Limfni čvor (interfolikularni limfociti)
PRMT6	Testis (germinativne ćelije)	Limfni čvor
p300	Testis (germinativne ćelije)	Limfni čvor (interfolikularni limfociti)
PCAF	Placenta (citolofoblast)	Limfni čvor (interfolikularni limfociti)
E-kaderin	Crvuljak (epitel)	Limfni čvor
MMP9	Testis (stroma) Stroma ispitivanih tumora	Crvuljak (epitel)
Vimentin	Krvni sudovi (glatkomišićne ćelije) i stroma (fibroblasti)	Normalan epidermis Limfni čvor (interfolikularni limfociti)

3.4 Analiza imunohistohemijskog bojenja

Analiza je vršena na Olympus BX50 svetlosnom mikroskopu na uveličanjima 100x i 200x. Analizirana je površina celog cilindra TMN-a. Analizirani su sledeći parametri:

- obim imunopozitivnosti tj. broj pozitivnih ćelija
- distribucija pozitivnih ćelija

3.4.1 Analiza HMGA1a/1b imunohistohemijskog bojenja

Analizirana je jedarna imunopozitivnost bilo kog intenziteta. Ispitivani su postojanje i obim jedarne ekspresije. Jedarna ekspresija u svakom pojedinačnom slučaju je ocenjivana kao odsutna ili prisutna. Obim jedarne ekspresije je ocenjivan kao nizak (0-10% pozitivnih ćelija) i kao povišen (>10% pozitivnih ćelija). Distribucija pozitivnih ćelija je ocenjivana kao nedifuzna (pozitivne ćelije u bazalnom ili suprabazalnom sloju epiderma u AK i BD,

odnosno u perifernim i intermedijernim delovima tumorskih plaža u SCC) i difuzna ekspresija (pozitivne ćelije distribuirane celom debljinom epiderma u AK i BD, odnosno celom površinom tumorskih plaža u SCC).

3.4.2 Analiza HMGA2 imunohistohemijskog bojenja

Analizirana je jedarna imunopozitivnost. Obim imunopozitivnosti je ocenjivan semikvantitativno trostepenim gradiranjem kao nizak ($\leq 30\%$ pozitivnih ćelija), umeren ($>30\%-60\%$) i visok obim ekspresije ($>60\%$). Distribucija pozitivnih ćelija je ocenjivana kao nedifuzna (pozitivne ćelije u bazalnom ili suprabazalnom sloju epiderma u AK i BD, odnosno perifernim i intermedijernim delovima tumorskih plaža u SCC) i difuzna ekspresija (pozitivne ćelije distribuirane celom debljinom epiderma u AK i BD, odnosno celom površinom tumorskih plaža u SCC).

3.4.3 Analiza PRMT1 imunohistohemijskog bojenja

U svim ispitanim slučajevima bila je prisutna jedarna imunopozitivnost. Obim imunopozitivnosti je ocenjivan semikvantitativno trostepenim gradiranjem kao nizak ($\leq 30\%$ pozitivnih ćelija), umeren ($>30\%-60\%$) i visok obim ekspresije ($>60\%$). Distribucija pozitivnih ćelija je ocenjivana kao nedifuzna (pozitivne ćelije u bazalnom ili suprabazalnom sloju epiderma u AK i BD, odnosno perifernim i intermedijernim delovima tumorskih plaža u SCC) i difuzna ekspresija (pozitivne ćelije distribuirane celom debljinom epiderma u AK i BD, odnosno celom površinom tumorskih plaža u SCC).

3.4.4 Analiza PRMT6 imunohistohemijskog bojenja

U svim ispitanim slučajevima bila je prisutna jedarna imunopozitivnost. Obim imunopozitivnosti je ocenjivan semikvantitativno trostepenim gradiranjem kao nizak ($\leq 30\%$ pozitivnih ćelija), umeren ($>30\%-60\%$) i visok obim ekspresije ($>60\%$). Distribucija pozitivnih ćelija je ocenjivana kao nedifuzna (pozitivne ćelije u bazalnom ili suprabazalnom sloju epiderma u AK i BD, odnosno perifernim i intermedijernim delovima tumorskih plaža u SCC) i difuzna ekspresija (pozitivne ćelije distribuirane celom debljinom epiderma u AK i BD, odnosno celom površinom tumorskih plaža u SCC).

3.4.5 Analiza p300 imunohistohemijskog bojenja

Uočeno je prisustvo jedarne i citoplazmatske p300 imunopozitivnosti. Obim jedarne ekspresije je ocenjivan kao visok (>60% pozitivnih ćelija) i nizak (≤60% pozitivnih ćelija). Citoplazmatska ekspresija je ocenjivana kao prisutna ili odsutna. Distribucija ćelija sa pozitivnom jedarnom ekspresijom ocenjivana je kao nedifuzna (pozitivne ćelije u bazalnom ili suprabazalnom sloju epiderma u AK i BD, odnosno perifernim i intermedijernim delovima tumorskih plaža u SCC)) i difuzna ekspresija (pozitivne ćelije distribuirane celom debljinom epiderma u AK i BD, odnosno celom površinom tumorskih plaža u SCC).

3.4.6 Analiza PCAF imunohistohemijskog bojenja

Uočeno je prisustvo jedarne i citoplazmatske PCAF imunopozitivnosti. Obim jedarne i citoplazmatske ekspresije su ocenjivani kao prisutna ili odsutna ekspresija. Distribucija ćelija sa pozitivnom citoplazmatskom ekspresijom ocenjivana je kao nedifuzna (pozitivne ćelije u bazalnom ili suprabazalnom sloju epiderma u AK i BD, odnosno perifernim i intermedijernim delovima tumorskih plaža u SCC)) i difuzna ekspresija (pozitivne ćelije distribuirane celom debljinom epiderma u AK i BD, odnosno celom površinom tumorskih plaža u SCC).

3.4.7 Analiza E-kaderin, MMP9 i vimentin imunohistohemijskog bojenja

Analizirano je prisustvo membranske ekspresije E-kaderina. Ona je, radi poređenja sa PRMT1 ekspresijom, ocenjivana kao normalna (>90% ćelija sa membranskim bojenjem), smanjena (>10% i ≤90% ćelija sa membranskim bojenjem) ili odsutna (0-10% ćelija sa membranskim bojenjem).

Ekspresija MMP9 je analizirana u citoplazmi tumorskih ćelija. Ona je ocenjivana kao niska (0-25% pozitivnih ćelija) i visoka (>25% pozitivnih ćelija).

Ekspresija vimentina je analizirana u citoplazmi tumorskih ćelija. Ona je ocenjivana kao normalna (≤5% pozitivnih ćelija) ili aberantna (>5% pozitivnih ćelija).

3.5 Dvostruko imunofluorescentno bojenje

Za dvostruko imunofluorescentno bojenje su sečeni preseći debljine 5µm iz parafinskih kalupa i nanošeni na pločice sa dodatnim adhezivnim svojstvima. Pločice sa tkivnim presjecima su potom sušene na temperaturi od 60°C tokom 2h. Uzorci su deparafinirani u rastvoru ksilola u trajanju od 3x5 min, a potom hidratisani u etanolu opadajuće koncentracije (100%, 96%, 70%) u trajanju od 2x4 min, nakon čega su ostavljeni u destilovanoj vodi tokom 5 min.

Demaskiranje antigena vršeno je toplotom, u pretis loncu u citratnom puferu (10mM, pH 6,0) u trajanju od 10 min. Nakon hlađenja i ispiranja u destilovanoj vodi na preseke je nanošen 3% rastvor glicina u fosfatnom puferu, a u cilju smanjenja autofluorescencije tkiva. Potom je vršeno blokiranje nespecifičnog vezivanja primarnih i sekundarnih antitela rastvorom 1% goveđeg seruma tokom 20 minuta. Inkubacija uzoraka sa prvim primarnim kozjim anti-HMGA1a/1b antitelom (koncentracija 1,8 µg/ml; ab109706, Abcam, Cambridge, MA, USA) vršena je na sobnoj temperaturi u trajanju od 60 minuta. Nakon ispiranja u fosfatnom puferu je vršena inkubacija sa sekundarnim magarećim anti-kozjim antitelom obeleženim fluorohromom Alexa Fluor 594 (razblaženje 1:500; A-11058, Invitrogen, Basel, Switzerland) na sobnoj temperaturi u trajanju od 60 minuta. Nakon ispiranja u fosfatnom puferu tkivni preseći su inkubirani sa drugim primarnim antitelom: zečjim anti-PRMT1 antitelom (razblaženje 1:100; ab92299, Abcam, Cambridge, MA, USA), zečjim anti-PRMT6 antitelom (razblaženje 1:100; ab93877, Abcam, Cambridge, MA, USA) ili zečjim anti-p300 antitelom (razblaženje 1:200; sc-584, Santa Cruz Biotechnology CA, USA) na sobnoj temperaturi tokom 60 minuta. Nakon ispiranja u fosfatnom puferu tkivni preseći su inkubirani sa sekundarnim kozjim anti-zečjim antitelom obeleženim fluorohromom Alexa Fluor 488 (razblaženje 1:500; A-11034, Invitrogen, Basel, Switzerland) na sobnoj temperaturi u trajanju od 60 minuta. Nakon ispiranja u fosfatnom puferu preseći su prekrivani ProLong Gold medijumom za pokrivanje koji u sebi sadrži 4',6-di-amidino-2-fenilindol (engl. 4',6-di-amidino-2-phenylindole, DAPI) (P36931, Invitrogen, Basel, Switzerland) i pokrovnim staklima.

Analiza je vršena na epifluorescentnom mikroskopu sa F-View CCD kamerom (Olympus, Germany), a digitalne slike za svaki fluorescentni kanal su slikane na uveličanju 400x i preklapane za svaki tip signala upotrebom AnalySIS softvera za analizu (Soft Imaging Systems, Olympus, Germany). Crveni fluorescentni signal je predstavljao ekspresiju HMGA1a/1b, a zeleni ekspresiju PRMT1, PRMT6 ili p300. Žuti do narandžasti fluorescentni signal na preklapljenim slikama je predstavljao kolokalizaciju dva markera u pojedinačnim ćelijama. Plavi fluorescentni signal je predstavljao signal koji je stvarao DAPI i označavao je jedra ispitivanih ćelija.

3.6 Statistička analiza

Razlike u ekspresiji HMGA1a/1b, HMGA2, PRMT1, PRMT6, p300 i PCAF su ispitivane u odnosu na:

- tip ispitivane lezije (AK, BD, SCC)
- gradus keratinocitne intraepidermalne neoplazije (KIN1-3)
- stepen diferentovanosti SCC kože (dobro, srednje i slabo diferentovani SCC)
- dijametar SCC kože (≤ 2 cm i > 2 cm)
- debljinu SCC kože (≤ 6 mm i > 6 mm)
- dubinu invazije SCC kože (dermis i potkožno masno tkivo i dublja tkiva).

U celom uzorku, kao i u AK, BD i SCC zasebno, je vršena i uporedna analiza ekspresije E-kaderina sa ekspresijom PRMT1, p300 i PCAF, ekspresije MMP9 sa ekspresijom PRMT6, kao i ekspresije vimentina sa ekspresijom p300 i PCAF.

Vršena je i uporedna analiza ekspresije HMGA1a/1b i PRMT1, PRMT6 i p300, odnosno HMGA2 i PCAF u celom uzorku, kao i u AK, BD i SCC zasebno.

U statističkoj analizi korišćeni su studentov t-test, Kruskal-Wallis-ov test, Hi-kvadrat test, Fišerov test tačne verovatnoće i Mann-Whitney test. Vrednosti $p < 0,05$ su smatrane statistički značajnim.

4 REZULTATI

4.1 Ekspresija HMGA proteina

4.1.1 Ekspresija HMGA1a/1b proteina

Ekspresije HMGA1a/1b je ispitana u 276 slučajeva, odnosno 78 AK, 45 BD i 153 SCC (54 dobro, 41 srednje i 58 slabo diferentovanih). Rezultati analize ekspresije HMGA1a/1b su prikazani u tabeli 12. Jedarna ekspresija koja je uočena u ispitanim uzorcima je uglavnom bila slabog intenziteta i u najvećem broju slučajeva je bila niska ($\leq 10\%$). Jedarna ekspresija je bila češće prisutna u SCC nego u AK i BD ($p=0,012$) (Slika 8a-c). Međutim, nije bilo razlike u obimu ekspresije. Distribucija pozitivnih ćelija je u većini slučajeva bila difuzna, bez obzira na obim, uz vrlo retke slučajeve sa nedifuznom distribucijom.

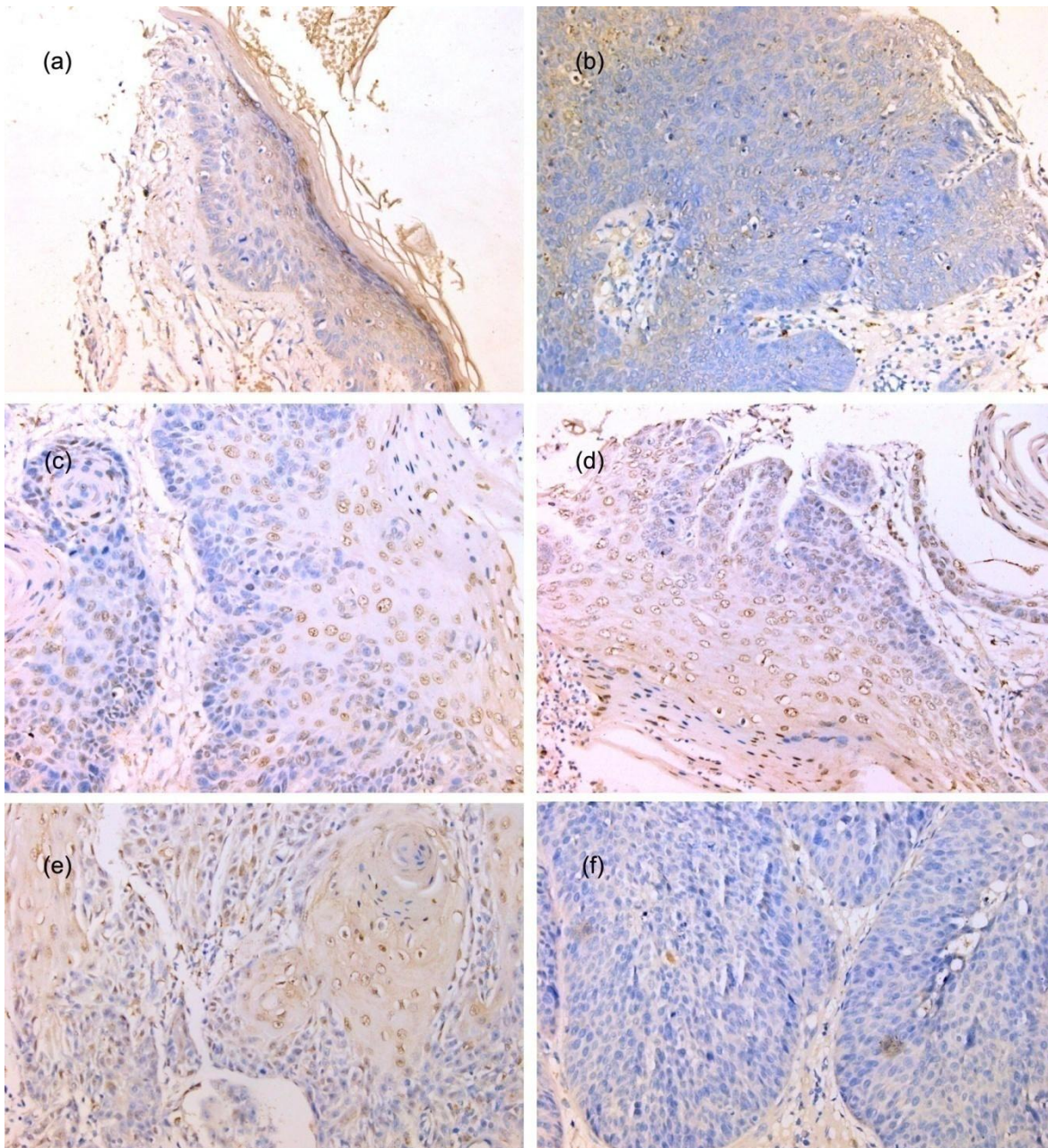
Analizom ekspresije u in situ lezijama (AK i BD) u odnosu na stepen displazije tj. KIN nije uočena razlika u prisustvu jedarne ekspresije, kao ni u obimu jedarne ekspresije.

Analizom obima ekspresije u odnosu na prognostičke parametre SCC kože uočena je razlika u odnosu na diferentovanost tumora. Jedarna ekspresija je bila češća u dobro i srednje diferentovanim SCC nego u slabo diferentovanim tumorima ($p<0,001$) (Slika 8d-f), dok je obim ekspresije bio češće viši u dobro diferentovanim nego u slabo diferentovanim SCC ($p=0,028$). Nije bilo razlike u prisustvu i obimu jedarne ekspresije u odnosu na dijаметar ($p=0,401$), debljinu ($p=0,733$) i dubinu invazije tumora ($p=0,175$). Takođe, nisu uočene ni razlike u obimu jedarne ekspresije u odnosu na dijаметar ($p=0,963$), debljinu ($p=0,313$) i dubinu invazije tumora ($p=0,333$).

Tabela 12. Imunohistohemijska analiza ekspresije HMGA1a/1b u AK, BD i SCC

VARIJABLA	n	Prisustvo jedarne ekspresije		p	Obim jedarne ekspresije		p
		Odsutna (%)	Prisutna (%)		nizak (%)	povišen (%)	
Tip lezije							
AK	78	56,4	43,6	0,012*	82,1	17,9	0,273
BD	45	60,0	40,0		86,7	13,3	
SCC	153	39,9	60,1		76,5	23,5	
KIN							
KIN1	44	63,6	36,4	0,494	84,1	15,9	0,996
KIN2	32	50,0	50,0		84,4	15,6	
KIN3	46	58,7	41,3		84,8	15,2	
Diferentovanost SCC							
Dobro	54	14,8	85,2	<0,001*	64,8	35,2	0,028*
Srednje	41	31,7	68,3		78,0	22,0	
Slabo	58	69,0	31,0		86,2	13,8	
Dijametar SCC (cm)							
≤2	94	37,2	62,8	0,401	76,6	23,4	0,963
>2	59	44,1	55,9		76,3	23,7	
Debljina SCC (mm)							
≤6	108	40,7	59,3	0,733	78,7	21,3	0,313
>6	45	37,8	62,2		71,1	28,9	
Dubina invazije							
dermis	83	34,9	65,1	0,175	79,5	20,5	0,333
potkožno masno tkivo i dublje	70	45,7	54,3		72,9	27,1	

Skraćenice: n, broj slučajeva; AK, solarna keratoza; BD, Bowen-ova bolest; SCC, planocelularni karcinom kože; KIN, keratinocitna intrapeidermalna neoplazija, p, vrednosti verovatnoća; *statistički značajne p vrednosti.



Slika 8. Ekspresija HMGA1a/1b u AK, BD i SCC: Odsutna jedarna ekspresija u AK (a) i BD (b); Prisutna jedarna ekspresija u SCC (c), dobro (d) i srednje (e) diferentovanim SCC; Odsutna ekspresija u slabo diferentovanom SCC (f) (uveličanje x200).

4.1.2 Ekspresija HMGA2 proteina

Ekspresije HMGA2 je ispitana u 299 slučajeva, odnosno 78 AK, 48 BD i 173 SCC (58 dobro, 58 srednje i 57 slabo diferentovanih). Rezultati analize ekspresije HMGA2 su prikazani u tabeli 13. Analizom obima ekspresije uočeno je da je nizak obim bio češći u AK i BD nego u SCC ($p < 0,001$) (Slika 9a-c). Difuzna distribucija HMGA2 pozitivnih ćelija bila je češća u SCC nego u AK i BD ($p < 0,001$).

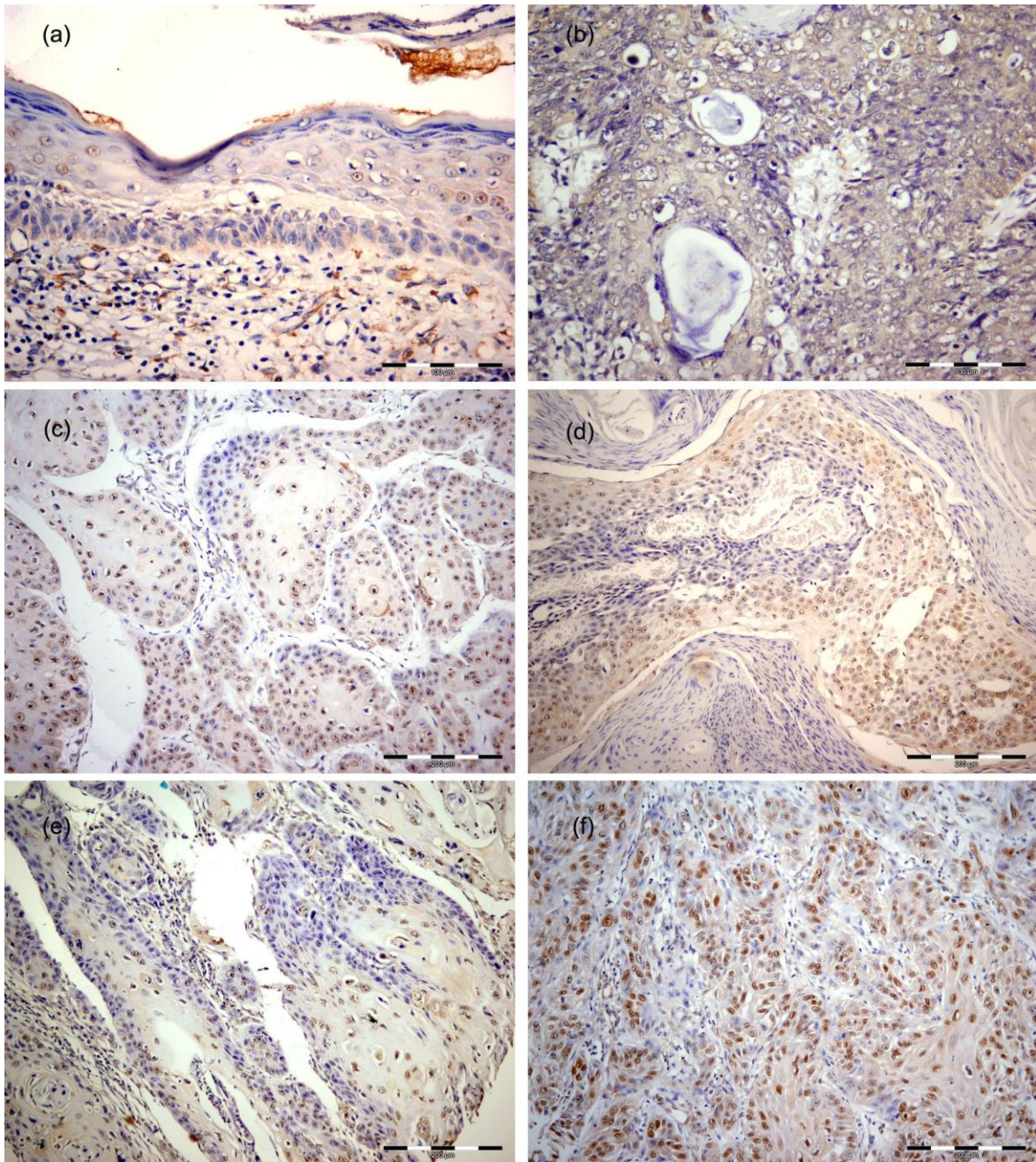
Analizom ekspresije u in situ lezijama (AK i BD) u odnosu na stepen displazije tj. KIN uočeno je da je nizak obim HMGA2 bio češći u KIN1 nego u KIN2 i KIN3 lezijama ($p = 0,003$). Ipak, difuzna distribucija je bila češća u KIN1 i KIN3 nego u KIN2 ($p = 0,029$).

Analizom obima ekspresije u odnosu na prognostičke parametre SCC kože nije uočena razlika u odnosu na diferentovanost ($p = 0,080$), dijametar ($p = 0,391$), debljinu ($p = 0,942$) i dubinu invazije SCC ($p = 0,589$). Difuzna distribucija HMGA2 pozitivnih ćelija je bila češća u slabo diferentovanim SCC u poređenju sa dobro i srednje diferentovanim tumorima (Slika 9d-e), kao i u srednje diferentovanim SCC u poređenju sa dobro diferentovanim tumorima ($p < 0,001$). Nije bilo razlike u distribuciji imunopozitivnosti u odnosu na dijametar ($p = 0,081$), debljinu ($p = 0,905$) i dubinu invazije tumora ($p = 0,064$).

Tabela 13. Imunohistohemijska analiza ekspresije HMGA2 u AK, BD i SCC

VARIJABLA	n	Obim ekspresije			P	Distribucija		P
		nizak	umeren (%)	visok		nedifuzna (%)	difuzna (%)	
Tip lezije								
AK	78	80,8	14,1	5,1	<0,001*	80,0	20,0	<0,001*
BD	48	68,8	27,1	4,2		51,5	48,5	
SCC	173	36,4	38,7	24,9		29,9	70,1	
KIN								
KIN1	53	90,6	9,4	0	0,003*	72,7	27,3	0,029*
KIN2	23	60,9	21,7	17,4		86,4	13,6	
KIN3	49	67,3	28,6	4,1		52,9	47,1	
Diferentovanost SCC								
Dobro	58	41,4	46,6	12,1	0,080	53,7	46,3	<0,001*
Srednje	58	41,4	25,9	32,8		25,5	74,5	
Slabo	57	26,3	43,9	29,8		10,9	89,1	
Dijametar SCC (cm)								
≤2	110	38,2	39,1	22,7	0,391	32,7	67,3	0,081
>2	63	33,3	38,1	28,6		24,6	75,4	
Dubina invazije SCC								
Dermis	93	33,3	41,9	24,7	0,589	36,0	64,0	0,064
Potkožno masno tkivo i dublje	80	40,0	35,0	25,0		22,7	77,3	
Debljina SCC (mm)								
≤6	125	36,8	37,6	25,6	0,942	32,8	67,2	0,905
>6	48	35,4	41,7	22,9		22,2	77,8	

Skraćenice: n, broj slučajeva; AK, solarna keratoza; BD, Bowen-ova bolest; SCC, planocelularni karcinom kože; KIN, keratinocitna intrapeidermalna neoplazija, p, vrednosti verovatnoća; *statistički značajne p vrednosti.



Slika 9. Ekspresija HMGA2 u AK, BD i SCC: Nizak obim jedarne ekspresije u AK (a) i BD (b); Visok obim ekspresije u SCC (c); Nedifuzna distribucija jedarne imunopozitivnosti u dobro (d) i srednje (e) diferentovanim SCC; Difuzna distribucija u slabo diferentovanom SCC (f) (a,b - uveličanje x100; c-f – uveličanje 100x).

4.2 Ekspresija PRMT proteina

4.2.1 Ekspresija PRMT1

Ekspresije PRMT1 je ispitana u 307 slučajeva, odnosno 90 AK, 50 BD i 167 SCC (57 dobro, 55 srednje i 55 slabo diferentovanih). Rezultati analize ekspresije PRMT1 su prikazani u tabeli 14. Analizom obima PRMT1 ekspresije uočeno je da je visoka ekspresija bila češća u BD i SCC nego u AK ($p=0,001$) (Slika 10a-c). Takođe, u BD i SCC je bila češća i difuzna idistribucija imunopozitivnih ćelija ($p<0,001$). U BD je skoro jednak broj slučajeva bio sa difuznom i nedifuznom distribucijom, dok je u SCC dominantan obrazac distribucije bio difuzan.

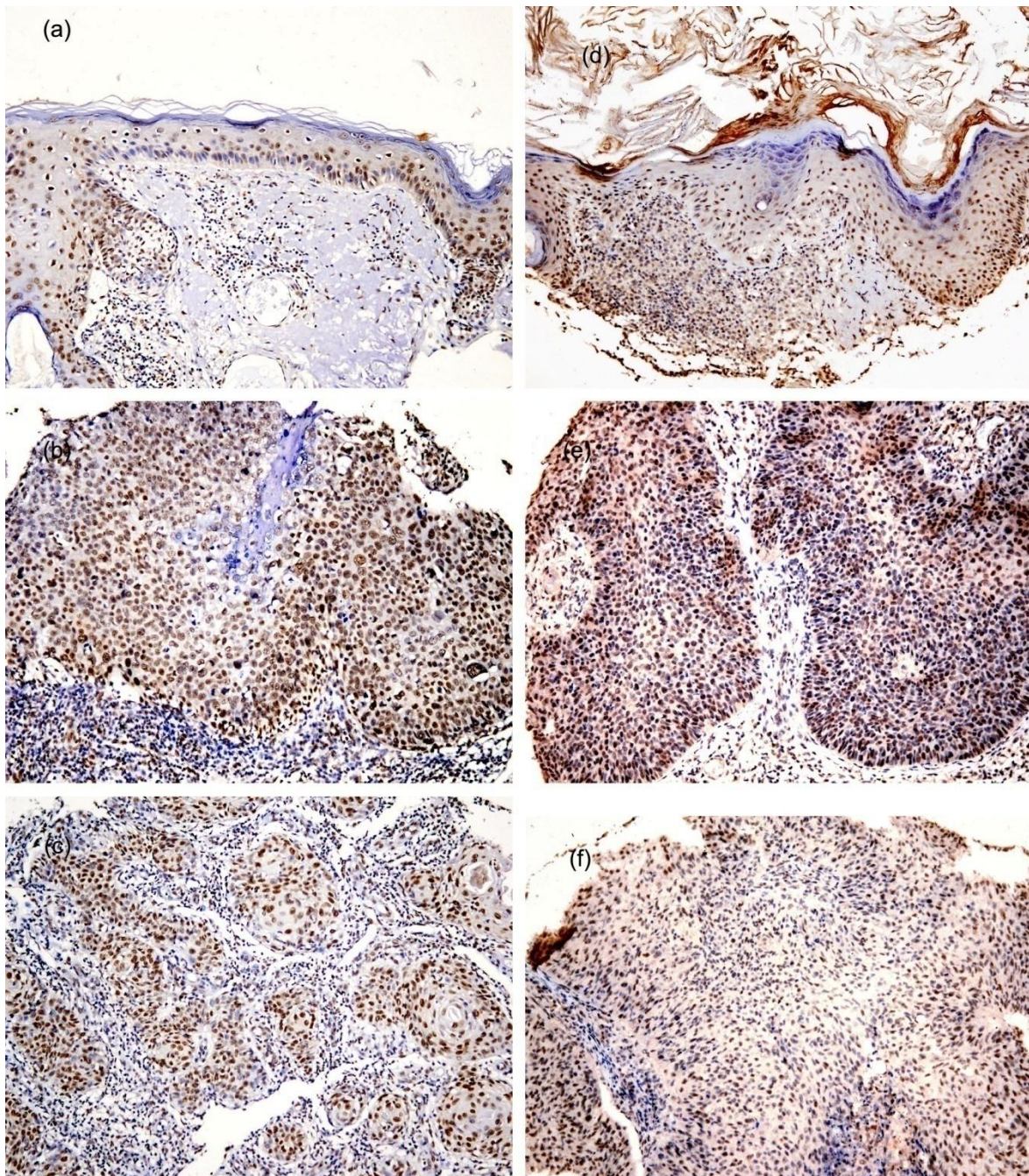
Analizom ekspresije u in situ lezijama (AK i BD) u odnosu na stepen displazije tj. KIN uočeno je da je visoka ekspresija bila češća u KIN1 i KIN3 nego u KIN2 lezijama ($p<0,001$). Međutim, difuzna distribucija je bila češća u KIN1 i KIN3 nego u KIN2, kao i u KIN3 nego u KIN1 ($p<0,001$).

Analizom obima ekspresije u odnosu na prognostičke parametre SCC kože nije uočena razlika u odnosu na diferentovanost ($p=0,295$), dijametar ($p=0,898$), debljinu ($p=0,375$) i dubinu invazije SCC ($p=0,653$). Difuzna distribucija je bila češća u srednje i slabo diferentovanim SCC ($p<0,001$), dok nije bilo razlike u odnosu na dijametar ($p=0,489$), debljinu ($p=0,082$) i dubinu invazije tumora ($p=0,210$).

Tabela 14. Imunohistohemijska analiza ekspresije PRMT1 u AK, BD i SCC

VARIJABLA	n	Obim ekspresije			P	Distribucija		P
		nizak	umeren (%)	visok		nedifuzna (%)	difuzna (%)	
Tip lezije								
AK	90	7,8	45,6	46,7	0,001*	81,1	18,9	<0,001*
BD	50	0	28,0	72,0		46,0	54,0	
SCC	167	7,2	24,0	68,9		24,0	76,0	
KIN								
KIN1	53	3,8	35,8	60,4	<0,001*	71,7	28,3	<0,001*
KIN2	36	13,9	58,3	27,8		94,4	5,6	
KIN3	51	0	29,4	70,6		47,1	52,9	
Diferentovanost SCC								
Dobro	57	5,3	22,8	71,9	0,295	50,9	49,1	<0,001*
Srednje	55	5,5	18,2	76,4		14,5	85,5	
Slabo	55	10,9	30,9	58,2		5,5	94,5	
Dijametar SCC (cm)								
≤2	105	7,6	24,8	67,6	0,898	25,7	74,3	0,489
>2	62	6,5	22,6	71,0		21,0	79,0	
Dubina invazije SCC								
Dermis	90	8,9	23,3	67,8	0,653	27,8	72,2	0,210
Potkožno masno tkivo i dublje	77	5,2	24,7	70,1		19,5	80,5	
Debljina SCC (mm)								
≤6	115	6,1	21,7	72,2	0,375	27,8	72,2	0,082
>6	52	9,6	28,8	61,5		15,4	84,6	

Skraćenice: n, broj slučajeva; AK, solarna keratoza; BD, Bowen-ova bolest; SCC, planocelularni karcinom kože; KIN, keratinocitna intrapeidermalna neoplazija, p, vrednosti verovatnoća; *statistički značajne p vrednosti.



Slika 10. Ekspresija PRMT1 i PRMT6 u AK, BD, SCC: Umerena ekspresija PRMT1 u AK (a); Visoka ekspresija PRMT1 u BD (b) i SCC (c); Umerena ekspresija PRMT6 u AK (d); Visoka ekspresija PRMT6 u BD (e) i SCC (f) (uveličanje x200).

Razlike u ekspresiji E-kaderina u odnosu na ekspresiju PRMT1 analizirane su zasebno u AK, BD i SCC. Kao granična vrednost normalne i povišene ekspresije PRMT1 korišćena je vrednost od 60%. Usled gubitka tkiva prilikom izrade preparata i imunohistohemijskog bojenja analizirano je 71 AK, 42 BD i 155 SCC (Tabela 15.). Ekspresija E-kaderina nije se razlikovala u odnosu na ekspresiju PRMT1 ni u AK ($p=0,736$), niti u BD ($p=0,957$) ili SCC ($p=0,142$).

Tabela 15. Poređenje ekspresije E-kaderina sa ekspresijom PRMT1 u AK, BD i SCC

TIP LEZIJE	E-kaderin	PRMT1		p
		≤60% n (%)	>60% n (%)	
AK				
	Normalna	6 (15,8)	8 (24,2)	0,736
	Smanjena	28 (73,7)	17 (51,5)	
	Odsutna	4 (10,5)	8 (24,2)	
BD				
	Smanjena	5 (55,6)	18 (54,5)	0,957
	Odsutna	4 (44,4)	15 (45,5)	
SCC				
	Normalna	3 (6,5)	6 (5,5)	0,142
	Smanjena	22 (47,8)	69 (63,3)	
	Odsutna	21 (45,7)	34 (31,2)	

Skraćenice: n, broj slučajeva; AK, solarna keratoza; BD, Bowen-ova bolest; SCC, planocelularni karcinom kože; p, vrednosti verovatnoća.

4.2.2 Ekspresija PRMT6

Ekspresije PRMT6 je ispitana u 307 slučajeva, odnosno 90 AK, 50 BD i 167 SCC (57 dobro, 55 srednje i 55 slabo diferentovanih). Rezultati analize ekspresije PRMT6 su prikazani u tabeli 16. U AK, BD i SCC ekspresija PRMT6 je bila dominantno umerena i visoka (Slika 10d-f), ali je u SCC ona češće bila niska nego u AK ($p=0,015$). Difuzna distribucija imunopozitivnih ćelija je češće bila prisutna u BD nego u AK ili SCC ($p=0,038$).

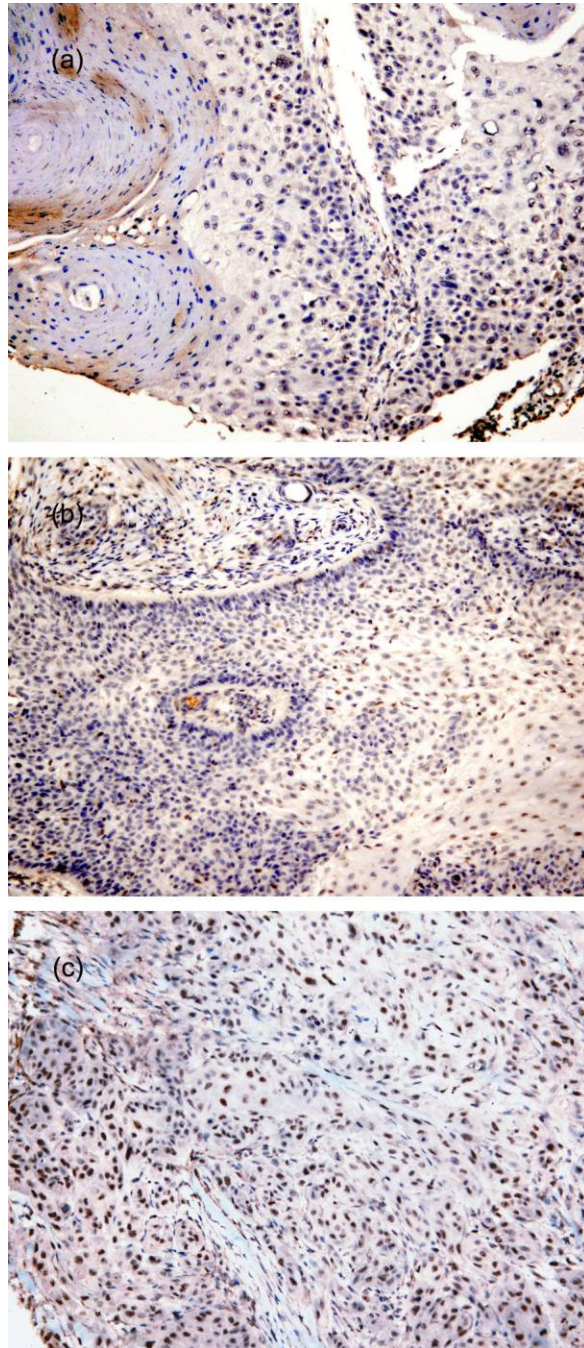
Analizom ekspresije u in situ lezijama (AK i BD) u odnosu na stepen displazije tj. KIN nije uočena razlika u obimu ekspresije PRMT6 ($p<0,001$). Međutim, difuzna distribucija je bila češća u KIN3 nego u KIN1 ($p=0,029$).

Dalje je analizirana ekspresija PRMT6 u odnosu na prognostičke parametre SCC kože. Visoka ekspresija je bila karakteristika slabo diferentovanih SCC ($p < 0.001$) (Slika 11a-c), dok nije bilo razlike u obimu ekspresije u odnosu na dijametar ($p = 0,240$) i dubinu invazije tumora ($p = 0,104$). Postojala je tendencija prisustva visoke ekspresije u tumorima debljim od 6 mm, ali razlika nije bila značajna ($p = 0,055$). Difuzan obrazac distribucije PRMT6 imunopozitivnih ćelija je bio dominantan u srednje i slabo diferentovanim tumorima ($p < 0.001$), u tumorima debljim od 6 mm ($p = 0,020$), kao i u tumorima sa invazijom potkožnog masnog tkiva i dubljih struktura ($p = 0,013$). Razlika u tipu distribucije imunopozitivnih ćelija nije uočena u odnosu na dijametar SCC kože ($p = 0,565$).

Tabela 16. Imunohistohemijska analiza ekspresije PRMT6 u AK, BD i SCC

VARIJABLA	n	Obim ekspresije			p	Distribucija		p
		nizak	umeren	visok		nedifuzna	difuzna	
		(%)				(%)		
Tip lezije								
AK	90	1,1	51,1	47,8	0,002*	30,0	70,0	0,038*
BD	50	6,0	44,0	50,0		12,0	88,0	
SCC	167	18,6	42,5	38,9		31,7	68,3	
KIN								
KIN1	53	0	50,9	49,1	0,940	35,8	62,3	0,029*
KIN2	36	2,8	50,0	47,2		22,2	77,8	
KIN3	51	5,9	45,1	49,0		11,8	88,2	
Diferentovanost SCC								
Dobro	57	22,8	57,9	19,3	<0,001*	57,9	42,1	<0,001*
Srednje	55	25,5	40,0	34,5		32,7	67,3	
Slabo	55	7,3	29,1	63,6		3,6	96,4	
Dijametar SCC (cm)								
≤2	105	20,0	44,8	35,2	0,240	33,3	66,7	0,565
>2	62	16,1	38,7	45,2		29,0	71,0	
Dubina invazije SCC								
Dermis	90	15,6	50,0	34,4	0,104	40,0	60,0	0,013*
Potkožno masno tkivo i dublje	77	22,1	33,8	44,2		22,1	77,9	
Debljina SCC (mm)								
≤6	115	20,0	47,0	33,0	0,055	37,4	62,6	0,020*
>6	52	15,4	32,7	51,9		19,2	80,8	

Skraćenice: n, broj slučajeva; AK, solarna keratoza; BD, Bowen-ova bolest; SCC, planocelularni karcinom kože; KIN, keratinocitna intrapeidermalna neoplazija; p, vrednosti verovatnoća; *statistički značajne p vrednosti.



Slika 11. Ekspresija PRMT6 u različito diferentovanim SCC: Umeren obim ekspresije u dobro (a) i srednje (b) diferentovanim SCC; Visok obim ekspresije u slabo diferentovanom SCC (c) (uveličanje x200).

Razlike u ekspresiji MMP9 u odnosu na ekspresiju PRMT6 analizirane su zasebno u AK, BD i SCC. Kao granična vrednost normalne i povišene ekspresije PRMT6 korišćena je vrednost od 30%. Usled gubitka tkiva prilikom izrade preparata i imunohistohemijskog bojenja analizirano je 87 AK, 45 BD i 155 SCC (Tabela 17.). Ekspresija E-kaderina nije se razlikovala u odnosu na ekspresiju PRMT6 ni u AK ($p=0,767$), niti u BD ($p=0,580$) ili SCC ($p=0,347$).

Tabela 17. Poređenje ekspresije E-kaderina sa ekspresijom PRMT1 u AK, BD i SCC

TIP LEZIJE	MMP9	PRMT6		P
		≤30% n (%)	>30% n (%)	
AK	Normalna	1 (100)	79 (91,9)	0,767
	Povećana	0 (0)	7 (8,1)	
BD	Normalna	3 (100)	38 (90,5)	0,580
	Povećana	0 (0)	4 (9,5)	
SCC	Normalna	21 (75,0)	105 (82,7)	0,347
	Povećana	7 (25,0)	22 (17,3)	

Skraćenice: n, broj slučajeva; AK, solarna keratoza; BD, Bowen-ova bolest; SCC, planocelularni karcinom kože; p, vrednosti verovatnoća.

4.3 Ekspresija acetil transferaza p300 i PCAF

4.3.1 Ekspresija p300

Ekspresije p300 je ispitana u 294 slučaja, odnosno 79 AK, 47 BD i 168 SCC (58 dobro, 58 srednje i 52 slabo diferentovanih). Rezultati analize ekspresije p300 su prikazani u tabeli 18. Analizom obima jedarne ekspresije uočeno je da je visoka ekspresija bila češća u SCC nego u AK i BD ($p=0,001$) (Slika 12a-c). Obrnut trend je uočen u citoplazmatskoj ekspresiji, te je ona bila češće odsutna u SCC nego u AK ($p=0,026$) (Slika 12d-e). Distribucija jedarne imunopozitivnosti je češće bila difuzna u BD i SCC nego u AK ($p<0.001$) (Slika 12f-h).

Analizom ekspresije u in situ lezijama (AK i BD) u odnosu na stepen displazije tj. KIN nije uočena razlika u obimu jedarne ekspresije p300. Citoplazmatska ekspresija je bila

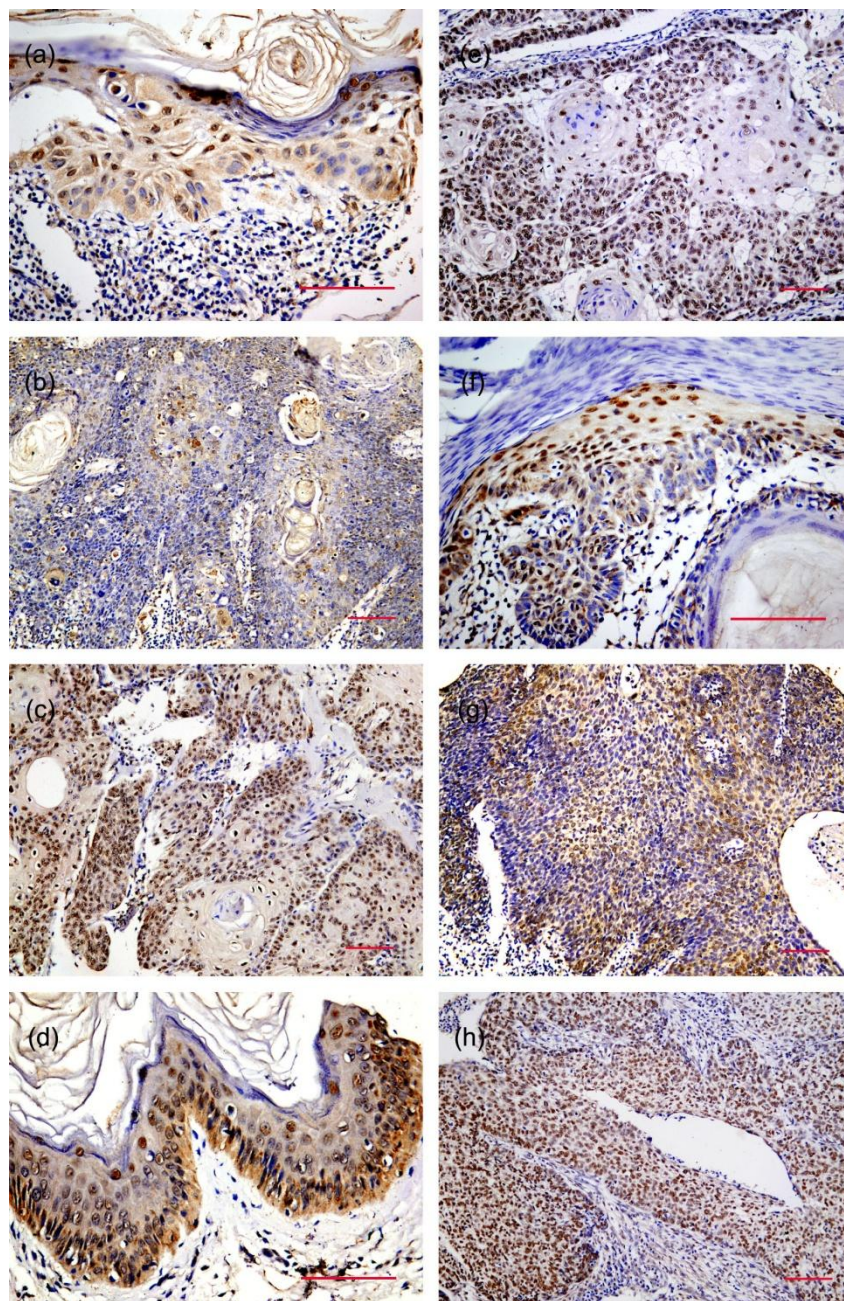
češća u KIN2 nego u KIN1 i KIN3 lezijama ($p=0,003$). Međutim, difuzna distribucija jedarne imunopozitivnosti je bila češća u KIN3 nego u KIN1 i KIN2 lezijama ($p<0,001$).

Obim jedarne ekspresije se nije razlikovao među različito diferentovanim SCC ($p=0,817$), kao ni tumorima različitog dijametra ($p=0,214$), debljine ($p=0,284$) ili dubine invazije ($p=0,214$). Citoplazmatska ekspresija je češće bila prisutna u tumorima sa invazijom potkožnog masnog tkiva ili dubljih struktura ($p=0,049$), dok nije bilo razlike u odnosu na diferentovanost SCC ($p=0,193$), dijametar ($p=0,367$) ili debljinu tumora ($p=0,349$). Difuzna distribucija jedarne imunopozitivnosti je bila karakteristika srednje i slabo diferentovanih SCC, pre nego dobro diferentovanih tumora ($p<0,001$). Nije bilo razlike u distribuciji imunopozitivnosti u odnosu na dijametar SCC ($p=0,071$). Takođe, difuzna distribucija je bila odlika tumora debljih od 6 mm ($p=0,027$), kao i tumora sa dubokom invazijom ($p=0,001$).

Tabela 18. Imunohistohemijska analiza ekspresije p300 u AK, BD i SCC

VARIJABLA	Jedarna ekspresija			P	Citoplazmatska ekspresija		P	Distribucija jedarne imunopozitivnosti		
	n	niska (%)	Visoka (%)		odsutna (%)	prisutna (%)		nedifuzna (%)	difuzna (%)	P
Tip lezije										
AK	79	69,6	30,4	0,001*	40,5	59,9	0,026*	79,7	20,3	<0,001*
BD	47	71,1	28,9		44,4	55,6		9,1	90,9	
SCC	168	48,2	51,8		57,7	42,3		35,0	65,0	
KIN										
KIN1	45	66,7	33,3	0,838	57,8	42,2	0,003*	78,6	21,4	<0,001*
KIN2	32	71,9	28,1		18,8	81,3		80,6	19,4	
KIN3	46	71,7	28,3		43,5	56,5		11,1	88,9	
Diferentovanost SCC										
Dobro	58	44,8	55,2	0,817	67,2	32,8	0,193	72,4	27,6	<0,001*
Srednje	58	50,0	50,0		53,4	46,6		20,7	79,3	
Slabo	52	50,0	50,0		51,9	48,1		6,4	93,6	
Dijametar SCC (cm)										
≤2	106	51,9	48,1	0,214	60,4	39,6	0,367	40,2	59,8	0,071
>2	62	41,9	58,1		53,2	46,8		26,2	73,8	
Debljina SCC (mm)										
≤6	120	50,8	49,2	0,284	60,0	40,0	0,349	40,2	59,8	0,027*
>6	48	41,7	58,3		52,1	47,9		21,7	78,3	
Dubina invazije										
dermis	89	51,7	48,3	0,214	64,0	36,0	0,049*	48,2	51,8	0,001*
potkožno masno tkivo i dublje	74	41,9	58,1		48,6	51,4		21,9	78,1	

Skraćenice: n, broj slučajeva; AK, solarna keratoza; BD, Bowen-ova bolest; SCC, planocelularni karcinom kože; KIN, keratinocitna intrapeidermalna neoplazija, p, vrednosti verovatnoća; *statistički značajne p vrednosti.



Slika 12. Imunohistohemijska analiza ekspresije p300 u AK, BD i SCC: Nizak obim jedarne ekspresije u AK (a) i BD (b); Visok obim jedarne ekspresije u SCC (c); Prisutna citoplazmatska ekspresija u AK (d); Odsutna citoplazmatska ekspresija u SCC (e); Nedifuzna distribucija jedarne imunopozitivnosti u AK (f); Difuzna distribucija jedarne imunopozitivnosti u BD (g) i SCC (h) (a,d,f – uveličanje 400x, b,c,e,g,h – uveličanje 200x).

Ekspresija markera epitelno-mezenhimne transformacije (EMT) je analizirana odvojeno u AK, BD i SCC. Usled gubitka tkiva prilikom izrade preparata i imunohistohemijskog bojenja analizirano je 69 AK, 42 BD i 153 SCC (Tabela 19.). Iako je postojao trend češćeg prisustva normalne ekspresije E-kaderina u AK sa visokom ekspresijom p300, nalaz nije bio značajan ($p=0,125$). Normalna ekspresija E-kaderina nije uočena u BD niti u SCC. Nije bilo razlike u ekspresiji E-kaderina u odnosu na ekspresiju p300 ni u BD ($p=$) niti u SCC ($p=0,559$). Postojala je jasna tendencija da SCC sa visokom ekspresijom p300 imaju aberantnu ekspresiju vimentina ($p=0,046$).

Tabela 19. Poređenje ekspresije p300 i markera EMT

TIP LEZIJE	Ekspresija EMT marker	p300		p
		Niska n (%)	Visoka n (%)	
AK				
	E-kaderin			
	normalna	7 (14,9)	8 (36,4)	0,125
	smanjena	33(70,2)	11 (50,0)	
	odsutna	7 (14,9)	3 (13,6)	
BD				
	E-kaderin			
	smanjena	16 (55,2)	7 (53,8)	0,937
	odsutna	13 (44,8)	6 (46,2)	
SCC				
	E-kaderin			
	normalna	4 (5,5)	5 (6,2)	0,559
	smanjena	44 (60,3)	54 (67,5)	
	odsutna	25 (34,2)	21 (26,3)	
	Vimentin			
	normalna	64 (87,6)	60 (75,0)	0,046*
	aberantna	9 (12,4)	20 (25,0)	

Skraćenice: n, broj slučajeva; EMT, epitelno-mezenhimna transformacija; AK, solarna keratoza; BD, Bowen-ova bolest; SCC, planocelularni karcinom kože; p, vrednosti verovatnoća; *statistički značajne p vrednosti.

4.3.2 Ekspresija PCAF

Ekspresije PCAF je ispitana u 294 slučajeva, odnosno 79 AK, 47 BD i 168 SCC (58 dobro, 58 srednje i 52 slabo diferentovanih). Jedarna ekspresija PCAF-a je češće bila odsutna u SCC nego u AK i BD ($p<0.001$) (Slika 14a-c), dok nije bilo razlike u prisustvu citoplazmatske ekspresije ($p=0,590$) (Slika 13d-f). Difuzna distribucija ćelija sa

pozitivnom ekspresijom PCAF-a u citoplazmi je bila odlika BD i SCC, pre nego AK ($p < 0.001$) (Slika 13g-i).

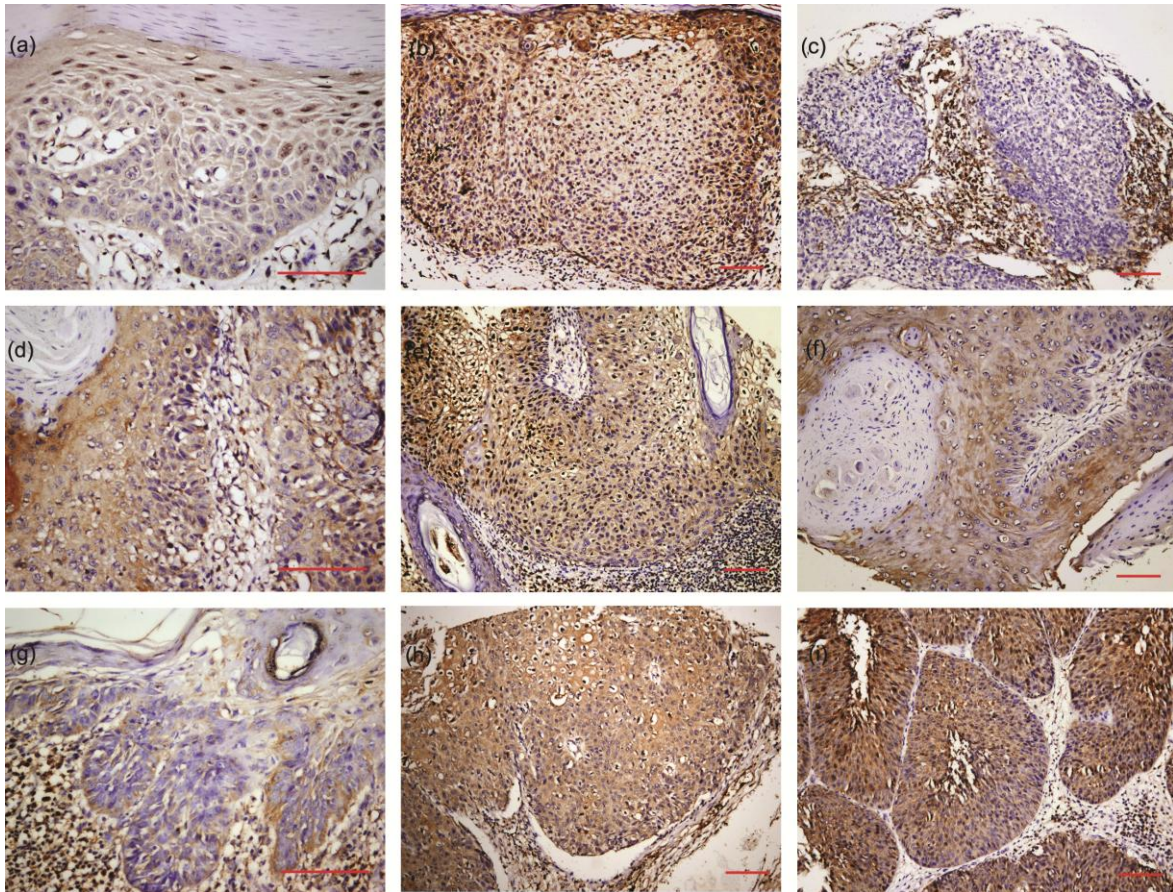
Analizom ekspresije u in situ lezijama (AK i BD) u odnosu na stepen displazije tj. KIN nije uočena razlika u prisustvu jedarne ekspresije HMGA2 ($p = 0,864$), kao ni u prisustvu citoplazmatske ekspresije ($p = 0,827$). Međutim, difuzna distribucija citoplazmatske imunopozitivnosti je bila češća u KIN3 nego u KIN1 i KIN2 lezijama ($p < 0,001$).

Daljom analizom nije uočena razlika u prisustvu jedarne ekspresije PCAF-a u odnosu na diferentovanost SCC ($p = 0,097$), niti njegov dijametar ($p = 0,900$), debljinu ($p = 0,898$) ili dubinu invazije ($p = 0,592$). Nije bilo razlike ni u prisustvu citoplazmatske ekspresije PCAF-a u odnosu na diferentovanost SCC ($p = 0,060$), niti njegov dijametar ($p = 0,854$), debljinu ($p = 0,116$) ili dubinu invazije ($p = 0,885$). Difuzna distribucija ćelija sa pozitivnom citoplazmatskom ekspresijom bila je češća u slabo diferentovanim SCC ($p < 0.001$), dok razlike nisu uočene kada je distribucija analizirana u odnosu na dijametar ($p = 0,692$), debljinu ($p = 0,840$) ili dubinu invazije tumora ($p = 0,914$).

Tabela 20. Imunohistohemijska analiza ekspresije PCAF u AK, BD i SCC

VARIJABLA	Jedarna ekspresija			Citoplazmatska ekspresija			Distribucija citoplazmatske ekspresije			
	n	Odsutna (%)	Prisutna (%)	P	odsutna (%)	prisutna (%)	P	nedifuzna (%)	difuzna (%)	P
Tip lezije										
AK	79	59,5	40,5	<0.001 *	15,2	84,8	0,590	69,7	30,3	<0.001*
BD	47	55,6	44,4		11,1	88,9		23,1	76,9	
SCC	168	82,7	17,3		10,7	89,3		30,5	69,5	
KIN										
KIN1	45	57,8	42,2	0,864	13,3	86,7	0,827	69,2	30,8	<0.001*
KIN2	32	62,5	37,5		15,6	84,4		69,2	30,8	
KIN3	46	56,5	43,5		10,9	89,1		25,0	75,0	
Diferentovanost SCC										
Dobro	58	86,2	13,8	0,097	3,4	96,6	0,060	46,6	53,4	<0.001*
Srednje	58	74,1	25,9		12,1	87,9		35,3	64,7	
Slabo	52	88,5	11,5		17,3	82,7		4,4	95,6	
Dijametar SCC (cm)										
≤2	106	83,0	17,0	0,900	10,4	89,6	0,854	31,6	68,4	0,692
>2	62	82,3	17,7		11,3	88,7		28,6	71,4	
Debljina SCC (mm)										
≤6	120	82,5	17,5	0,898	8,3	91,7	0,116	31,0	69,0	0,840
>6	48	83,3	16,7		16,7	83,3		29,3	70,7	
Dubina invazije										
dermis	89	84,3	15,7	0,592	10,1	89,9	0,885	31,3	68,3	0,914
potkožno masno tkivo i dublje	74	81,1	18,9		10,8	89,2		30,9	69,1	

Skraćenice: n, broj slučajeva; AK, solarna keratoza; BD, Bowen-ova bolest; SCC, planocelularni karcinom kože; KIN, keratinocitna intrapeidermalna neoplazija, p, vrednosti verovatnoća; *statistički značajne p vrednosti.



Slika 12. Ekspresija PCAF u AK, BD i SCC: Prisutna jedarna ekspresija u AK (a) i BD (b); Odsutna jedarna ekspresija u SCC (c); Prisutna citoplazmatska ekspresija u AK (d), BD (e) i SCC (f); Nedifuzna distribucija citoplazmatske imunopozitivnosti u AK (g); Difuzna distribucija citoplazmatske imunopozitivnosti u BD (h) i SCC (i) (a,d,g – uveličanje 400x, bc,e,f,h,i – uveličanje 200x).

Ekspresija markera epitelno-mezenhimne transformacije (EMT) je analizirana odvojeno u AK, BD i SCC. Usled gubitka tkiva prilikom izrade preparata i imunohistohemijskog bojenja analizirano je 69 AK, 42 BD i 153 SCC (Tabela 21.). Nije uočena razlika u ekspresiji E-kaderina u odnosu na ekspresiju PCAF ni u AK ($p=0,803$), niti u BD ($p=0,977$) ili SCC ($p=0,693$). Postojala je tendencija da SCC sa odsutnom jedarnom ekspresijom PCAF imaju aberantnu ekspresiju vimentina, ali razlika nije bila značajna ($p=0,076$).

Tabela 21. Poređenje ekspresije PCAF i markera EMT

TIP LEZIJE	Ekspresija EMT markera	Ekspresija PCAF		p
		niska	visoka	
AK				
	E-kaderin			
	normalna	9 (21,9)	6 (21,4)	0,803
	smanjena	27 (65,9)	17 (60,7)	
	odsutna	5 (12,2)	5 (17,9)	
BD				
	E-kaderin			
	smanjena	12 (54,5)	11 (55,0)	0,977
	odsutna	10 (45,5)	9 (45,0)	
SCC				
	E-kaderin			
	normalna	8 (6,4)	1 (3,6)	0,693
	smanjena	81 (64,8)	17 (60,7)	
	odsutna	36 (28,8)	10 (35,7)	
	Vimentin			
	normalna	98 (78,4)	26 (92,9)	0,076
	aberantna	27 (21,6)	2 (7,1)	

Skraćenice: n, broj slučajeva; EMT, epitelno-mezenhimna transformacija; AK, solarna keratoza; BD, Bowen-ova bolest; SCC, planocelularni karcinom kože; p, vrednosti verovatnoća.

4.4 Uporedna analiza ekspresije HMGA proteina i njihovih regulatora

4.4.1 Uporedna analiza ekspresije HMGA1a/1b i PRMT1

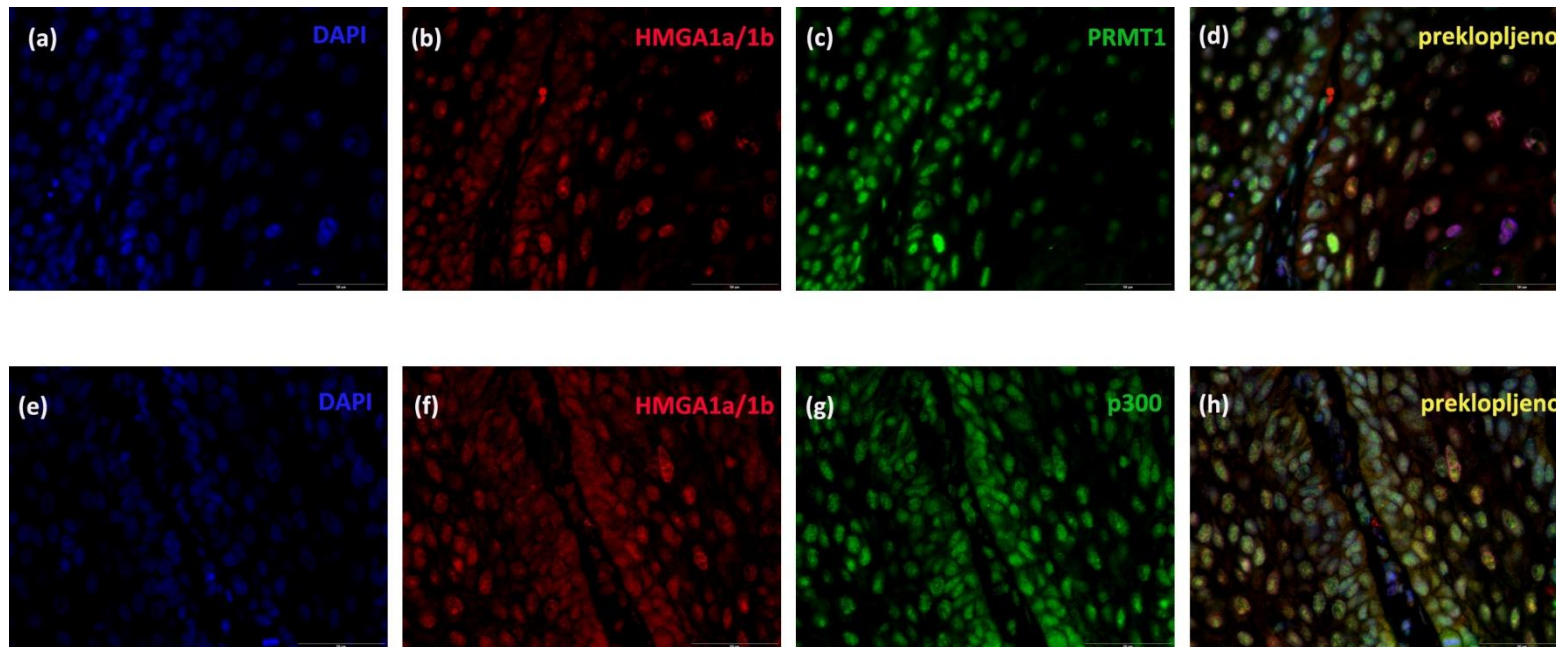
Poređenjem prisustva ekspresije HMGA1a/1b i obima ekspresije PRMT1 nije uočena udruženost njihove ekspresije u celom uzorku ($p=0,106$), kao ni u AK ($p=0,510$) i BD ($p=0,999$) (Tabela 22). Međutim, prisutna jedarna ekspresija HMGA1/1b je bila češća u SCC sa visokom (>60% pozitivnih ćelija) ekspresijom PRMT1 ($p=0,020$) (Slika 13).

Dalje, poređenjem obima jedarne ekspresije HMGA1a/1b i obima ekspresije PRMT1, takođe nije uočena udruženost njihove ekspresije u celom uzorku ($p=0,108$), kao ni u AK ($p=0,511$) i BD ($p=1,000$) (Tabela 22). Međutim, povišena jedarne ekspresija HMGA1/1b je bila češća u SCC sa visokom ($>60\%$ pozitivnih ćelija) ekspresijom PRMT1 ($p=0,025$) (Slika 14a-d).

Tabela 22. Uporedna analiza ekspresije HMGA1a/1b i PRMT1

Ekspresija PRMT1	n	Prisustvo jedarne ekspresije		p	Obim jedarne ekspresije		p
		odsutna (%)	prisutna (%)		nizak (%)	povišen (%)	
Svi slučajevi							
≤60%	99	42,2	32,6	0,106	39,6	27,8	0,108
>60%	167	57,7	67,4		60,4	72,2	
AK							
≤60%	41	50,0	57,6	0,510	51,6	61,5	0,511
>60%	36	50,0	42,4		48,4	38,5	
BD							
≤60%	11	25,9	22,2	0,999	25,6	16,7	1,000
>60%	34	74,1	77,8		74,4	83,3	
SCC							
≤60%	47	43,9	25,3	0,020*	37,6	17,1	0,025*
>60%	97	56,1	74,7		62,4	82,9	

Skraćenice: n, broj slučajeva; AK, solarna keratoza; BD, Bowen-ova bolest; SCC, planocelularni karcinom kože; p, vrednosti verovatnoća; *statistički značajne p vrednosti.



Slika 14. Prikaz prisutne i povišene ekspresije HMGA1a/1b u SCC sa visokom ekspresijom PRMT1 (a-d) i u SCC sa visokom ekspresijom p300 (e-h) (uveličanje 400x).

4.4.2 Uporedna analiza ekspresije HMGA1a/1b i PRMT6

Poređenjem prisustva jedarne ekspresije HMGA1a/1b i obima ekspresije PRMT6 nije uočena udruženost njihove ekspresije u celom uzorku ($p=0,556$), kao ni u AK ($p=0,999$), BD ($p=0,999$) i SCC zasebno ($p=0,819$) (Tabela 23). Dalje, poređenjem obima jedarne ekspresije HMGA1a/1b i obima ekspresije PRMT6 nije uočena udruženost njihove ekspresije u celom uzorku ($p=0,875$), kao ni u AK ($p=0,999$), BD ($p=0,999$) i SCC zasebno ($p=0,931$).

Tabela 23. Uporedna analiza ekspresije HMGA1a/1b i PRMT6

Ekspresija PRMT6	n	Prisustvo jedarne ekspresije		p	Obim jedarne ekspresije		p
		odsutna (%)	prisutna (%)		nizak (%)	povišen (%)	
Svi slučajevi							
≤30%	28	9,4	11,6	0,556	10,4	11,1	0,875
>30%	238	90,6	88,4		89,6	88,9	
AK							
≤30%	1	2,3	0,0	0,999	1,6	0	0,999
>30%	76	97,7	100,0		98,4	100	
BD							
≤30%	3	7,4	5,6	0,999	7,7	0	0,999
>30%	42	92,6	94,4		92,3	100	
SCC							
≤30%	24	15,8	17,2	0,819	17,1	16,7	0,931
>30%	120	84,2	82,8		82,9	83,3	

Skraćenice: n, broj slučajeva; AK, solarna keratoza; BD, Bowen-ova bolest; SCC, planocelularni karcinom kože; p, vrednosti verovatnoća; *statistički značajne p vrednosti.

4.4.3 Uporedna analiza ekspresije HMGA1a/1b i p300

Poređenjem prisustva jedarne ekspresije HMGA1a/1b i obima ekspresije p300 nije uočena udruženost njihove ekspresije u celom uzorku ($p=0,660$), kao ni u AK ($p=0,889$), BD ($p=0,212$) i SCC zasebno ($p=0,642$) (Tabela 24). Dalje, poređenjem obima jedarne ekspresije HMGA1a/1b i obima ekspresije PRMT6 nije uočena udruženost njihove ekspresije u celom uzorku ($p=0,598$), kao ni u AK ($p=1,000$) i BD ($p=0,643$). Iako je postojala tendencija da je ekspresija p300 visoka u SCC sa povišenom ekspresijom HMGA1a/1b, udruženost nije bila značajna ($p=0,680$) (Slika 14e-f).

Tabela 24. Uporedna analiza ekspresije HMGA1a/1b i p300

	Ekspresija p300	n	Prisustvo jedarne ekspresije		p	Obim jedarne ekspresije		p
			odsutna (%)	prisutna (%)		nizak (%)	povišen (%)	
Svi slučajevi	≤60%	122	56,1	53,2	0,660	55,4	51,1	0,598
	>60%	102	43,9	46,8		44,6	48,9	
AK	≤60%	38	63,6	65,4	0,889	63,5	71,4	1,000
	>60%	21	36,4	34,6		36,5	28,6	
BD	≤60%	25	57,1	76,5	0,212	63,6	80,0	0,643
	>60%	13	42,9	23,5		36,4	20,0	
SCC	≤60%	57	50,0	45,6	0,642	48,3	44,1	0,680
	>60%	64	50,0	54,4		51,7	55,9	

Skraćenice: n, broj slučajeva; AK, solarna keratoza; BD, Bowen-ova bolest; SCC, planocelularni karcinom kože; p, vrednosti verovatnoća; *statistički značajne p vrednosti.

4.4.4 Uporedna analiza ekspresije HMGA2 i p300

Poređenjem obima jedarne ekspresije HMGA2 i obima ekspresije p300 uočeno je da je visoka ekspresija HMGA2 udružena sa visokom ekspresijom p300 u celom uzorku

($p < 0,001$), kao i u AK ($p = 0,004$) (Tabela 25). Međutim, udruženost ekspresije ova dva proteina nije bila prisutna u BD ($p = 0,740$) i SCC ($p = 0,106$).

Tabela 25. Uporedna analiza ekspresije HMGA2 i p300

	Ekspresija p300	n	Obim ekspresije HMGA2			p
			nizak	umeren (%)	visok	
Svi slučajevi	≤60%	130	65,6	43,2	35,9	<0,001*
	>60%	111	34,4	56,8	64,1	
AK	≤60%	35	73,7	33,3	0,0	0,004
	>60%	19	26,7	66,7	100,0	
BD	≤60%	27	70,4	63,6	50,0	0,740
	>60%	13	29,6	36,4	50,0	
SCC	≤60%	66	58,5	41,5	38,2	0,106
	>60%	74	41,5	58,5	61,8	

Skraćenice: n, broj slučajeva; AK, solarna keratoza; BD, Bowen-ova bolest; SCC, planocelularni karcinom kože; p, vrednosti verovatnoća; *statistički značajne p vrednosti.

5 DISKUSIJA

Proteini visoke mobilnosti HMGA1 i HMGA2 su visoko ekspimirani u toku embrionalnog razvoja, kada igraju bitnu ulogu u nastanku i razvoju više različitih tkiva i organa (34,35,46–50). U adultnom organizmu ekspresija oba proteina je vrlo niska i omogućava održavanje stem-ćelijskog fenotipa (34,35). HMGA1 i HMGA2 imaju bitnu ulogu u nastanku i progresiji različitih tumora. Mehanizmi kojima tu ulogu ostvaruju su različiti i uključuju izmenu kontrole proliferacije ćelija, indukciju fenotipa matičnih ćelija, nastanak epitelno-mezenhimne transformacije (EMT), kao i negativan uticaj na mehanizme popravke oštećene DNK (43,51–55,58,59,61–66). Ekspresija HMGA1 i HMGA2 je povišena u benignim i malignim tumorima kože koji su hemijski indukovani kod miševa i korelira sa stepenom ćelijske atipije i neoplastičnih promena (56,57). Njihova ekspresija do sada nije ispitana u većini humanih tumora kože, osim u melanomu, dermatofibromu i DFSP (47,94).

Naše istraživanje je pokazalo da je jedarna ekspresija HMGA1a/1b uglavnom odsutna u AK i BD, kao intraepidermalnim neoplastičnim proliferacijama, za razliku od invazivnog SCC kože. Međutim, obim ekspresije je uglavnom bio nizak kako u AK i BD, tako i u SCC. Takođe, u većini pozitivnih slučajeva ekspresija je bila slabog intenziteta. Ekspresija HMGA1 je ranije ispitana u displazijama drugih epitela i odgovarajućim invazivnim karcinomima. Veća ekspresija je uočena u karcinomima pankreasa u poređenju sa pankreasnom intraepitelnom neoplazijom (PanIN) (80), kao i u invazivnom SCC grlića materice u poređenju sa CIN lezijama (67). Takođe, ekspresija HMGA1 je bila viša u kolorektalnim karcinomima nego u adenomima, kao prekursorskim lezijama (72). Ranije je u ćelijama karcinoma želuca pokazano da poremećaj Wnt/ β -katenin signalnog puta i jedarna lokalizacija β -katenina dovode do aktivacije HMGA1 i povećane proliferacije tumorskih ćelija (58). S obzirom da je ovaj signalni put često poremećen u SCC kože moguće je da je aktivacija ekspresije HMGA1 posredovana β -kateninom u nastanku invazivnog SCC kože (167).

Poređenjem ekspresije HMGA1a/1b nismo uočili razliku u odnosu na stepen displazije u epidermu tj. graduse KIN-a. Za razliku od našeg istraživanja, pokazano je da je ekspresija

HMGA1 češće prisutna u PanIN višeg gradusa (PanIN2 i PanIN3) nego nižeg (PanIN1) (80). U CIN1-3 je, takođe, uočeno povećanje ekspresije sa progresijom displazije (67). Ekspresija je značajno manja i u oralnoj leukoplakiji bez displazije nego u leukoplakiji sa displazijom (87). Ekspresija u kolorektalnim adenomima sa atipijom niskog i umerenog stepena se nije razlikovala međusobno, ali je bila značajno niža nego u adenomima sa visokim stepenom atipije (72). U izmenjenom epitelu bronha ekspresija HMGA1 je detektovana u bazalnim ćelijama u hiperplaziji bazalnih i mukusnih ćelija, zatim donjim delovima metaplastičnog epitela bronha, ali i difuzno u različitom obimu u displazijama i in situ karcinomu (74).

Dalje je analizirana ekspresija HMGA1a/1b u odnosu na prognostičke parametre SCC. Uočili smo da je ona češće odsutna i niža u slabo diferentovanim nego u bolje diferentovanim tumorima. Ovakav nalaz je paradoksalan i drugačiji od nalaza u drugim tumorima. Ekspresija HMGA1 je u pozitivnoj korelaciji sa histološkim gradusom glioma mozga, retinoblastoma i karcinoma pluća i pankreasa (53,55,60,73), ali ne i sa gradusom NET digestivnog trakta i karcinoma želuca i dojke (58,75,82,83). U našem istraživanju nije uočena razlika u ekspresije HMGA1a/1b u SCC kože u odnosu na njihov dijametar, debljinu ili dubinu invazije. Ekspresija HMGA1 je bila udružena sa većim dimenzijama HCC i dubljom invazijom zida creva kolorektalnim karcinomom (68,72). Razlike u ekspresiji HMGA1 nisu nađene u odnosu na dijametar karcinoma želuca i uvealnog melanoma (75,88), kao ni u odnosu na debljinu uvealnog melanoma i dubinu invazije karcinoma želuca (75,88). Naši rezultati ukazuju da bi HMGA1a/1b mogao da ima ulogu u nastanku invazivnog SCC kože, ali ne i u njegovoj progresiji.

Naše istraživanje je pokazalo da je ekspresija HMGA2 niska u AK i BD u poređenju sa SCC kože, u kome je ona češće umerena i visoka. Takođe, ekspresija HMGA2 u SCC se odlikuje difuznom distribucijom. Ranije je pokazano da je ekspresija HMGA2 značajno viša u duktalnom karcinomu pankreasa nego u PanIN (168). Veća ekspresija HMGA2 je uočena i u primarnim i metastatskim melanomima kože, karcinomima štitaste žlezde nego odgovarajućim benignim tumorima - adenokarcinomima ekstrahepatičnih bilijarnih duktusa nego u melanocitnim nevusima i adenomima štitaste žlezde i ekstrahepatičnih

bilijarnih puteva (70,89,94). Povišena ekspresija HMGA2 u SCC kože bi, kao i u slučaju HMGA1a/1b, mogla biti posledica poremećene kontrole Wnt/ β -katenin signalnog puta. Naime, u ćelijama trostruko-negativnih karcinoma dojke, upravo aktivacija Wnt/ β -katenin signalnog puta dovodi do ekspresije HMGA2 i proliferacije tumorskih ćelija (59). Translokacije i amplifikacije *HMGA2*, kao i delecije pojedinih delova ovog gena su opisane u različitim mezenhimalnim tumorima, kao i karcinomima pljuvačnih žlezda nastalih iz pleomorfno adenoma (97,99,100). S obzirom da su u SCC i melanomima vulve uočene duga i skraćena forma *HMGA2* iRNK (169), moguće je da preuređenja gena, ali i izmena posttranskripcione obrade iRNK imaju ulogu u nastanku invazivnog SCC kože, te su neophodna dalja istraživanja koja bi to ispitala.

Kada smo in situ lezije analizirali kao KIN uočeno je da je niska ekspresija prisutna u KIN1, a da je difuzna distribucija bila prisutna ne samo u KIN3 već i u KIN1. Kako najveći deo KIN3 čine BD, ovakav nalaz može ukazati na to da su AK heterogene lezije u smislu ekspresije HMGA2. Ukoliko bi AK bile homogene lezije moglo bi se očekivati da je ekspresija HMGA2 u KIN1 niža i nedifuzna, a u KIN2 bi ona bila, najmanje, viša, ako ne i difuzna. Ekspresija HMGA2 u hiperplastičnom epitelu bronha je bila odsutna u bazalnim ćelijama, ali prisutna u drugim ćelijama (obrnuta distribucija nego HMGA1), dok je u displazijama ona bila difuzna i varijabilnog obima (74).

U ovom radu analizirana je i ekspresija HMGA2 proteina u odnosu na prognostičke parametre SCC kože. Pokazali smo da je ekspresija HMGA2 difuzna u slabo diferentovanim tumorima, dok nije bilo razlika u obimu ekspresije. Povezanost ekspresije HMGA2 sa diferentovanošću tumora ranije je pokazana u adenokarcinomu pankreasa, seroznom karcinomu jajnika, karcinomu dojke, NET digestivnog trakta, retinoblastomu i SCC jezika (60,63,77,83,92,168), ali ne i u SCC usne duplje kolorektalnim karcinomima (65,91). U karcinomima pankreasa ekspresija HMGA2 je bila difuzna nezavisno od stepena diferentovanosti (79). Aktivacija HMGA2 doprinosi održavanju nediferentovanog stanja embrionalnih matičnih ćelija (38), te bi, iako nije bilo razlika u obimu ekspresije HMGA2, naš nalaz difuzne distribucije pozitivnih ćelija u plažama slabo diferentovanih SCC kože mogao ukazati na značaj aktivacije HMGA2 u evoluciji i progresiji SCC kože. S

obzirom da HMGA proteini ostvaruju direktnu interakciju i sa drugim transkripcionim faktorima (34), ispitivanje uloge ovih proteina u normalnim i tumorskim tkivima, kakav je SCC, se uslozjava. Takođe, u našem istraživanju nisu uočene razlike ni u obimu ni u distribuciji ekspresije HMGA2 u odnosu na dijametar, debljinu ili dubinu invazije SCC. U adenokarcinomima pankreasa, SCC usne duplje i karcinomima nazofarinksa obim HMGA2 ekspresije nije bio povezan sa veličinom primarnog tumora (91,93,168), ali jeste sa veličinom karcinoma dojke (59). Ekspresija HMGA2 je korelirala sa dubinom invazije karcinoma želuca (86), ali ne i kolorektalnih karcinoma (65). Sveukupno posmatrano, moguće je da HMGA2 igra bitnu ulogu u nastanku invazivnog SCC kože, ali da je u progresiji ovih tumora njegov značaj značaj ograničen.

Metilacija arginina, jedna od najznačajnijih posttranslacionih modifikacija proteina je uključena u regulaciju osnovnih procesa u ćeliji. PRMT1 je odgovoran za većinu arginin metilacije u ćeliji, mada su i PRMT1 i PRMT6 bitni za normalno funkcionisanje ćelije (102,103). Ekspresija ovih proteina u normalnim i tumorskim tkivima je do sada ispitivana u nekoliko imunohistohemijskih studija. Ekspresija PRMT1 je uočena u većini normalnih tkiva, uključujući i epidermis (121). Međutim obrazac ekspresije i intraćelijska lokalizacija (jedarna vs. citoplazmatska) nisu evaluirane u većini studija (osim u onim koje su ispitivale ekspresiju u štitastoj žlezdi). Citoplazmatska ekspresija PRMT1 je uočena u normalnom epitelu dojke i debelog creva (122,123). Veoma slab intenzitet ekspresije PRMT1 i PRMT6 uočen je u normalnom urotelu (125). U našoj studiji ekspresija PRMT1 je bila samo jedarna. Anti-PRMT1 antitelo koje je korišćeno u istraživanju prepoznaje C-terminalni kraj PRMT1, koji je zajednički za sve izoforme, te antitelo nije specifično za pojedinačne forme, tj. trebalo bi da ispoljava rekativnost prema svim izoformama. Moguće je da su PRMT1 izoforme v1 and -v7, kao uglavnom jedarne forme, dominantne u ispitivanim tumorima, a da izoforma v2, kao dominantno citoplazmatska forma, nije ekspimirana. Neophodna su detaljnija istraživanja, RT-PCR ili proteomska, kako bi se detaljnije razjasnio obrazac i uloga izoformi PRMT1 u ovim tumorima. Ekspresija PRMT6 u AK, BD i SCC je, takođe, bila samo jedarna.

Nekoliko studija koje su ispitivale prisustvo PRMT1 iRNK su pokazale da u karcinomima dojke, debelog creva, mokraćne bešike, kao i u nesitnoćelijskim karcinomima pluća postoji ushodna regulacija PRMT1 u poređenju sa normalnim tkivima (104,122–126). Primenom imunohistohemijskih metoda uočeno je da je PRMT1 eksprimiran u citoplazmi ćelija karcinoma dojke i debelog creva, kao i u jedrima skvamoznog i urotelnog karcinoma mokraćne bešike (122,124,125). U studiji Elakoum-a i saradnika, u kojoj je ispitivana ekspresija PRMT1 u nesitnoćelijskim karcinomima pluća, analizirani su i procenat pozitivnih ćelija i intenzitet imunohistohemijskog bojenja, odnosno njihov umnožak. Međutim, ćelijska lokalizacija nije evaluirana (126). Mi nismo analizirali intenzitet bojenja. Naime, mi smo uočili da intenzitet varira među ćelijama pojedinačnih slučajeva. Takođe, evaluacija intenziteta bojenja je izrazito subjektivna i teško je postići adekvantu međuposmatračku saglasnost. U našoj studiji je visoka ekspresija PRMT1 bila češća u BD i SCC, kao uznapredovalim neoplastičnim proliferacijama, nego u AK. Ovi nalazi bi se mogli objasniti dvojakom ulogom PRMT1 u regulaciji ekspresije E-kaderina i ćelijske atezije. PRMT1 metiluje Axin i omogućava membransku lokalizaciju E-kaderina i adekvatnu ćelijsku ateziju (115). Takođe, on metiluje i aktivira Twist1, transkripcioni repressor gena za E-kaderin (112). Prekomerna ekspresija v1 i v2 izoformi PRMT1 u ćelijskim kulturama karcinoma dojke je dovela do smanjenja ćelijske atezije posredovane E-kaderinom i β -kateninom, indukcije epitelno-mezenhimne transformacije i povećanog motiliteta ćelija i invazivnosti (120). Ranije je pokazano da bi gubitak membranske ekspresije β -katenina mogao imati ulogu u progresiji od in situ do invazivnog SCC kože(167). Moguće je da je nishodna-regulacija PRMT1 i Axina neophodna u početku neoplastične transformacije keratinocita u AK. Analizom ekspresije PRMT1 u KIN lezijama različitog stepena, uočeno je da je ekspresija u KIN1 viša i češće difuzna nego u KIN2 lezijama. S obzirom da KIN1 i KIN2 lezije čine AK, ovakav nalaz ukazuje da su AK heterogene lezije i da se ekspresija PRMT1 proteina ne menja linearno od displazija nižeg ka displazijama višeg gradusa. Tokom našeg istraživanja postavljena je i pretpostavka da bi povišena ekspresija PRMT1 u BD i SCC bi mogla imati efekat na Twist1 i biti uzrok smanjene ekspresije E-kaderina, pomeranja β -katenina u jedro i aktivacije *Wnt*-signalnog puta. Međutim, mi mismo uočili razlike u ekspresiji E-kaderina u odnosu na ekspresiju

PRMT1 u AK, BD ili SCC. Bitno je naglasiti da postoji sedam izoformi PRMT1, kao i da svaka ima specifične supstrate (103). Visoka ekspresija v1 i v2 varijanti iRNK je bila udružena sa visokim tumorskim gradusom u karcinomima dojke i debelog creva (122,123). U našoj studiji obim ekspresije PRMT1 nije bio udružen sa gradusom SCC, niti je postojala razlika u ekspresiji E-kaderina u odnosu na ekspresiju PRMT1 u različito diferentovanim tumorima. Neophodna su dalja istraživanja koja bi objasnila koje izoforme su prisutne u normalnom epitelu, a koje igraju bitnu ulogu u neoplastičnoj transformaciji keratinocita. Kako antitelo koje je korišćeno u našoj studiji prepoznaje sve izoforme PRMT1, moguće je da postoji ushodna ili jnishodna regulacija različitih izoformi, čime bi se mogle objasniti varijacije u ukupnoj ekspresiji PRMT1 koja je uočena u našem istraživanju.

Uloga PRMT6 u kancerogenezi je manje poznata. U poređenju sa normalnim tkivima ekspresija na nivou iRNK ili proteina je smanjena u melanomima, ali je povišena u karcinomima prostate, pluća, dojke i mokraćne bešike (125,127,129). Mi smo uočili generalno povišenu ekspresiju PRMT6 u AK, BD i SCC, i nije bilo negativnih slučajeva. Ipak, niska ekspresija PRMT6 je bila češće prisutna u SCC nego u AK. U KIN lezijama su, uglavnom, uočene umerena i visoka ekspresija PRMT6, nezavisno od stepena KIN lezije. Interesantan nalaz jeste porasta ekspresije u slabo diferentovanim SCC u poređenju sa dobro i srednje diferentovanim tumorima. Ranije je pokazano da PRMT6 ima represivan uticaj na ekspresiju MMP9 (135), kao i da je ekspresija MMP9 povišena u invazivnom SCC kože (22). Međutim, u našoj studiji nisu uočene razlike u ekspresiji MMP9 u odnosu na ekspresiju PRMT6 niti u AK, BD ili SCC, kao ni među tumorima različitog dijametra, debljine ili stepena diferentovanosti. Pored inhibitorog uticaja na transkripciju gena PRMT6 ima svojstvo metilacije histona H3R42, kojom se aktivira transkripcija gena (30). Nije poznato koji geni se aktiviraju na ovaj način, te su dalja istraživanja neophodna kako bi se ispitala uloga PRMT6 i ovog vida genske regulacije u nastanku i progresiji SCC kože.

p300 i PCAF su, kao transkripcioni kofaktori i epigenetski modulatori uključeni u regulaciju ćelijske proliferacije, diferencijacije, reakcije na oštećenje DNK i apoptozu.

(139,141,144). U našoj studiji analizirani su jedarna i citoplazmatska ekspresija p300 i PCAF. Uočena je visoka jedarna ekspresija p300 u SCC u poređenju sa AK i BD, dok je citoplazmatska ekspresija češće bila odsutna. Takođe, uočili smo i da je obim jedarne ekspresije p300 relativno sličan u KIN1 i KIN2 lezijama, ali da je u KIN2 lezijama distribucija češće difuzna. Usled toga, AK su lezije sa relativno homogenim obimom ekspresije p300, ali ne i njegove distribucije. Do sada su razlike u jedarnoj i citoplazmatskoj ekspresiji p300 ispitivane samo u melanocitnim tumorima, kada je pokazano da je jedarna ekspresija smanjena, a citoplazmatska povišena u melanomima u poređenju sa običnim i displastičnim melanocitnim nevusima (170). Ovakav obrazac jedarne i citoplazmatske ekspresije u melanomima je suprotan onom koji smo mi uočili u SCC kože. Moguće je da je p300 uključen u drugačije molekularne puteve u melanocitima i keratinocitima, te da je uloga p300 drugačija u kancerogenezi melanocitnih i keratinocitnih tumora. Genska ispitivanja p300 gena su pokazala da mutacije u ovom genu nisu česte u solidnim tumorima. Neke od uočenih mutacija nemaju efekat na ekspresiju gena, dok u nekima dovode do gubitka ekspresije (141,166). Mutacije p300 gena su uočene u SCC usne duplje, ali bez efekta na ekspresiju. U istoj studiji je pokazana demetilacija promotorskog regiona ovog gena (151), što ukazuje da izmenjena epigenetska kontrola ekspresije p300 ima bitnu ulogu u razvoju SCC usne duplje. Međutim, ostaje da se ispita koji mehanizmi kontrole ekspresije p300 su izmenjeni u AK, BD i SCC kože i kako doprinose njihovom nastanku i progresiji. Neophodna su dalja istraživanja koja bi ispitala prisustvo i značaj izmenjene epigenetske kontrole p300 u evoluciji SCC kože.

Ekspresija p300 je ispitivana u SCC različitim lokalizacijama. Visoka nuklearna ekspresija je bila udružena sa višim gradusima SCC jednjaka i larinksa, ali ne i SCC kože i usne duplje. (150,151,156,161). U našem istraživanju, takođe, nije uočena udruženost jedarne, ali ni citoplazmatske ekspresije p300 i diferentovanosti SCC kože. Jedino je u srednje i slabo diferentovanim tumorima bila češća difuzna distribucija pozitivnih ćelija. Takođe, jedarna ekspresija p300 nije bila povezana sa dijametrom SCC kože i usne duplje (151,161). Nalazi našeg istraživanja su slični, tj. nije postojala udruženost jedarne ili citoplazmatske ekspresije sa dijametrom SCC. Međutim, u našem istraživanju je kao granična vrednost za

dijametar tumora korišćeno 2 cm, dok su Chen i saradnici u svojoj studiji poredili tumore manje i veće od 5 cm (161). U našem uzorku ni citoplazmatska ni jedarna ekspresija p300 nisu bile udružene sa debljinom tumora, ali je postojala tendencija prisustva citoplazmatske ekspresije u tumorima koji su infiltrisali potkožno masno tkivo i dublja tkiva. Pored toga, difuzna distribucija jedarne imunopozitivnosti je bila značajno češća u debljim tumorima (>6 mm) i tumorima sa infiltracijom dubljih tkiva. Prema poslednjoj verziji sistema za određivanje stadijuma AJCC debljina SCC veća od 2 mm i infiltracija retikularnog dermisa i dubljih tkiva predstavljaju kriterijume visokog rizika i čije prisustvo određuje pT1 odnosno pT2 stadijum (12). Međutim, u našem uzorku je postojalo svega nekoliko slučajeva SCC tanjih od 2 mm, te smo koristili graničnu vrednost od 6 mm. Ova granična vrednost debljine SCC kože je ranije predložena od drugih autora, jer je uočeno da bolje korelira sa povećanim rizikom za nastanak metastaza (13). Chen i saradnici su ranije pokazali da jedarna ekspresija ne korelira sa T stadijumom SCC kože, ali da korelira sa sveukupnim kliničkim stadijumom (161). Povezanost visokog obima jedarne ekspresije i prisustva dublje infiltracije, odnosno višeg pT stadijuma je pokazana u SCC jednjaka (156). Naša studija je prva u kojoj je ispitivan odnos citoplazmatske ekspresije p300 i distribucije jedarne imunopozitivnosti sa prognostičkim parametrima SCC kože.

Naše istraživanje je prvo koje je ispitivalo ekspresiju PCAF u AK, BD i SCC kože. Uočeno je smanjenje jedarne ekspresije u SCC u poređenju sa AK i BD. Citoplazmatska ekspresija je uočena u većini slučajeva AK, BD i SCC, ali je u BD i SCC češće bila prisutna difuzna distribucija citoplazmatske imunopozitivnosti. Takođe, gubitak jedarne i prisustvo citoplazmatske ekspresije su prisutni nezavisno od stepena KIN lezija. Ranije je pokazano da je ekspresija PCAF prisutna u citoplazmi keratinocita bazalnog sloja epidermis (nediferentovani keratinociti), dok je ekspresija u jedru prisutna u suprabazalnim (diferentovanim) keratinocitima.(145). Moguće je da citoplazmatska ekspresija PCAF-a predstavlja imaturni obrazac u normalnim keratinocitima. Čini se da većina ćelija u AK, BD i SCC ima ovakav imaturni obrazac ekspresije PCAF-a, te da bi njegoa disregulacija mogla biti rani događaj u neoplastičnoj transformaciji keratinocita. Međutim, s obzirom da je PCAF gen retko mutiran u humanim karcinomima, a da i tada ne nastaje poremećaj

proteinske ekspresije,(164,165) neophodna su dalja istraživanja koja bi objasnila značaj fenotipa koji je uočen u našoj studiji..

Ekspresija PCAF-a je ranije ispitana u dva tipa humanih karcinoma – u SCC jednjaka i intestinalnom tipu adenokarcinoma želuca. Pokazano je da postoji smanjena ekspresija mRNA u SCC jednjaka, ali to smanjenje nije koreliralo sa histološkim gradusom ili stadijumom tumora. U većini takvih slučajeva sa smanjenom ekspresijom postojala je metilacija promotorskog regiona gena za PCAF, dok su delecije bile retke (163). Gubitak i jedarne i citoplazmatske ekspresije PCAF-a je uočen u intestinalnom tipu adenokarcinoma želuca. Ovaj gubitak je korelirao sa dubljom infiltracijom zida želuca i većim dijametrom tumora, ali ne i sa stepenom diferencijacije tumora (162). U našoj studiji gubitak jedarne i prisustvo citoplazmatske ekspresije PCAF-a su bili uočeni u većini slučajeva SCC i nije postojala povezanost ekspresije PCAF-a (bilo jedarne, bilo citoplazmatske) sa diferentovanošću SCC kože, njegovim dijametrom, debljinom ili dubinom invazije. Jedine razlike su uočene u distribuciji citoplazmatske imunopozitivnosti, koja je bila karakteristična za slabo diferentovane SCC. Kao što je prethodno rečeno, gubitak jedarne, a porast citoplazmatske ekspresije PCAF-a bi mogao predstavljati imaturni obrazac koji je dominantan u slabo diferentovanim SCC kože.

Uloga p300 i PCAF u epitelno-mezenhimnoj transformaciji (EMT) je ranije ispitana na nekoliko različitih tipova ćelijskih kultura, ali su rezultati bili neujednačeni. U kulturi ćelija intrahepatičnog holangiokarcinoma p300 i PCAF su indukovali ekspresiju E-kaderina, dok je njihova supresija dovela do smanjenja ekspresije E-kaderina i potenciranja EMT (171). Nasuprot tome, u kulturama invazivnog i slabo diferentovanog hepatocelularnog karcinoma inhibicija p300 je dovela do porasta ekspresije E-kaderina, smanjenja ekspresije vimentina i imala negativan efekat na migratorni potencijal tumorskih ćelija (149). Ranije je pokazano da pojava EMT u SCC kože korelira sa aktivacijom PI3K/AKT puta (172). AKT fosforiluje i stabilizuje p300, potencira njenu acetilaznu aktivnost i regrutuje je u region promotora gena (173). Upotrebom imunohistohemijskih metoda mi nismo pokazali da postoji korelacija ekspresije E-kaderina i obima ekspresije

p300 ili prisustva jedarne ekspresije PCAF-a. Moguće je da p300 i PCAF regulišu EMT u SCC kože nezavisno od ekspresije E-kaderina. U tkivu karcinoma debelog creva visoka ekspresija p300 je korelirala sa prisustvom transkripcionog faktora ZEB1 u regionu gena za receptor za vitamin D (engl. *vitamin D receptor gene, VDR*), ali ne i sa prisustvom SNAIL transkripcionog faktora u regionu gena za E-kaderin (148). S obzirom da smo uočili slabu udurženost ekspresije vimentina i jedarne ekspresije p300, neophodna su dalje ispitivanja, imunohistohemijška in a ćelijskim kulturama, kako bi se ispitala moguća uloga p300 i PCAF u nastanku EMT u SCC kože.

Posttranslacione modifikacije HMGA proteina bi mogle imati veliki značaj u regulaciji njihove aktivnosti. Međutim, mehanizmi kojima su PTM regulisane, kao ni njihov efekat na HMGA proteine nisu u potpunosti razjašnjeni. Metilacija posredovana PRMT1 proteinom je pokazana u in vitro uslovima, ali ne i u humanim ćelijama, za razliku od PRMT6. Međutim, njihov efekat na funkciju HMGA proteina nije potpuno jasan (43,44).. HMGA proteini i p300 i PCAF imaju složen i višesmeran odnos. Acetilacija HMGA1 posredovana PCAF-om stabilise enhanceosom, sprečava CBP-acetilaciju HMGA1a i aktivira transkripciju (33,39), dok HMGA2 regulise ekspresiju p300 i PCAF, kao i stepen acetilacije histona H3K9 i H3K27 (45). U našem istraživanju smo pokazali da su prisustvo ekspresije HMGA1a/1b i njegova povišena ekspresija u SCC kože udruženi sa visokom ekspresijom PRMT1. Umerena, a naročito visoka ekspresija HMGA2 su bile udružene sa visokom ekspresijom p300 u AK. Naše istraživanje pokazuje da, pojedinačno, ispitani proteini imaju bitnu ulogu u nastanku invazivnog SCC kože, dok je njihov značaj u progresiji tumora nešto manji. Udružena ekspresija HMGA2 i p300 bi mogla imati ulogu u nastanku invazivnog SCC kože, a udružena ekspresija HMGA1a/1b i PRMT1 u progresiji tumora. Međutim, imunohistohemijške metode analize ekspresije proteina ne omogućavaju određivanje smera odnosa dva ili više proteina, ali mogu ukazati na njihovu potencijalnu povezanost. Usled toga su neophodna dalja istraživanja, uključujući eksperimente na kulturama tumorskih ćelija i životinjskim ksenograft modelima.

6 ZAKLJUČCI

Na osnovu analize ekspresije ispitivanih markera u odnosu na histopatološki tip lezije izvedeni su sledeći zaključci:

1. Ekspresija HMGA1a/1b je češće prisutna u SCC nego u AK i BD, ali je generalno niskog obima u ispitanim uzorcima, dok je HMGA2 visoka i difuzna u SCC kože, dok je niska i nedifuzna u AK i BD
2. Ekspresija PRMT1 je češće visoka i difuzna u BD i SCC kože nego u AK, dok je PRMT6 uglavnom umerena ili visoka u AK, BD i SCC kože.
3. Jedarna ekspresija p300 je češće visoka, a citoplazmatska češće odsutna u SCC kože u poređenju sa AK i BD; takođe difuzna jedarna ekspresija p300 je češća u BD i SCC nego u AK.
4. Jedarna ekspresija PCAF je češće odsutna u SCC kože nego u AK i BD; citoplazmatska ekspresija PCAF je prisutna u većini AK, BD i SCC, ali je njena distribucija češće difuzna u BD i SCC nego u AK.

Na osnovu analize ekspresije HMGA proteina i njihovih modulatora u keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji (KIN) izvedeni su sledeći zaključci:

5. AK je homogena lezija u pogledu prisustva i obima ekspresije HMGA1a/1b, dok je heterogena u pogledu obima i distribucije ekspresije HMGA2, s obzirom da je u KIN1 ekspresija niska i difuzna, dok je u KIN2 difuzna
6. AK je heterogena lezija u pogledu obima i distribucije ekspresije PRMT1, s obzirom da je ekspresija u KIN1 visoka i nedifuzna, a u KIN2 umerena i nedifuzna, a homogena u pogledu obima i distribucije ekspresije PRMT6.
7. AK je heterogena lezija u pogledu ekspresije p300 s obzirom na češće prisustvo citoplazmatske ekspresije u KIN2 i odsustvo razlika u jedarnoj ekspresiji između KIN1 i KIN2.
8. AK je homogena lezija u pogledu prisustva jedarne i citoplazmatske ekspresije, kao i distribucije citoplazmatske ekspresije PCAF.

Na osnovu analize ekspresije HMGA proteina i njihovih modulatora sa prognostičkim parametrima planocelularnog karcinoma kože izvedeni su sledeći zaključci:

9. Ekspresija HMGA1a/1b je češće prisutna i višeg obima u dobro i srednje diferentovanim nego u slabo diferentovanim SCC kože, a nije povezana sa dijametrom, debljinom i dubinom invazije SCC kože.
10. Difuzna ekspresija HMGA2 je češća u srednje i slabo diferentovanim SCC kože nego u dobro diferentovanim tumorima, ali nije povezana sa dijametrom, debljinom i dubinom invazije SCC kože.
11. Difuzna ekspresija PRMT1 je češća u srednje i slabo diferentovanim SCC kože nego u dobro diferentovanim tumorima; međutim, obim i distribucija ekspresije PRMT1 nisu povezane sa dijametrom, debljinom i dubinom invazije SCC kože.
12. Ekspresija PRMT6 je viša i difuzna u slabo diferentovanim nego u dobro i srednje diferentovanim SCC kože.
13. Difuzna jedarna ekspresija p300 je češća u srednje i slabo diferentovanim SCC kože, tumorima debljim od 6 mm, kao i u tumorima sa invazijom potkožnog masnog tkiva i dubljih struktura.
14. Difuzna distribucija citoplazmatske ekspresije PCAF je češća u slabo diferentovanim nego u dobro i srednje diferentovanim SCC kože, dok nije povezana sa dijametrom, debljinom i dubinom invazije SCC kože.
15. Udružena ekspresija HMGA2 i p300 bi mogla imati ulogu u nastanku invazivnog SCC kože, a udružena ekspresija HMGA1a/1b i PRMT1 u progresiji tumora; p300 je, takođe, povezan i sa značajnim parametrima agresivnijeg biološkog ponašanja (debljinom i dubinom invazije) SCC kože.
16. Imunohistohemijским metodama nije pokazana jasna povezanost ekspresije PRMT1, PRMT6, p300 i PCAF ekspresijom markera epitelno-mezenhimne transformacije u AK, BD i SCC kože, osim povezanosti ekspresije p300 sa ekspresijom vimentina.

Na osnovu procene različitih načina evaluacije imunohistohemijskog bojenja u odnosu na tip lezije i prognostičke parametre izvedeni su sledeći zaključci:

17. Obim i distribucija jedarne ekspresije HMGA2, PRMT1, PRMT6 odnosno p300 imaju podjednak značaj u analizi ispoljavanja ovih markera u odnosu na histopatološki tip lezije.
18. Distribucija jedarne ekspresije PRMT6 i p300, kao i citoplazmatske ekspresije PCAF imaju veći značaj nego obim ekspresije u analizi razlika u prisustvu ovih markera u in situ lezijama klasifikovanim kao KIN.
19. Distribucija jedarne ekspresije PRMT1, PRMT6 i p300, kao i citoplazmatske ekspresije PCAF imaju veći značaj nego obim ekspresije u analizi imunohistohemijskog bojenja ovih markera u odnosu na prognostičke parametre planocelularnog karcinoma kože.

7 LITERATURA

1. Cockerell CJ. Histopathology of incipient intraepidermal squamous cell carcinoma (“actinic keratosis”). *J Am Acad Dermatol.* 2000;42(1):S11–7.
2. Salasche SJ. Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42(1):S4–7.
3. Rossi R, Mori M, Lotti T. Actinic Keratosis. *Int J Dermatol.* 2007;46:895–904.
4. Smoller BR. Squamous cell carcinoma: from precursor lesions to high-risk variants. *Mod Pathol.* 2006;19:S88–92.
5. Bonerandi JJ, Beauvillain C, Caquant L, Chassagne JF, Chaussade V, Clavere P, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cutaneous squamous cell carcinoma and precursor lesions. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2011;25(Suppl 5):1–51.
6. Anwar J, Wrone DA, Kimyai-Asadi A, Alam M. The development of actinic keratosis into invasive squamous cell carcinoma: evidence and evolving classification schemes. *Clin Dermatol.* 2004;22(3):189–196.
7. Diepgen TL, Mahler V. The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol.* 2002;146(Suppl 61):1–6.
8. Stratigos A, Garbe C, Lebbe C, Malvehy J, Del Marmol V, Pehamberger H, et al. Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer.* 2015;51(14):1989–2007.
9. Videnović G, Miljuš D, Ilić D, Krsić D. Nonmelanoma Skin Cancer in the Population of the City of Belgrade in the Period 1999 – 2011. *Srp Arh Celok Lek.* 2015;143(5-6):290–295.
10. Kallini JR, Hamed N, Khachemoune A. Squamous cell carcinoma of the skin: epidemiology, classification, management, and novel trends. *Int J Dermatol.* 2015;54:130–140.

11. Luzar B, Bastian BC, Calonje E. Tumors of the surface epithelium. In: McKee P, editor. McKee's pathology of the skin with clinical correlations 4th ed. Elsevier; 2012.
12. Farasat S, Yu SS, Neel VA, Nehal KS, Lardaro T, Mihm MC, et al. A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous squamous cell carcinoma: Creation and rationale for inclusion of tumor (T) characteristics. *J Am Acad Dermatol*. 2011;64(6):1051–1059.
13. Breuninger H, Brantsch K, Eigentler T, Häfner HM. Comparison and evaluation of the current staging of cutaneous carcinomas. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2012;10(8):579–586.
14. Breuninger H, Eigentler T, Bootz F, Hauschild A, Kortmann R-D, Wolff K, et al. Brief S2k guidelines - Cutaneous squamous cell carcinoma. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2013;11(s3):37–45.
15. Werner RN, Sammain A, Erdmann R, Hartmann V, Stockfleth E, Nast A. The natural history of actinic keratosis: A systematic review. *Br J Dermatol*. 2013;169:502–518.
16. Brantsch KD, Meisner C, Schönfish B, Trilling B, Wehner-Caroli J, Röcken M, et al. Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: a prospective study. *Lancet Oncol*. 2008;9(8):713–720.
17. Boukamp P. Non-melanoma skin cancer: What drives tumor development and progression? *Carcinogenesis*. 2005;26(10):1657–1667.
18. Ra SH, Li X, Binder S. Molecular discrimination of cutaneous squamous cell carcinoma from actinic keratosis and normal skin. *Mod Pathol*. 2011;24(7):963–973.
19. Campbell C, Quinn a G, Ro YS, Angus B, Rees JL. P53 Mutations Are Common and Early Events That Precede Tumor Invasion in Squamous Cell Neoplasia of the

- Skin. *J Invest Dermatol*. 1993. 100:746–748.
20. Ratushny V, Gober MD, Hick R, Ridky TW, Seykora JT. From keratinocyte to cancer: the pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Clin Invest*. 2012;122(2):464–472.
 21. Jang TJ. Epithelial to mesenchymal transition in cutaneous squamous cell carcinoma is correlated with COX-2 expression but not with the presence of stromal macrophages or CD10-expressing cells. *Virchows Arch*. 2012;460:481–487.
 22. O’Grady A, Dunne C, O’Kelly P, Murphy GM, Leader M, Kay E. Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in non-melanoma skin cancer: implications for tumour progression. *Histopathology*. 2007;51(6):793–804.
 23. Poswar FO, Fraga CAC, Farias LC, Feltenberger JD, Cruz VPD, Santos SHS, et al. Immunohistochemical analysis of TIMP-3 and MMP-9 in actinic keratosis, squamous cell carcinoma of the skin, and basal cell carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2013;209(11):705–709.
 24. Botchkarev V a, Gdula MR, Mardaryev AN, Sharov A a, Fessing MY. Epigenetic regulation of gene expression in keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2012;132(11):2505–2521.
 25. Luger K, Dechassa ML, Tremethick DJ. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(7):436–447.
 26. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693–705.
 27. Pal S, Sif S. Interplay Between Chromatin Remodelers and Protein Arginine Methyltransferases. *J Cell Physiol*. 2007;213:306–315.

28. Guccione E, Bassi C, Casadio F, Martinato F, Cesaroni M, Schuchlantz H, et al. Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. *Nature*. 2007;449:933–937.
29. Hyllus D, Stein C, Schnabel K, Schiltz E, Imhof A, Dou Y, et al. PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3K4 trimethylation. *Genes Dev*. 2007;21:3369–3380.
30. Casadio F, Lu X, Pollock SB, LeRoy G, Garcia B a, Muir TW, et al. H3R42me2a is a histone modification with positive transcriptional effects. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110:14894–14899.
31. Cleynen I, Van de Ven WJM. The HMGA proteins: a myriad of functions (Review). *Int J Oncol*. 2008;32(2):289–305.
32. Li G, Reinberg D. Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Curr Opin Genet Dev*. 2011;21(2):175–186.
33. Zhang Q, Wang Y. HMG modifications and nuclear function. *Biochim Biophys Acta* . 2010;1799(1-2):28–36.
34. Reeves R. Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene*. 2001 Oct 17;277(1-2):63–81.
35. Ozturk N, Singh I, Mehta A, Braun T, Barreto G. HMGA proteins as modulators of chromatin structure during transcriptional activation. *Front Cell Dev Biol*. 2014;2:5.
36. Reeves R. High mobility group (HMG) proteins: Modulators of chromatin structure and DNA repair in mammalian cells. *DNA Repair (Amst.)*. 2015;36:122-136.
37. Giannini G, Cerignoli F, Mellone M, Massimi I, Ambrosi C, Rinaldi C, et al. Molecular mechanism of HMGA1 deregulation in human neuroblastoma. *Cancer Lett*. 2005;228(1-2):97–104.
38. Pfannkuche K, Summer H, Li O, Hescheler J, Dröge P. The high mobility group

protein HMGA2: a co-regulator of chromatin structure and pluripotency in stem cells? *Stem Cell Rev.* 2009;5(3):224–30.

39. Sgarra R, Rustighi A, Tessari M a, Di Bernardo J, Altamura S, Fusco A, et al. Nuclear phosphoproteins HMGA and their relationship with chromatin structure and cancer. *FEBS Lett.* 2004;574(1-3):1–8.
40. Cleynen I, Huysmans C, Sasazuki T, Shirasawa S, Van De Ven W, Peeters K. Transcriptional control of the human high mobility group A1 gene: Basal and oncogenic Ras-regulated expression. *Cancer Res.* 2007;67(10):4620–9.
41. Schwanbeck R, Manfioletti G, Wis JR. Architecture of High Mobility Group Protein I-C DNA Complex and Its Perturbation upon Phosphorylation by Cdc2 Kinase. 2000;275(3):1793–801.
42. Agostino S Di, Fedele M, Chieffi P, Fusco A, Rossi P, Geremia R, et al. Phosphorylation of High-Mobility Group Protein A2 by Nek2 Kinase during the First Meiotic Division in Mouse Spermatocytes. *Mol Biol Cell.* 2004;15:1224–1232.
43. Miranda TB, Webb KJ, Edberg DD, Reeves R, Clarke S. Protein arginine methyltransferase 6 specifically methylates the nonhistone chromatin protein HMGA1a. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;336(3):831–835.
44. Frankel A, Yadav N, Lee J, Branscombe TL, Clarke S, Bedford MT. The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity. *J Biol Chem.* 2002;277(5):3537–3543.
45. Dangi-Garimella S, Sahai V, Ebine K, Kumar K, Munshi HG. Three-Dimensional Collagen I Promotes Gemcitabine Resistance In Vitro in Pancreatic Cancer Cells through HMGA2-Dependent Histone Acetyltransferase Expression. *PLoS One.* 2013;8(5):e64566.
46. Battista S, Pentimalli F, Baldassarre G, Fedele M, Fidanza V, Croce CM, et al. Loss of Hmgal1 gene function affects embryonic stem cell lympho-hematopoietic

- differentiation. *FASEB J.* 2003;17(11):1496–8.
47. Franco R, Esposito F, Fedele M, Liguori G, Pierantoni GM, Botti G, et al. Detection of high-mobility group proteins A1 and A2 represents a valid diagnostic marker in post-pubertal testicular germ cell tumours. 2008;214:58–64.
 48. Chieffi P, Battista S, Barchi M, Di Agostino S, Pierantoni GM, Fedele M, et al. HMGA1 and HMGA2 protein expression in mouse spermatogenesis. *Oncogene.* 2002;21(22):3644–50.
 49. Hirning-Folz U, Wilda M, Rippe V, Hameister H. The Expression Pattern of the Hmgic Gene During Development. 1998;23:350–357.
 50. Singh I, Mehta A, Contreras A, Boettger T, Carraro G, Wheeler M, et al. Hmga2 is required for canonical WNT signaling during lung development. *BMC Biol.* 2014;12(1):21.
 51. Shah SN, Cope L, Poh W, Belton A, Roy S, Talbot CC, et al. HMGA1: A Master Regulator of Tumor Progression in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *PLoS One.* 2013;8(5):e63419.
 52. Sterenczak KA, Eckardt A, Kampmann A, Willenbrock S, Eberle N, Länger F, et al. HMGA1 and HMGA2 expression and comparative analyses of HMGA2, Lin28 and let-7 miRNAs in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2014;14(1):694-705.
 53. Pang B, Fan H, Zhang IY, Liu B, Feng B, Meng L, et al. HMGA1 expression in human gliomas and its correlation with tumor proliferation, invasion and angiogenesis. *J Neurooncol.* 2012;106(3):543–549.
 54. Pegoraro S, Ros G, Piazza S, Sommaggio R, Ciani Y, Rosato A, et al. HMGA1 promotes metastatic processes in basal-like breast cancer regulating EMT and stemness. *Oncotarget.* 2013;4(8):1293–1308.
 55. Hristov AC, Cope L, Di Cello F, Reyes MD, Singh M, Hillion J, et al. HMGA1

- Correlates with Advanced Tumor Grade and Decreased Survival in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 2010;23(1):98–104.
56. Rajeswari MR, Singh D, Jain A, Ray R. Elevated levels of high-mobility-group chromosomal proteins, HMGA1, in murine skin carcinoma. *Cancer Lett.* 2001;173(1):93–99.
 57. Visone R, Iuliano R, Palmieri D, Server IN, Chiappetta G, De Martino I, et al. Hmgal null mice are less susceptible to chemically induced skin carcinogenesis. *Eur J Cancer.* 2008;44(2):318–325.
 58. Akaboshi S, Watanabe S, Hino Y, Sekita Y, Xi Y, Araki K, et al. HMGA1 is induced by Wnt/beta-catenin pathway and maintains cell proliferation in gastric cancer. *Am J Pathol.* 2009;175(4):1675–1685.
 59. Wend P, Runke S, Wend K, Anchondo B, Yesayan M, Jardon M, et al. WNT10B/ β -catenin signalling induces HMGA2 and proliferation in metastatic triple-negative breast cancer. *EMBO Mol Med.* 2013;5(2):264–279.
 60. Mu G, Liu H, Zhou F, Xu X, Jiang H, Wang Y, et al. Correlation of overexpression of HMGA1 and HMGA2 with poor tumor differentiation, invasion, and proliferation associated with let-7 down-regulation in retinoblastomas. *Hum Pathol.* 2010;41(4):493–502.
 61. Hetland TE, Holth A, Kærn J, Flørenes VA, Tropé CG, Davidson B. HMGA2 protein expression in ovarian serous carcinoma effusions, primary tumors, and solid metastases. *Virchows Arch.* 2012;460(5):505–513.
 62. Watanabe S, Ueda Y, Akaboshi S, Hino Y, Sekita Y, Nakao M. HMGA2 maintains oncogenic RAS-induced epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells. *Am J Pathol.* 2009;174(3):854–868.
 63. Zhao XP, Zhang H, Jiao JY, Tang DX, Wu Y, Pan CB. Overexpression of HMGA2

- promotes tongue cancer metastasis through EMT pathway. *J Transl Med.* 2016;14(1):26-37.
64. Kaur H, Ali SZ, Huey L, Hütt-Cabezas M, Taylor I, Mao X, et al. The transcriptional modulator HMGA2 promotes stemness and tumorigenicity in glioblastoma. *Cancer Lett.* 2016;377(1):55–64.
 65. Rizzi C, Cataldi P, Iop A, Isola M, Sgarra R, Manfioletti G, et al. The expression of the high-mobility group A2 protein in colorectal cancer and surrounding fibroblasts is linked to tumor invasiveness. *Hum Pathol.* 2013;44(1):122–132.
 66. Wang X, Liu X, Li AYJ, Chen L, Lai L, Lin HH, et al. Overexpression of HMGA2 promotes metastasis and impacts survival of colorectal cancers. *Clin Cancer Res.* 2011;17(8):2570–2580.
 67. Bandiera A, Bonifacio D, Manfioletti G, Mantovani F, Rustighi A, Zanconati F, et al. Expression of HMGI (Y) Proteins in Squamous Intraepithelial and Invasive Lesions of the Uterine Cervix Expression of HMGI (Y) Proteins in Squamous Intraepithelial and Invasive Lesions of the Uterine Cervix. 1998;(58):426–431.
 68. Chang ZG, Yang LY, Wang W, Peng JX, Huang GW, Tao YM, et al. Determination of high mobility group A1 (HMGA1) expression in hepatocellular carcinoma: a potential prognostic marker. *Dig Dis Sci.* 2005;50(10):1764–70.
 69. Chiappetta G, Tallini G, Biasio DMC, Manfioletti G, Martinez-Zello FJ, Pentimalli F, et al. Detection of high mobility group I HMGI (Y) protein in the diagnosis of thyroid tumors: HMGI (Y) expression represents a potential diagnostic indicator of carcinoma. *Cancer Res.* 1998;(58):4193–4198.
 70. Zakharov V, Ren B, Ryan C, Cao W. Diagnostic value of HMGAs, p53 and β -catenin in discriminating adenocarcinoma from adenoma or reactive atypia in ampulla and common bile duct biopsies. *Histopathology.* 2013;62(5):778–787.
 71. Fedele M, Bandiera A, Chiappetta G, Battista S, Viglietto G, Manfioletti G, et al.

Human Colorectal Carcinomas Express High Levels of High Mobility Group HMGI(Y) Proteins. 1996;56:1896–1901.

72. Abe N, Watanabe T, Sugiyama M, Uchimura H, Chiappetta G, Fusco A, et al. Advances in Brief Determination of High Mobility Group I (Y) Expression Level in Colorectal Neoplasias: A Potential Diagnostic Marker. 1999;59:1169–1174.
73. Lin S, Peng F. Association of SIRT1 and HMGA1 expression in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* 2015;782–788.
74. Sarhadi VK, Wikman H, Salmenkivi K, Kuosma E, Sioris T, Salo J, et al. Increased expression of high mobility group A proteins in lung cancer. *J Pathol.* 2006;209(2):206–212.
75. Nam ES, Kim DH, Cho SJ, Chae SW, Kim HY, Kim SM, et al. Expression of HMGI(Y) associated with malignant phenotype of human gastric tissue. *Histopathology.* 2003;42(5):466–71.
76. Masciullo V, Baldassarre G, Pentimalli F, Berlingieri MT, Boccia A, Chiappetta G, et al. HMGA1 protein over-expression is a frequent feature of epithelial ovarian carcinomas. *Carcinogenesis.* 2003;24(7):1191–1198.
77. Mahajan A, Liu Z, Gellert L, Zou X, Yang G, Lee P, et al. HMGA2: a biomarker significantly overexpressed in high-grade ovarian serous carcinoma. *Mod Pathol.* 2010;23(5):673–681.
78. Abe N, Watanabe T, Masaki T, Mori T, Sugiyama M. Pancreatic duct cell carcinomas express high levels of high mobility group I (Y) proteins. *Cancer Res.* 2000;3117–3122.
79. Abe N, Watanabe T, Suzuki Y, Matsumoto N, Masaki T, Mori T, et al. An increased high-mobility group A2 expression level is associated with malignant phenotype in pancreatic exocrine tissue. *Br J Cancer.* 2003;89(11):2104–2109.

80. van der Zee JA, ten Hagen TLM, Hop WCJ, van Dekken H, Dicheva BM, Seynhaeve ALB, et al. Differential expression and prognostic value of HMGA1 in pancreatic head and periampullary cancer. *Eur J Cancer*. 2010;46(18):3393–3399.
81. Chiappetta G, Botti G, Pasquinelli R, Pentimalli F, Bonito M Di, Aiuto GD, et al. HMGA1 Protein Overexpression in Human Breast Carcinomas : Correlation with ErbB2 Expression HMGA1 Protein Overexpression in Human Breast Carcinomas : Correlation with ErbB2 Expression. 2004;10:7637–7644.
82. Sepe R, Piscuoglio S, Quintavalle C, Perrina V, Quagliata L, Formisano U, et al. HMGA1 overexpression is associated with a particular subset of human breast carcinomas. 2015;0:1–5.
83. Rahman MM, Qian ZR, Wang EL, Sultana R, Kudo E, Nakasono M, et al. Frequent overexpression of HMGA1 and 2 in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours and its relationship to let-7 downregulation. *Br J Cancer* . 2009;100(3):501–10.
84. Wang EL, Qian ZR, Rahman MM, Yoshimoto K, Yamada S, Kudo E, et al. Increased expression of HMGA1 correlates with tumour invasiveness and proliferation in human pituitary adenomas. *Histopathology*. 2010;56(4):501–9.
85. Palumbo A, Da Costa NM, Esposito F, De Martino M, D’Angelo D, de Sousa VPL, et al. HMGA2 overexpression plays a critical role in the progression of esophageal squamous carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(18):25872-25884.
86. Jun KH, Jung JH, Choi HJ, Shin EY, Chin HM. HMGA1/HMGA2 protein expression and prognostic implications in gastric cancer. *Int J Surg*. 2015;24:39–44.
87. Larsson L, Jäwert F, Magnusson B, Hasséus B, Kjeller G. Expression of High Mobility Group A Proteins in Oral Leukoplakia. 2013;4266:4261–4266.
88. Qu Y, Wang Y, Ma J, Zhang Y, Meng N, Li H, et al. Overexpression of high mobility group A1 protein in human uveal melanomas: implication for prognosis. *PLoS One* . 2013;8(7):e68724.

89. Belge G, Meyer A, Klemke M, Burchardt K, Stern C, Wosniok W, et al. Upregulation of HMGA2 in thyroid carcinomas: a novel molecular marker to distinguish between benign and malignant follicular neoplasias. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008;47(1):56–63.
90. Meyer B, Loeschke S, Schultze A, Weigel T, Sandkamp M. HMGA2 Overexpression in Non-Small Cell Lung Cancer. *Mol Carcinog*. 2007;46(7):503–511.
91. Miyazawa J, Mitoro A, Kawashiri S, Chada KK, Imai K. Expression of Mesenchyme-Specific Gene HMGA2 in Squamous Cell Carcinomas of the Oral Cavity Expression of Mesenchyme-Specific Gene HMGA2 in Squamous Cell Carcinomas of the Oral Cavity. *Cancer Res*. 2004;64:2024–2029.
92. Wu J, Zhang S, Shan J, Hu Z, Liu X, Chen L, et al. Elevated HMGA2 expression is associated with cancer aggressiveness and predicts poor outcome in breast cancer. *Cancer Lett*. 2016;376(2):284–292.
93. Liu Z, Wu K, Yang Z, Wu A. High-mobility group A2 overexpression is an unfavorable prognostic biomarker for nasopharyngeal carcinoma patients. *Mol Cell Biochem*. 2015;409(1-2):155–162.
94. Raskin L, Fullen DR, Giordano TJ, Thomas DG, Frohm ML, Cha KB, et al. Transcriptome profiling identifies HMGA2 as a biomarker of melanoma progression and prognosis. *J Invest Dermatol*. 2013;133(11):2585–2592.
95. Lee CT, Wu TT, Lohse CM, Zhang L. High-mobility group AT-hook 2: An independent marker of poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hum Pathol*. 2014;45(11):2334–2340.
96. Eide HA, Halvorsen AR, Bjaanæs MM, Piri H, Holm R, Solberg S, et al. The MYCN-HMGA2-CDKN2A pathway in non-small cell lung carcinoma—differences in histological subtypes. *BMC Cancer*. 2016;16(1):71-83.

97. Medeiros F, Erickson-johnson MR, Keeney GL, Clayton AC, Nascimento AG, Wang X, et al. Frequency and Characterization of HMGA2 and HMGA1 Rearrangements in Mesenchymal Tumors of the Lower Genital Tract. 2007;46:981–990.
98. Ordulu Z, Nucci MR, Dal Cin P, Hollowell ML, Otis CN, Hornick JL, et al. Intravenous leiomyomatosis: an unusual intermediate between benign and malignant uterine smooth muscle tumors. *Mod Pathol*. 2016;29(5):500-510.
99. Saâda-Bouزيد E, Burel-Vandenbos F, Ranchère-Vince D, Birtwisle-Peyrottes I, Chetaille B, Bouvier C, et al. Prognostic value of HMGA2, CDK4, and JUN amplification in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas. *Mod Pathol*. 2015;28(11):1404-1414.
100. Katabi N, Ghossein R, Ho A, Dogan S, Zhang L, Sung Y-S, et al. Consistent PLAG1 and HMGA2 abnormalities distinguish carcinoma ex-pleomorphic adenoma from its de novo counterparts. *Hum Pathol*. 2015;46(1):26-33.
101. Li N, McNiff J, Hui P, Manfioletti G, Tallini G. Differential Expression of HMGA1 and HMGA2 in Dermatofibroma and Dermatofibrosarcoma Protuberans: Potential Diagnostic Applications, and Comparison with Histologic Findings, CD34, and Factor XIIIa Immunoreactivity. *Am J Dermatopathol*. 2004;26(4):267–172.
102. Bedford MT, Clarke SG. Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why. *Mol Cell*. 2009;33(1):1–13.
103. Baldwin RM, Morettin A, Côté J. Role of PRMTs in cancer: Could minor isoforms be leaving a mark? *World J Biol Chem*. 2014;5(2):115–129.
104. Goulet I, Gauvin G, Boisvenue S, Côté J. Alternative splicing yields protein arginine methyltransferase 1 isoforms with distinct activity, substrate specificity, and subcellular localization. *J Biol Chem*. 2007;282(45):33009–33021.
105. Pawlak MR, Scherer CA, Chen J, Roshon MJ, Ruley HE. Arginine N-

methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. *Mol Cell Biol.* 2000;20(13):4859–4869.

106. Mathioudaki K, Papadokostopoulou A, Scorilas A, Xynopoulos D, Agnanti N, Talieri M. The PRMT1 gene expression pattern in colon cancer. *Br J Cancer.* 2008;99(12):2094–2099.
107. Mathioudaki K, Scorilas A, Ardavanis A, Lymberi P, Tsiambas E, Devetzi M, et al. Clinical evaluation of PRMT1 gene expression in breast cancer. *Tumour Biol.* 2011;32(3):575–582.
108. Papadokostopoulou A, Mathioudaki K, Scorilas A, Xynopoulos D, Ardavanis A, Kouroumalis E, et al. Colon cancer and protein arginine methyltransferase 1 gene expression. *Anticancer Res.* 2009;29(4):1361–1366.
109. Herrmann F, Lee J, Bedford MT, Fackelmayer FO. Dynamics of human protein arginine methyltransferase 1(PRMT1) in vivo. *J Biol Chem.* 2005;280(45):38005–38010.
110. Zhao X, Jankovic V, Gural A, Huang G, Pardanani A, Menendez S, et al. Methylation of RUNX1 by PRMT1 abrogates SIN3A binding and potentiates its transcriptional activity. *Genes Dev.* 2008;22:640–653.
111. Zheng S, Moehlenbrink J, Lu YC, Zalmas LP, Sagum CA, Carr S, et al. Arginine methylation-dependent reader-writer interplay governs growth control by E2F-1. *Mol Cell.* 2013;52(1):37–51.
112. Avasarala S, Van Scoyk M, Karuppusamy Rathinam MK, Zerayesus S, Zhao X, Zhang W, et al. PRMT1 is a Novel Regulator of Epithelial-Mesenchymal-Transition in Non-Small Cell Lung Cancer. *J Biol Chem.* 2015;290(21):13479–13489.
113. Guendel I, Carpio L, Pedati C, Schwartz A, Teal C, Kashanchi F, et al. Methylation of the tumor suppressor protein, BRCA1, influences its transcriptional cofactor function. *PLoS One.* 2010;5(6):e11379.

114. Zou L, Zhang H, Du C, Liu X, Zhu S, Zhang W, et al. Correlation of SRSF1 and PRMT1 expression with clinical status of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol.* 2012;5:42-53.
115. Cha B, Kim W, Kim YK, Hwang BN, Park SY, Yoon JW, et al. Methylation by protein arginine methyltransferase 1 increases stability of Axin, a negative regulator of Wnt signaling. *Oncogene.* 2011;30:2379–2389.
116. An W, Kim J, Roeder RG. Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. *Cell.* 2004;117:735–748.
117. Boisvert F, Déry U, Masson JY, Richard S. Arginine methylation of MRE11 by PRMT1 is required for DNA damage checkpoint control. *Genes Dev.* 2005;19(514):671–676.
118. Scoumanne A, Chen X. Protein methylation: A new mechanism of p53 tumor suppressor regulation. *Histol Histopathol.* 2008;23:1143–1149.
119. Mitchell TRH, Glenfield K, Jeyanthan K, Zhu XD. Arginine methylation regulates telomere length and stability. *Mol Cell Biol.* 2009;29(18):4918–4934.
120. Baldwin RM, Morettin A, Paris G, Goulet I, Co   J. Alternatively spliced protein arginine methyltransferase 1 isoform PRMT1v2 promotes the survival and invasiveness of breast cancer cells. *Cell Cycle.* 2012;11(24):4597–4612.
121. Vezzalini M, Aletta JM, Beghelli S, Moratti E, Della Peruta M, Mafficini A, et al. Immunohistochemical detection of arginine methylated proteins (MeRP) in archival tissues. *Histopathology.* 2010;57:725–733.
122. Mathioudaki K, Papadokostopoulou A, Scorilas A, Xynopoulos D, Agnanti N, Talieri M. The PRMT1 gene expression pattern in colon cancer. *Br J Cancer.* 2008;99:2094–2099.
123. Mathioudaki K, Scorilas A, Ardavanis A, Lymberi P, Tsiambas E, Devetzi M, et al.

- Clinical evaluation of PRMT1 gene expression in breast cancer. *Tumor Biol.* 2011;32:575–582.
124. Papadokostopoulou A, Mathioudaki K, Scorilas A, Xynopoulos D, Ardavanis A, Kouroumalis E, et al. Colon cancer and protein arginine methyltransferase 1 gene expression. *Anticancer Res.* 2009;29:1361–1366.
 125. Yoshimatsu M, Toyokawa G, Hayami S, Unoki M, Tsunoda T, Field HI, et al. Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers. *Int J Cancer.* 2011;128(3):562–573.
 126. Elakoum R, Gauchotte G, Oussalah A, Wissler MP, Clément-Duchêne C, Vignaud JM, et al. CARM1 and PRMT1 are dysregulated in lung cancer without hierarchical features. *Biochimie.* 2014;97:210–218.
 127. Limm K, Ott C, Wallner S, Mueller DW, Oefner P, Hellerbrand C, et al. Dereglulation of protein methylation in melanoma. *Eur J Cancer.* 2013;49(6):1305–1313.
 128. Phalke S, Mzoughi S, Bezzi M, Jennifer N, Mok WC, Low DHP, et al. P53-Independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by PRMT6. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(19):9534–9542.
 129. Vieira FQ, Costa-Pinheiro P, Ramalho-Carvalho J, Pereira A, Menezes FD, Antunes L, et al. Deregulated expression of selected histone methylases and demethylases in prostate carcinoma. *Endocr Relat Cancer.* 2014;21(1):51–61.
 130. Di Lorenzo A, Yang Y, Macaluso M, Bedford MT. A gain-of-function mouse model identifies PRMT6 as a NF- κ B coactivator. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(13):8297–8309.
 131. Kleinschmidt MA, de Graaf P, van Teeffelen HAAM, Timmers HTM. Cell cycle regulation by the PRMT6 arginine methyltransferase through repression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *PLoS One.* 2012;7(8):e41446.

132. Stein C, Riedl S, Rüttnick D, Nötzold RR, Bauer UM. The arginine methyltransferase PRMT6 regulates cell proliferation and senescence through transcriptional repression of tumor suppressor genes. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(19):9522–9533.
133. Wang X, Huang Y, Zhao J, Zhang Y, Lu J, Huang B. Suppression of PRMT6-mediated arginine methylation of p16 protein potentiates its ability to arrest A549 cell proliferation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(12):2333–2341.
134. Neault M, Mallette F a., Vogel G, Michaud-Levesque J, Richard S. Ablation of PRMT6 reveals a role as a negative transcriptional regulator of the p53 tumor suppressor. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(19):9513–9521.
135. Kim NH, Kim SN, Seo DW, Han JW, Kim YK. PRMT6 overexpression upregulates TSP-1 and downregulates MMPs: Its implication in motility and invasion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;432(1):60–65.
136. Neault M, Mallette F a, Vogel G, Michaud-Levesque J, Richard S. Ablation of PRMT6 reveals a role as a negative transcriptional regulator of the p53 tumor suppressor. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(19):9513–9521.
137. El-Andaloussi N, Valovka T, Toueille M, Steinacher R, Focke F, Gehrig P, et al. Arginine Methylation Regulates DNA Polymerase β . *Mol Cell.* 2006;22:51–62.
138. Dowhan DH, Harrison MJ, Eriksson N a., Bailey P, Pearen M a., Fuller PJ, et al. Protein arginine methyltransferase 6-dependent gene expression and splicing: Association with breast cancer outcomes. *Endocr Relat Cancer.* 2012;19:509–526.
139. Bedford DC, Kasper LH, Fukuyama T, Brindle PK. Target gene context influences the transcriptional requirement for the KAT3 family of CBP and p300 histone acetyltransferases. *Epigenetics.* 2010;5(1):9–15.
140. Howe L, Auston D, Grant P. Histone H3 specific acetyltransferases are essential for cell cycle progression. *Genes Dev.* 2001;15:3144–3154.

141. Iyer NG, Ozdag H, Caldas C. p300/CBP and cancer. *Oncogene*. 2004;23:4225–4231.
142. Ogryzko V V, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*. 1996;87:953–9.
143. Jin Q, Yu LR, Wang L, Zhang Z, Kasper LH, Lee JE, et al. Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation. *EMBO J*. 2011;30(2):249–262.
144. Grossman SR. p300 / CBP / p53 interaction and regulation of the p53 response. *Eur J Biochem*. 2001;268:2773–2778.
145. Pickard A, Wong PP, McCance DJ. Acetylation of Rb by PCAF is required for nuclear localization and keratinocyte differentiation. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 21):3718–3726.
146. Mizuguchi Y, Specht S, Lunz JG, Isse K, Corbitt N, Takizawa T, et al. Cooperation of p300 and PCAF in the control of microRNA 200c/141 transcription and epithelial characteristics. *PLoS One*. 2012;7(2):e32449.
147. Krubasik D, Iyer NG, English WR, Ahmed AA, Vias M, Roskelley C, et al. Absence of p300 induces cellular phenotypic changes characteristic of epithelial to mesenchyme transition. *Br J Cancer*. 2006;94:1326–1332.
148. Peña C, García JM, García V, Silva J, Domínguez G, Rodríguez R, et al. The expression levels of the transcriptional regulators p300 and CtBP modulate the correlations between SNAIL, ZEB1, E-cadherin and vitamin D receptor in human colon carcinomas. *Int J Cancer*. 2006;119():2098–2104.
149. Yokomizo C, Yamaguchi K, Itoh Y, Nishimura T, Umemura A, Minami M, et al. High expression of p300 in HCC predicts shortened overall survival in association with enhanced epithelial mesenchymal transition of HCC cells. *Cancer Lett*.

2011;310(2):140–147.

150. Chen YF, Luo RZ, Li Y, Cui BK, Song M, Yang AK, et al. High expression levels of COX-2 and P300 are associated with unfavorable survival in laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 2013;270:1009–1017.
151. Cho YA, Hong JS, Choe EJ, Yoon HJ, Hong SD, Lee JI, et al. The role of p300 in the tumor progression of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2015;44:185–192.
152. Debes JD, Sebo TJ, Lohse CM, Murphy LM, Haugen DAL, Tindall DJ. p300 in Prostate Cancer Proliferation and Progression. *Cancer Res*. 2003;63:7638–7640.
153. Hou X, Li Y, Luo RZ, Fu JH, He JH, Zhang LJ, et al. High expression of the transcriptional co-activator p300 predicts poor survival in resectable non-small cell lung cancers. *Eur J Surg Oncol*. 2012;38:523–530.
154. Huh JW, Kim HC, Kim SH, Park YA, Cho YB, Yun SH, et al. Prognostic impact of p300 expression in patients with colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2013;108:374–377.
155. Ishihama K, Yamakawa M, Semba S, Takeda H, Kawata S, Kimura S, et al. Expression of HDAC1 and CBP/p300 in human colorectal carcinomas. *J Clin Pathol*. 2007;60:1205–1210.
156. Li Y, Yang HX, Luo RZ, Zhang Y, Li M, Wang X, et al. High expression of p300 has an unfavorable impact on survival in resectable esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Thorac Surg*. 2011;91:1531–1538.
157. Liao ZW, Zhou TC, Tan XJ, Song XL, Liu Y, Shi XY, et al. High expression of p300 is linked to aggressive features and poor prognosis of Nasopharyngeal Carcinoma. *J Transl Med*. 2012;10:110-118.
158. Syrjänen S, Naud P, Sarian L, Derchain S, Roteli-Martins C, Longatto-Filho A, et

- al. P300 Expression Is Related To High-Risk Human Papillomavirus Infections and Severity of Cervical Intraepithelial Neoplasia But Not To Viral or Disease Outcomes in a Longitudinal Setting. *Int J Gynecol Pathol*. 2010;29:135–145.
159. Vleugel MM, Shvarts D, van der Wall E, van Diest PJ. p300 and p53 levels determine activation of HIF-1 downstream targets in invasive breast cancer. *Hum Pathol*. 2006;37:1085–1092.
160. Xiao XS, Cai MY, Chen JW, Guan XY, Kung HF, Zeng YX, et al. High expression of p300 in human breast cancer correlates with tumor recurrence and predicts adverse prognosis. *Chinese J Cancer Res*. 2011;23(3):201–207.
161. Chen MK, Cai MY, Luo RZ, Tian X, Liao QM, Zhang XY, et al. Overexpression of p300 correlates with poor prognosis in patients with cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2014;172(1):111–119.
162. Ying MZ, Wang JJ, Li DW, Yu GZ, Wang X, Pan J, et al. The p300/CBP associated factor is frequently downregulated in intestinal-type gastric carcinoma and constitutes a biomarker for clinical outcome. *Cancer Biol Ther*. 2010;9(4):312–320.
163. Zhu C, Qin YR, Xie D, Chua DTT, Fung JM, Chen L, et al. Characterization of tumor suppressive function of P300/CBP-associated factor at frequently deleted region 3p24 in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene*. 2009;28:2821–2828.
164. Nishimori H, Nishikawa R, Fujimaki T, Nakagomi T, Matsutani M, Su Huang HJ, et al. Analysis of the p300/CBP-Associated Factor (PCAF) gene in astrocytic tumors. *J Neurooncol*. 2000;46:17–22.
165. Ozdağ H, Batley SJ, Försti A, Iyer NG, Daigo Y, Boutell J, et al. Mutation analysis of CBP and PCAF reveals rare inactivating mutations in cancer cell lines but not in primary tumours. *Br J Cancer*. 2002;87(10):1162–1165.
166. Gayther S, SJ B, L L, A B, K T, Chin S-F, et al. Mutations truncating the EP300

- acetylase in human cancers. *Nat Genet.* 2000;24(3):300–303.
167. Brasanac D, Boricic I, Todorovic V, Tomanovic N, Radojevic S. Cyclin A and beta-catenin expression in actinic keratosis, Bowen's disease and invasive squamous cell carcinoma of the skin. *Br J Dermatol.* 2005;153(6):1166–1175.
 168. Piscuoglio S, Zlobec I, Pallante P, Sepe R, Esposito F, Zimmermann A, et al. HMGA1 and HMGA2 protein expression correlates with advanced tumour grade and lymph node metastasis in pancreatic adenocarcinoma. *Histopathology.* 2012;60(3):397–404.
 169. Agostini A, Panagopoulos I, Andersen HK, Johanesen LE, Davidson B, Trope CG, et al. HMGA2 expression pattern and TERT mutations in tumors of the vulva. *Oncol Rep.* 2015;33(6):2675–2680.
 170. Rotte A, Bhandaru M, Cheng Y, Sjoestroem C, Martinka M, Li G. Decreased Expression of Nuclear p300 Is Associated with Disease Progression and Worse Prognosis of Melanoma Patients. *PLoS One.* 2013;8(9):1–12.
 171. Mizuguchi Y, Specht S, Lunz JG, Isse K, Corbitt N, Takizawa T, et al. Cooperation of p300 and PCAF in the control of microRNA 200c/141 transcription and epithelial characteristics. *PLoS One.* 2012;7(2).
 172. Barrette K, Kelst S Van, Wouters J, Marasigan V, Agostinis P, Bioinformatics S, et al. Epithelial-Mesenchymal Transition during invasion of cutaneous Squamous Cell Carcinoma is paralleled by AKT activation. *Br J Derm.* 2014;171:1014–1021.
 173. Chen J, Li Q. Life and death of transcriptional co-activator p300. *Epigenetics.* 2011;6(8):957–961.

SPISAK SKRAĆENICA

AAM	Agresivni angiomiksom
AK	Aktinična keratoza
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ADMA	Asimetrični di-metil-arginin
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated
BER	Base excision repair
CK2	Casein kinase 2
CIN	Cervikalna intraepitelna neoplazija
DF	Dermatofibrom
DFSP	Dermatofibrosarcoma protuberans
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
DSBR	Double strand break repair
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epitelno-mezenhimna transformacija
FISH	Fluorescentna in situ hibridizacija
GS	Govedi serum
HCC	Hepatocelular carcinoma
HMGA	High mobility group A
HIPK2	Homeodomain-interacting protein kinase-2
HPV	Humanim papiloma virus
ITGCT	Intratubular germ cell tumor

KIN	Keratinocitna intraepidermalna neoplazija
MS	Magareći serum
MMP	Matriksna metaloproteinaza
mk	Monoklonalno
MMA	Mono-metil-arginin
NET	Neuroendokrini tumor
NMSC	Non-melanoma skin cancer
NER	Nucleotid excision repair
PCAF	p300/CBP associated factor
PanIN	Pankreasna intraepitelna neoplazija
pk	Poliklonalno
PRMT	Protein arginine methyltransferase
PKC	Protein kinase C
SDMA	Simetrični di-metil-arginin
ST	Sobna temperatura
SCC	Squamous cell carcinoma
TMN	Tkivni mikroniz
VDR	Vitamin D receptor
XPA	Xeroderma pigmentosum A

BIOGRAFIJA

Martina Bosić je rođena 17.10.1982. godine u Bihaću, Bosna i Hercegovina. Osnovnu školu i V beogradsku gimnaziju je završila sa odličnim uspehom. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2007. godine sa prosečnom ocenom 9,26.

Dr Bosić je od marta 2008. zaposlena kao asistent na Katedri za patologiju na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a od 2009. godine i kao istraživač saradnik na projektima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Završila je Specijalističke akademske studije, smer Citologija, histohemija, elektronska mikroskopija i embriologija na Medicinskom fakultetu u Beogradu 2009. godine. Specijalistički ispit iz patološke anatomije dr Bosić je položila u januaru 2014. godine, a od novembra 2015. je upisana na studije Uže specijalizacije iz Kliničke patologije na Medicinskom fakultetu u Beogradu.

Uže oblasti interesovanja dr Bosić su dermatopatologija i molekularna patologija, kao i uloga epigenetskih i mehanizama očuvanja telomera u kancerogenezi. Dr Bosić se kontinuirano usavršavala u zemlji i inostranstvu; učesnik je nekoliko domaćih i inostranih kongresa, kurseva i simpozijuma, a u februaru 2014. je završila obuku za fluorescentnu *in situ* hibridizaciju u Institutu za istraživanje raka dece u Beču, Austrija, pod mentorstvom prof. Petera Ambrosa. Dr Bosić je član Evropske asocijacije za istraživanje raka, Međunarodnog društva dermatopatologa, kao i Evropskog udruženja patologa, gde je član Radne grupe za dermatopatologiju.

Do sada je u saradnji sa drugim autorima objavila 31 bibliografsku jedinicu od kojih je 9 objavljeno *in extenso* (jedan u vrhunskom međunarodnom časopisu, jedan u istaknutom međunarodnom časopisu, šest u međunarodnim časopisima i dva u časopisima međunarodnog značaja). Prvi autor je u dva rada (jedan u vrhunskom međunarodnom časopisu i jedan u međunarodnom časopisu). Od radova objavljenih u izvodu, 16 su saopštenja sa međunarodnih naučnih skupova, a pet su saopštenja sa domaćih naučnih skupova.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a: **Martina Bosić**

broj upisa: 08-DS-MM-11

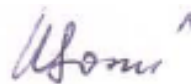
Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Ekspresija proteina visoke mobilnosti grupe a (hmgA) i njihovih modulatora u keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji i invazivnom planocelularnom karcinomu kože“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda



U Beogradu, 30.03.2016.

Prilog 2.

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije
doktorskog rada**

Ime i prezime autora: **Martina Bosić**

Broj upisa 08-DS-MM-11

Studijski program Molekularna medicina

Naslov rada „Ekspresija proteina visoke mobilnosti grupe a (hmga) i njihovih modulatora u keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji i invazivnom planocelularnom karcinomu kože“

Mentor prof. dr Dimitrije Brašanac



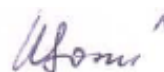
Potpisani _____

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda



U Beogradu, 30.03.2016.

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

„Ekspresija proteina visoke mobilnosti grupe a (hmga) i njihovih modulatora u keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji i invazivnom planocelularnom karcinomu kože“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

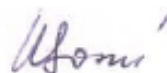
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda



U Beogradu, 30.03.2016.

1. **Autorstvo -** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerade.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo - deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.