

# Stupanj metilacije gena ASC/TMS1 i MyD88 u uzorcima zdravog tkiva i tkiva karcinoma pločastih stanica grkljana

---

Kovač Bilić, Lana

Doctoral thesis / Disertacija

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:583195>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-10**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





**Središnja medicinska knjižnica**

**Kovač Bilić, Lana (2018) *Stupanj metilacije gena ASC/TMS1 i MyD88 u uzorcima zdravog tkiva i tkiva karcinoma pločastih stanica grkljana.* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/3052>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Lana Kovač Bilić**

**Stupanj metilacije gena ASC/TMS1 i  
MyD88 u uzorcima zdravog tkiva i  
tkiva karcinoma pločastih stanica  
grkljana**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2018.**

*Disertacija je izrađena na Klinici za bolesti uha, nosa i grla i kirurgiju glave i vrata Kliničkog bolničkog centra Zagreb u suradnji s Zavodom za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb te Zavodom za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.*

*Voditelji: prof. dr. sc. Srećko Branica*

*dr. sc. Jelena Knežević, viša znanstvena suradnica*

*Ovim putem se od sveg srca zahvaljujem dr. sc. Jeleni Knežević na predloženoj temi, velikoj pomoći i nesebičnom trudu kojim mi je pomogla u izradi ovog istraživanja.*

*Zahvaljujem se i Maji Šutić na stručnoj i ljudskoj pomoći u izradi i interpretaciji rezultata.*

*Naposlijetku zahvaljujem se prof. dr. sc. Srećku Branici na prenesenom znanju, velikom povjerenju i strpljenju tijekom izrade ovog istraživanja.*

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Karcinom pločastih stanica grkljana</b> .....	1
1.1.1. Definicija .....	1
1.1.2. Epidemiologija.....	1
1.1.3. Etiologija.....	1
1.1.4. Podjela karcinoma grkljana.....	3
1.1.5. Klinička slika.....	5
1.1.6. Dijagnostički postupci.....	6
1.1.7. Liječenje.....	6
<b>1.2. Povezanost kronične upale s nastankom karcinoma</b> .....	7
<b>1.3. Mehanizam stanične imunosti i njegova uloga u tumorigenezi</b> .....	8
1.3.1. Uloga gena <b>ASC/TMS1</b> u staničnoj imunosti.....	9
1.3.2. Uloga gena <b>MyD88</b> u staničnoj imunosti.....	10
<b>1.4. Epigenetika</b> .....	12
1.4.1. Metilacija gena <b>ASC/TMS1</b> .....	12
1.4.2. Metilacija gena <b>MyD88</b> .....	13
<b>2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	14
<b>3. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA</b> .....	15
<b>3.1. Ispitanici</b> .....	15
<b>3.2. Metode</b> .....	15
3.2.1. Analiza metilacije DNA pirosekvenciranjem.....	15
3.2.2. Izolacija genomske DNA iz tkiva.....	15
3.2.3. Bisulfitna konverzija genomske DNA.....	16
3.2.4. Dizajniranje početnica za umnažanje DNA lančanom reakcijom polimeraze (PCR) i sekvenciranje .....	18
3.2.5. Lančana reakcija polimeraze (PCR).....	19
3.2.6. Statistička obrada rezultata analize pirosekvenciranja slijeda DNA.....	23
3.2.7. Izolacija ukupnih proteina iz zdravog i tumorskog tkiva.....	23
3.2.8. Mjerenje koncentracije proteina.....	23
3.2.9. Ispitivanje izražaja proteina Western blot analizom.....	24
3.2.10. Razdvajanje proteina na SDS-poliakrilamidnom gelu na temelju veličine pod utjecajem električnog polja (SDS-PAGE).....	24
3.2.11. Prijenos proteina s gela na membranu .....	26

3.2.12.	Označavanje proteina od interesa primarnim i sekundarnim protutijelima....	26
3.2.13.	Određivanje signala metodom kemoluminiscencije.....	27
3.2.14.	Relativna kvantifikacija detektiranog signala i statistička obrada.....	28
<b>4.</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1.</b>	<b>Karakteristike ispitivane populacije.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2.</b>	<b>Rezultati analize određivanja statusa metilacije gena MyD88.....</b>	<b>35</b>
4.2.1.	Status metilacije CpG1 mjesta u promotorskoj regiji gena MyD88.....	36
4.2.2.	Status metilacije CpG2 mjesta u promotorskoj regiji gena MyD88.....	36
4.2.3.	Status metilacije CpG3 mjesta u promotorskoj regiji gena MyD88.....	37
4.2.4.	Status metilacije CpG4 mjesta u promotorskoj regiji gena MyD88.....	37
4.2.5.	Status metilacije CpG5 mjesta u promotorskoj regiji gena MyD88.....	38
4.2.6.	Status metilacije CpG6 mjesta u promotorskoj regiji gena MyD88.....	38
4.2.7.	Status metilacije CpG7 mjesta u promotorskoj regiji gena MyD88.....	39
4.2.8.	Status metilacije CpG8 mjesta u promotorskoj regiji gena MyD88.....	39
4.2.9.	Status metilacije CpG9 mjesta u promotorskoj regiji gena MyD88.....	40
4.2.10.	Status metilacije CpG10 mjesta u promotorskoj regiji gena MyD88.....	40
4.2.11.	Ukupni status metilacije CpG mjesta u promotorskoj regiji gena MyD88.....	41
<b>4.3.</b>	<b>Rezultati analize određivanja statusa metilacije gena ASC/TMS1.....</b>	<b>42</b>
4.3.1.	Status metilacije CpG1 mjesta u promotorskoj regiji gena ASC/TMS1.....	43
4.3.2.	Status metilacije CpG2 mjesta u promotorskoj regiji gena ASC/TMS1.....	43
4.3.3.	Status metilacije CpG3 mjesta u promotorskoj regiji gena ASC/TMS1.....	44
4.3.4.	Ukupni status metilacije CpG mjesta u promotorskoj regiji gena ASC/TMS144	
<b>4.4.</b>	<b>Rezultati analize ekspresije proteina u zdravim i tumorskim tkivima</b>	
	<b>grkljana.....</b>	<b>46</b>
4.4.1.	Rezultati analize ekspresija proteina MyD88 u zdravim i tumorskim tkivima	
	grkljana.....	46
4.4.2.	Rezultati analize ekspresija proteina ASC/TMS1 u zdravim i tumorskim tkivima	
	grkljana.....	47
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA.....</b>	<b>49</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>56</b>
<b>7.</b>	<b>SAŽETAK.....</b>	<b>57</b>
<b>8.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>58</b>
<b>9.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>59</b>
<b>10.</b>	<b>ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>64</b>

## POPIS KRATICA

ASC/TMS1: Apoptozi združen protein koji sadrži kaspaza regrutirajuću domenu/ciljna molekula metilacijom potaknutog utišavanja -1 (engl. *Apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruiting domain/Target of methylation induced silencing-1*)

MyD88: Primaran odgovor mijeloidne diferencijacije 88 (engl. *Myeloid differentiation primary response 88*)

HNC: Karcinom glave i vrata (engl. *Head and Neck Cancer*)

HNSCC: Karcinom pločastih stanica glave i vrata (engl. *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*)

SCC: Karcinom pločastih stanica (engl. *Squamous Cell Carcinoma*)

TNM: T tumor N čvor M udaljena metastaza (engl. *T tumor N node M metastasis*)

PRR: Receptori koji prepoznaju molekularne strukture (engl. *Pattern Recognition Receptors*)

TLR: Toll-u nalik receptori (engl. *Toll-like receptors*)

PAMP: Patogenu združeni molekularni slijedovi (engl. *Pathogen Associated Molecular Patterns*)

NLR: NOD-u nalik receptori (engl. *NOD-like receptors*)

DNMT: DNA metiltransferaza (engl. *DNA methyltransferase*)

PCR: Lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*)

SDS-PAGE: Natrij dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforeza (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

# 1. UVOD

## 1.1. Karcinom pločastih stanica grkljana

### 1.1.1. Definicija

Karcinom grkljana spada u grupu karcinoma glave i vrata (engl. *Head and Neck Cancer – HNC*), a nastaje u sklopu epitela pločastih stanica grkljana. Obuhvaća sve podjedinice grkljana - supraglotis, glotis i subglotis. Karcinom grkljana u preko 95% slučajeva histološki je građen od pločastih stanica te ga zbog toga i nazivamo karcinomom pločastih stanica grkljana.

### 1.1.2. Epidemiologija

Karcinom grkljana je najčešći karcinom glave i vrata i obuhvaća 40% svih karcinoma glave i vrata; čini 1-2% svih malignih tumora. Pojavnost karcinoma grkljana je 2,5 do 17,1 na 100 000 stanovnika kod muškaraca te 0,1 do 1,3 na 100 000 stanovnika kod žena (1). Svjetska pojavnost karcinoma glave i vrata 2010. godine iznosila je 500 000 slučajeva godišnje, a upravo karcinom gornjeg zračno-probavnog sustava, u koji spada i karcinom pločastih stanica grkljana, je treći najčešći karcinom kod muškaraca te četvrti najčešći karcinom kod žena (2). Regije posebno visokog rizika za nastanak karcinoma pločastih stanica grkljana su južna i istočna Europa, južna Amerika i zapadna Azija (3).

### 1.1.3. Etiologija

Za nastanak karcinoma pločastih stanica grkljana najvažniji rizični čimbenici su pušenje i prekomjerna konzumacija alkohola koji imaju sinergistički učinak. Dim cigarete sadrži više od 50 štetnih sastojaka, uključujući aromatske policikličke ugljikohidrate, nitrozamine, aromatske amine i aldehide. Metabolizam ovih spojeva odvija se u dvije faze. U prvoj fazi reakcijom hidrolize, redukcije i oksidacije, djelovanjem enzimatskog sustava citokrom P-450, dolazi do stvaranja reaktivnih toksičnih spojeva. Oksidativni stres pojačava transkripciju glutathion S-transferaze koja omogućava eliminaciju štetnih spojeva (4). Toksični metaboliti prve faze dovode do oštećenja molekula DNA i RNA. Na taj način potiču genetsku



nestabilnost i stvaranje mutacija što potiče proces karcinogeneze. U drugoj fazi najvažniju ulogu ima glutathion S-transferaza koja glukuronizacijom, sulfacijom i metilacijom inaktivira štetne spojeve na način da postaju topljivi u vodi i tako se lakše izluče iz organizma (5).

Jaber i sur. su u svom istraživanju pokazali da je dim cigarete neovisni rizični čimbenik u displaziji epitelnih stanica, dok je štetnost alkohola dokazana samo u kombinaciji s dimom cigarete (6). Međutim, Schlecht i sur. (7) su pokazali da je i alkohol neovisni čimbenik rizika i promotor karcinoma gornjeg zračno-probavnog sustava. Povećana propustljivost epitelnih stanica na štetne sastojke iz dima cigarete koje djelovanjem alkohola postaju topljivije ima kancerogeni učinak.

Važno je napomenuti da dim cigarete i alkohol nisu samo rizični čimbenici za nastanak primarnog karcinoma nego i drugog primarnog karcinoma gornjeg zračno-probavnog sustava (8).

Ostali rizični čimbenici za razvoj pločastog karcinoma grkljana su infekcije izazvane različitim virusima, npr. humanim papiloma virusom (HPV), neovisno o izloženosti duhanskom dimu ili konzumaciji alkohola (9). Također, polimorfizmi gena koji kodiraju za enzime koji sudjeluju u metabolizmu toksičkih spojeva, obiteljska predispozicija i uravnotežena prehrana važni su čimbenici u nastanku i razvoju karcinoma grkljana (10). Poznato je da povećan unos povrća i voća bogatog beta-karotenom, vitaminima C i E i konzumiranje maslinovog ulja može imati zaštitnu ulogu u nastanku i razvoju maligne transformacije stanica (11).

U zadnjih dvadeset godina zabilježen je lagani pad pojavnosti karcinoma pločastih stanica grkljana zbog globalnog pristupa u propagandi protiv pušenja te zakona o zabrani pušenja na javnim mjestima (12). Nažalost, to nema utjecaja na preživljenje jer nije zabilježeno značajnije poboljšanje preživljenja kod bolesnika; još uvijek postoje lokalni i regionalni recidivi bolesti, udaljene metastaze i pojava sekundarnih primarnih tumora (13). Prema statistici iz 2011. godine samo 40-50% bolesnika s karcinomom pločastih stanica glave i vrata (engl. *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma* – HNSCC) ima petogodišnje preživljenje (14).

Prognoza kod bolesnika s karcinomom pločastih stanica grkljana najviše ovisi o stadiju bolesti prilikom postavljanja dijagnoze. Procjena stadija bolesti obuhvaća veličinu i poziciju samog tumora, zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova te prisutnosti udaljenih metastaza (8th edition of the TNM classification of Head and Neck Tumors, 2017) (15).

#### 1.1.4. Podjela karcinoma grkljana

Karcinom grkljana se prema histološkom nalazu dijeli na karcinom pločastih stanica grkljana (95-98% svih karcinoma grkljana) i na sve ostale histološki drugačije tipove karcinoma koje obuhvaća zajednički naziv - karcinomi nepločastih stanica grkljana (1-2% svih karcinoma grkljana). Druga podjela karcinoma grkljana je prema mjestu zahvaćanja tumora na razini samog grkljana, primjerice, na karcinom grkljana smješten u području glotisa (60%), karcinom grkljana smješten u području supraglotisa (40%) i karcinom grkljana smješten u subglotičnoj regiji (1%). Kao i svi karcinomi glave i vrata i karcinom grkljana podijeljen je na stadije bolesti ovisno o anatomske proširenosti, zahvaćenosti limfnih čvorova i prisutnosti udaljenih metastaza. O stupnju proširenosti karcinoma grkljana te o histološkom tipu ovisi i vrsta liječenja karcinoma. Za određivanje stadija tumora koristi se TNM klasifikacija prema Međunarodnom UICC TNM (engl. *Union for International Cancer Control*) sustavu stupnjeva bolesti. Oznaka T odnosi se na veličinu primarnog tumora, N na zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova, a M na prisutnost udaljenih metastaza. UICC TNM klasifikacija prikazana je u Tablici 1. do 5. (16).

Tablica 1. TNM klasifikacija karcinoma grkljana

##### Supraglotis

T1	tumor ograničen na 1 podjedinicu supraglotisa sa normalnom pomičnošću glasnica
T2	tumor koji zahvaća više od 1 podjedinice supraglotisa ili glotisa ili regije izvan supraglotisa bez fiksacije glasnice
T3	tumor ograničen na grkljan sa fiksacijom glasnice i/ili invazijom postkrikoidnog, preepiglottičkog i paraglotičkog prostora i/ili prisutna mala erozija štitne hrskavice
T4a	tumor zahvaća tiroidnu hrskavicu i/ili meko tkivo izvan grkljana
T4b	tumor zahvaća prevertebralni prostor, strukture medijastinuma ili karotidnu arteriju

Tablica 2. TNM klasifikacija karcinoma grkljana

##### Glottis

T1	tumor zahvaća glasnicu(e) može dopirati do prednje ili stražnje komisure sa urednom pomičnošću grkljana
T1a	tumor zahvaća jednu glasnicu
T1b	tumor zahvaća obje glasnice
T2	tumor se širi prema supraglotisu ili subglotisu ili je oštećena pomičnost glasnice
T3	tumor ograničen na grkljan sa fiksacijom glasnice i/ili zahvaća paraglotski prostor i/ili prisutna mala erozija štitne hrskavice
T4a	tumor zahvaća tiroidnu hrskavicu i/ili meko tkivo izvan grkljana
T4b	tumor zahvaća prevertebralni prostor, strukture medijastinuma ili karotidnu arteriju

Tablica 3. TNM klasifikacija karcinoma grkljana

Subglotis

T1	tumor ograničen u području subglotisa
T2	tumor koji se širi na glasnicu(e) sa normalnom ili oštećenom pomičnošću glasnice
T3	tumor ograničen na grkljan sa fiksacijom glasnice
T4a	tumor zahvaća tiroidnu hrskavicu i/ili meko tkivo izvan grkljana
T4b	tumor zahvaća prevertebralni prostor, strukture medijastinuma ili karotidnu arteriju

Tablica 4. TNM klasifikacija karcinoma grkljana

N-regionalni limfni čvorovi

<b>Nx</b>	ne može se odrediti širenje u čvorove
<b>N0</b>	nema zahvaćenih limfnih čvorova
<b>N1</b>	tumor u 1 ipsilateralnom limfnom čvoru < 3 cm
<b>N2</b>	tumor u 1 limfnom čvoru 3 do 6 cm; multipli ipsilateralni čvorovi do 6 cm; bilateralni ili kontralateralni ili bilateralni limfni čvor do 6 cm
<b>N2a</b>	tumor u 1 ipsilateralnom čvoru 3 do 6 cm
<b>N2b</b>	tumor u multiplim ipsilateralnim čvorovima do 6 cm
<b>N2c</b>	tumor u bilateralnim ili kontralateralnim čvorovima do 6 cm
<b>N3</b>	tumoru čvoru > 6 cm

M-udaljene metastaze

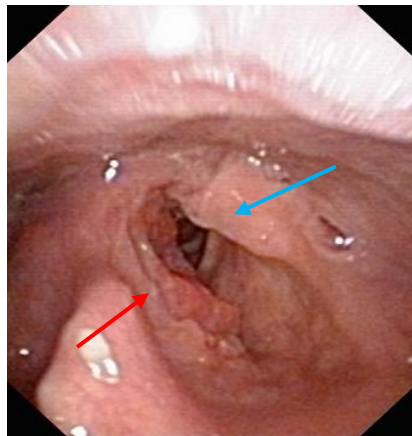
<b>Mx</b>	ne mogu se odrediti udaljene metastaze
<b>M1</b>	nema udaljenih metastaza
<b>M2</b>	udaljene metastaze

Tablica 5. Stadij karcinoma grkljana prema TNM klasifikaciji

<b>STADIJ</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>0</b>	<b>Tis</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>
<b>I</b>	<b>T1</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>
<b>II</b>	<b>T2</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>
<b>III</b>	<b>T3, T1-3</b>	<b>N0, N1</b>	<b>M0</b>
<b>IVA</b>	<b>T4, T1-4</b>	<b>N0-1, N2</b>	<b>M0</b>
<b>IVB</b>	<b>T1-4</b>	<b>N3</b>	<b>M0</b>
<b>IVC</b>	<b>T1-4</b>	<b>N0-3</b>	<b>M1</b>

### 1.1.5. Klinička slika

Karcinom grkljana koji nastaje na području glotisa ima najizraženiji simptom u vidu promuklosti, i to u vrlo ranom stadiju bolesti, pa upravo zbog toga i bolju prognozu od karcinoma nastalih na ostalim područjima grkljana jer se ranije i dijagnosticira. Bolja prognoza bolesti ovog područja ovisi i o ograničenoj limfnoj drenaži glotisa što onemogućava brzo širenje bolesti u regionalne limfne čvorove i na taj način otkrivanje bolesti u ranijem stadiju proširenosti. Ostali simptomi su nespecifični te obuhvaćaju otežano gutanje, osjećaj stranog tijela u grkljanu, učestalo pročišćavanje grkljana i nakašljavanje, hemoptizu te otežano disanje. Vrlo veliki tumori dovode do otežanog i čujnog disanja što može dovesti i do poremećaja funkcije donjih dišnih puteva. Kod karcinoma grkljana koji se šire i u područje hipofarinksa (donja regija ždrijela u blizini grkljana) može se pojaviti reflektirajuća bol u uhu zbog nadražaja vagalnog živca tumorom (Slika 1.).



*Slika 1. Prikaz karcinoma desne polovice grkljana (desnog hemilarinksa) s fleksibilnim fiberoptičkim endoskopom. Vizualizacija karcinoma grkljana - desne glasnice sa širenjem u desni ventrikularni nabor i desni aritenoid fleksibilnim fiberoptičkim endoskopom (crvena strelica prikazuje karcinom desne polovice grkljana, plava strelica uredan izgled lijeve glasnice)*

### 1.1.6. Dijagnostički postupci

Dijagnoza karcinoma grkljana postavlja se vizualizacijom i procjenom pomičnosti glasnica metodama indirektne laringoskopije i fleksibilne fiberoptičke endoskopije. U slučaju da se karcinom ne vizualizira, a postoje promjene u glasu, potrebno je učiniti videostroboskopiju kojom se analizira vibracija glasnica te uočavaju odstupanja koja mogu upućivati na leziju ispod sluznice nevidljivu klasičnim metodama pretrage. Zahvaćenost limfnih čvorova vrata dijagnosticira se UZV vrata i citološkom dijagnostikom punkcije limfnog čvora. Za procjenu proširenosti bolesti potrebno je učiniti i CT vrata (tumori > T2) s osvrtom na sam grkljan te limfne čvorove vrata. U slučaju proširene bolesti potrebno je učiniti Rtg pluća ili CT toraksa s posebnim osvrtom na postojanje metastaza na plućima. Mikrolaringoskopija u općoj anesteziji konačan je čin točnog utvrđivanja proširenosti karcinoma grkljana, uzimanja tkiva za patohistološku potvrdu karcinoma te procjene stadija bolesti o kojem ovisi daljnje liječenje (17).

### 1.1.7. Liječenje

Osnovni načini liječenja karcinoma grkljana su operacija i radioterapija, sa ili bez kemoterapije. Opseg operacije ovisi o veličini i smještaju tumora koji određuju i stadij bolesti. T1 i T2 tumori svih podjedinica grkljana odstranjuju se endoskopskim putem bez potrebe vanjskog pristupa na vrat sa CO<sub>2</sub> laserom u slučaju da se mogu u potpunosti endoskopski prikazati i da pomičnost glasnica nije ugrožena. Tumori T3 i T4 svih podjedinica grkljana odstranjuju se djelomičnim odstranjenjem grkljana (*parcijalna laringektomija*) ovisno o lokalizaciji tumora (horizontalna ili vertikalna laringektomija) i potpunim odstranjenjem grkljana (*totalna laringektomija*). Kod malih karcinoma grkljana u regiji glotisa bez zahvaćenih limfnih čvorova na vratu nije potrebno elektivno odstranjivanje čvorova na vratu (*selektivna disekcija vrata*) dok je kod manjih tumora drugih regija i kod većih tumora potrebno učiniti elektivnu disekciju vrata u regijama koje prema putu širenja tumora odgovaraju lokalizaciji samog tumora bez obzira jesu li limfni čvorovi već zahvaćeni tumorom. Ukoliko su čvorovi na vratu već zahvaćeni tumorom potrebno je odstraniti čvorove svih regija vrata uz odstranjenje sternokleidomastoidnog mišića, akcesornog živca i jugularne vene (*radikalna disekcija vrata*). Kod malih karcinoma regije glotisa i subglotisa T1 i T2 uz primarno kirurško liječenje moguća je i primarna radioterapija s podjednakim rezultatima kao i poslijeoperativno dok se kod većih tumora provodi poslijeoperativna radioterapija ili

konkomitantna kemoradioterapija (18). Poslijeoperativna radioterapija sa ili bez kemoterapije provodi se kod karcinoma grkljana regije glotisa u slučaju velikog tumora (T4) i proširene bolesti (N2-3), tumorom zahvaćenog resekcijskog ruba, slabo diferenciranog tumora (GII-GIII), prisutnosti ekstrakapsularnog širenja, perineuralne ili perivaskularne invazije te limfangozne karcinomatose (19).

Molekularni mehanizmi karcinogeneze kod karcinoma pločastih stanica grkljana još uvijek su nedovoljno poznati, a genetska i biološka heterogenost ove bolesti zahtijeva razvoj novih strategija u dijagnosticiranju i liječenju bolesti.

## 1.2. Povezanost kronične upale s nastankom karcinoma

Rudolf Virchow je proučavao prisutnost leukocita u okolini tumora te pretpostavio postojanje povezanosti između upale i nastanka tumora (20). Zadnjih desetljeća postalo je jasno da upala ima kritičnu ulogu u nastanku većeg broja karcinoma. Poznato je da upalne reakcije, koje se međusobno razlikuju prema uzročniku, mehanizmu djelovanja, intenzitetu i ishodu, sudjeluju u poticanju nastanka i širenja karcinoma. Patogeni uzročnici, kao što su bakterije i virusi, dovode do aktivacije urođene imunosti što omogućava njihovu eliminaciju iz organizma. Pojedini patogeni mogu utjecati na mehanizme urođene imunosti, mijenjati ih i tako spriječavati odstranjenje patogena iz organizma i dovesti do kronične upale. Kronična upala ima protumorski učinak i povećava rizik za nastanak karcinoma. Poznati primjeri su trajna infekcija bakterijom *Helicobacter pylori* koja povećava rizik od nastanka karcinoma želuca (21), te infekcija virusima *hepatitisa B i C* (HBV i HCV) koji povećavaju rizik nastanka hepatocelularnog karcinoma (22). Kronična upala kao posljedica poremećaja imunološke regulacije također se dovodi u vezu s nastankom kolorektalnog karcinoma (23).

Čimbenici okoliša, na prvom mjestu udisanje duhanskog dima i inhalacija azbesta (24) i silikona (25), dovode do kronične upale koja protumorigenim učinkom potiče nastanak i razvoj karcinoma grkljana i pluća. I manje poznati čimbenici kao što su starenje stanice (26), nakupljanje oštećene DNA (27) i pretilost (28) dovode do kronične upale koja potiče nastanak karcinoma (29).

U mikrookolini tumora nalaze se stanice urođene i specifične imunosti koje međusobno komuniciraju direktno, ili putem citokina i kemokina, i na taj način kontroliraju rast tumora. Profil ekspresije različitih molekula koje sudjeluju u aktivaciji i modulaciji imunološkog odgovora i upalne reakcije, njihovo pojačano nakupljanje te pojačana ili smanjena aktivacija određuju ravnotežu između protumorskog ili antitumorskog okoliša (30). Aktivacijom

različitih signalnih puteva citokini kontroliraju upalu tako što s jedne strane potiču protutumorsku imunost (IL-12, TRAIL, IFN $\gamma$ ), a s druge strane razvoj (IL-6, IL-17, IL-23), rast i preživljavanje tumora (TRAIL, FasL, TNF- $\alpha$ , EGFR, TGF- $\beta$ ). Općenito, karcinom nastaje kao posljedica promjene signalnih puteva koji sudjeluju u regulaciji stanične proliferacije. Promjene u sadržaju i funkcionalnom stanju molekula signalnog puta koje sudjeluju u aktivaciji i regulaciji imunološkog odgovora dovode do specifičnih promjena koje se povezuju s pojačanim preživljavanjem stanica (31). Ključni čimbenici u povezanosti kronične upale s nastankom karcinoma su transkripcijski čimbenici (NF- $\kappa$ B i STAT3), te upalni citokini kao što su (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 i TNF- $\alpha$ ) (32). Napredovanje tumora je proces rasta jedne tumorske stanice u tkivo tumora. Ovaj proces, između ostalog, ostvaruje se i upalom stimuliranom proliferacijom tumorskih stanica i smanjenjem stanične smrti. Mehanizmi koji dovode do napredovanja tumora uključuju proizvodnju i aktivaciju citokina unutar signalnih puteva. Dakle, stanice urođene imunosti i upalne stanice stvaraju citokine koji su važan mehanizam u napredovanju tumora i omogućavaju rast i preživljavanje tumorskih stanica u većini slučajeva na parakrini način (33).

### **1.3. Mehanizam stanične imunosti i njegova uloga u tumorigenezi**

Mehanizam stanične imunosti prva je linija obrane organizma i bazira se na razlikovanju onoga što pripada samom organizmu („self“) kao što su npr. vlastiti proteini od onoga što ne pripada organizmu („nonself“) kao npr. mikroorganizmi. Matzinger je 1994. godine opisala tzv. „hipotezu opasnosti“ gdje opasnost za organizam domaćina, bez prisutnosti „stranog“, dovodi do koordinirane aktivacije imunološkog sustava kao odgovor na signal (34). Mehanizmi stanične imunosti regulirani su nizom nasljednih gena koji kodiraju receptore za prepoznavanje uzoraka (engl. *pattern-recognition receptors*–PRRs). Ekspimiraju ih stanice makrofaga, monocita, dendritičkih stanica, neutrofila, epitelnih stanica kao i stanice tumora. Najbolje proučeni receptori urođene imunosti su Toll-like receptori (TLRs) koji su smješteni na površini stanice ili na stjenkama endoplazmatskog retikuluma i na taj način prepoznaju patogenu pridružene molekularne slijedove (engl. *pathogen associated molecular patterns*–PAMPs). Druga vrsta receptora NOD-like receptori (NLRs) su smješteni unutar stanice, u citoplazmi, i predstavljaju drugu liniju obrane. Aktivacija receptora urođene imunosti dovodi do pokretanja složenog signalnog puta koji u konačnici dovodi do aktivacije transkripcijskih čimbenika NF- $\kappa$ B i AP-1, te sinteze i lučenja proupalnih citokina i kemokina (35). Aktivacijom NLRa dolazi do formiranja proteinske platforme, inflamiasoma, koja omogućava

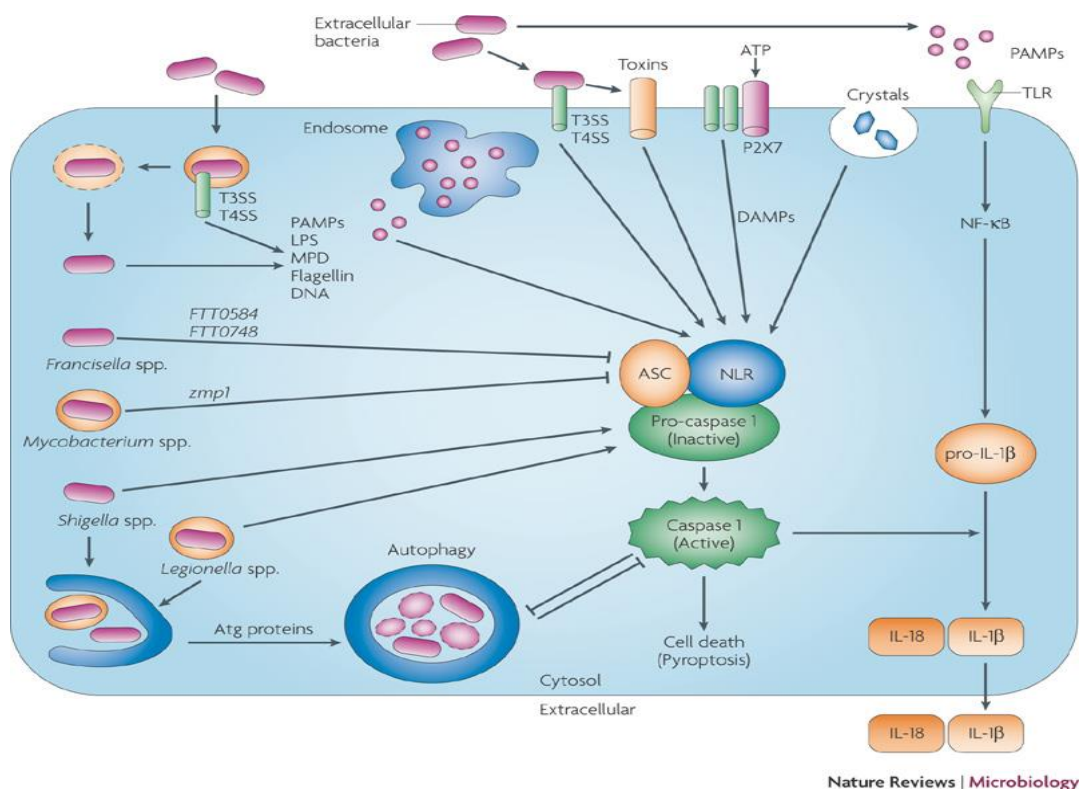
prelazak inaktivnog oblika kaspaze u aktivne oblike i dozrijevanje pro-IL-1 $\beta$  u aktivni oblik. Ova dva puta su međusobno povezana i aktivacija TLR signalnog puta potiče stvaranje pro-IL-1 $\beta$  koji će putem aktivacije NLR signalnog puta prijeći u zreli oblik.

### 1.3.1. Uloga gena **ASC/TMS1** u staničnoj imunosti

Gen ASC/TMS1 kodira adaptornu molekulu ASC (engl. *Apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruiting domain/Target of methylation induced silencing-1 gene*) koja ima važnu ulogu u signalnom putu aktiviranom odgovorom organizma na infekciju ili ozljedu, a karakterizira ga stvaranje inflamiasoma. Ovaj signalni put kontrolira sazrijevanje i lučenje interleukina IL-1 $\beta$  i IL-18.

NOD-like receptori koji sudjeluju u ovom signalnom putu pripadaju porodici NLR receptora od kojih je najbolje proučena uloga receptora NLRP3 u stvaranju NLRP3 inflamiasoma. NLRP3 inflamiasom čine receptor, adaptorna molekula ASC i kaspaza-1. NLRP3 receptor aktivira se nakon izlaganja specifičnim ligandima kao što su bakterije, toksini, kristali, unutarstanične bakterije, lipopolisaharidi i različite molekula PAMP-a. Njegova aktivacija dovodi do NLRP3 oligomerizacije, nakupljanja PYD domene samog receptora, homotipne međureakcije sa PYD domenom adaptorne molekule ASC/TMS1, te međureakcije CARD domene adaptorne molekule ASC/TMS1 s CARD domenom prokaspaze-1. Prokaspaza-1 cijepanjem prelazi u aktivni oblik kaspaza-1 koja dalje dovodi do sazrijevanja i sekrecije IL-1 $\beta$  (Slika 2.). Do sada su u literaturi opisani mogući mehanizmi aktivacije NLRP3 inflamiasoma. Prvi model navodi da izvanstanični ATP stimulira otvaranje ATP-ovisnog ionskog kanala stanične membrane i na taj način formiranje pora stanične membrane koje omogućavaju direktnu aktivaciju NLRP3 inflamiasoma putem NLRP3 agonista u citoplazmi. Drugi model navodi kao aktivatore čestice različitih kristala (urata, silikona, azbesta) koji aktivacijom fagocita dovode do lizosomalnog oštećenja te oslabljuju sadržaj lizosoma u citoplazmi i na taj način aktiviraju NLRP3 inflamiasome (36).





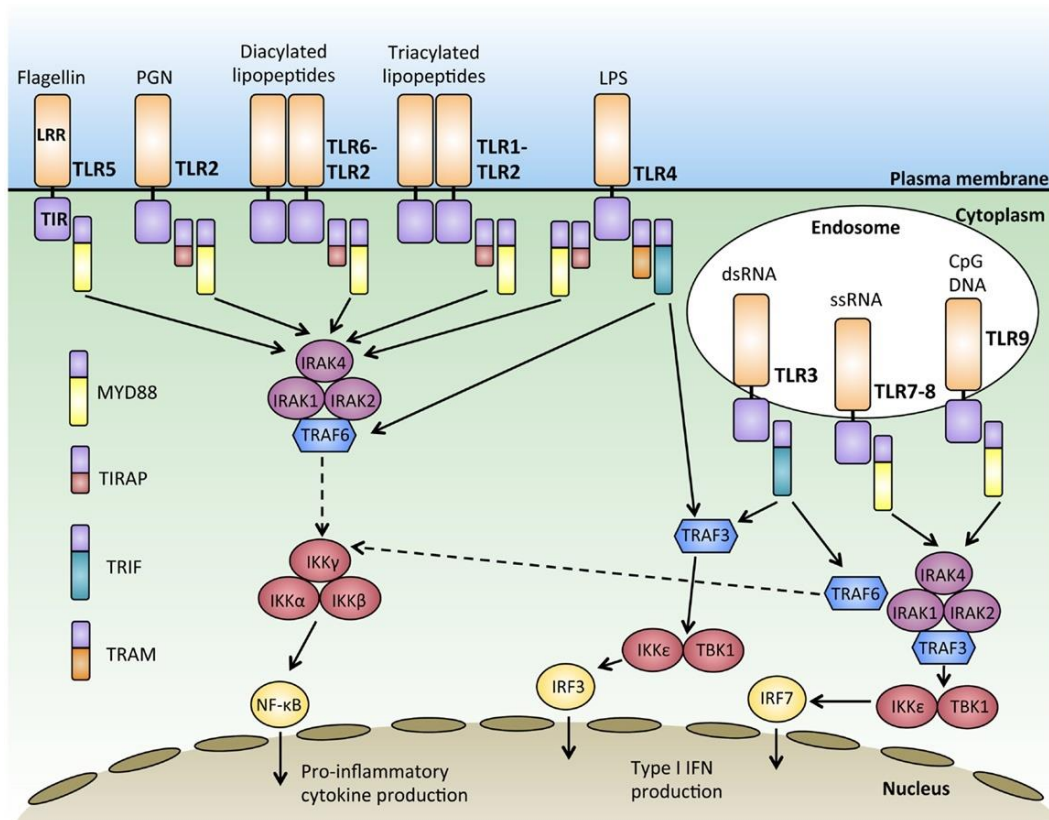
Slika 2. Aktivacija NOD-like NLRP3 receptora i stvaranje NLRP3 inflammasoma (preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu (37))

### 1.3.2. Uloga gena MyD88 u staničnoj imunosti

Gen MyD88 kodira adaptornu molekulu MyD88 (engl. *Myeloid differentiation primary response 88*) koja ima ključnu ulogu u TLR signalnom putu. TLRi nalaze se ili na staničnoj membrani kao površinski TLR-i ili na membrani unutarstaničnih vezikula kao unutrašnji TLR-i. Površinski TLR-i prepoznaju evolucijski sačuvane komponente membrana ili vanjskih ovojnica bakterija, virusa i parazita, dok unutarstanični TLR-i prepoznaju nukleinske kiseline. Toll-u slični receptori izraženi su uglavnom na stanicama imunološkog sustava ali i na mnogim drugim neimunološkim stanicama, pa i stanicama tumora (38). Aktivacija ovih receptora pokreće signalni put koji u konačnici završava aktivacijom transkripcijskog čimbenika NF- $\kappa$ B i sintezom različitih citokina i kemokina (39).

Adaptorna molekula MyD88 je ključna molekula ovog signalnog puta- stvara reverzibilni kompleks s receptornim homodimerom što omogućava signalnu kaskadu. Nakon vezanja specifičnog liganda na TLR, signal se prenosi preko citoplazme do stanične jezgre. Prijenos signala putem TLRa započinje kada adaptorski protein MyD88, nakon vezanja s

unutarstaničnom domenu receptora, prenese signal, tj. pokrene fosforilaciju kinaza IRAK-4, 2 i 1 (engl. *IL-1 receptor associated kinase*), TRAF6 (engl. *TNF receptor associated factor 6*) te TAB2 i TAB3 (engl. *TAK1 binding protein*), koji potom aktiviraju TAK1 (engl. *TGF- $\beta$ -activated kinase 1*). TAK1 se pridružuje IKK-kompleksu i fosforilira IKK $\beta$ , što vodi do razgradnje I $\kappa$ B inhibitornih proteina i aktivacije transkripcijskih čimbenika NF- $\kappa$ B. Aktivacija NF- $\kappa$ B i ostalih transkripcijskih faktora rezultira sekrecijom proupalnih citokina, uključujući IL-6, TNF- $\alpha$  i IL-12 (Slika 3.) (40).



Slika 3. Prijenos signala putem TLRa (preuzeto i prolagođeno prema literaturnom navodu (41))

## 1.4. Epigenetika

Epigenetika izučava promjene u ekspresiji gena koje nisu posljedica nasljednih promjena u slijedu DNA. Mehanizam epigenetskih promjena, uz RNA utišavanje i modifikaciju histona, najvećim djelom je DNA metilacija. Metilacija DNA pojavljuje se na citozinskom kraju posebno malih regija DNA koje su bogate CpG dinukleotidima (<500 pb). Takve regije bogate CG dinukleotidima (> od 55%) nazivaju se CpG mjesta. Najčešće se nalaze unutar regulatornih regija gena, promotora, i utječu na transkripciju tih gena. Ukoliko su CpG mjesta promotorske regije nemetilirana tada su geni eksprimirani, ali ukoliko postanu hipermetilirana dolazi do utišavanja ekspresije gena (engl. *gene silencing*) (42). Obzirom da se status metilacije povezuje s nastankom i razvojem tumora, reverzibilnost DNA metilacije ciljanih gena može ukazivati na novu terapijsku strategiju obnavljanjem ekspresije transkripcijski utišanih tumor supresorskih gena (43). Upala inducira DNA metilaciju ovisnu o DNA metiltransferazi (engl. *DNA methyltransferase*, DNMT) što dovodi do utišavanja gena koji sudjeluju u putu razvoja tumora (44).

Do sada je najčešće analizirana aberantna hipermetilacija u promotorskim regijama tumor supresorskih gena koja time dovodi do epigenetske inaktivacije tih gena (45).

### 1.4.1. Metilacija gena ASC/TMS1

Iz literature je poznato da je metilacijom inducirano utišavanje gena ASC/TMS1 povezano s kasnim stadijem razvoja kolorektalnog karcinoma. Prema ovim rezultatima ASC/TMS1 spada u proapoptične gene uključene u aktivaciju NF- $\kappa$ B signalnog puta. Kod bolesnika s kolorektalnim karcinomom pokazan je visoki stupanj metilacije gena ASC/TMS1 i dokazana je povezanost između statusa metilacije i ekspresije ASC/TMS1 gena. Isto tako pokazano je da ne postoji metilacija gena ASC/TMS1 kod benignih kolorektalnih promjena kao što su tubularni i vilarni adenomi. Metilacija ovog gena uočena je samo u kasnom stadiju kolorektalnog karcinoma i to kod inazivnih karcinoma, a nije otkrivena kod premalignih lezija. Upravo zbog toga metilacija ASC/TMS1 gena može služiti kao biomarker u prognostičkom značenju te dijagnosticiranju recidiva i metastaza karcinoma (46).

Promijenjena metilacija gena ASC/TMS1 dokazana je i kod nekih drugih vrsta karcinoma uključujući 40% karcinoma dojke (47), 50% primarnih melanoma (48), 16-40% karcinoma jajnika (49), 40% nemalih stanica karcinoma pluća i 41% malih stanica karcinoma pluća (50), 21-43% glioblastoma (51), 64% karcinoma prostate (52) i 36% karcinoma žučnjaka (53).

U novijim istraživanjima proučavana je korelacija stupnja metilacije gena ASC/TMS1 i gena p53 sa prognozom kod bolesnika s karcinomom žučnjaka. Pokazano je da 66,7% bolesnika s ovim karcinomom pokazuje metilaciju barem jednog od ovih tumor supresorskih gena i takvi bolesnici imaju lošije patohistološke značajke bolesti a time i prognozu (54).

Do sada u literaturi nije proučavan status metilacije ASC/TMS1 gena kod karcinoma grkljana niti je u bilo kojem od navedenih karcinoma korištena metoda pirosekvenciranja za određivanje statusa metilacije.

#### 1.4.2. Metilacija gena **MyD88**

U dosadašnjoj literaturi nema podataka da je kod karcinoma proučavan status metilacije gena MyD88 koji kodira adaptornu molekulu MyD88, ključnu molekulu u prijenosu signala putem aktivacije TLRa i kontroli mehanizma stanične imunosti i tumorigeneze.

Do sada su u novijoj literaturi prikazane somatske mutacije gena MyD88 koje dovode do aktivacije TLR signalnih puteva i posljedične aktivacije transkripcijskog čimbenika NF- $\kappa$ B koji tako promovira stanično preživljavanje i proliferaciju stanica. Neadekvatna aktivacija TLRa uvjetovana somatskim mutacijama TLR adaptorne molekule MyD88 pokazala se vodećim uzročnikom mnogih hematoloških malignih bolesti. Funkcionalne mutacije gena MyD88 nađene su u 39% aktivnih difuznih limfoma velikih B-stanica i u gotovo 100% bolesnika s Waldenströmovom makroglobulinemijom. MyD88 mutacije prisutne su i u 2-10% bolesnika s kroničnom limfocitnom leukemijom (CLL), 69% bolesnika s kožnim difuznim limfomom velikih B-stanica (CBCL) i 38% bolesnika s primarnim limfomom središnjeg živčanog sustava (PCNSL). Upravo otkrivanje mutacija adaptorne molekule MyD88 jedan je od mnogih dokaza Virchowove hipoteze povezanosti kronične upale i karcinoma (41).

## 2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Promijenjeni status metilacije promotorske regije gena odgovornih za aktivaciju i regulaciju upale (ASC/TMS1 i MyD88), unutar zdravoga i tumorskog tkiva grkljana, povezan je s nastankom i progresijom tumora grkljana.

**Glavni cilj** ovog istraživanja je ispitati postoji li razlika u stupnju metilacije gena ključnih u aktivaciji imunološkog odgovora unutar zdravoga i tumorskog tkiva grkljana i očituje li se ta razlika na proteinskoj razini. Cilj je istražiti također može li se stupanj metilacije testiranih gena koristiti kao potencijalni biomarker u dijagnosticiranju, liječenju i praćenju ishoda liječenja karcinoma grkljana.

**Specifični ciljevi** istraživanja jesu:

1. Ispitati status metilacije promotorske regije gena ASC/TMS1 i MyD88 u zdravom i tumorskom tkivu ispitanika s karcinomom grkljana
2. Ispitati ekspresiju testiranih gena, u zdravom i tumorskom tkivu, na razini proteina
3. Usporediti status metilacije gena s statusom ekspresije proteina

### **3. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA**

#### **3.1. ISPITANICI**

Uzorci tkiva bolesnika s primarnim planocelularnim karcinomom grkljana kod kojih nisu prisutne ili su prisutne metastaze u limfne čvorove na vratu prikupljeni su tijekom rutinskog operativnog kirurškog liječenja na Klinici za bolesti uha, nosa i grla i kirurgiju glave i vrata, KBC Zagreb. Tijekom istraživanja na Klinici se prikupilo 36 uzoraka tumorskih tkiva bolesnika i pripadajuća histološki zdrava/tumorom nezahvaćena tkiva u razdoblju tri godine (2014-2016). Uzorci tumorskih tkiva patohistološki su analizirani u svrhu utvrđivanja čistoće tumorskog tkiva u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KBC Zagreb. Tumorsko tkivo za potrebe daljnjih analiza narezano je iz tumorske mase koja je najbogatija tumorskim stanicama (>70%) i pohranjeno na -80°C. Patohistološki je analizirano i okolno histološki normalno/tumorom nezahvaćeno tkivo da bi se potvrdilo da nema tumorskih stanica. Svi bolesnici su prije uključjenja u istraživanje potpisali informirani pristanak. Svi bolesnici su dokumentirani pod šifrom poznatom samo glavnom istraživaču čime je zajamčena anonimnost ispitanika. Istraživanje je započelo nakon dobivanja odobrenja Etičkog povjerenstva KBC Zagreb. Sva molekularna istraživanja provedena su u Laboratoriju za naprednu genomiku Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.

#### **3.2 METODE**

##### **3.2.1 Analiza metilacije DNA pirosekvenciranjem**

Metilacijski statusi promotora pojedinog gena analizirani su metodom pirosekvenciranja koja nam je omogućila precizno izražavanje postotka metilirane DNA u analiziranom uzorku tkiva. Metoda analize metilacije DNA zahtijeva izolaciju genomske DNA iz uzoraka tkiva, bisulfitnu konverziju DNA, dizajniranje početnica za umnažanje DNA PCR-om i sekvenciranje, umnažanje fragmenata DNA predviđenih za analizu, pirosekvenciranje te obradu rezultata dobivenih sekvenciranjem.

##### **3.2.2. Izolacija genomske DNA iz tkiva**

Genomska DNA iz tkiva izolirana je pomoću komercijalno dostupnog kompleta za izolaciju DNA (Qiagen, Hilden, Njemačka; Dneasy Blood and Tissue Kit), prema uputama proizvođača. Ukratko, uzorci zdravoga i tumorskog tkiva izvađeni su sa -80°C i ostavljeni da se otope na sobnoj temperaturi. Tkiva (15-25 mg) su potom lizirana u puferu ATL (180 µL)

uz dodatak proteinaze K (20  $\mu$ L) preko noći na 56°C u vodenoj kupelji. Nakon lize tkiva, lizatima je dodano 200  $\mu$ L pufera AL i 200  $\mu$ L 96% etanola uz vorteksiranje. Pripremljeni lizati potom su nanješeni na kolonice za izolaciju DNA. Tijekom centrifugiranja (6000 x g/1min.) DNA se selektivno veže na membranu kolonice. Slijedilo je ispiranje s dva pufera AW1 (500  $\mu$ L, centrifuga 6000 x g/1min.) i AW2 (500  $\mu$ L, centrifuga 20 000 x g/3min.). Izolirana DNA eluirana je u 100  $\mu$ L pufera AE (centrifuga 6000 x g/1min.), a eluat je još jednom provučen kroz kolonice kako bi se povećala iskoristivost izolirane DNA (centrifuga 6000 x g/1min.). Korištena je centrifuga Eppendorf 5810R (Eppendorf, Hamburg, Njemačka), a svi koraci odvijali su se na sobnoj temperaturi. Kvaliteta i koncentracija izolirane genomske DNA provjerena je na BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis spektrofotometru (Shimadzu, Kyoto, Japan). Izolirana DNA smatrala se kvalitetna i čista ukoliko je zadovoljila dva uvjeta: 1. Omjer apsorbancije  $A_{260}/A_{280}$  1,7-1,9i  $A_{260}/A_{230}$  2,0-2,2; 2. Ako graf apsorbancije  $A_{260}$  pokazuje simetričan “peak“. Izolirana genomska DNA koja je zadovoljila gore navedene uvjete pohranjena je na -20°C, do daljnje analize.

### 3.2.3 Bisulfitna konverzija genomske DNA

Za potrebe analize metilacije DNA, genomska DNA zadovoljavajuće kvalitete je modificirana reakcijom bisulfitne konverzije. Natrij bisulfit ne utječe na metilirani citozin (5-metilcitozin), dok nemetilirane citozine, preko prvotne konverzije deaminacijom u uracile, mijenja u timine čime se epigenetička oznaka prebacuje u slijedu DNA (Tablica 6.).

Tablica 6. Princip reakcije bisulfitne konverzije DNA

	Originalna sekvenca	Bisulfitna konverzija	PCR umnažanje
Nemetilirana DNA	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-U-G-N-U-G-N-U-G-N	N-T-G-N-T-G-N-T-G-N
Metilirana DNA	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N

Za reakciju bisulfitne konverzije koristilo se 500 ng genomske DNA koja je obrađena i pročišćena pomoću komercijalno dostupnog kompleta (Qiagen, Hilden, Njemačka; Epiect® 96 bisulfite kit) prema uputi proizvođača. Ukratko, genomska DNA pomiješa se s otopinom bisulfitne smjese. Bisulfitna smjesa otopljenja je u 80 0 $\mu$ L vode slobodne od RNase, uz kratkotrajno vorteksiranje. Reakcije za bisulfitnu konverziju pripremljene su prema uputi navedenoj u Tablici 7.

Tablica 7. Priprema reakcije bisulfitne konverzije

Komponente reakcije	Volumen po reakciji (μL)
Genomska DNA+ RNase-free voda	40 (DNA input 500 ng)
Otopljeni Bisulfitni miks <sup>1</sup>	85
DNA Protect pufer <sup>2</sup>	15
<b>Ukupni volumen reakcije</b>	<b>140</b>

<sup>1</sup>Bisulfitni miks (sastav poznat proizvođaču) omogućava optimalnu razinu pH za konverziju citozina u uracil<sup>2</sup>DNA Protect pufer (sastav poznat proizvođaču) sprječava fragmentaciju DNA na visokim temperaturama i pri niskim pH vrijednostima. Sadrži boju koja služi kao pH indikator

Bisulfitna konverzija odvijala se u PCR uređaju sa uključenim grijanim poklopcem (Biometra Tprofessional, Göttingen, Njemačka). Reakcija je podešena prema Tablici 8.

Tablica 8. Uvjeti reakcije bisulfitne konverzije genomske DNA

Korak	Trajanje (min.)	Temperatura (°C)
Denaturacija	5	95
Inkubacija	25	60
Denaturacija	5	95
Inkubacija	85	60
Denaturacija	5	95
Inkubacija	175	60

Nakon reakcije bisulfitne konverzije uzorci su pomiješani s 560 μL pufera BL koji promovira vezanje jednolančane konvertirane DNA na membranu kolonica (EpiTect® spin kolonice za pročišćavanje DNA) (centrifuga 14000 rpm/1min). Slijedilo je ispiranje puferom BW koji uklanja ostatke natrij bisulfita (500 μL, centrifuga 14000 rpm/1min.) i BD desulfonizirajućim puferom (500 μL, inkubacija 15min., centrifuga 14000 rpm/1min.) te ponovo BW puferom 2 puta (500 μL, centrifuga 14000 rpm/1min.) uz dodatni korak centrifugiranja (14000 rpm/1min.) radi uklanjanja zaostale tekućine. DNA je eluirana u 40 μL EB pufera (12000 rpm/1min.). Korištena je centrifuga Heraeus PICO21 (Thermo scientific, Waltham, SAD), a svi koraci centrifugiranja odvijali su se na sobnoj temperaturi. Bisulfitno konvertirana i pročišćena DNA pohranjena je na -20°C do upotrebe za lančanu reakciju umnažanja polimerazom (PCR).

### 3.2.4 Dizajniranje početnica za umnažanje DNA lančanom reakcijom polimeraze (PCR) i sekvenciranje

Slijed DNA na temelju kojih su konstruirane početnice za lančanu reakciju polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) preuzete su iz besplatno dostupne baze podataka



GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI). Identifikacijska oznaka gena MyD88 u bazi podataka je NG\_016964, a gena ASC/TMS1 AF184072.1. Dizajniranje početnica započinje određivanjem dijela slijeda DNA promotora od interesa gena MyD88 i ASC/TMS1 proksimalno od ATG mjesta (početak transkripcije gena). Nakon otkrivanja regije od interesa pristupilo se dizajnu početnica. Za potrebe PCR-a biotinom obilježene početnice specifične za bisulfitno konvertiranu DNA i početnice za pirosekvenciranje dizajnirane su pomoću računalnog programa PyroMark Assay Design Software 2.0 (Qiagen, Hilden, Njemačka), prema uputama proizvođača. Ukratko, slijed DNA od interesa unesene su u program, odabran je CpG esej, označena je regija od interesa (CpG mjesta promotorske regije gena MyD88 i ASC/TMS1). Program automatski prikazuje slijed bisulfitno konvertirane DNA. Pokretanjem analize prikazuje se lista mogućih setova početnica. Odabrani setovi početnica za PCR reakciju prikazani su u Tablici 9, a početnice za pirosekvenciranje u Tablici 10.

*Tablica 9. Početnice korištene za lančanu reakciju polimeraze (PCR)*

<b>Naziv početnice</b>	<b>Sekvenca (5'-3')</b>	<b>Regija gena i kromosomski smještaj (pb)*</b>	<b><i>L<sub>a</sub></i>/pb</b>
MyD88_F2	TATGTTGAGAGTAGTTAGGG	5' uzvodno (promotor) 3p22.2 ; CpG otok	479
MyD88_R2	TATAAACCCCTCAAATTCCTC ‡	38179793-38180272	
ACS_F2	GAGGTTTGGGTGGGAGG	5' uzvodno (promotor) 16p11.2 ; CpG otok	383
ACS_R2	AATCTCCAAATAAAAACTAAC CAAC‡	31213822-31214205	

pb-parova baza, *L<sub>a</sub>*—duljina produkta, \*prema Ensembl (GRCh38.p7), ‡biotinizirana početnica

Tablica 10. Početnice korištene za reakciju pirosekvenciranja

Naziv početnice	Sekvenca (5'-3')	Analizirana sekvenca (5'-3')	<i>n</i> CpG otoka
MyD88_S1	TGGTGATGGTGTAGTA	GGTTGGYGGYGGAGTGAGGAYG ATTTTTTTTTYGGGGGTTG	4
MyD88_S2	GAGATTTGGAGAGGTT	TAYGGTATYG TTTYGAGGG TTTGGTGATG GTGTTAGTAG G	3
MyD88_S3	GGGGTGTTTATTTTTAT T	TTTGAGGTTTYGAGGYGGGTGA TGTGGGGGGYG	3
ASC_S1	GTTTTTTGTTGGAGGGT AA	YGGATYGGGG YGGGGAGTYG GGAGA	4

n- broj, Y- mogući metilirani citozin (CpG otok)

### 3.2.5. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Nakon bisulfitne konverzije genomska DNA umnožena je s odabranim početnicama. Sadržaj svake reakcije PCR prikazan je u Tablici 11., a koraci reakcije su podešeni prema Tablici 12.

Tablica 11. Komponente lančane reakcije polimeraze

Komponente reakcije	Volumen po reakciji (μL)
10X pufer	2,5
dNTP miks (10 mmol/L)	0,5
Primer F2	1 (10 pmol)
Primer R2	1 (10 pmol)
DNA polimeraza*	0,2(1 U)
Mq H <sub>2</sub> O	18,8
DNA (bis. konv.)	1
<b>Ukupni volumen</b>	<b>25 μL</b>

\*FastStart Taq DNA polimeraza 5U/μl (Roche, Basel, Švicarska)

FastStart Taq DNA polimeraza je termostabilna, kemijski modificirana Taq DNA polimeraza.

FastStart Taq DNA polimerazaje inaktivnana sobnoj temperaturi (15-25°C) i aktivira se inicijalnom denaturacijom na 95°C čime se sprječava nespecifično vezanje i stvaranje dimer početnica pri nižim temperaturama. 10x PCR pufer sadrži 20 mM MgCl<sub>2</sub>. dNTP miks sadrži deoksiribonukleotide dATP (deoksiadenozin-trifosfat), dGTP (deoksigvanozin-trifosfat), dTTP (deoksitimidin-trifosfat) i dCTP (deoksicitidin-trifosfat). Lančana reakcija polimerazom provedena je na T-professional thermal cycler uređaju (Biometra Tprofessional, Göttingen, Njemačka).

Tablica 12. PCR program

Korak	Trajanje (min.)	Temperatura (°C)
Inicijalna denaturacija	5	95
Denaturacija	30 s	95
Vezivanje početnica	30 s	60
Elongacija	45 s	72; 35 X
Finalna elongacija	5	72

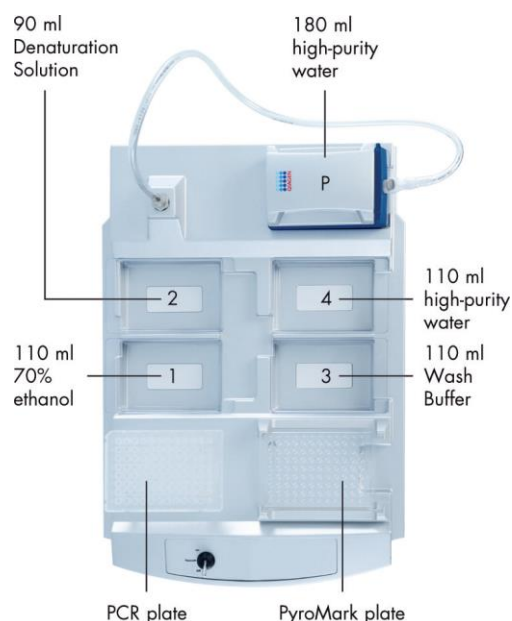
Produkti svake reakcije PCR-a analizirani su elektroforezom na 1% agaroznom gelu (uz dodatak EtBr) u TAE puferu (2M Tris base, 50 mM EDTA, octena kiselina, destilirana voda), kako bi se provjerila uspješnost reakcije PCR te isključila mogućnost kontaminacije uzoraka. Elektroforeza je provedena pri naponu od 120 mV, u trajanju oko 20 min, na uređaju BIO-RAD Power PAC 200 (Hercules, Kalifornija, SAD). Signal je vizualiziran UV svjetlom na uređaju ALLIANCE XD-79LS-26MX (Uvitec, Cambridge, UK). Veličina fragmenata određena je usporedbom s fragmentima DNA poznatih veličina.

Prije same analize pirosekvenciranjem biotinizirani PCR produkti imobilizirani su na sefarnim perlama obloženim streptavidinom (Streptavidin Sepharose High Performance, GE Healthcare). Komponente reakcije prikazane su u Tablici 13.

Tablica 13. Imobilizacija PCR produkta na perle

Komponente reakcije	Volumen po reakciji (μL)
Biotinizirani PCR produkt	10
Sefarozne perle obložene streptavidinom	1,5 (3 μL)
PyroMark vezajući pufer	40
Milli-Q H <sub>2</sub> O	28,5 (27)
<b>Ukupni volumen reakcije</b>	<b>80 μL</b>

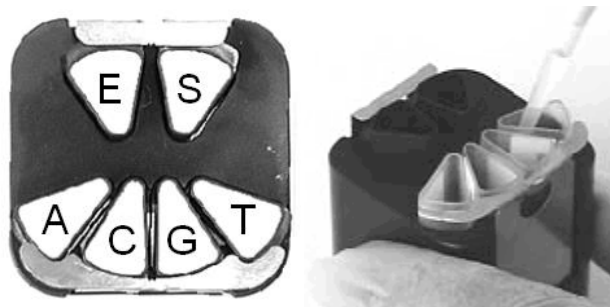
U svaku jažicu PCR pločice (96 jažica) dodano je 80 μL pripremljene reakcije. PCR pločica postavljena je na termomikser (Eppendorf® Thermomixer Compact), 10 minuta, pri brzini od 1400 rpm i sobnoj temperaturi. Tijekom imobilizacije pripremljena je vakumska postaja za razdvajanje lanaca DNA (PyroMarkQ96 Vacuum Workstation, Qiagen, Hilden, Njemačka). U kadice na vakumskoj postaji dodane su otopine (Milli-Q voda, 70% etanol, denaturacijska otopina ili pufer za ispiranje) kako je prikazano na Slici 4.



Slika 4. Vakumska postaja za razdvajanje lanaca DNA (preuzeto iz *QIAGEN PyroMark Q96 Reagens Handbook 07/2014*)

Pripremljena je i pločica za pirosekvenciranje. U svaku jažicu stavljeno je 40  $\mu$ L otopine sekvencijske početnice (Tablica 5.) za jedan od istraživanih gena (0,4  $\mu$ M početnice u puferu za vezanje). PCR pločica i pločica za pirosekvenciranje fiksirane su na vakumsku postaju. Nastavci s filterima vakumske četke pod vakuumom su umetnutina 15 sekundi u jažice PCR pločice sa biotiniziranim PCR produktom koji se imobilizirao na sefarozne kuglice obložene streptavidinom. Četka vakumske pumpe potom je uronjena na kratko u 70% etanol pomoću kojega se ispiru zaostaci PCR reakcije. Slijedi odvajanje lanaca DNA u denuracijskoj otopini na 5 sekundi (sastav poznat proizvođaču), pri čemu biotinizirani lanac ostaje vezan za sefarozne kuglice. Nevezani lanci i nečistoće ispiru se u puferu za ispiranje (sastav poznat proizvođaču) na 10 sekundi. Četka je ostavljena 5 sekundi u vertikalni položaj kako bi aspirirala tekućinu iz filtera vakumske četke nakon čega je vakuum isključen. Četka vakumske pumpe uronjena je potom u jažice pločice za pirosekvenciranje s blagom trešnjom (10 sekundi) kako bi se perle s vezanim jednolančanim PCR ulomcima (fragmentima) otpustile u otopine sekvencijskih početnica za određeni gen. Četka je potom isprana u Milli-Q vodi (10 sekundi). Nakon zagrijavanja (denaturacije) na termomikseru (2 min na 80°C bez trešnje) pločica je ostavljena da se ohladi na sobnu temperaturu. U međuvremenu je pripremljen pirosekvencer pomoću PyroMark Gold Q96 CDT kompleta reagensa prema uputama proizvođača (Slika 5.). PyroMark Gold Q96 CDT komplet (Qiagen, Hilden, Njemačka) sadrži sve potrebne komponente (enzime, supstrate i nukleotide) potrebne za pirosekvenciranje. Enzimatska smjesa sadrži DNA polimerazu za ugradnju nukleotida, ATP

sulfurilazu za konverziju pirofosfata u ATP, luciferazu za stvaranje svjetlosnog signala i apirazu za degradaciju neinkorporiranih nukleotida i ATP-a. Enzimatska smjesa pipetira se u komoricu pirosekvenatora označenu sa E. Supstratna smjesa sadrži adenozin- 5'- fosfosulfat (APS) potreban za stvaranje ATP-a i luciferina. Supstratna smjesa pipetira se u komoricu pirosekvencera označenu sa S. U komorice označene sa A,C,G i T pipetiraju se nukleotidi otopljeni u stabilizirajućem puferu.



*Slika 5. Priprema pirosekvenatora. (preuzeto iz QIAGEN PyroMark Gold Q96 Reagens Handbook 7/2014)*

U program PyroMark Q96 MD uneseni su potrebni podatci (Tablica 5.), a pločica za pirosekvenciranje umetnuta je u PyroMark Q96 uređaj (Qiagen, Hilden, Njemačka) te je pokrenuto pirosekvenciranje. Tijekom pirosekvenciranja dio molekule DNA od interesa se produljuje dodavanjem definiranih dNTP-ova. Ako dođe do ugradnje nukleotida u slijed DNA nastaje pirofosfatni ostatak koji je supstrat enzima apiraze. U posljedičnoj reakciji apiraze nastaje ATP koji kao kofaktor zajedno s enzimom luciferazom sudjeluje u stvaranju svjetlosnog signala. Prema intenzitetu svjetlosti pirosekvencer kvantificira broj uspješno ugrađenih nukleotida, a prema redosljed u bacivanja pojedinih nukleotida i vrstu ugrađenog nukleotida te na taj način očitava slijed DNA. Konačni rezultat je pirogram.

Nakon reakcije pirosekvenciranja, analizirani su pirogrami pomoću Pyro Q-CpG<sup>TM</sup> programa (Qiagen, Hilden, Njemačka). Program automatski određuje individualne metilacijske frekvencije za sve CpG mjesta, kao i procjenu kvalitete eseja. Pirogrami koji nisu zadovoljili kvalitetom (kriteriji kvalitete inkorporirani u program) isključeni su iz analize.

### 3.2.6. Statistička obrada rezultata analize pirosekvenciranja slijeda DNA

Rezultati analize pirosekvencioniranja slijeda DNA, koji predstavljaju brojčani prikaz udjela metilirane DNA u analiziranom slijedu izražen u postotku, analizirani su pomoću kompjuterskog programa GraphPad vs 5.0 (Windows verzija programa) primjenom uparenog testa (Paired *t*-test); samo *p* vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnim.

### 3.2.7. Izolacija ukupnih proteina iz zdravog i tumorskog tkiva

Ukupni proteini iz zdravog i pripadajućeg tumorskog tkiva grkljana izolirani su pomoću Pasivnog pufera za lizu stanica (Promega, Fitchburg, Wisconsin, SAD; Passive Lysis Buffer 5x) prema uputi proizvođača. Ukratko, pufer za lizu razrijeđen je pet puta na radnu koncentraciju 1x (razrjeđenje sa Milli-Q H<sub>2</sub>O; Synergy® Water Purification System, Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka). Uzorci tkiva izvađeni su sa -80°C, spuštteni na dno tubice kratkim centrifugiranjem i stavljeni na led. Svakom uzorku tkiva dodano je 60 µL pasivnog pufera za lizu stanica (1x) nakon čega su uzorci ostavljeni na ledu 30 minuta. Nakon inkubacije tkiva u puferu za lizu stanice, uzorci su centrifugirani na maksimalnoj brzini (14 000rpm-20781G) 30 minuta, na temperaturi 4°C. Nakon centrifugiranja supernatant je skupljen u čiste 1,5 mL mikroeprovete (označene šifrom uzorka), dok se talog sa staničnim ostatcima bačen. Supernatanti su potom korišteni za kvantifikaciju ukupnih proteina komercijalno dostupnim kompletom BCA Protein Assay Kit (Pierce™, Thermo scientific, Waltham, MA,SAD).

### 3.2.8. Mjerenje koncentracije proteina

KompletPierce™ BCAProteinAssay koristi kombinaciju biuret reakcije (redukcija Cu<sup>2+</sup> u Cu<sup>+</sup> u alkalnoj otopini proteina) i visoko osjetljive, selektivne kolorimetrijske detekcije bakrovog kationa (Cu<sup>+</sup>) pomoću reagensa koji sadrži bicinkoničnu kiselinu (BCA). Koncentracija proteina određuje se usporedbom vrijednosti apsorbancije sa standardnom krivuljom poznatih koncentracija. Prvo se naprave serijska razrjeđenja proteinskog standarda (goveđi albumin iz seruma (BSA, engl. *bovine serum albumin*) poznate koncentracije 2 mg/mL (BSA u kompletu otopljen u 0,9% NaCl otopini s dodatkom 0,05% natrijevog azida). Također se pripreme razrjeđenja proteina nepoznate koncentracije iz uzoraka (4 µL uzorka + 36 µL Milli-Q vode, razrjeđenje uzorka 10x). Zatim se prema uputi proizvođača pripremi radna otopina koja se

sastoji od BCA reagensa A i B. Razrjeđenja standarda i uzoraka se nanese na pločicu sa 96 bunarića u tripletu (3x10  $\mu$ L po bunariću standarda/uzorka). Svakom bunariću sa standardom ili uzorkom potom se dodaje 80  $\mu$  L pripremljene radne otopine. Otopine se dobro pomješaju pomoću pipete. Ploča se potom stavi u inkubator (Jouan EB 18, Jouan SA, Saint-Herblain, Francuska) podešen na 37°C, 30 min. Nakon inkubacije mjere se apsorbancije na 562 nm (Multiskan EX, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Iz dobivenih vrijednosti apsorbancija pomoću programa Excel izračunaju se koncentracije proteina iz uzorka na slijedeći način:

1. Izračunaju se srednje vrijednosti apsorbancije za sve triplete razrjeđenja standarda
2. Formira se krivulja prema dobivenim vrijednostima
3. Iz grafa se računa jednadžba pravca
4. Pomoću jednadžbe pravca računa se koncentracija proteina iz uzorka
5. Dobiveni rezultat pomnoži se sa 10 (jer je uzorak razrijeđen 10x prilikom pripreme). Tražena koncentracija proteina u uzorku izražena je u mg/mL.

### **3.2.9.** Ispitivanje izražaja proteina Western blot analizom

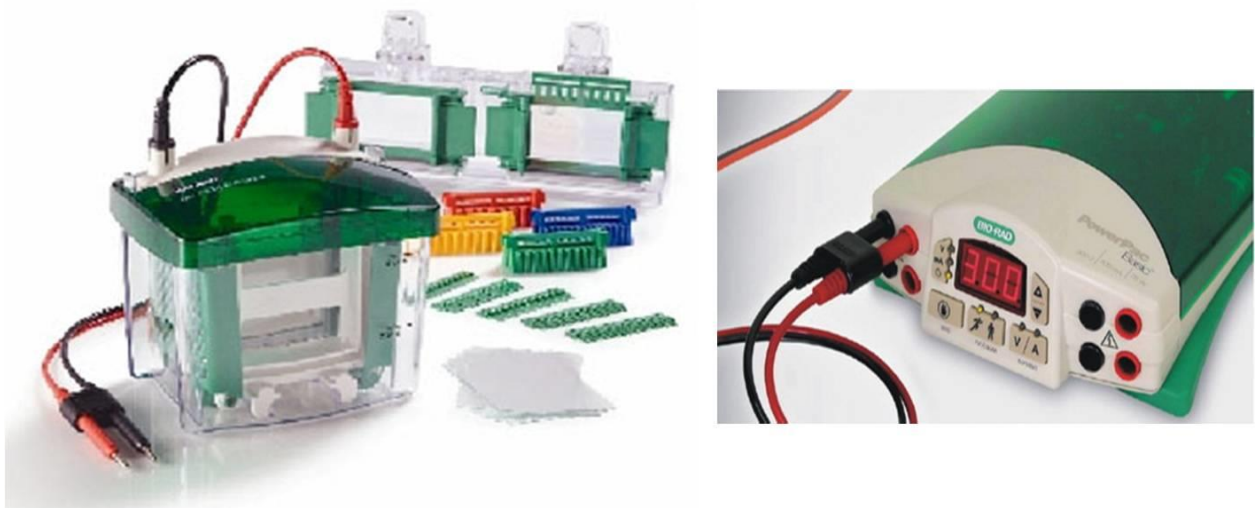
Western blot je tehnika koja omogućava otkrivanje specifičnih proteina iz smjese proteina ekstrahiranih iz uzoraka. Western blot analiza sastoji se od nekoliko koraka:

- a) razdvajanje proteina na SDS-poliakrilamidnom gelu na temelju veličine (pod utjecajem električnog polja)
- b) prijenosa proteina s gela na membranu
- c) označavanje proteina od interesa primarnim i sekundarnim protutijelima za vizualizaciju proteina.

### **3.2.10.** Razdvajanje proteina na SDS-poliakrilamidnom gelu na temelju veličine pod utjecajem električnog polja (SDS-PAGE)

Gelovi za elektroforezu napravljeni su ručno, prema uhodanom i provjerenom protokolu Laboratorija za naprednu genomiku. Gelovi se sastoje od dvije zone: zone za koncentriranje (engl. *stacking*) i zone za razdvajanje (engl. *resolving*). Veličina pora u gelu ovisi o koncentraciji bis-akrilamida u gelu i ukupnoj koncentraciji mješavine akrilamida i bis-akrilamida u gelu. SDS (natrij dodecil sulfat) je anionski detergent koji otapa, disocira i denaturira većinu proteina na podjedinice. Za potrebe SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) korišteni su 10% gelovi prikladni za razdvajanje proteina molekulske mase 10-150 kDa. Sastav zone za razdvajanje je slijedeći: Milli-Q H<sub>2</sub>O,

1M Tris-HCl pH 8,8, 10% SDS, 30% AAS, 10% APS i TEMED. Sastav zone za sabijanje je slijedeći: Milli-Q H<sub>2</sub>O, 1M Tris-HCl pH 6,8, 10% SDS, 30% AAS, 10% APS i TEMED. Polimerizacijska smjesa razdvajajuće zone izlivena je između dvije staklene ploče (1,5 mm) pričvršćene na stalak do  $\frac{3}{4}$  ukupnog volumena između stakala. Smjesa je zatim nadslojena izopropanolom i ostavljena na sobnoj temperaturi da se polimerizira. Nakon polimerizacije donje zone na nju se izlijeva zona za sabijanje do vrha stakala, i umetnu se češljici 1,5 mm debljine koji će tijekom polimerizacije gornje zone i uklanjanja formirati oblik jažica. Kada se gornja zona polimerizirala, stakla sa gelom se postave u vertikalni sustav za elektroforezu Mini-PROTEAN® Tetra Handcast System (BIO-RAD, Hercules, Kalifornija, SAD) (Slika 6.). Između nosača sa gelovima izlije se pufer za elektroforezu (25 mM Tris-HCl, 191 mM glicin, 1% SDS; pH pufera 7,4). Proteini za elektroforezu pripremaju se na slijedeći način: 100 µg proteina svakog uzorka se otpipetira u čiste 1,5 mL tubice i doda im se 1/6 ukupnog volumena 6x LB pufer za nanošenje (LB, engl. *loading buffer*; sastav 375 mM Tris-HCl pH 6,8, 6% SDS, 48% glicerol, 9% 2-merkaptoetanol i 0,03% bromfenol blue). Uzorci pomiješani sa puferom za nanošenje zagriju se 10 minuta na 95°C u termobloku (Tembloc, J.P. Selecta, Abrera, Španjolska) i centrifugiraju 1 minutu na 14 000 rpm (Hereus PICO 21, Thermo scientific). U prvu jažicu svakog gela se nanese oko 10 µL proteinskog markera BenchMark™ Prestained Protein Standard (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD), a u ostale jažice uzorci. Elektroforeza se odvija pri naponu od 180 V, pri konstantnoj jakosti struje od 400 mA u trajanju približno 90 minuta (PowerPac™ Basic Power Supply, BIO-RAD, Kalifornija, SAD).

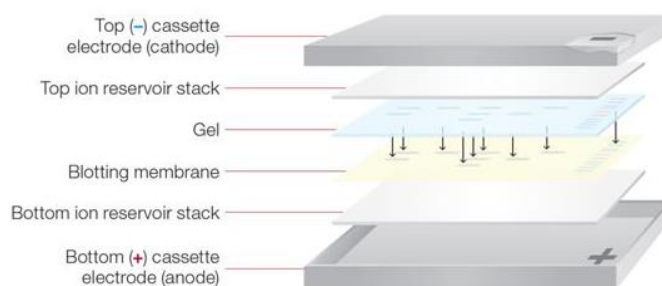


Slika 6. BIO-RAD Mini-PROTEAN® Tetra Handcast System za Western Blot (lijevo) i PowerPac™ Basic Power Supply (desno) (slika preuzeta sa [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com))

### 3.2.11. Prijenos proteina s gela na membranu



Nakon elektroforeze radi se prijenos proteina s gela na nitroceluloznu membranu veličine pora 0,2  $\mu\text{m}$  (BIO-RAD, Hercules, Kalifornija, SAD). Proteini se na nitroceluloznu membranu adsorbiraju kombinacijom hidrofobnih i elektrostatskih međureakcija. Za potrebe transfera proteina korišten je uređaj Trans Blot Turbo<sup>TM</sup> Transfer System (BIO-RAD, Hercules, Kalifornija, SAD). Nakon elektroforeze gelovi su prenešeni u uređaj za prijenos proteina s gela na membranu pomoću struje (Slika 7.). Prijenos proteina odvija se pod naponom od 25V, pri konstantnoj jakosti struje od 2,5 A tijekom 10 minuta. Završetkom prijenosa proteina s gela na membranu, proteini su imobilizirani na površini membrane i dostupni za interakciju sa antitijelima.



Slika 7. Trans Blot Turbo<sup>TM</sup> Transfer System (slika preuzeta sa [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com))

Prije upotrebe primarnih protutijela membrana se blokira kako bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela na membranu) poboljšava osjetljivost eseja smanjujući pozadinsku "buku" i vežući se na sva potencijalno zaostala nespecifična mjesta interakcije na membrani bez utjecanja na epitope za vezanje primarnih protutijela. Blokiranje membrane na tresilici i sobnoj temperaturi u trajanju 1 sat.

### 3.2.12. Označavanje proteina od interesa primarnim i sekundarnim protutijelima

Nakon blokiranja u puferu za blokiranje (5% otopina mlijeka u prahu u PBST puferu (20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH 7,6) membrane se inkubiraju u otopini specifičnih protutijela, preko noći, na temperaturi 4°C. Specifikacija korištenih protutijela i točna razrijeđenja navedeni su u Tablici 9. U svrhu kvantifikacije izražaja proteina i određivanja razlike u izražaju testiranih proteina u zdravom i tumorskom tkivu korišteno je i antitijelo specifično na humani vinkulin (117 kDa). Primarna protutijela razrjeđuju se u 5% otopini mlijeka u prahu u PBST-u (za nitrocelulozne membrane) ili 5% otopini mlijeka u

prahu Blotting puferu (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20) za PVDF membrane. Razrjeđenja korištenih protutijela prikazana su u Tablici 14.

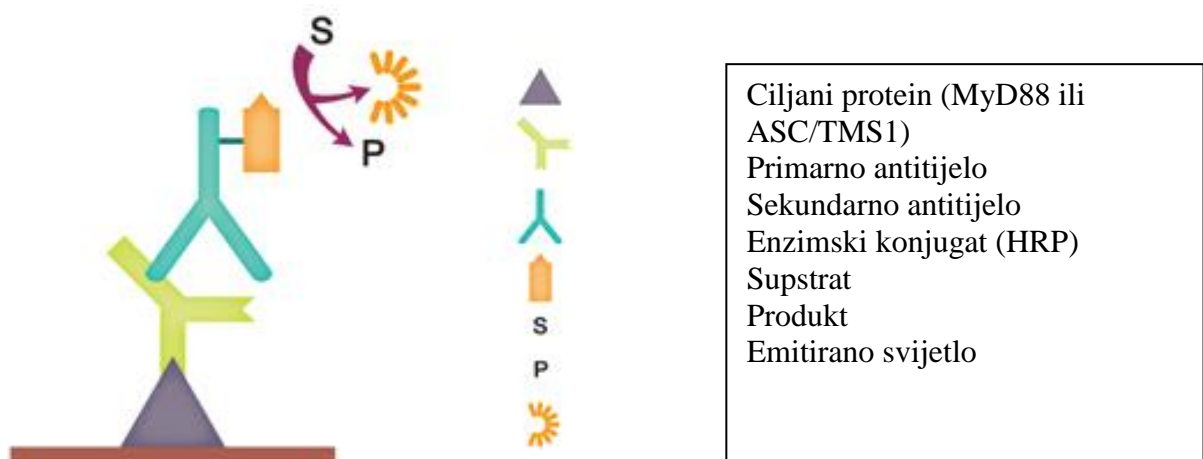
*Tablica 14. Protutijela korištena za analizu Western blot*

Primarno protutijelo	Razrjeđenje	Sekundarno protutijelo	Razrjeđenje
Vinkulin mišje monoklonalno (Santa Cruz-Biotechnology, SAD, (7F9):sc-73614)	1:1000	Protu-mišje IgG/HRP (BIO-RAD, SAD; 170-6516 )	1:10 000
MyD88 mišje monoklonalno (Novus Biologicals, SAD, NBP2-27369)	1:200	Protu-mišje IgG/HRP (BIO-RAD, SAD; 170-6516 )	1:10 000
ASC/TMS1 kozje poliklonalno (R&D Systems, SAD, AF3805)	1:200	Protu-kozje IgG/HRP (DAKO-Agilent Technologies, SAD, P0449)	1:5000

Nakon prekonoćne inkubacije nitrocelulozne membrane se ispiru 3 puta u PBST puferu po 10 minuta, a PVDF membrane 5 puta u Blotting puferu po 7 minuta. Nakon ispiranja membrane se inkubiraju 1 sat na sobnoj temperaturi u otopini sekundarnih protutijela; za nitrocelulozne membrane protutijela se razrjeđuju u 5% otopini mlijeka u prahu u PBST puferu, a za PVDF u 5% otopini mlijeka u prahu u Blotting puferu. Slijedi ispiranje membrana pod istim uvjetima kao i nakon inkubacije primarnim protutijelima.

### **3.2.13. Određivanje signala metodom kemoluminiscencije**

U svrhu određivanja signala korišten je komplet kemoluminiscentnih reagensa Clarity™ Western ECL Blotting Substrates (BIO-RAD, Hercules, Kalifornija, SAD), prema uputi proizvođača (Slika 8.). U kompletu su priložena dva reagensa (sastav poznat proizvođaču) koji se međusobno miješaju u omjeru 1:1. Nakon ispiranja membrane se obrađuju mješavinom kemiluminiscentnih reagensa (oko 500 µL / traki membrane) i inkubiraju se 5 minuta. Membrane se potom preklope drugom prozirnom folijom i pomoću papirnatog ubrusa se odstrani višak tekućine između folija, pazeći da između folija ne ostanu zarobljeni mjehurići zraka jer mogu utjecati na vizualizaciju proteina. Membrane u foliji se stave u aparat za slikanje membrana ALLIANCE XD-79LS-26MX (Uvitec, Cambridge, UK). Membrane su bile eksponirane 5 minuta.



Slika 8. Detektiranje signala proteina kemiluminiscencijom (slika preuzeta i prilagođena sa [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com))

### 3.2.14. Relativna kvantifikacija detektiranog signala i statistička obrada

U svrhu kvantifikacije detektiranog signala korišten je besplatan, javno dostupni računalni program ImageJ 1.49v (<http://imagej.nih.gov/ij>). U program se unesu slike membrana, slikanih na instrumentu Uvitec, apotom se na temelju označenih jažica izračunava vrijednost gustoće označene jažice i u brojčanu vrijednost gustoće sadržaja. Dobivene vrijednosti testiranih proteina (MyD88 i ASC/TMS1) su potom normalizirane vrijednostima očitanih gustoća za kontrolni protein (vinkulin) sa pripadajućeg gela. Normalizirane vrijednosti su statistički obrađene u programu GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, USA) za Windows operativni sustav, pomoću dvofaktorske analize varijance (2way ANOVA test) i uparenog dvosmjernog *t*-testa. Sve *p*-vrijednosti testova s dvosmjernom vjerojatnošću manje od 0,05 smatrane su statistički značajnim.

## 4. REZULTATI

Urođeni imunosni sustav ima važnu ulogu u obrani organizma i njegova aktivacija, koja uključuje TLR i NLR signalne puteve, predstavlja vezu između kronične upale i nastanka tumora (55). MyD88 je ključna adaptorna molekula u signalnom putu TLRa, dok je ASC/TMS1 ključna molekula koja sudjeluje u stvaranju proteinske platforme inflamiasoma. Kako se poremećena regulacija upale povezuje s nastankom karcinoma, a epigenetske modifikacije mogu utjecati na izražaj gena povezanih sa regulacijom upale, u ovom radu nas je zanimala korelacija stupnja metilacije i proteinskog izražaja navedenih gena u zdravom i tumorskom tkivu. Cilj ovih istraživanja bio je utvrditi postoji li razlika između metilacije zdravoga i tumorskog tkiva i da li bi stupanj metilacije pojedinih CpG mjesta bio dobar biomarker specifičan za tumorsko tkivo.

### 4.1. Karakteristike ispitivane populacije

U Tablici 15. navedena su 36 ispitanika; 33 muškarca i 3 žene u dobi od 40 do 78 godina. Svim bolesnicima patohistološkom analizom dokazan je karcinom pločastih stanica grkljana (engl. *Squamous Cell Carcinoma, SCC*) različitih stupnjeva diferencijacije od stadija I do stadija III. Stadij I predstavlja dobro diferenciran karcinom pločastih stanica koji je sličan normalnom pločastom epitelu, prisutna je karakteristična obilna keratinizacija, rijetke mitoze i rijedak polimorfizam jezgara. Stadij II predstavlja srednje diferencirani karcinom pločastih stanica sa jasnim pleomorfizmom jezgara, vidljivim mitozama, uključujući i abnormalne mitoze sa obično manje izraženom keratinizacijom. Stadij III predstavlja slabo diferencirani karcinom pločastih stanica koji se sastoji od nezrelih stanica s brojnim tipičnim i atipičnim mitozama i minimalnom keratinizacijom.

Obzirom da je najvažnija varijabla preživljavanja bolesnika s karcinomom pločastih stanica grkljana uz stupanj diferencijacije lokalizacija i veličina tumora te proširenost na limfne čvorove vrata i postojanje udaljenih metastaza kod svih ispitanika navedena je lokalizacija tumora grkljana, zahvaćenost limfnih čvorova vrata te određen stadij bolesti prema TNM klasifikaciji. Kod zahvaćenosti limfnih čvorova vrata posebno je navedeno u kojim čvorovima je prisutno ekstrakapsularno širenje jer su Oosterkamp i sur. (56) pokazali da ekstrakapsularno širenje u limfnim čvorovima vrata kod karcinoma pločastih stanica grkljana devet puta povećava rizik nastanka udaljenih metastaza. Naveden je odgovarajući kirurški zahvat

obzirom na TNM klasifikaciju u skladu s postulatima kirurškog liječenja bolesnika s karcinomom pločastih stanica grkljana.

*Tablica 15. Podjela ispitanika prema spolu i dobi kod dijagnoze bolesti, vrsti i lokalizaciji karcinoma grkljana, TNM klasifikaciji i izvedenom operativnom zahvatu*

	Spol	Dob dijag. (godina)	Vrsta tumora	Lokalizacija tumora	Zahvaćenost limfnih čvorova vrata	TNM	Operacija
001	M	54	SCC(GIII)	lijeva glasnica, širi se na desnu glasnica i dijelom supraglotično	-	T3N0M0	TL, SD L II-IV, VI
002	Ž	55	SCC(GII)	oba aritenoida i širi se prema lijevom ariepiglotskom naboru, širi se submukozno sve do hrskavice aritenoida, stražnja stijenka hipofarinksa	+ L II,III EŠ DII	T3N2CM0	TL, RDD, SD L II-IV,
003	M	58	SCC (GI)	obje glasnice, širi se supra i infraglotično, zahvaća i prednju komisuru	-	T4N0M0	TL, SDD II-IV MRDIL
004	M	58	SCC (GII)	lijevi piriformni sinus, lijevi ariepi nabor, infiltrira aritenoidnu hrskavicu lijevo	+ L II, III, IV, infiltriran SCM	T4aN2bM0	TL, RDL SD D II-IV
005	M	74	SCC (GII)	prednja trećina obje glasnice i prednja komisura	-	T3N0M0	TL, SDLII-IV SD D II-IV
006	M	64	SCC (GIII)	desna strana orofarinksa, desni vent. nabor i desnu glasnica, desni piriformni sinus	+ D III, IV, VEŠ	T3N2bM0	TL, SD L II-IV RD D
007	M	59	SCC(GII)	petiolus epiglotisa lijevo paramed., stražnja trećina desne glasnice	-	T2N0M0	TL, SD D II-IV SD L II-IV
008	M	49	SCC(GII)	prednja komisura, obje glasnice	-	T2N0M0	TL
009	M	68	SCC (GII)	lijevi ariepiglotski nabor, lijeva glasnia, donji rub krikoida, obliterated lijevi piriformni sinus, u visini ari nabora prelazi medijalnu liniju	-	T3N0M0	TL, SD D II-IV SD L II-IV
010	M	40	SCC (GII)	cijela desna glasnica, slabo pokretna	+ D III	T2N2bM0	PVL D
011	M	59	SCC(GIII)	petiolus epiglotisa, širi se na oba ventrikularna nabora, prednja komisura	+ DIII	T4N2cM0	TL, SD D II-IV RD L
012	M	58	SCC (GI)	desna glasnica, prednja komisura, vokalni nastavak, glasnice mobilne	-	T2N0M0	PVL D, SD D II-IV
013	M	62	SCC (GIII)	desna glasnica, širi se subglotično, prelazi medijalnu liniju i zahvaća prednji dio lijeve glasnice	-	T2N0M0	TL
014	M	71	SCC (GII)	lijevi hemilarinks i širi se lijevo submukozno u petiolus lijevo	+ D III L III, IV EŠ	T4aN2cM0	TL, SD L RD D
015	M	48	SCC (GI)	laringealna ploština gotovo epiglotisa	-	T2N0M0	PSL, SD D II-IV SD L II-IV
016	M	52	SCC (GII)	desna glasnica, prednja komisura desni aritenoid, desni ari nabor i pir. sinus	-	T3N0M0	TL, SD D II-IV
017	Ž	75	SCC(GIII)	wpiglotis, desnoi ventr. nabor	-	T2N0M0	PVL, SD D
018	M	61	SCC (GII)	desni piriformni sinus, desni	+ D I EŠ	T4aN1M0	TL, RD D

019	M	58	SCC (GII)	ariepiglotski nabor desni piriformni sinus, desni ariepiglotski nabor, ispod hioida u meke česti	-	T2N0M0	TL, RD D
020	M	78	SCC(GIII)	prednja komisura, desni ariepiglotski nabor	-	T2bN0M0	TL, SD D II-IV
021	Ž	58	SCC (GIII)	desni ventrikularni nabor, laringealna ploča epiglotisa	+D II	T3N1M0	PSL, SD D II-IV SD L II-IV
022	M	63	SCC (GI)	lijeva glasnica, prelazi medijalnu liniju, prednja komisura i prednja 1/3 desne glasnice, lijeva glasnica nepomična	-	T3N0M0	TL, SD D II-IV SD L II-IV
023	M	76	SCC (GII)	desna glasnica do aritenoida, širi se subglotično	-	T2N0M0	PHL D
024	M	65	SCC (GII)	prednja komisura, desna glasnica, oba ariepiglotska nabora	-	T2N0M0	PSL, SD D II-IV SD L II-IV
025	M	68	SCC (GII)	desna polovica grkljana	+ D II,III EŠ	T4aN2bM0	TL, SD D II-IV
026	M	57	SCC(GIII)	lijeva polovica grkljana, natkriljuje rimu u prednje 2/3	-	T2N0M0	PVL L, SD L II-IV
027	M	57	SCC(GII)	lijeva glasnica ostala nakon parcijalna laringektomije lijevo	+ D II L III	T4aN2bMo	TL, SD D II-IV SD L II-IV
028	M	58	SCC (GI)	desna glasnica, subglotično desno	-	T3N0M0	TL
029	M	61	SCC (GII)	desni ventrikularni nabor, desna glasnica subglotično	-	T2N0M0	PVL D, SD D II-IV
030	M	65	SCC (GIII)	laringealna strana epiglotisa, lijevi vent. nabor	+ L III, IV EŠ	T3N2bM0	PSL, RND L SD D II-IV
031	M	57	SCC (GII)	lijeva glasnica subglotis, prelazi na prednju komisuru i desnu glasnica	-	T2N0M0	TL, SD D SD L
032	M	60	SCC (GII)	tumor zahvaća lijevu glasnicu, širi se subglotično	-	T3N0M0	PVL L, SD D II-IV SD L II-IV
033	M	69	SCC (GIII)	tumor zahvaća lijevi ventrikularni nabor i bazu epiglotisa	-	T2N0M0	PSL
034	M	80	SCC (GII)	desna strana larinksa, desni lobus štitnjače, lijeva strana larinksa	+ D II	T4aN2bM0	TL, SD D II-IV PT D PT L
035	M	71	SCC (GII)	epiglotis, prednja komisura, desna glasnica, subglotično	-	T3N0M0	TL
036	M	68	SCC(GII)	desni piriformni sinus, oba aritenoida, subglotično	+ D III, IV EŠ L I, III, IV EŠ	T4aN2cM0	TL, RD D RDMI L

M – muški (male)  
F – žensko (female)  
PC – planocelularni karcinom  
D – desno  
L – lijevo  
EŠ – ekstrakapsularno širenje  
TL – totalna laringektomija  
SD – selektivna disekcija vrata  
RD – radikalna disekcija vrata  
PVL – parcijalna vertikalna laringektomija  
PSL – parcijalna supraglotična laringektomija

U Tablici 16. navedeni su isti ispitanici kao u prethodnoj tablici te je navedeno njihovo postoperativno preživljenje u mjesecima zaključno sa završetkom ovog istraživanja 31.12. 2016. godine. Bez obzira na multimodalno agresivno liječenje bolesnika s karcinomom pločastih stanica grkljana uključujući kirurgiju i kemoradioterapiju oko 40-50% bolesnika s uznapređovalom bolešću (stadij III i IV) stvara recidive (57). Prema Takes i sur. oko 80% recidiva pojavit će se unutar dvije godine (58).

Navedeni su i bolesnici kod kojih je provedena postoperativna adjuvantna radioterapija i kemoterapija ovisno o T i N stadiju tumora, intraoperativnom nalazu kirurga i konačnom patohistološkom nalazu.

*Tablica 16. Podjela ispitanika prema pojavi recidiva bolesti i preživljenju do 31.12.2016. godine te postoperativnom onkološkom liječenju*



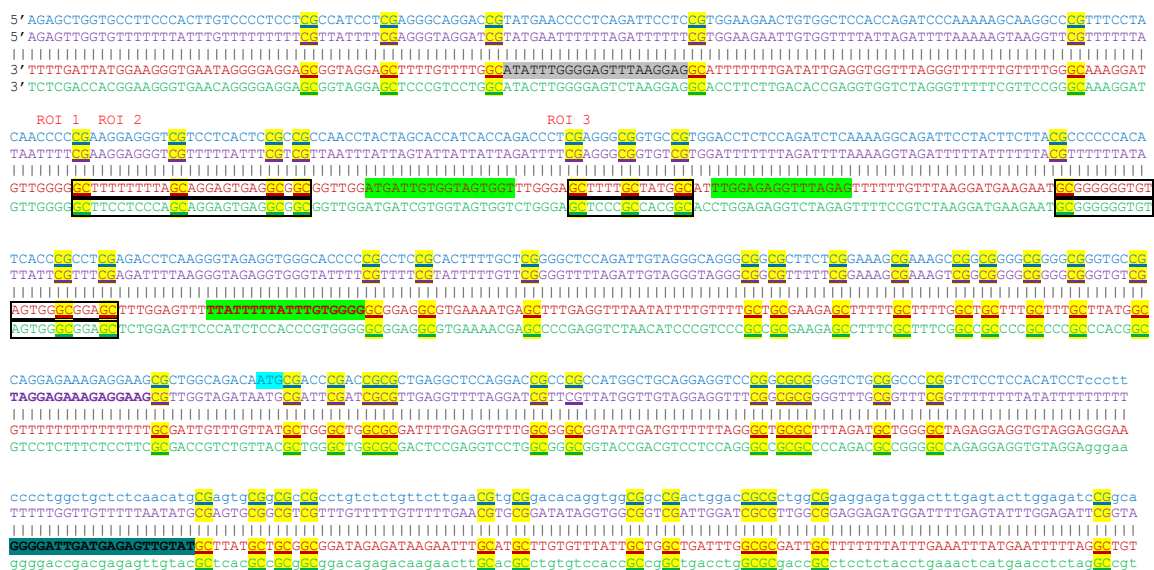
	Spol	Dob dijag. (godina)	Vrsta tumora	TNM	Recidiv bolesti do 31.12. 2016.	Preživljenje (u mj) do 31.12.2016.	Postoperativno onkološko liječenje
001	M	54	SCC (GIII)	T3N0M0	bez recidiva	Ž	praćenje
002	F	55	SCC (GII)	T3N2CM0	27.3.2015. (recidiv lokalni)	14	kemoradioterapija
003	M	58	SCC (GI)	T4N0M0	bez recidiva	12	adjuvantna radioterapija
004	M	58	SCC (GII)	T4aN2bM0	bez recidiva	Ž	kemoradioterapija
005	M	74	SCC (GII)	T3N0M0	bez recidiva (drugi primarni tm, jednjak)	Ž	postoperativna radioterapija
006	M	64	SCC (GIII)	T3N2bM0	15.1.2015. (recidiv udaljeni, pluća)	20	kemoradioterapija
007	M	59	SCC (GII)	T2N0M0	bez recidiva (kronična mijeloična leukemija)	18	praćenje
008	M	49	SCC (GII)	T2N0M0	bez recidiva (drugi primarni tm, jednjak)	Ž	praćenje
009	M	68	SCC (GII)	T3N0M0	20.1.2015. (recidiv lokalni)	20	adjuvantna radioterapija
010	M	40	SCC (GII)	T2N2bM0	bez recidiva	Ž	kemoradioterapija
011	M	59	SCC (GIII)	T4N2cM0	9.12.2016. (recidiv udaljeni, pluća)	Ž	kemoradioterapija
012	M	58	SCC (GI)	T2N0M0	bez recidiva	Ž	kemoradioterapija
013	M	62	SCC (GIII)	T2N0M0	bez recidiva	20	praćenje
014	M	71	SCC (GII)	T4aN2cM0	bez recidiva	Ž	kemoradioterapija
015	M	48	SCC (GI)	T2N0M0	bez recidiva	Ž	postoperativna radioterapija
016	M	52	SCC (GII)	T3N0M0	bez recidiva	Ž	praćenje
017	F	75	SCC (GIII)	T2N0M0	bez recidiva	Ž	adjuvantna radioterapija
018	M	61	SCC (GII)	T4aN1M0	bez recidiva	Ž	kemoradioterapija
019	M	58	SCC (GII)	T2N0M0	bez recidiva	Ž	postoperativna radioterapija
020	M	78	SCC (GIII)	T2bN0M0	bez recidiva	Ž	praćenje
021	F	58	SCC (GIII)	T3N1M0	bez recidiva	Ž	postoperativna radioterapija
022	M	63	SCC (GI)	T3N0M0	bez recidiva	Ž	praćenje
023	M	76	SCC (GII)	T2N0M0	14.9.2015. (recidiv, lokalni)	20	praćenje
024	M	65	SCC (GII)	T2N0M0	nemam podatak	nemam podatak	praćenje
025	M	68	SCC (GII)	T4aN2bM0	08.01.2016. (recidiv lokalni, stoma)	9	kemoradioterapija
026	M	57	SCC (GIII)	T2N0M0	bez recidiva	Ž	praćenje
027	M	57	SCC (GII)	T4aN2bMo	bez recidiva (infarkt)	3	postoperativna radioterapija
028	M	58	SCC (GI)	T3N0M0	bez recidiva	Ž	praćenje
029	M	61	SCC (GII)	T2N0M0	bez recidiva	Ž	praćenje
030	M	65	SCC (GIII)	T3N2bM0	bez recidiva (drugi primarni tm, pluća)	Ž	kemoradioterapija
031	M	57	SCC (GII)	T2N0M0	bez recidiva	Ž	praćenje
032	M	60	SCC	T3N0M0	bez recidiva	Ž	postoperativna

			(GII)				radioterapija
033	M	69	SCC (GIII)	T2N0M0	bez recidiva (infarkt)	4	praćenje
034	M	80	SCC (GII)	T4aN2bM0	24.2.2016. (lokalni, stoma)	11	kemoradioterapija
035	M	71	SCC (GII)	T3N0M0	14.12.2016. (recidiv čvorovi na vratu)	Ž	praćenje
036	M	68	SCC (GII)	T4aN2cM0	bez recidiva	Ž	kemoradioterapija

M – muški (male)  
F – žensko (female)  
Ž - živ

## 4.2. Rezultati analize određivanja statusa metilacije gena MyD88

Kako bi se ispitala diferencijalna metilacija gena MyD88 u zdravom i tumorskom tkivu grkljana, procijenjen je status metilacije CpG mjesta u promotorskoj regiji navedenog gena. Na temelju slijeda nukleotida DNA određene su tri regije od interesa na genu MyD88 (Slika 9.).



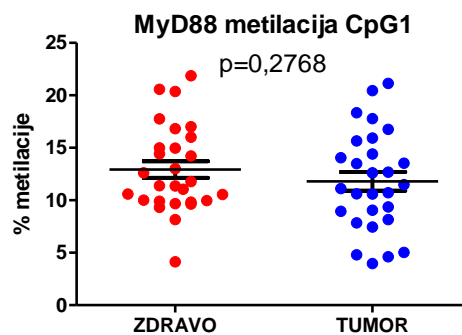
Slika 9. Obradeni slijed nukleotida DNA promotorske regije gena Myd88. Ukovireno su mjesta bogata CpG sljedovima. Zeleno su označene početnice korištene za sekvencioniranje, a sivo početnice korištene za reakciju PCR

Kao što je vidljivo na Slici 6. za gen MyD88 u regiji od interesa 1 (ROI\_1) otkrivena su četiri CpG mjesta 277pb (CpG1), 266pb (CpG2), 255pb (CpG3) i 252pb (CpG4) uzvodno od ATG mjesta. U regiji od interesa 2 (ROI\_2) otkrivena su tri CpG mjesta 221pb (CpG5), 215pb (CpG6) i 209pb (CpG7) uzvodno od ATG mjesta. U regiji od interesa 3 (ROI\_3) također su

otkrivena tri CpG mjesta 166pb (CpG8), 150pb (CpG9) i 145pb (CpG10) uzvodno od ATG mjesta. U svrhu određivanja statusa metilacije promotorske regije gena MyD88 metodom pirosekvencioniranja odredili smo razinu metilacije 10 CpG mjesta. Selektirana CpG mjesta smještena su u regiji promotora koja je izuzetno transkripcijski aktivna.

#### 4.2.1. Status metilacije CpG1 mjesta u promotorskoj regiji gena MyD88

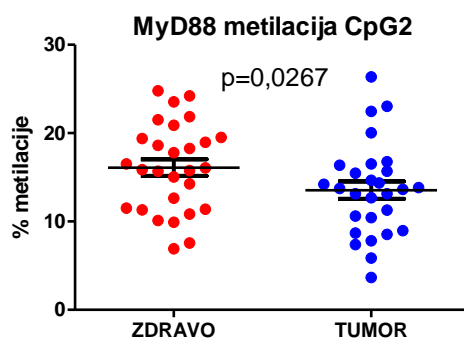
CpG1 mjesto smješteno je 277 parova baza uzvodno od mjesta početka transkripcije. Rezultati analize pirosekvencioniranja na DNA izoliranoj iz 28 uzorka zdravog i 28 uzoraka pripadajućeg tumorskog tkiva pokazuje da je prosječna razina metilacije CpG1 mjesta u zdravom tkivu blago povećana u odnosu na tumorsko tkivo. Nakon statističke analize rezultata zaključili smo da ta razlika nije statistički značajna ( $p > 0,05$ ;  $p = 0,276$ ). Rezultati analize prikazani su na Slici 10.



Slika 10. Grafički prikaz metilacije CpG1 mjesta promotorske regije MyD88. Paired t-test;  $p \leq 0,05$ . Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM

#### 4.2.2. Status metilacije CpG2 mjesta u promotorskoj regiji gena MyD88

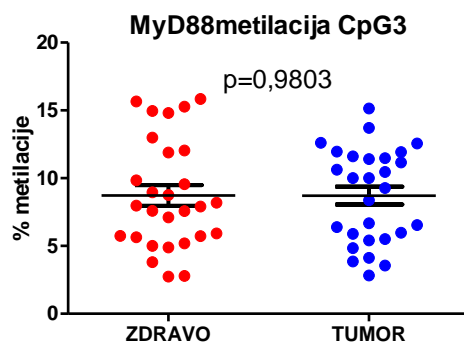
CpG2 mjesto smješteno je 266 parova baza uzvodno od mjesta početka transkripcije. Rezultati analize pirosekvencioniranja na DNA izoliranoj iz 28 uzorka zdravog i pripadajućeg tumorskog tkiva. Rezultati analize pokazuju da je prosječna razina metilacije CpG2 mjesta u zdravom tkivu u odnosu na tumorsko povećana. Statističkom obradom dobivenih rezultat pokazali smo da na CpG2 mjestu postoji statistički značajna razlika u metilaciji između zdravog i tumorskog tkiva: tumorsko tkivo je značajno hipometilirano u odnosu na zdravo tkivo grkljana, sa statističkom značajnošću od  $p = 0,0267$  ( $p < 0,05$ ). Rezultati ove analize prikazani su na Slici 11.



Slika 11. Grafički prikaz metilacije CpG2 mjesta promotorske regije MyD88. Paired t-test;  $p \leq 0,05$ . Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM

#### 4.2.3. Status metilacije CpG3 mjesta u promotorskoj regiji gena MyD88

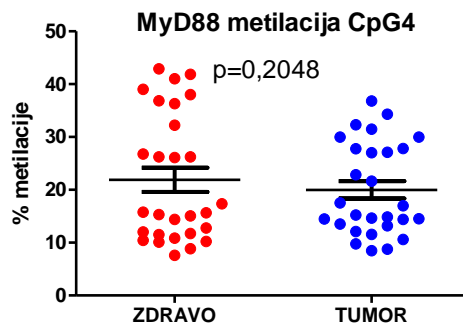
CpG3 mjesto nalazi se 255 parova baza uzvodno od mjesta početka transkripcije. Rezultat pirosekvenciranja na 28 uzorka zdravog i tumorskog tkiva grkljana pokazuju da tumorsko tkivo na CpG3 mjestu ima jednaku razinu metilacije u odnosu na zdravo tkivo grkljana, odnosno nema statistički značajne razlike u razini metilacije jer je  $p=0,9803$  ( $p > 0,05$ ), kao što je i vidljivo na Slici 12.



Slika 12. Grafički prikaz metilacije CpG3 mjesta promotorske regije MyD88. Paired t-test;  $p \leq 0,05$ . Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM

#### 4.2.4. Status metilacije CpG4 mjesta u promotorskoj regiji gena MyD88

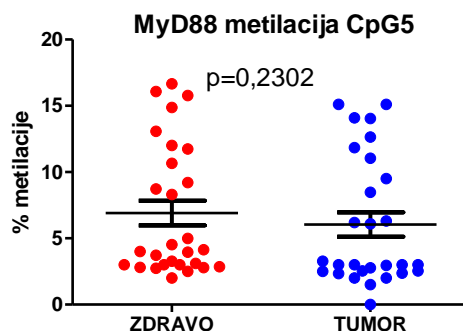
CpG4 mjesto nalazi se 252 para baza uzvodno od mjesta početka transkripcije. Rezultat pirosekvenciranja na 28 uzorka pokazuju da nema statistički značajne razlike u razini metilacije između zdravih i tumorskih tkiva grkljana jer je  $p=0,2048$  ( $p > 0,05$ ) (Slika 13.).



Slika 13. Grafički prikaz metilacije CpG4 mjesta promotorske regije MyD88. Paired t-test;  $p \leq 0,05$ . Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM

#### 4.2.5. Status metilacije CpG5 mjesta u promotorskoj regiji gena MyD88

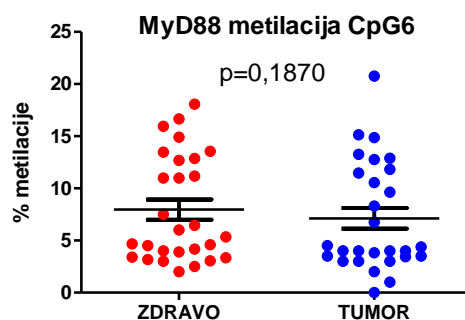
CpG5 mjesto nalazi se 221 par baza uzvodno od mjesta početka transkripcije. Rezultat pirosekvenciranja na 28 uzorka zdravog i tumorskog tkiva grkljana pokazuju da nema statistički značajne razlike u razini metilacije između zdravih i tumorskih tkiva grkljana;  $p=0,2302$  ( $p > 0,05$ ) (Slika 14.).



Slika 14. Grafički prikaz metilacije CpG5 mjesta promotorske regije MyD88. Paired t-test;  $p \leq 0,05$ . Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM

#### 4.2.6. Status metilacije CpG6 mjesta u promotorskoj regiji gen MyD88

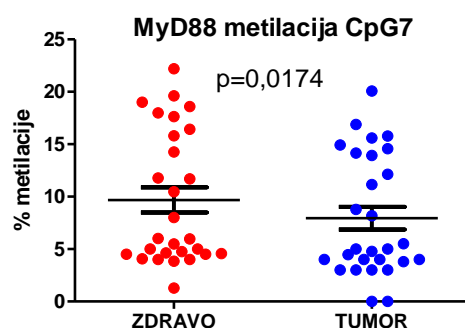
CpG6 mjesto nalazi se 215 parova baza uzvodno od mjesta početka transkripcije. Rezultati analize pirosekvenciranja na 28 uzorka pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u razini metilacije između zdravih i tumorskih tkiva grkljana jer je  $p=0,1870$  ( $p > 0,05$ ) (Slika 15.).



Slika 15. Grafički prikaz metilacije CpG6 mjesta promotorske regije MyD88. Paired t-test;  $p \leq 0,05$ . Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM

#### 4.2.7. Status metilacije CpG7 mjesta u promotorskoj regiji gena MyD88

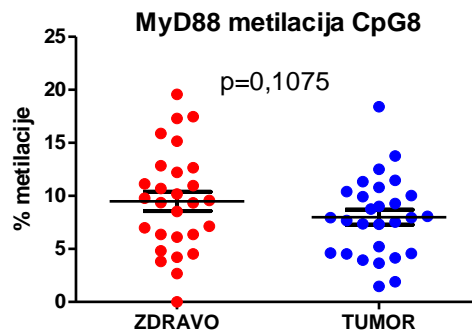
CpG7 mjesto nalazi se 209 parova baza uzvodno od mjesta početka transkripcije. Rezultati analize pirosekvenciranja na 28 uzorka tkiva grkljana pokazuju da postoji statistički značajna razlika u razini metilacije između zdravih i tumorskih tkiva, odnosno da je razina metilacije u tumorskom tkivu statistički značajno smanjena u odnosu na zdravo tkivo grkljana na razini statističke značajnosti  $p=0,0174$  ( $p > 0,05$ ) (Slika 16.).



Slika 16. Grafički prikaz metilacije CpG7 otočica promotorske regije MyD88. Paired t-test;  $p \leq 0,05$ . Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM

#### 4.2.8. Status metilacije CpG8 mjesta u promotorskoj regiji gena MyD88

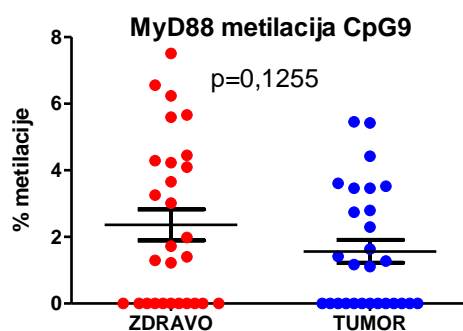
CpG8 mjesto nalazi se 166 parova baza uzvodno od mjesta početka transkripcije. Rezultat pirosekvenciranja na 28 uzorka zdravog i tumorskog tkiva grkljana pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u razini metilacije između zdravih i tumorskih tkiva;  $p=0,1740$  ( $p > 0,05$ ) (Slika 17.).



Slika 17. Grafički prikaz metilacije CpG8 mjesta promotorske regije MyD88. Paired t-test;  $p \leq 0,05$ . Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM

#### 4.2.9. Status metilacije CpG9 mjesta u promotorskoj regiji gena MyD88

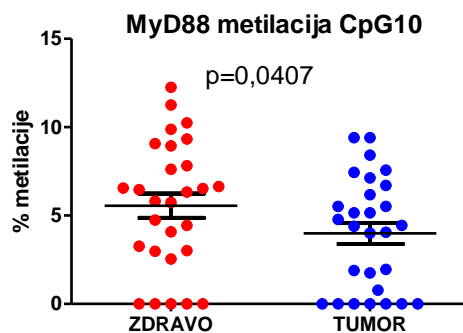
CpG9 mjesto nalazi se 150 parova baza uzvodno od mjesta početka transkripcije. Rezultati analize pirosekvenciranja na 28 uzorka tkiva grkljana pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u razini metilacije između zdravih i tumorskih tkiva jer je  $p=0,1255$  ( $p > 0,05$ ) (Slika 18.).



Slika 18. Grafički prikaz metilacije CpG9 mjesto promotorske regije MyD88. Paired t-test;  $p \leq 0,05$ . Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM

#### 4.2.10. Status metilacije CpG10 mjesta u promotorskoj regiji gena MyD88

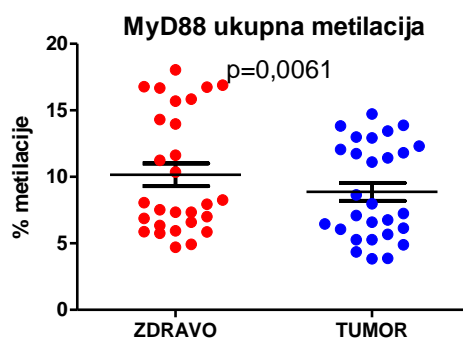
CpG10 mjesto nalazi se 145 parova baza uzvodno od mjesta početka transkripcije. Rezultati analize pirosekvenciranja na 28 uzorka tkiva grkljana pokazuju da postoji statistički značajna razlika u razini metilacije između zdravih i tumorskih tkiva grkljana, odnosno da je tumorsko tkivo grkljana značajno hipometilirano u odnosu na pripadna zdrava tkiva grkljana na razini statističke značajnosti  $p=0,0407$  ( $p < 0,05$ ) (Slika 19.).



Slika 19. Grafički prikaz metilacije CpG10 mjesta promotorske regije MyD88. Paired *t*-test;  $p \leq 0,05$ . Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM

#### 4.2.11. Ukupni status metilacije CpG mjesta u promotorskoj regiji gena MyD88

Svrha ove analize bila je odrediti ukupnu razinu metilacije promotorske regije gena MyD88. Ukupnu metilaciju promotorske regije odredili smo tako da smo izračunali vrijednost stupnja metilacije pojedinačnih CpG mjesta, a dobivene vrijednosti koristili za računanje prosječnog stupnja ukupne metilacije promotora. Za potrebe statističke obrade podataka dobivenih analizom pirosekvenciranja koristili smo programu GraphPad Prism. Rezultati ovih analiza su pokazali da postoji statistički značajna razlika u ukupnoj razini metilacije između zdravih i tumorskih tkiva. Iz dobivenih rezultata smo zaključili da su tumorska tkiva grkljana značajno hipometilirana u odnosu na zdrava tkiva, na razini statističke značajnosti  $p=0,0061$  (Slika 20.). Statistička obrada podataka dobivenih pirosekvenciranjem pokazuje da ukupnoj razlici u razini metilacije zdravih i tumorskih tkiva značajno doprinose tri CpG mjesta: CpG2 ( $p=0,0267$ ), CpG7 ( $p=0,0174$ ) i CpG10 ( $p=0,0407$ ). Ostala testirana CpG mjesta ne doprinose značajno ukupnoj razlici u razini metilacije između zdravih i tumorskih tkiva grkljana.



Slika 20. Grafički prikaz ukupne metilacije CpG mjesta promotorske regije MyD88. Paired *t*-test;  $p \leq 0,05$ . Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM



Vrijednosti razine metilacije dobivene kao rezultat analize pirosekvenciranja za svako CpG mjesto pojedinačno, kao i razina ukupne metilacije za promotorsku regiju MyD88 gena prikazana je u Tablici 17.

Tablica 17. Prikaz rezultata razine metilacije u promotorskoj regiji MyD88 gena dobivenih pirosekvenciranjem zdravih i tumorskih uzoraka tkiva grkljana

CpG1		CpG2		CpG3		CpG4		CpG5		CpG6		CpG7		CpG8		CpG9		CpG10		Ukupna metilacija %	
ZDRAVO	TUMOR	ZDRAVO	TUMOR	ZDRAVO	TUMOR	ZDRAVO	TUMOR	ZDRAVO	TUMOR	ZDRAVO	TUMOR	ZDRAVO	TUMOR	ZDRAVO	TUMOR	ZDRAVO	TUMOR	ZDRAVO	TUMOR	ZDRAVO	TUMOR
13,00	13,54	16,50	26,37	5,00	11,17	12,00	14,53	2,87	2,00	2,00	3,50	4,77	4,00	9,79	4,58	0,00	0,00	0,00	0,00	6,5925	7,968
17,02	15,92	19,50	13,84	4,90	10,02	10,45	12,12	4,00	3,00	6,00	4,00	4,50	3,00	6,36	4,16	4,10	0,00	5,82	0,00	8,2635	6,604
11,38	8,94	7,57	7,38	5,64	4,12	10,11	8,47	4,53	2,50	4,67	2,00	5,49	4,00	6,99	8,07	0,00	3,46	3,02	0,00	5,938	4,893
12,62	4,61	15,05	3,67	8,20	5,50	8,84	11,55	3,96	2,38	6,44	3,45	1,28	4,00	7,13	3,67	0,00	0,00	0,00	0,00	6,35	3,881
4,14	11,11	14,27	12,68	5,92	5,98	12,77	14,39	3,72	3,00	4,18	4,00	3,84	5,50	10,96	1,91	5,60	0,00	9,89	1,90	7,5255	6,046
11,37	3,97	11,31	5,87	5,74	4,84	15,31	8,77	2,82	1,50	3,34	3,00	4,58	3,00	8,53	7,54	1,30	0,00	5,75	0,00	7,0025	3,8475
9,33	5,04	9,92	8,54	7,11	3,86	15,65	14,65	4,14	2,55	5,34	0,00	8,00	4,46	10,70	4,54	0,00	0,00	9,34	0,00	7,95	4,3625
10,00	21,15	15,78	23,04	5,20	6,39	15,75	17,51	2,74	3,00	3,90	4,38	5,97	0,00	11,15	3,95	3,66	0,00	6,34	7,13	8,046	8,652
8,17	7,84	10,10	16,35	2,74	3,56	10,22	10,61	3,28	2,00	3,18	3,00	4,64	3,00	3,82	4,62	3,02	0,00	0,00	1,76	4,916	5,2725
9,97	20,44	20,89	15,69	7,58	5,89	17,37	14,85	3,00	3,28	4,50	3,82	4,50	5,00	2,68	1,48	0,00	2,99	1,96	7,3465	7,2385	
11,78	4,81	12,63	8,70	2,79	6,54	11,52	14,49	2,79	2,54	3,06	3,00	6,00	3,00	4,54	5,22	0,00	0,00	2,55	4,45	5,7635	5,274
14,43	7,44	24,21	11,30	7,98	11,47	15,05	9,75	3,12	2,34	4,60	1,00	4,08	5,00	0,00	8,77	0,00	0,00	7,57	7,344	6,463	
9,68	9,06	10,85	14,35	3,81	5,42	14,38	16,99	3,00	3,00	2,50	4,00	5,00	4,00	6,37	7,96	0,00	5,46	3,27	0,78	5,884	7,1
10,55	10,61	11,51	13,74	5,72	2,83	10,84	15,24	3,00	2,78	3,41	4,02	4,00	4,79	4,82	7,36	0,00	1,42	4,74	4,78	5,875	6,754
9,82	9,36	6,92	8,96	9,55	6,67	7,62	13,50	2,00	2,96	3,00	4,50	4,00	3,80	4,23	7,69	0,00	0,00	4,01	4,713	6,1445	
10,59	8,16	15,70	10,45	8,96	11,41	11,73	13,19	2,50	0,00	4,00	3,50	5,00	0,00	6,12	9,01	0,00	1,11	4,08	0,00	6,866	5,682
20,37	15,67	23,53	13,63	15,84	13,72	36,31	27,82	14,88	11,04	15,95	12,89	17,99	13,94	12,22	9,28	1,72	2,80	8,95	8,42	16,773	12,9175
16,82	10,59	17,80	7,80	14,80	9,28	42,89	22,85	11,74	12,65	12,86	15,13	16,43	14,92	12,66	11,48	4,23	4,43	6,65	5,15	15,6855	11,4265
17,75	10,72	18,60	10,61	14,97	10,62	41,00	21,64	9,22	15,11	12,67	14,87	17,64	15,60	19,57	7,95	7,51	1,64	7,82	9,41	16,673	11,8145
20,58	17,78	24,79	22,46	15,66	12,56	38,04	31,47	13,08	14,04	16,65	13,26	19,61	16,90	17,30	11,34	4,45	1,28	10,25	6,18	18,0395	14,724
21,86	12,61	21,86	16,52	15,28	8,38	36,87	27,02	12,00	8,48	11,18	20,77	15,81	14,16	12,84	12,52	4,29	5,43	6,47	4,06	15,8445	12,993
14,97	14,40	18,28	13,15	11,89	11,97	39,03	27,78	16,07	9,51	13,47	11,83	22,20	12,13	15,16	9,92	6,56	2,30	11,25	4,39	16,886	11,7375
14,23	14,06	18,95	14,22	12,04	11,61	41,87	27,11	15,78	6,19	18,08	10,56	10,47	8,17	17,48	10,40	6,24	3,53	12,26	5,16	16,7365	11,1
9,91	16,76	16,06	16,77	7,60	12,62	26,75	36,83	16,66	6,10	13,56	8,30	18,59	11,17	15,89	13,76	5,67	2,74	9,07	9,41	13,9745	13,4435
16,00	18,34	19,40	20,03	12,99	15,15	32,23	29,99	8,73	11,84	14,90	9,63	19,01	14,58	10,17	10,04	1,99	3,61	7,62	5,52	14,3015	13,8705
11,05	11,49	11,40	15,46	9,84	10,00	26,10	29,98	4,99	6,31	10,99	12,76	14,25	8,79	9,36	18,41	1,23	0,00	4,44	7,45	10,362	12,063
15,00	12,68	21,52	13,15	8,75	11,93	26,22	32,32	8,31	14,10	7,51	6,77	11,70	15,79	9,35	7,32	1,41	3,47	6,56	5,52	11,6305	12,302
9,64	13,48	15,86	14,67	7,90	10,46	26,22	34,30	10,67	15,11	11,00	11,47	11,79	20,07	9,57	10,81	3,26	1,17	6,53	6,71	11,2415	13,823

### 4.3. Rezultati analize određivanja statusa metilacije gena ASC/TMS1

Kako bi ispitali diferencijalnu metilaciju promotorske regije gena ASC/TMS1 u zdravom i tumorskom tkivu grkljana, procijenjen je status metilacije CpG mjesta u promotorskoj regiji navedenog gena. U promotorskoj regiji gena ASC/TMS1 otkrivena je jedna regija od interesa (ROI\_1) sa tri CpG mjesta, kao što je vidljivo na Slici 21. Svrha ovih analiza bila je odrediti status metilacije pojedinih CpG mjesta u promotorskoj regiji gena ASC/TMS1 i ukupnu razinu metilacije gena ASC/TMS1 u zdravom i tumorskom tkivu grkljana. Analizirali smo 3 različita CpG mjesta smještena u transkripcijski izrazito aktivnoj regiji gena. U ROI\_1 CpG1 nalazi se 132pb, CpG2 127pb, a CpG3 122pb uzvodno od mjesta početka transkripcije (mjesta ATG).

```

5' GACAAGCAGGCCACCCATGAGCCCTCTGSCCCOCTCCGGTCCACCTTCAGGCCAGCTGGAGGGGAGCATCTGGATCCCCCGAGTGGCTGGGCCCCAATCCAGAGCCCTGGTGGGAGG
5' GATAAGTAGGCTTATTATGAGTTTTTTTGGTTTTTTTTGGTTTTATTTCAGGTAGTTAGTGGAGGGGCGGATTTTGGCTTTTTGAGCGGTTGGGTTTTAATTAGAGGTTGGGTGGGAGG
|||||
3' TTGTTTGTTCGGTGGGATTTGGGGAGATCTGGGGAGGCTTAGGGTGGAGCTTTGGTTGATTTTTTCCCTAGGATCCAGGGCTGCTGGATTGGGGTTAGTTTTGGATTATTTTT
3' CTGTTCTGTCCGGTGGTACTCGGGGAGATCCGGGGAGGCCAGGGTGGAGCTCCCGTGCACCTCCCCTAGGACCGAGGGCTGCGGACCCCGGGTTAGGTTCCCGGACCCACCTCC

ROI
ekson 1 >
GGACCAAGGGTAGTAAGGAAGCCCTTTGTGGAGGGCAAGGACCGGGGCGGGAGTGGAGACCAGAGTGGGAGGAAGCGGGAGTCCAGGTTCCCCCGGAGCGACTTCTCTGGTGGCG
GGATTAAGGGTAGTAAGGAAGCGCTTGTGATGAGGGGAGGATGGGGGCGGGAGTGGAGATTAGAGTGGGAGGAAGCGGGAGTTCAGGTTTGGTTGGAGTGGATTTTTTTGGTGGCG
|||||
TTGGTTTTTATATATTTTTTGGAAAATGATTTTTGTTGCTTGGCTTCTTTTAACTTTTGGTTTTATTTTTTTTCTTTTAGGTTAAGCGGGCTTTCTGTAAGGAGGATTAAGCG
CCTGTTCCACATCATCTCTTCGGAAAACGACCTCCGGTCTGCTCCCTCACTCTGCTCTCACCTCTCTCCCTCAGTCCCAAGCGGCGCTCGCTGAAGGAGGACCAAGCG

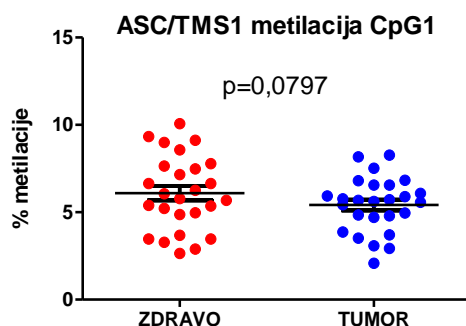
GCTGCAGCGGGTGAGCGCGCAGCGCCGGGATCTGGAGCCATGCGGCGGCGCGGACCCATCTGGATGCTGGAGAACCTGACCGCGAGGAGCTCAAGAAGTTCAAGCTGAAGTGTGTGT
GTTGTACCGGGTGAGCGCGTAGCGTGGGATTTGGAGTTATGGGGCGGCGCCGAGCTTATTTTGGATGCTGGAGAATTGATCTCGAGGAGTTAAGAAGTTAAGTTGAAGTTGTTGTG
|||||
TGATGCTTTTATTTTCTGTTCTGCTTTTAGGATTTGGTATTTTGGGCGCGCTGGTAGGATTTATGATTTTGGATTGCGCTTTTGGATTTTAAGTTGATTTGATGATA
CGACGTCGCCACTCCCGTCCGCTCCCTAGGACCTCGGTACCCCGGCGCGGCTGGTAGGACCTACGACCTCTGGACTCGCTCTCGATCTCTCAAGTTGACTTCGACGACAC
GTGCCTCGCGAGGGCTACCGGCATCCCGGGCGCTGCTGTCATGGAACCTTGGACCTCACGACAAGCTGGTCAGCTTCTACCTGGAGACCTACCGCCCGAGCTCACCGTAACTGCTG
GTGCTGCGCGAGGGTTACGGGCTATTTCCCGGGCGCTTGTGTTTATGGAACCTTTGGATTTATGATAATCTGCTAGGTTTAACTGAGGATACCGGCTCGAGTTATCTTAACTGTTG
|||||
TATGCGATCGCTTTTGTATTTCTAGGCGCTTTCCGATGATAGTATTGGAAATTGGAGTGGTTTGGATTAGTTGAAGATGGATTTTGGATCGTCCGCTGGAGTGGATTATGAT
CACGCGAGCGCTCCCGATCCCGCTAGGCGCCCGGACGACAGGTACCTCGGAACCTGGAGTGGTTTCGACAGCTCGAAGATGGACCTCTGGATCGCGCTGGAGTGGATTACGAC

```

Slika 21. Obradeni slijed nukleotida DNA promotorske regije gena ASC/TMS1. Uokviren slijed predstavlja regiju od interesa. Zeleno označeni slijed nukleotida DNA označava početnicu korištenu za sekvencioniranje. Sivo i tamno plavo označeni slijed nukleotida DNA su početnice korištene za reakciju PCR

#### 4.3.1. Status metilacije CpG1 mjesta u promotorskoj regiji gena ASC/TMS1

CpG1 mjesto smješteno je 132 parova baza uzvodno od mjesta početka transkripcije. Rezultati analize pirosekvenciranja na 26 uzorka tumorskog i pripadajućeg zdravog tkiva grkljana pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u razini metilacije između zdravih i tumorskih tkiva grkljana;  $p=0,0797$  ( $p>0,05$ ) (Slika 22.).

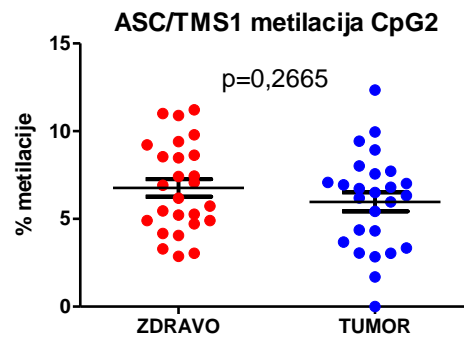


Slika 22. Grafički prikaz ukupne metilacije CpG1 otočića promotorske regije ASC/TMS1 gena. Paired t-test;  $p\leq 0,05$ . Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM

#### 4.3.2. Status metilacije CpG2 mjesta u promotorskoj regiji gena ASC/TMS1

CpG2 mjesto nalazi se 127 parova baza uzvodno od mjesta početka transkripcije. Rezultati analize pirosekvenciranja na 26 uzorka zdravog i pripadajućeg tumorskog tkiva

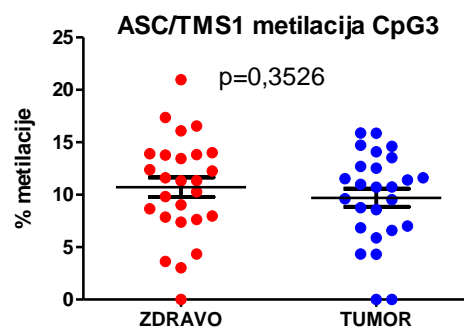
grkljana pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u razini metilacije između zdravih i tumorskih tkiva grkljana jer je  $p > 0,05$  ( $p = 0,2665$ ) (Slika 23.).



Slika 23. Grafički prikaz ukupne metilacije CpG2 mjesta promotorske regije ASC/TMS1 gena. Paired t-test;  $p \leq 0,05$ . Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM

#### 4.3.3. Status metilacije CpG3 mjesta u promotorskoj regiji gena ASC/TMS1

CpG3 mjesto nalazi se 122 parova baza uzvodno od mjesta početka transkripcije. Rezultati analize pirosekvenciranja na 26 uzorka tumorskog i pripadajućeg zdravog tkiva grkljana pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u razini metilacije između zdravih i tumorskih tkiva grkljana jer je  $p > 0,05$  ( $p = 0,3526$ ) (Slika 24.).

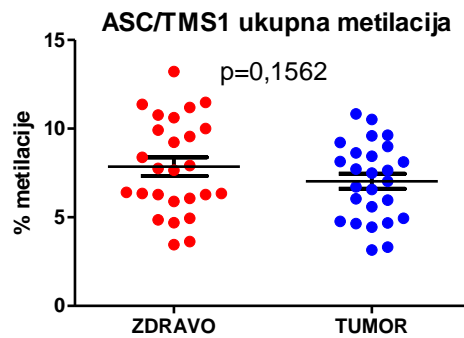


Slika 24. Grafički prikaz ukupne metilacije CpG3 otočića promotorske regije ASC/TMS1 gena. Paired t-test;  $p \leq 0,05$ . Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM

#### 4.3.4. Ukupni status metilacije CpG mjesta u promotorskoj regiji gena ASC/TMS1

Ukupna razina metilacije (sva CpG mjesta) u promotorskoj regiji ASC/TMS1 gena se ne razlikuje značajno u zdravom od tumorskog tkiva grkljana jer je  $p = 0,1562$  ( $p > 0,05$ ) (Slika

25.). Analiza pojedinačnih CpG mjesta pokazala je da ne postoji niti razlika u razini metilacije pojedinih CpG mjesta, odnosno da razlika u statusu metilacije pojedinih CpG mjesta u zdravom tkivu nije statistički značajno različita od razine metilacije u tumorskom tkivu grkljana.



Slika 25. Grafički prikaz metilacije CpG mjesta promotorske regije ASC/TMS1. Paired t-test;  $p \leq 0,05$ . Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM

Vrijednosti razine metilacije dobivene kao rezultat analize pirosekvenciranja na PyroMark Q96 ID platformi za svako CpG mjesto pojedinačno, kao i razina ukupne metilacije za promotersku regiju ASC/TMS1 gena prikazana je u Tablici 18.

Tablica 18. Prikaz rezultata razine metilacije u promotorskoj regiji ASC/TMS1 gena dobivenih pirosekvenciranjem zdravih i tumorskih uzoraka tkiva grkljana

CpG1		CpG2		CpG3		Ukupna metilacija %	
ZDRAVO	TUMOR	ZDRAVO	TUMOR	ZDRAVO	TUMOR	ZDRAVO	TUMOR
7,775	6,805	4,9	9,96	10,275	0	7,65	5,588333
6,645	5,725	7,45	8,02	0	8,75	4,698333	7,498333
3,68	2,075	3,04	3,06	3,645	4,35	3,455	3,161667
3,465	4,71	2,865	4,32	11,335	4,32	5,888333	4,45
7,64	3,865	4,165	6,5	3,035	10,71	4,946667	7,025
3,28	5,565	3,29	5,97	4,335	6,585	3,635	6,04
5,395	5,435	10,9	12,34	12,39	14,71	9,561667	10,82833
10,075	8,17	8,625	0	20,965	11,53	13,22167	6,566667
6,055	3,085	9,795	1,695	13,91	9,525	9,92	4,768333
6,64	4,79	11,215	3,04	14	7,015	10,61833	4,948333
5,355	3,515	5,46	3,68	7,385	6,835	6,066667	4,676667
5,685	2,93	8,545	7,015	9,03	0	7,753333	3,315
3,47	3,705	5,735	4,365	9,83	5,875	6,345	4,648333
2,895	4,955	4,05	3,345	7,63	9,615	4,858333	5,971667
2,645	5,615	5,27	2,84	11,32	15,885	6,411667	8,113333
4,965	4,85	5,22	6,73	8,665	8,58	6,283333	6,72
7,155	5,925	9,405	7,085	13,45	11,405	10,00333	8,138333
9,12	6,085	9,22	6,335	16,1	10,745	11,48	7,721667
7,485	5,685	11,01	6,95	13,82	12,695	10,77167	8,443333
8,57	8,265	8,475	7,715	16,555	10,99	11,2	8,99
9,33	6,555	7,415	6,8	17,36	12,535	11,36833	8,63
8,99	6,835	4,905	6,2	13,785	15,87	9,226667	9,635
5,78	5,89	7,08	5,425	12,265	11,61	8,375	7,641667
6,25	5,77	4,72	8,925	7,86	14,095	6,276667	9,596667
5,225	6,555	6,92	7,575	11,62	13,54	7,921667	9,223333
4,87	7,515	6,18	9,435	7,975	14,605	6,341667	10,51833

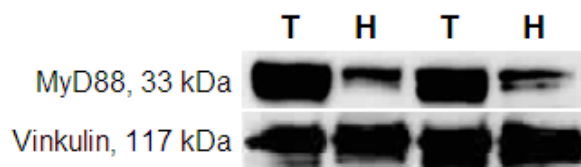
#### 4.4. Rezultati analize ekspresije proteina u zdravim i tumorskim tkivima grkljana

Rezultati analize statusa metilacije promotorskih regija testiranih gena pokazali su da postoji statistički značajna razlika u metilaciji promotora gena MyD88 u zdravom tkivu u odnosu na tumorsko, dok ta razlika nije potvrđena u rezultatima analiza za gen ASC/TMS1. Poznato je da je metilacija promotora jedan od mehanizama kontrole ekspresije gena. Svrha ovih analiza, na razini proteina, bila je ispitati postoji li u našem uzorku korelacija metilacije promotora testiranih gena s ekspresijom na proteinskoj razini.

##### 4.4.1. Rezultati analize ekspresija proteina MyD88 u zdravim i tumorskim tkivima grkljana

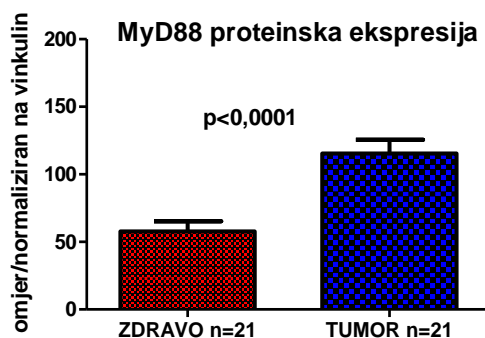
U svrhu određivanja ekspresije proteina MyD88 koristili smo se metodom Western blot. Ukupni proteini izolirani su iz lizata zdravih i tumorskih uzoraka tkiva, ukupno 21 tkivo tumora i pripadajuće zdravo tkivo, od istih osoba. Na Slici 26. prikazani su reprezentativni rezultati analize 2 para uzoraka tumorskog (T) i zdravog (H) tkiva. Nakon kvantifikacije intenziteta dobivenog signala i normalizacije tih rezultata s kontrolnim uzorcima, analize su

pokazale da je protein MyD88 jače eksprimiran u tumorskim uzorcima tkiva grkljana u odnosu na zdrava tkiva. Kako bi odredili da li je ta razlika statistički značajna, napravljena je statistička obrada vrijednosti dobivenih denzitometrijskom analizom uz pomoću programa GraphPad Prism za statističku obradu podataka.



Slika 26. Proteinska ekspresija MyD88 adaptorne molekule u tkivima grkljana. 100  $\mu$ g ukupnih proteina iz zdravih i tumorskih tkivnih lizata nanošeno je na 10% poliakrilamidne gelove. Kao kontrola nanošenja korišten je Vinculin. T označava tumorska, a H zdrava tkiva

Statističkom analizom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika ekspresije proteina MyD88 u tumorskim tkivima u odnosu na zdrava tkiva grkljana i to na razini statističke značajnosti  $p < 0,0001$  (Slika 27.).

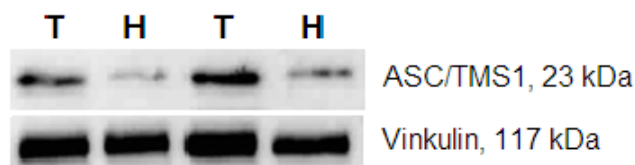


Slika 27. Denzitometrijska kvantifikacija proteinskih bendova MyD88 adaptorne molekule. Graf pokazuje da postoji statistički značajna razlika u ekspresiji proteina MyD88 u tumorskim u odnosu na zdrava tkiva grkljana. Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM

#### 4.4.2. Rezultati analize ekspresija proteina ASC/TMS1 u zdravim i tumorskim tkivima grkljana

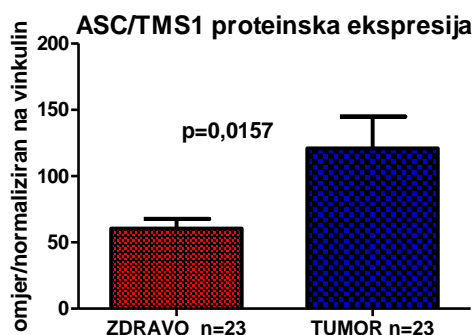
Ekspresija proteina ASC/TMS1 također je analizirana metodom Western blot na zdravim i tumorskim tkivima grkljana, koristeći lizate tkiva grkljana od ukupno 23 bolesnika.

Kao što je vidljivo na Slici 28. uočeno je da je protein ASC/TMS1 jače eksprimiran u tumorskim uzorcima tkiva grkljana u odnosu na zdrava tkiva. Da bi se utvrdilo postoji li i statistički značajna razlika u ekspresiji proteina MyD88 u tumorskom u odnosu na zdrava tkiva, napravljena je denzitometrijska kvantifikacija proteinske ekspresije pomoću programa ImageJ. Statistička obrada razine proteinske ekspresije dobivenih denzitometrijom napravljena je pomoću programa GraphPad Prism.



Slika 28. Proteinska ekspresija ASC/TMS1 adaptorne molekule u tkivima grkljana. 100  $\mu$ g ukupnih proteina iz zdravih i tumorskih tkivnih lizata nanošeno je na 10% poliakrilamidne gelove. Kao kontrola nanošenja korišten je Vinkulin. T označava tumorska, a H zdrava tkiva

Statističkom analizom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika ekspresije ASC/TMS1 proteina u tumorskim u odnosu na zdrava tkiva grkljana na razini statističke značajnosti  $p=0,0157$  (Slika 29.).



Slika 29. Denzitometrijska kvantifikacija proteinskih bendova adaptorne molekule ASC/TMS1. Graf pokazuje da postoji statistički značajna razlika u ekspresiji proteina ASC/TMS1 u tumorskim u odnosu na zdrava tkiva grkljana. Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM

## 5. RASPRAVA

Karcinomi glave i vrata, unutar kojih su najčešći karcinomi grkljana, predstavljaju vrlo važnu skupinu novotvorenina čija se pojavnost povećava u mnogim djelovima svijeta. Dosadašnja dostignuća u dijagnostici i liječenju ovih tumora zahtijevaju pronalaženje novih molekularnih ciljeva, signalnih molekularnih puteva i otkrivanje ranih karcinomskih lezija. Otkrivanje promjena na molekularnom nivou, specifičnih za tumorsko tkivo općenito, omogućava značajan napredak u dijagnostici i liječenju tumora. Najčešći uzročnik karcinoma grkljana je dugogodišnje izlaganje duhanskom dimu i prekomjerna konzumacija alkohola. Analiza podataka Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organisation*, WHO) o mortalitetu od karcinoma grkljana u zadnja dva desetljeća, u 34 europske zemlje, pokazuje da se stopa mortaliteta od karcinoma grkljana smanjila u većini europskih zemalja. Najviša stopa zabilježena je 2010. i 2011. godine u Mađarskoj, Moldaviji i Rumunjskoj ( $>6/100000$ ), a najniža u Finskoj, Švedskoj i Švicarskoj ( $<1/100000$ ). Mortalitet od karcinoma grkljana pokazuje pozitivne trendove smanjenja pojavnosti u europskim zemljama u zadnja dva desetljeća što se pripisuje smanjenju pušenja i konzumacije alkohola (59).

Uzročna ovisnost upale, urođene imunosti i tumorigeneze nije novost i općenito je prihvaćena. Međutim, mnogi molekularni i stanični mehanizmi koji ostvaruju tu ovisnost još uvijek nisu otkriveni. Davnih dana je Peyton Rous prvi dokazao da se karcinomi razvijaju iz „neoplastičnih još nevidljivih promjena“ uzrokovanim virusnim ili kemijskim karcinogenima koji induciraju somatske promjene (60-62).

Onkogeni različitih molekularnih oblika i načina djelovanja dovode do proupalnog odgovora. (npr. angiogeneza, nakupljanje mijelomonocitnih stanica i sl.). Tako se primjerice upalna stanja nakon infekcije povezuju s nastankom karcinoma. Okidači kronične upale koji povisuju rizik od nastanka i razvoja karcinoma uključuju infekciju (npr. *Helicobacter pylori* za karcinom želuca i limfoma, *Papilloma virus* za nastanak karcinoma vrata maternice, *Hepatitis virus* za nastanak karcinoma jetre), autoimune bolesti (upalna bolest crijeva za karcinom debelog crijeva) i upalna stanja nejasnog porijekla (upala prostate za karcinom prostate). Ključni mehanizmi povezani s ovim događajima uključuju aktivaciju transkripcijskih čimbenika putem receptora urođene imunosti i posljedično lučenje proupalnih citokina. Tako se može reći da su molekularne veze koje povezuju upalu i karcinom, i njihov međusobni odnos, ključni u nastanku karcinoma, a genetska nestabilnost molekula važnih u ovom procesu povezuje se s nastankom tumorskih stanica. Upravo stoga molekularne veze koje



povezuju upalu i karcinom predstavljaju cilj istraživanja novih strategija liječenja ili prevencije tumora (63).

Sustav urođene imunosti vrlo je važan dio imunološkog sustava i obuhvaća široki spektar mehanizama koji brane organizam domaćina od štetnih utjecaja iz okoline. Odgovor urođene imunosti bazira se na grupi proteina, receptora, tzv. receptora urođene imunosti, čijom aktivacijom putem specifičnog liganda dolazi do aktivacije stanica koje ih eksprimiraju. Tijekom kritičnih sati ili dana nakon izlaganja novom patogenu ovisimo o mehanizmu urođene imunosti koji nas štiti od infekcije. Sustav urođene imunosti omogućava nakupljanje imunoloških stanica na mjestu infekcije proizvodnjom medijatora upale-citokina (64). Poznato je da receptori urođene imunosti imaju ulogu u tumorigenezi i metastaziranju tumora jer kronična upala potaknuta sustavom urođene imunosti stimulira nastanak i razvoj malignih neoplazma (65). Važnu ulogu u procesu aktivacije i regulacije aktivacije receptora urođene imunosti imaju adaptorne molekule signalnih puteva. U našem istraživanju zanimala nas je korelacija stupnja metilacije i ekspresije predloženih gena MyD88 i ASC/TMS1, adaptornih molekula u TLR i NLR signalnim putevima, te može li se stupanj metilacije predloženih gena koristiti kao potencijalni prognostički biomarker. Budući da su nekontrolirana aktivacija/regulacija upalne reakcije i infekcija povezani s nastankom tumora, te zbog važnosti uloge adaptornih molekula u tom procesu, naša je hipoteza bila da bi promijenjeni status metilacije promotorske regije, unutar zdravog i tumorskog tkiva grkljana, gena odgovornih za aktivaciju i regulaciju upalnog odgovora mogao biti povezan s nastankom i progresijom tumora grkljana. Također, rezultati ovog rada predstavljaju i značajni doprinos u istraživanju statusa metilacije adaptornih molekula urođene imunosti, jer do sada u literaturi nema podataka da je proučavan status metilacije gena MyD88 u tkivima tumora. Nadalje, metodološki pristupi koje smo koristili također predstavljaju inovativan pristup jer smo u našim analizama statusa metilacije koristili metodu pirosekvencioniranja koja se još uvijek smatra zlatnim standardom u analizi stupnja metilacije. Svi dosadašnji rezultati u nama dostupnoj literaturi koji su analizirali stupanj metilacije gena ASC/TMS1 koristili su metodu metil-specifične reakcije PCR.

Rezultati naših istraživanja pokazali su da postoji značajna razlika u metilaciji pojedinih CpG mjesta promotorske regije gena MyD88 u zdravom i tumorskom tkivu grkljana. Točnije, rezultati ovog istraživanja pokazuju da je tumorsko tkivo grkljana statistički značajno hipometilirano u odnosu na zdravo tkivo. Također, pokazali smo da je i ukupna razina metilacije promotorske regije gena MyD88 značajno smanjena u tumorskom tkivu, u odnosu na zdravo. Nadalje, ispitivanjem razine ekspresije proteina MyD88, u svrhu povezivanja

statusa metilacije i proteinske ekspresije pokazali su da postoji snažna korelacija metilacije i ekspresije. Naime rezultati ovog istraživanja pokazali su da smanjena metilacija promotorske regije gena MyD88 u DNA izoliranoj iz tkiva tumora odgovara povećanoj ekspresiji tog proteina u tkivutumora (Slika 27.). Obratno vrijedi za zdrava tkiva grkljana – povećana metilacija povezana je sa smanjenom ekspresijom proteina. U recentnoj literaturi Lu i sur. (66) jedini su do sada proučavali ekspresiju MyD88 adaptorne molekule i posljedični klinički utjecaj na karcinom grkljana. Pokazali su da je pozitivna stopa ekspresije MyD88 u karcinomu grkljana prisutna u 68,6% što je značajno više u odnosu na zdravo tkivo u blizini karcinoma gdje je pozitivna stopa ekspresija prisutna u 11,8%. Pozitivna ekspresija MyD88 korelira s kliničkim stadijem bolesti i prisutnosti metastaza u limfnim čvorovima što pokazuje da je obrnuto proporcionalna sa stopom petogodišnjeg preživljenja. Pokazali su da MyD88 može biti važan čimbenik u razvoju karcinoma larinksa te da bi u budućnosti ciljana terapija mogla poboljšati prognozu bolesnika koji boluju od ovog karcinoma. Rakoff-Nahoum i Medzhitov (67) među prvima su pokazali da adaptorna molekula MyD88 ima kritičnu ulogu u spontanom razvoju tumora miševa sa heterozignom mutacijom na genu APC (od engl. *adenomatous polyposis coli*). Upravo ta molekula kontrolira ekspresiju glavnih modificirajućih gena koji dovode do razvoja karcinoma crijeva (intestinalne tumorigeneze) i ima kritičnu ulogu i u spontanom i u karcinogenom induciranom razvoju tumora. Najvjerojatniji mehanizam ostvaren je induciranjem ekspresije gena ciklooksigenaze 2 (COX2), matriks metaloproteinaza 7 i 10 (MMP7 and MMP10), IL-6 i čimbenika nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ). Slične rezultate pokazali su i Naugler i sur. (68) na modelu hepatocelularnog karcinoma miša gdje su pokazali da je dietilnitrozamin inducirani hepatocelularni karcinom povezan s proizvodnjom IL-6 čija je ekspresija ovisna o signalnim putevima koji regrutiraju molekulu MyD88. Chefetz i sur. (69) pokazali su da signalni putevi u kojima sudjeluje molekula MyD88 pridonose protumorskoj upali kao i obnavljanju matičnih stanica u modelu karcinoma jajnika. Matične stanice karcinoma iniciraju i održavaju tumor te se povezuju s vrlo učestalim recidiviranjem karcinoma jajnika. Prema autorima specifična populacija epitelnih matičnih stanica karcinoma jajnika, CD44+/MyD88+ EOC, i aktivan proupalni signalni put TLR2-MyD88-NF $\kappa$ B čine dva glavna čimbenika koji potiču rast tumora. Također, Higgins i sur. (70) ispitali su doprinos molekule MyD88 na rast tumorskih stanica karcinoma dojke kod miša. Pokazali su RNA sekvenciranjem da MyD88-ovisni signalni put dovodi do pojačane ekspresije gena koji pridonose progresiji karcinoma dojke i gena prethodno povezanih sa lošijom prognozom kod bolesnika s karcinomom dojke te dodatno suprimira ekspresiju gena koji mogu inhibirati progresiju tog karcinoma. Međutim,

MyD88-ovisan signalni put u tumorskim stanicama suprimira i ekspresiju gena koji pridonose progresiji tumora te se tako otkriva višestruka uloga MyD88-ovisnog signalnog puta u karcinomu dojke kod miševa. Za razliku od prethodnih rezultata iz literature Kinowaki i sur. (71) prikazali su da je smanjena ekspresija MyD88 u hepatocelularnom karcinomu (HCC) povezana s progresijom tumora.

Rezultati analize metodom pirosekvencioniranja, s ciljem određivanja stupnja metilacije promotorske regije gena MyD88, pokazali su da na razini ukupne metilacije postoji razlika u metilaciji između uzoraka zdravih i tumorskih tkiva. Statistička obrada podataka ukupnog statusa metilacije promotorske regije pokazala je da je ta razlika statistički značajna te da ukupnoj razlici u razini metilacije zdravih i tumorskih tkiva značajno doprinose tri CpG otočića: otočići CpG2 (Slika 11.), CpG7 (Slika 16.) i CpG10 (Slika 19.). Za ostala testirana CpG mjesta (Slika 10.,12.-15.,17.-18., Tablica 17.) nije pokazana razlika u ukupnoj razini metilacije između zdravih i tumorskih tkiva grkljana. Rezultati ovog istraživanja značajni su po tome što po prvi puta u literaturi istražuju status metilacije promotorske regije gena MyD88 u tkivu tumora grkljana i zdravom tkivu, pokazuju da postoji statistički značajna razlika u stupnju metilacije, odnosno da je ovaj gen smanjeno metiliran kod tkiva tumora, te da taj rezultat korelira sa stupnjem ekspresije proteina (Slika 27.). Važno je napomenuti da je u sklopu istraživanja, koje je još u tijeku, grupe s Instituta Ruđer Bošković ispitan i status metilacije gena MyD88 na uzorcima karcinoma pločastih stanica tumora pluća. Preliminarni rezultati tih istraživanja pokazuju da se uzorak (engl. *pattern*) metilacije promotorske regije gena MyD88 razlikuje u ispitivanim podtipovima karcinoma pločastih stanica. Naime, pokazano je da za isti gen postoji tkivno specifična metilacija pojedinih CpG mjesta u promotoru. Obzirom na činjenicu da karcinomi grkljana mogu u određenom postotku metastazirati u pluća i obzirom na činjenicu da za diferencijaciju drugog primarnog tumora pluća od metastaze karcinoma grkljana još uvijek ne postoje dobri biomarkeri, rezultati ovog istraživanja mogli bi doprinijeti u postupku diferencijacije.

Rezultati ovog istraživanja, koji su provedeni u svrhu određivanja statusa metilacije u promotorskoj regiji gena ASC/TMS1 pokazali su da nema statistički značajne razlike u statusu metilacije pojedinih CpG mjesta između zdravih i tumorskih tkiva grkljana. (Slika 22.-24., Tablica 18.). Također, pokazano je da ne postoji razlika niti u ukupnoj metilaciji promotora u zdravom i tumorskom tkivu grkljana (Slika 25.). Međutim, rezultati ispitivanja statusa ekspresije gena pokazuju da postoji razlika u ekspresiji gena ASC/TMS1 u zdravom i tumorskom tkivu – dobiveni rezultati pokazuju da je ekspresija proteina ASC/TMS1 značajno

povećana u tumorskom tkivu (Slika 29.). Zbog važnosti adaptorne molekule ASC/TMS1 u proupalnom signalnome putu te povezanosti kronične upale i tumorigeneze status metilacije i razina ekspresija ovoga gena proučavani su u velikom broju tumora. Stupanj metilacije gena ASC/TMS1, sa korelacijom ekspresije proteina u tumorskom tkivu grkljana u odnosu na zdravo tkivo do sada u literaturi nije objavljivano. Metilacija promotorske regije ovog gena i korelacija s ekspresijom proteina ovog gena proučavana je međutim u brojnim tumorima. Salminen i sur. (72) proučavali su mehanizme uključene u epigenetsku regulaciju ASC/TMS1 kao i njihov značaj u koordinaciji apoptoze i uloge inflamiasoma. Hong i sur. (73) pokazali su da je ASC/TMS1 vrlo često epigenetskim mehanizmom metilacije utišan u mnogim tumorskim stanicama. Pokazali su i da ponovnim obnavljanjem ASC/TMS1 ekspresije kod bolesnika sa kolorektalnim karcinomom DLD-1 stanica u kojima je ASC/TMS1 gen bio utišan aberantnom metilacijom dolazi do potenciranja stanične smrti putem oštećenja DNA. Pojačana osjetljivost DLD-1 stanica s ekspresijom ASC/TMS1 na genotoksični stres neovisna je o formiranju inflamiasoma i kaspaza i parcijalno ovisi o mitohondrijskom stvaranju reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i aktivaciji c-jun kinaze (JNK) mitogen aktivirajućeg protein kinaze (MAPK) signalnog puta. Ovi rezultati sugeriraju da je ekspresija ASC/TMS1 u tumorskim stanicama važan čimbenik koji određuje njihovu osjetljivost na kemoterapiju. Virmani i sur. (50) pokazali su da je metilacija ASC/TMS1 gena povezana s smanjenom ekspresijom tog gena prisutna u karcinomima malih stanica i ne malih stanica pluća te karcinomu dojke i da posljedično taj gen ima važnu ulogu u patogenezi ovih karcinoma. Xiaofang i sur. (54) proučavali su status metilacije tumor supresorskih gena kod bolesnika s kolangiokarcinomom. Otkrivena je statistički značajna razlika u patološkoj širini, diferencijaciji i invaziji tumora kod bolesnika s kombiniranom mutacijom gena p53, DAPK, p14ARF i metilacijom ASC/TMS1 gena u odnosu na bolesnike bez mutacije navedenih gena i metilacije ASC/TMS1 gena. Ova mutacija s ASC/MTS1 metilacijom otkrivena je u 38,9% bolesnika i ti bolesnici imali su statistički značajno lošiju prognozu od ostalih bolesnika s kolangiokarcinomom. Za razliku od dosadašnjih navoda iz literature Tamandani i sur. (74) proučavali su status metilacije ASC/TMS1 i CASP8 gena u karcinomu vrata maternice. Njihovi rezultati pokazali su da je metilacija gena ASC/TMS1 i CASP8 u karcinomu vrata maternice rijetka (<6%) te zbog toga nema kritičnu ulogu u razvoju karcinoma vrata maternice. Mirza i sur. (75) vjeruju da metilacija promotorske regije gena koji sudjeluju u popravku oštećene DNA i hormonskoj regulaciji dovodi do porasta karcinoma dojke s agresivnim kliničkim tijekom (ER i/ili PR negativnih). Tako su proučavali status metilacije gena ASC/TMS1, BRCA1, ER $\alpha$  i PRB kod invazivnog dukalnog karcinoma

i uparenih seruma DNA. Od 50 bolesnica s karcinomom dojke 72% tumora i 64% pokazalo je hipermetilaciju barem jednog od ovih navedenih gena dok je 34% tumora i 24% seruma pokazalo hipermetilaciju tri gena. Metilacija ASC/TMS1 bila je prisutna u 24% bolesnika. Deswaerte i sur. (76) također u svojem istraživanju navode protumorigenu ulogu adaptorne molekule ASC/TMS1 i njezinog efektornog citokina IL-18 u karcinomu želuca. Genetska ablacija IL-18 u modelu miša suprimira stvaranje karcinoma želuca dok blokiranje IL-1 $\beta$  i IL-1 $\alpha$  zbog genetske ablacije IL-1 receptora nema učinka. Protumorigena uloga IL-18 povezana je s visokom ekspresijom IL-18 gena u epitelnim stanicama karcinoma želuca. IL-18 blokiranje ili anti IL-18 protutijelom ili delecijom ASC/TMS1 gena povećava staničnu smrt (apoptozu) u humanim stanicama karcinoma želuca. U humanim stanicama karcinoma želuca vidi se značajna korelacija povišene razine zrelih citokina IL-18 i razine mRNA ASC/TMS1. Ova saznanja podržavaju teoriju da je signalna os ASC/TMS1/IL-18 važan kandidat ciljane terapije karcinoma želuca u budućnosti. Machida i sur. (77) predlažu da hipermetilacija ASC/TMS1 gena u iskašljaju bude biljeg za otkrivanje karcinoma. Hipermetilirani promotorski slijedovi gena izuzetno su obećavajući biljezi za sve karcinome. Autori su proučavali proapoptotički gen, gen ASC/TMS1 u karcinomima pluća, te rezultate koristili za razvoj biljega u iskašljaju. Pokazali su da su razine proteina ASC/TMS1 snižene u svim tipovima karcinoma pluća ali ne i u preinvazivnim lezijama. Hipermetilacija je povezana s invazivnim karcinomima s variranjem pojavnosti unutar patohistoloških tipova uključujući 32,1% kod adenokarcinoma, 13,2% kod karcinoma pločastih stanica, 38,5% kod karcinoma velikih stanica i 60% kod karcinoma malih stanica pluća. Hipermetilacija korelira s uznapredovalim stadijima bolesti te je prisutna samo u 14% slučajeva kod stadija I i u 60% slučajeva u ostalim uznapredovalijim stadijima. Nedostatak hipermetilacije u 98% iskašljaja osoba koji su teški pušači, a nemaju kliničkih znakova karcinoma, ukazuje na visoku specifičnost predviđanja karcinoma pluća korištenjem ovog biljega. Učestalost hipermetilacije gena ASC/TMS1 u iskašljaju prisutna je u 2% pušača visokog rizika za razvoj karcinoma ali bez evidentnog karcinoma pluća, 15% bolesnika stadija I karcinoma pluća nemalih stanica, 41% bolesnika stadija III karcinoma pluća nemalih stanica od čega 56% bolesnika s adenokarcinomom pluća. Iskašljaj je pozitivan i u 24% bolesnika vrlo visokog rizika, koji klinički nemaju karcinom ali su prethodno operirani zbog stadija I karcinoma pluća nemalih stanica. Tako hipermetilacija ASC/TMS1 u iskašljaju može biti biljeg za uznapredovalije stadije karcinoma pluća i predviđa prognozu bolesnika operiranih u ranom stadiju karcinoma pluća.

Rezultati analize stupnja metilacije gena ASC/TMS1 u našem istraživanju nešto su drugačiji od do sada objavljenih rezultata. Prema našim rezultatima čini se da ne postoji razlika u stupnju metilacije tumorskog i zdravog tkiva, što nije slučaj u gotovo svim do sada objavljenim istraživanjima. Jedan od mogućih razloga može biti u činjenici da je analiza stupnja metilacije, u ovom istraživanju, provedena metodom pirosekvencioniranja koja je značajno preciznija od do sada primjenjivane metode u tu svrhu, metode metil-specifične reakcije PCR. Također, obzirom da ne postoji korelacija stupnja metilacije s razinom ekspresije proteina ASC/TMS1 ukazuje na činjenicu da je ekspresija proteina pod nekim drugim posttranskripcijskim mehanizmima regulacije.

Zaključno, značajan doprinos ovog istraživanja je u tome što je po prvi puta ispitana razina metilacije gena MyD88 i ASC/TMS1 u zdravim i tumorskim tkivima grkljana, i to metodom pirosekvencioniranja, koja još uvijek predstavlja zlatni standard u analizi statusa metilacije. Nadalje, pokazali smo da postoji razlika u metilaciji zdravog i tumorskog tkiva grkljana, međutim samo u genu MyD88. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da u slučaju gena/proteina MyD88 postoji pozitivna korelacija statusa metilacije i ekspresije proteina – povećana metilacija korelira sa smanjenom ekspresijom proteina. Važno je napomenuti da su rezultati ovog istraživanja pokazali da u slučaju gena/proteina ASC/TMS1 ne možemo govoriti o pozitivnoj korelaciji metilacije i ekspresije gena/proteina. Naime, rezultati su pokazali da ne postoji razlika u metilaciji gena, dok je protein statistički značajno jače ekspimiran u tumorskim tkivima. Poveznica rezultata dvaju odvojenih istraživanja koja su pokazala da postoji razlika u obrascu metilacije MyD88 promotora u tumorima pločastih stanica grkljana i pluća izuzetno je važna jer ukazuje na potencijal otkrića novih biljega u diferencijalnoj dijagnostici tumora glave i vrata i pluća.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Ukupna metilacija promotorske regije gena MyD88, izražena kao prosječna vrijednost stupnja metilacije pojedinih testiranih CpG mjesta (10 mjesta), je statistički značajno povećana u zdravim tkivima grkljana u odnosu na tumorska.
2. Unutar promotorske regije gena MyD88 postoje specifična CpG mjesta čija razlika u metilaciji u zdravom i tumorskom tkivu doprinosi ukupnoj razlici metilacije – CpG2, CpG7 i CpG10 mjesta.
3. Ekspresija MyD88 proteina statistički je značajno povećana u tumorskom tkivu grkljana, u odnosu na zdravo tkivo grkljana.
4. Povećana metilacija promotorske regije gena MyD88 u zdravom tkivu u korelaciji je sa smanjenom ekspresijom proteina, i obrnuto, smanjena metilacija promotorske regije u tumorskom tkivu u korelaciji je s povećanom ekspresijom proteina.
5. Ukupna metilacija promotorske regije gena ASC/TMS1, izražena kao prosječna vrijednost stupnja metilacije pojedinih testiranih CpG mjesta (3 mjesta), je nepromijenjena u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo grkljana.
6. Unutar promotorske regije gena ASC/TMS1 ne postoji statistički značajna razlika u stupnju metilacije pojedinih testiranih CpG mjesta u zdravom i tumorskom tkivu grkljana.
7. Ekspresija proteina ASC/TMS1 je statistički značajno povećana u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo grkljana.
8. Obzirom da ne postoji razlika u stupnju ukupne metilacije promotorske regije gena ASC/TMS1 u zdravom i tumorskom tkivu, pretpostavljamo da je uočena razlika u ekspresiji proteina ASC/TMS1 (povećana ekspresija u tumorskom tkivu) posljedica nekih drugim posttranskripcijskih mehanizama regulacije.

## 7. SAŽETAK

Karcinom grkljana je najčešći karcinom glave i vrata sa visokom stopom mortaliteta. Gotovo 90% karcinoma grkljana nastaje uslijed genetskih i epigenetskih promjena uzrokovanih načinom života i čimbenicima okoliša. Više od 95% karcinoma grkljana patohistološki su karcinomi pločastih stanica. Do danas ne postoje pouzdani klinički etablirani tumorski biljezi koji bi olakšali dijagnozu, prognozu i liječenje oboljelih od ove maligne bolesti. Novija istraživanja pokazuju da su poremećena kontrola upalne reakcije i prisutnost infekcije povezani s nastankom i razvojem tumorskih bolesti. Važnu ulogu u kontroli upalne reakcije ima urođena imunost. Obrambeni mehanizam urođene imunosti očituje se aktivacijom receptora odgovornih za prepoznavanje patogena, a ključnu ulogu u tom procesu imaju adaptorne molekule signalnih puteva. U ovom istraživanju pretpostavili smo da bi postojanje promijenjenog statusa metilacije promotorske regije gena ASC/TMS1 i gena MyD88, odgovornih za aktivaciju i regulaciju upale, unutar zdravog i tumorskog tkiva grkljana moglo biti povezano s nastankom i progresijom tumora. Cilj istraživanja je ispitati postoji li razlika u stupnju metilacije ovih gena zdravog i tumorskog tkiva grkljana i očituje li se ta razlika na proteinskoj razini. Status metilacije ovih gena u karcinomu grkljana do sada nije proučavan, niti je u bilo kojem od karcinoma korištena metoda pirosekvenciranja za određivanje statusa metilacije kao u ovom istraživanju. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je ukupna metilacija promotorske regije gena MyD88 statistički značajno povećana u zdravim tkivima grkljana u odnosu na tumorska tkiva i taj nalaz korelira s ekspresijom proteina. Ukupna metilacija promotorske regije gena ASC/TMS1 nepromijenjena je u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo grkljana. Ekspresija proteina ASC/TMS1 je statistički značajno povećana u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo grkljana. Obzirom da ne postoji razlika u stupnju ukupne metilacije promotorske regije gena ASC/TMS1 u zdravom i tumorskom tkivu, pretpostavljamo da je uočena razlika u ekspresiji proteina ASC/TMS1 (povećana ekspresija u tumorskom tkivu) posljedica nekih drugim posttranskripcijskih mehanizama regulacije. Smatramo da bi rezultati ovog istraživanja u budućnosti mogli doprinjeti ranijem otkrivanju, terapiji i praćenju karcinoma pločastih stanica grkljana ali i doprinjeti novim spoznajama o ulozi gena ASC/TMS1 i MyD88.



## 8. SUMMARY

Laryngeal Cancer is the most frequent Head and Neck Cancer comprising high mortality rate. Almost 90% of all Laryngeal Cancers develop due to genetical and epigenetical changes caused by lifestyle and environmental factors. More than 95% of all laryngeal cancers are Squamous Cell Carcinoma. To date there are no established biomarkers to facilitate the diagnosis, prognosis and treatment of patients suffering from this malignant disease. Recent studies showed that inadequate control of inflammation and presence of infection are tightly related with developing and promotion of the cancer. Innate immune system has a very important role in the control of inflammation. Innate immunity defense mechanisms activate pattern recognition receptors (PRRs) and adaptor molecules play the key role in all signalling pathways. In this study, we hypothesized that the changes in the methylation status of promotor regions of ASC/TMS1 and MyD88 genes, responsible for activation and regulation of inflammation, in healthy and laryngeal cancer tissue might be related with development and progression of cancer. The aim of this study is to investigate is there a difference in the methylation status of this genes in healthy and tumor tissue and does it correlate with protein expression. In recent literature the methylation status of this genes has still not been analyzed in Laryngeal Cancer and the pyrosequencing method in methylation status determination as performed in this study has not been used in other cancers. Results of this study show that the overall methylation level of the promotor region of MyD88 gene is statistically significantly higher in healthy laryngeal tissue in relation to cancer tissue and this finding correlate with protein expression level. The overall methylation level of promotor region of ASC/TMS1 gene is unchanged in Laryngeal Cancer and healthy laryngeal tissue. The protein expression level of ASC/TMS1 is statistically significantly higher in cancer in relation to healthy laryngeal tissue. Taking into account there is no difference in the overall methylation level of the promotor region of ASC/TMS1 gene in healthy and tumor tissue we assume that the observed difference in ASC/TMS1 protein expression (higher expression in tumor tissue) is the outcome of other posttranscriptional regulation mechanisms.

We consider that the results of this study in the future may lead to earlier detection, treatment and follow-up of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma and reveal new scientific discoveries of the role of ASC/TMS1 and MyD88 genes.

## 9. LITERATURA

1. Hazelden LA, Newman MJ, Shuey S, Waldfogel JM, Brown VT. Evaluation of the head and neck cancer patient population and the incidence of hospitalization at an academic medical center. *J Oncol PharmPract*. 2017. doi: 10.1177/1078155217735688. [Epub ahead of print]
2. Rezende TMB, de Souza Freire M, Franco OL. Head and neck cancer: proteomic advances and biomarker achievements. *Cancer*. 2010;116(21):4914–25.
3. Vigneswaran N, Williams MD. Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2014;(2):123–41.
4. Verma S, Saxena R, Siddiqui MH, Santha K, Sethupathy S. Evaluation of CYP1B1 Expression, Oxidative Stress and Phase 2 Detoxification Enzyme Status in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(3):1-5.
5. Kriek E, Rojas M, Alexandrov K, Bartsch H. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in humans: relevance as biomarkers for exposure and cancer risk. *Mutat Res*. 1998;400(1–2):215–31.
6. Jaber MA. Tobacco smoking and alcohol consumption as risk factors for site-specific intraoral epithelial dysplasia. *J Investig Clin Dent*. 2010;1(2):101–7.
7. Schlecht NF, Franco EL, Pintos J, Negassa A, Kowalski LP, Oliveira BV i sur. Interaction between tobacco and alcohol consumption and the risk of cancers of the upper aero-digestive tract in Brazil. *Am J Epidemiol*. 1999;150(11):1129–37.
8. Leon ME, Peruga A, McNeill A, Kralikova E, Guha N, Minozzi S i sur. European Code against Cancer, 4th Edition: Tobacco and cancer. *Cancer Epidemiol*. 2015;39 Suppl 1:20-33.
9. Nowińska K, Ciesielska U, Podhorska-Okołów M, Dzięgiel P. The role of human papillomavirus in oncogenic transformation and its contribution to the etiology of precancerous lesions and cancer of the larynx: A review. *Adv Clin Exp Med*. 2017; 26(3):539–47.
10. Adelstein DJ, Ridge JA, Gillison ML, Chaturvedi AK, D’Souza G, Gravitt PE i sur. Head and neck squamous cell cancer and the human papillomavirus: summary of a National Cancer Institute State of the Science Meeting, November 9-10, 2008, Washington, D.C. *Head Neck*. 2009;31(11):1393–422.
11. Gallus S, Bosetti C, Franceschi S, Levi F, Negri E, La Vecchia C. Laryngeal cancer in women: tobacco, alcohol, nutritional, and hormonal factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003;12(6):514–7.
12. Levy DT, Tam J, Kuo C, Fong GT, Chaloupka F. The Impact of Implementing Tobacco Control Policies: The 2017 Tobacco Control Policy Scorecard. *J Public Health Manag Pract*. 2018. doi: 10.1097/PHH.0000000000000780. [Epub ahead of print]
13. Brandstorp-Boesen J, Sørnum Falk R, Boysen M, Brøndbo K. Impact of stage, management and recurrence on survival rates in laryngeal cancer. *PLoS One*. 2017;12(7):e0179371.
14. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(1):9–22.
15. García J, López M, López L, Bagué S, Granell E, Quer M i sur. Validation of the pathological classification of lymph node metastasis for head and neck tumors according to the 8th edition of the TNM Classification of Malignant Tumors. *Oral Oncol*. 2017;70:29–33.
16. Lambiel S, Dulguerov P. Changes in the new TNM classification in Head and Neck

- oncology. *Rev Med Suisse*. 2017;13(577):1684–9.
17. Crosetti E, Pilolli F, Succo G. A new strategy for endoscopic staging of laryngeal carcinoma: multistep endoscopy. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2012;32(3):175–81.
  18. Chung SY, Kim KH, Keum KC, Koh YW, Kim SH, Choi EC i sur. Radiotherapy versus Cordectomy in the Management of Early Glottic Cancer. *Cancer Res Treat* 2018;50(1):156-163.
  19. Dansky Ullmann C, Harlan LC, Shavers VL, Stevens JL. A population-based study of therapy and survival for patients with head and neck cancer treated in the community. *Cancer*. 2012;118(18):4452–61.
  20. Virchow R. Standpoints in Scientific Medicine, *Bull Hist Med*. 1877;30(6):537–43.
  21. Sitarz R, Skierucha M, Mielko J, Offerhaus GJA, Maciejewski R, Polkowski WP. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Manag Res*. 2018;10:239–48.
  22. Moustafa S, Karakasiliotis I, Mavromara P. Hepatitis C virus core+1/ARFP modulates Cyclin D1/pRb pathway and promotes carcinogenesis. *J Virol*. 2018;92(9):e02036-17.
  23. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18(1):e197.
  24. Korda RJ, Clements MS, Armstrong BK, Law HD, Guiver T, Anderson PR i sur. Risk of cancer associated with residential exposure to asbestos insulation: a whole-population cohort study. *Lancet Public Heal*. 2017;2(11):e522–8.
  25. El Zoghbi M, Salameh P, Stücker I, Brochard P, Delva F, Lacourt A. Absence of multiplicative interactions between occupational lung carcinogens and tobacco smoking: a systematic review involving asbestos, crystalline silica and diesel engine exhaust emissions. *BMC Public Health*. 2017;17(1):156.
  26. Zhang X, Meng X, Chen Y, Leng SX, Zhang H. The Biology of Aging and Cancer: Frailty, Inflammation, and Immunity. *Cancer J*. 2017; 23(4):201–5.
  27. Leonardi GC, Accardi G, Monastero R, Nicoletti F, Libra M. Ageing: from inflammation to cancer. *Immun Ageing*. 2018;15:1.
  28. Sanikini H, Yuan JM, Butler LM, Koh WP, Gao YT, Steffen A i sur. Body mass index and lung cancer risk: a pooled analysis based on nested case-control studies from four cohort studies. *BMC Cancer*. 2018;18(1):220.
  29. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883–99.
  30. Bui JD, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr Opin Immunol*. 2007;19(2):203–8.
  31. Fridovich-Keil JL, Hansen LJ, Keyomarsi K, Pardee AB. Progression through the cell cycle: an overview. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142:S3-6.
  32. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436–44.
  33. Gao SP, Mark KG, Leslie K, Pao W, Motoi N, Gerald WL i sur. Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas. *J Clin Invest*. 2007;117(12):3846–56.
  34. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:991–1045.
  35. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805–20.
  36. Gurung P, Kanneganti TD. Novel roles for caspase-8 in IL-1 $\beta$  and inflammasome regulation. *Am J Pathol*. 2015;185(1):17–25.
  37. Diacovich L, Gorvel JP. Bacterial manipulation of innate immunity to promote

- infection. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(2):117–28.
38. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388(6640):394–7.
  39. Tartey S, Takeuchi O. Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells. *Int Rev Immunol*. 2017;36(2):57–73.
  40. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. *Cell*. 2010;140(6):821–32.
  41. Wang JQ, Jeelall YS, Ferguson LL, Horikawa K. Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. *Front Immunol*. 2014;5:367.
  42. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003;349(21):2042–54.
  43. Wu DD, Song J, Bartel S, Krauss-Etschmann S, Rots MG, Hylkema MN. The potential for targeted rewriting of epigenetic marks in COPD as a new therapeutic approach. *Pharmacol Ther*. 2018;182:1-14.
  44. Lee CJ, Evans J, Kim K, Chae H, Kim S. Determining the effect of DNA methylation on gene expression in cancer cells. *Methods Mol Biol*. 2014;1101:161–78.
  45. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*. 2002;21(35):5427–40.
  46. Riojas MA, Guo M, Glöckner SC, Machida EO, Baylin SB, Ahuja N. Methylation-induced silencing of *ASC/TMS1*, a pro-apoptotic gene, is a late-stage event in colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*. 2007;6(11):1710–6.
  47. Conway KE, McConnell BB, Bowring CE, Donald CD, Warren ST, Vertino PM. *TMS1*, a novel proapoptotic caspase recruitment domain protein, is a target of methylation-induced gene silencing in human breast cancers. *Cancer Res*. 2000;60(22):6236–42.
  48. Guan X, Sagara J, Yokoyama T, Koganehira Y, Oguchi M, Saida T i sur. *ASC/TMS1*, a caspase-1 activating adaptor, is downregulated by aberrant methylation in human melanoma. *Int J Cancer*. 2003;107(2):202–8.
  49. Terasawa K, Sagae S, Toyota M, Tsukada K, Ogi K, Satoh A i sur. Epigenetic inactivation of *TMS1/ASC* in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10(6):2000–6.
  50. Virmani A, Rathi A, Sugio K, Sathyanarayana UG, Toyooka S, Kischel FC i sur. Aberrant methylation of *TMS1* in small cell, non small cell lung cancer and breast cancer. *Int J Cancer*. 2003;106(2):198–204.
  51. Stone AR, Bobo W, Brat DJ, Devi NS, Van Meir EG, Vertino PM. Aberrant methylation and down-regulation of *TMS1/ASC* in human glioblastoma. *Am J Pathol*. 2004;165(4):1151–61.
  52. Das PM, Ramachandran K, Vanwert J, Ferdinand L, Gopisetty G, Reis IM i sur. Methylation mediated silencing of *TMS1/ASC* gene in prostate cancer. *Mol Cancer*. 2006;5:28.
  53. Liu XF, Zhu SG, Zhang H, Xu Z, Su HL, Li SJ i sur. The methylation status of the *TMS1/ASC* gene in cholangiocarcinoma and its clinical significance. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2006;5(3):449–53.
  54. Xiaofang L, Kun T, Shaoping Y, Zaiqiu W, Hailong S. Correlation between promoter methylation of *p14ARF*, *TMS1/ASC*, and *DAPK*, and *p53* mutation with prognosis in cholangiocarcinoma. *World J Surg Oncol*. 2012;10(1):5.
  55. Cui J, Chen Y, Wang HY, Wang R. Mechanisms and pathways of innate immune activation and regulation in health and cancer. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(11):3270–85.
  56. Oosterkamp S, de Jong JMA, Van den Ende PL, Manni JJ, Dehing-Oberije C, Kremer B. Predictive value of lymph node metastases and extracapsular extension for the risk of distant metastases in laryngeal carcinoma. *Laryngoscope*. 2006;116(11):2067–70.

57. Andersen PE, Shah JP, Cambronero E, Spiro RH. The role of comprehensive neck dissection with preservation of the spinal accessory nerve in the clinically positive neck. *Am J Surg.* 1994;168(5):499–502.
58. Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Schuurin E, Hermans J, Vis AA, Litvinov SV i sur. Markers for assessment of nodal metastasis in laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997;123(4):412–9.
59. Chatenoud L, Garavello W, Pagan E, Bertuccio P, Gallus S, La Vecchia C i sur. Laryngeal cancer mortality trends in European countries. *Int J Cancer.* 2016;138(4):833–42.
60. Rous P, Kidd JG. Conditional neoplasms and subthreshold neoplastic states: a study of the TAR tumors of rabbits. *J Exp Med.* 1941;73(3):365-90.
61. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420(6917):860-7.
62. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol.* 2006;72(11):1605-21.
63. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis.* 2009;30(7):1073–81.
64. Yin Q, Fu TM, Li J, Wu H. Structural biology of innate immunity. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:393-416.
65. Yu Q, Nie SP, Wang JQ, Yin PF, Huang DF, Li WJ i sur. Toll-like receptor 4-mediated ROS signaling pathway involved in *Ganoderma atrum* polysaccharide-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion during macrophage activation. *Food Chem Toxicol.* 2014;66:14–22.
66. Lu B, Di W, Lian R, Lu Z, Yu W. The expression and clinical significance of MyD88 in laryngeal cancer. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi.* 2015;29(16):1477–9.
67. Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science.* 2007;317(5834):124–7.
68. Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM i sur. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science.* 2007;317(5834):121–4.
69. Chetani I, Alvero AB, Holmberg JC, Lebowitz N, Craveiro V, Yang-Hartwich Y i sur. TLR2 enhances ovarian cancer stem cell self-renewal and promotes tumor repair and recurrence. *Cell Cycle.* 2013;12(3):511–21.
70. Higgins MJ, Serrano A, Boateng KY, Parsons VA, Phuong T, Seifert A i sur. A Multifaceted Role for Myd88-Dependent Signaling in Progression of Murine Mammary Carcinoma. *Breast Cancer Basic Clin Res.* 2016;10:157-167.
71. Kinowaki K, Soejima Y, Kumagai A, Kondo F, Sano K, Fujii T i sur. Clinical and pathological significance of myeloid differentiation factor 88 expression in human hepatocellular carcinoma tissues. *Pathol Int.* 2017;67(5):256–63.
72. Salminen A, Kauppinen A, Hiltunen M, Kaarniranta K. Epigenetic regulation of ASC/TMS1 expression: potential role in apoptosis and inflammasome function. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(10):1855–64.
73. Hong S, Hwang I, Lee YS, Park S, Lee WK, Fernandes-Alnemri T i sur. Restoration of ASC expression sensitizes colorectal cancer cells to genotoxic stress-induced caspase-independent cell death. *Cancer Lett.* 2013;331(2):183–91.
74. Kordi Tamandani DM, Sobti RC, Shekari M, Huria A. CpG island methylation of TMS1/ASC and CASP8 genes in cervical cancer. *Eur J Med Res.* 2009;14:71–5.
75. Mirza S, Sharma G, Prasad CP, Parshad R, Srivastava A, Gupta SD i sur. Promoter hypermethylation of TMS1, BRCA1, ER $\alpha$  and PRB in serum and tumor DNA of

- invasive ductal breast carcinoma patients. *Life Sci.* 2007;81(4):280–7.
76. Deswaerte V, Nguyen PM, West A, Browning AF, Yu L, Ruwanpura S i sur. Inflammasomes adaptor ASC suppresses apoptosis of gastric cancer cells by an IL-18 mediated inflammation-independent mechanism. *Cancer Res.* 2018;78(5):1293-1307.
77. Machida EO, Brock M V, Hooker CM, Nakayama J, Ishida A, Amano J i sur. Hypermethylation of ASC/TMS1 is a sputum marker for late-stage lung cancer. *Cancer Res.* 2006;66(12):6210–8.

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 23. 07. 1977. godine u Zagrebu, gdje sam završila osnovnu školu i Klasičnu gimnaziju s odličnim uspjehom. U rujnu 2002. godine diplomirala sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu s odličnim uspjehom. U svibnju 2003. godine postajem znanstveni novak na Katedri za otorinolaringologiju s audiologijom i fonijatrijom MF u Zagrebu, i te godine upisujem poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo. U veljači 2005. godine započinjem specijalizaciju iz otorinolaringologije u Klinici za bolesti uha, nosa i grla i kirurgiju glave i vrata KBC Zagreb. Tijekom specijalizacije boravila sam na četveromjesečnom studijskom boravku u Klinici Lariboisière u Parizu. 25. rujna 2009. položila sam specijalistički ispit iz otorinolaringologije, te sam od svibnja 2010. godine zaposlena kao specijalist otorinolaringolog u Klinici za bolesti uha, nosa i grla i kirurgiju glave i vrata KBC Zagreb. 27. studenog 2012. godine izabrana sam u suradničko zvanje naslovnog asistenta na Katedri za otorinolaringologiju s audiologijom i fonijatrijom MF u Zagrebu. 26. ožujka 2014. položila sam subspecijalistički ispit iz uže specijalnosti audiologije, a u listopadu 2016. započinjem užu specijalizaciju iz fonijatrije. Aktivno sudjelujem u svakodnevnoj nastavi; u dodiplomskom studiju iz otorinolaringologije i kirurgije glave i vrata na MF, studiju na engleskom jeziku na MF, studiju logopedije na Edukacijsko-rehabilitacijskom fakultetu i u poslijediplomskom studiju iz otorinolaringologije i kirurgije glave i vrata, te hitne medicine. Autor sam većeg broja radova koji su objavljenih u međunarodnim i domaćim časopisima (od toga 15 CC). Sudjelovala sam na brojnim međunarodnim i domaćim kongresima, simpozijima i tečajevima kao pozvani predavač i aktivni sudionik. Koautor sam nekoliko poglavlja u knjigama iz područja otorinolaringologije i kirurgije glave i vrata. Član sam brojnih stručnih i znanstvenih udruga kako domaćih i međunarodnih a naročito ističem da sam jedini član iz Republike Hrvatske SFORL (Société Française d'ORL, Francusko društvo za ORL) – od 17. listopada 2010. godine, trenutno u izboru za predstavnika regije jugoistočne Europe.

Tečno govorim engleski, francuski i talijanski jezik.