

# Metiliranost promotora gena imunskog sustava u tumorima glave i vrata čovjeka

---

Anić, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:918563>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Petra Anić

**METILIRANOST PROMOTORA GENA  
IMUNOSNOG SUSTAVA U TUMORIMA GLAVE I  
VRATA ČOVJEKA**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, veljača 2020.

**Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu virologiju i bakteriologiju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta “Ruđer Bošković”, pod voditeljstvom dr. sc. Nine Milutin Gašperov, znanstvene suradnice, u sklopu Sveučilišnog diplomskog studija Molekularne biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistrice molekularne biologije.**

*Zahvaljujem mojoj mentorici, dr. sc. Nini Milutin Gašperov, na pruženoj prilici i potpori koju mi je pružila tijekom izrade ovog diplomskog rada, kao i njenoj dostupnosti i povjerenju. Veliko hvala i Jasminki te cijeloj ekipi iz Laboratorija za molekularnu virologiju i bakteriologiju koji su uvijek bili susretljivi i spremni pomoći kada mi je ta pomoć bila potrebna. Na kraju hvala i mojoj obitelji te prijateljima bez kojih ovo sve ne bi ni bilo moguće*

## METILIRANOST PROMOTORA GENA IMUNOSNOG SUSTAVA U TUMORIMA GLAVE I VRATA ČOVJEKA

PETRA ANIĆ

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Udio tumora glave i vrata koji se mogu povezati s infekcijom humanim papiloma virusima (HPV, *Human papilloma virus*) raste. Jedan od potencijalnih čimbenika odgovornih za nastanak tumora kod infekcije HPV-om je promjena stupnja metiliranosti promotora gena koji igraju ključnu ulogu u imunosnom odgovoru. U radu je istražena razlika u metiliranosti promotora gena: *EDARADD*, *IL12RB*, *MARCO*, *HLA DPB*, *GBP*, *SIGLEC* i *HAVCR2* u obriscima zdrave oralne sluznice naspram svježeg tkiva oralnih i orofaringealnih tumora čovjeka. Ispitano je i prisustvo infekcije HPV-om u svakom pojedinom uzorku. Za određivanje razlike u metiliranosti promotora navedenih gena, prethodno izolirana DNA je podvrgnuta kemijskoj modifikaciji natrijevim bisulfitom te umnožena metodom lančane reakcije polimerazom specifične za metilaciju. Analizirani geni pokazali su hipometiliranost kod uzoraka oralnih i orofaringealnih tumora glave i vrata u usporedbi s normalnim tkivom. Također, udio nemetiliranih promotora navedenih gena bio je veći kod HPV-pozitivnih tumora nego kod HPV-negativnih tumora, što ukazuje da je njihova aktivacija demetiliranjem najvjerojatnije odgovor na onkogene E6 i E7 HPV-a. Razlike u metiliranosti navedenih gena mogu biti pokazatelji prognoze te progresije pojedinih tumora glave i vrata te, po mogućnosti, odgovor na pitanje zašto kod nekih ljudi dolazi do razvoja ovih tumora, dok kod drugih ne, bez obzira na infekciju HPV-om.

72 stranice, 11 slika, 6 tablica, 220 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

**Ključne riječi:** oralni i orofaringealni tumori, imunosni sustav, epigenetičke promjene, HPV

Mentorica: dr. sc. Nina Milutin Gašperov

Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Inga Marijanović, izv. prof. dr. sc. Ana Galov, doc. dr. sc. Silvija Černi

Rad prihvaćen: Na sastanku povjerenstva za diplomske radove održanom 07.02.2020.

## **METHYLATION OF IMMUNE GENE PROMOTERS IN HUMAN HEAD AND NECK CANCER**

PETRA ANIĆ

Roosveltov square 6, 10000 Zagreb, Croatia

The proportion of human head and neck (HNC) cancer that can be attributable to human papilloma virus (HPV) infection is growing. A potential factor responsible for the emergence of HPV-positive HNC is a change in the degree of methylation of gene promoters that play a key role in the immune response. In this study, we investigated the difference in methylation of *EDARADD*, *IL12RB*, *MARCO*, *HLA DPB*, *GBP*, *SIGLEC* and *HAVCR2* gene promoters, in samples of healthy oral mucosa versus samples of oral and oropharyngeal tumors. The presence of HPV infection in samples was examined. To determine the difference in methylation of those gene promoters, isolated DNA was subjected to chemical modification by sodium bisulfite and amplified by methylation-specific PCR method. Analyzed genes showed hypomethylation in samples of oral and oropharyngeal tumors compared to normal tissue. Proportion of unmethylated promoters is higher in HPV-positive tumors than in HPV-negative tumors, indicating that their activation by demethylation is most likely a response to HPV oncogenes E6 and E7. These differences may be indicators of the prognosis and the progression of individual HNC and answer to the question why some people develop HNC, while others not, regardless of HPV infection.

72 pages, 11 figures, 6 tables, 220 references, original in: croatia

Thesis deposited in the Central Biological Library.

**Key words:** oral and oropharyngeal tumors, immune system, epigenetic changes, HPV

Supervisor: Nina Milutin Gašperov, PhD

Reviewers: Associate Professor Inga Marijanović, PhD, Associate Professor Ana Galov, PhD, Assistant Professor Silvija Černi, PhD

Thesis accepted: At the meeting of commission for graduation thesis held 07.02.2020.

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1.Tumori glave i vrata čovjeka .....	1
1.1.1.Tumori usne šupljine.....	1
1.1.2.Tumori orofarinksa .....	3
1.1.3.Epidemiologija tumora glave i vrata čovjeka. ....	3
1.2.Humani papiloma virus (HPV) .....	4
1.2.1.Genom HPV-a.....	4
1.2.2.Klasifikacija genotipova HPV-a .....	6
1.2.3.Regulacija replikacije i transkripcije HPV-a .....	8
1.2.4.Epidemiologija HPV-a u svijetu i u Hrvatskoj .....	10
1.2.5.Onkogeni potencijal HPV-a.....	12
1.2.6.Metode detekcije i genotipizacije HPV-a .....	14
1.3.Epigenetičke promjene.....	16
1.3.1.Histonske modifikacije .....	17
1.3.2.miRNA.....	19
1.3.3.Metiliranje DNA .....	20
1.3.4.Epigenetičke promjene u karcinogenezi .....	21
1.4.Metiliranje gena i imunski odgovor u tumorima glave i vrata (HNC) ....	23
1.4.1.Metiliranost gena u karcinomima .....	24
1.4.2.Imunski odgovor .....	25
1.4.3.Poremećaji imunskog sustava kod HNC.....	26
1.4.4.Ciljni geni koji imaju funkciju u imunskom sustavu .....	27
1.5.Metode otkrivanja metilirane DNA .....	30
<b>2. CILJ I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA</b> .....	33
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	34
3.1.Uzorci.....	34
3.2.Izolacija DNA .....	36
3.3.Bisulfitna konverzija DNA .....	37
3.4.Metoda lančane reakcije polimerazom specifične za metilaciju (MSP) ....	37
3.5.Elektroforeza u agaroznom gelu .....	40
3.6.Određivanje metiliranosti pojedinog genskog promotora.....	40
<b>4. REZULTATI</b> .....	41
4.1.Pozitivna i negativna kontrola lančane reakcije polimerazom specifične za metilaciju .....	41
4.2.Uzorci DNA izolirani iz obrisaka zdrave oralne sluznice .....	41

4.3. Metiliranost promotora gena imunosnog sustava kod obrisaka zdrave oralne sluznice .....	41
4.4. Uzorci DNA izolirani iz svježeg tkiva oralnih i orofaringealnih tumora čovjeka .....	43
4.5. Metiliranost promotora gena imunosnog sustava kod oralnih i orofaringealnih tumora čovjeka .....	44
4.6. Metiliranost promotora gena imunosnog sustava kod oralnih i orofaringealnih tumora čovjeka s obzirom na HPV-status .....	45
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>47</b>
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>53</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>55</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>72</b>



## **Popis kratica**

- 3' (5') UTR:** 3' (5') netranslatirana regija (*Untranslated Region*)
- APC:** antigen prezentirajuća stanica (*Antigen-Presenting Cell*)
- C:** dušična baza citozin (*Cytosin*)
- CD:** klaster diferencijacije (*Cluster of Differentiation*)
- CDKs:** ciklin ovisne kinaze (*Cyclin - Dependent Kinases*)
- DC:** dendritičke stanice (*Dendritic Cells*)
- ddNTP:** dideoksinukleotid trifosfat (*dideoxyNucleotide TriPhosphate*)
- DNA:** deoksiribonukleinska kiselina (*Deoxyribonucleic Acid*)
- DNMT1, 3a, 3b:** DNA metiltransferaza 1, 3a, 3b (*DNA-Methyltransferase 1, 3a, 3b*)
- E 1-7:** rani geni HPV genoma (*Early*)
- EDA:** ektodisplazin A (*Ectodysplasin A*)
- EDAR:** receptor ektodisplazina A (*Ectodysplasin A Receptor*)
- EDARADD:** adaptorski protein povezan s ektodisplazin A receptorom (*Ectodysplasin-A Receptor-Associated Adapter Protein*)
- GBP:** interferonom inducirani gvanilat vežući protein (*Interferon-induced Guanylate-Binding Protein*)
- HAT:** histon-acetiltransferaze (*Histone Acetyltransferase*)
- HAVCR:** stanični receptor virusa hepatitisa A (*Hepatitis A Virus Cellular Receptor*)
- HDAC:** histon-deacetilaza (*Histone Deacetylase*)
- HLA DPB:** glavni kompleks histokompatibilnosti, klasa II, beta lanac (*Major Histocompatibility Complex, class II, DP Beta*)
- HMT:** histon-metiltransferaza (*Histone Methyltransferase*)
- HNC:** tumori glave i vrata (*Head and Neck Cancer*)
- HNSCC:** karcinomi skvamoznih stanica glave i vrata (*Head and Neck Squamous-Cell Carcinoma*)
- HPV:** humani papiloma virus (*Human Papilloma Virus*)
- IL12RB:** beta podjedinica interleukinskog receptora 12 (*Interleukin 12 Receptor Subunit Beta*)
- L 1-2:** kasni geni HPV genoma (*Late*)
- MARCO:** receptor makrofaga s kolagenom strukturom (*Macrophage Receptor with Collagenous Structure*)
- MHC:** glavni kompleks histokompatibilnosti (*Major Histocompatibility Complex*)
- mRNA:** glasnička ribonukleinska kiselina (*messenger Ribonucleic Acid*)
- miRNA:** male, nekodirajuće RNA molekule (*MicroRNA*)
- NKC:** stanice prirodne ubojice (*Natural Killer Cells*)
- OPC:** orofaringealni karcinom (*Oropharyngeal Cancer*)
- OPSCC:** orofaringealni skvamozni karcinom glave i vrata (*Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma*)
- PAMP:** molekularni obrazac povezan s patogenom (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*)
- PCR:** lančana reakcija polimerazom (*Polymerase Chain Reaction*)
- pRB:** protein retinoblastoma (*Retinoblastoma protein*)

**PRR:** receptor koji prepoznaje obrazac patogena (*Pattern Recognition Receptors*)  
**SIGLEC:** lektin tipa imunoglobulina koji veže sialinsku kiselinu (*Sialic acid-binding Immunoglobulin-type Lectin*)  
**T:** dušićna baza timin (*Thymin*)  
**TA:** tumorski antigen (*Tumor antigen*)  
**Tcl:** citotoksični T limfocit (*cytotoxic T lymphocyte*)  
**Th1, 2:** pomoćnički limfociti T tipa 1 i 2 (*Type 1,2 T helper*)  
**TS:** tumor-supresorski gen (*Tumor Supressor*)  
**U:** dušićna baza uracil (*Uracil*)

# 1. Uvod

## 1.1. Tumori glave i vrata čovjeka

Tumori ili neoplazije označuju masu izmijenjenih stanica koje pokazuju nepravilan i progresivan rast do kojeg dolazi zbog utjecaja unutrašnjih ili vanjskih faktora. Osobine tumorskih stanica su nekontrolirani rast, izbjegavanje apoptoze, rast stanica u više slojeva, abnormalnost jezgre, nediferenciranost stanica, utišavanje tumor-supresorskih gena (TS, engl. *Tumor Suppressor*), poticanje aktivacije onkogeni, nepostojanje kontaktne inhibicije te promjena staničnog okruženja (Nakić i Žižić 2001).

Tumori glave i vrata čovjeka heterogena su skupina tumora koji, prema Međunarodnoj klasifikaciji bolesti (ICD-10, engl. *10th revision of the International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*), zahvaćaju kožu glave i vrata (C43, C44), usnice, usnu šupljinu, orofarinks, epi- i hipofarinks, žlijezde slinovnice (C0-C14), larinks, paranazalne sinuse (C30-C32) te štitnjaču i paratireoidne žlijezde (C73, C75.0). Razvijaju se iz višeslojnog pločastog epitela sluznice koja prekriva cijelo to područje, no područja koja su najčešće zahvaćena su gornji aerodigestivni trakt, odnosno usna šupljina, farinks i larinks (*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision*, <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en>). Većina tih tumora klasificiraju se kao planocelularni karcinomi glave i vrata (HNSCC, engl. *Head and Neck Squamous-Cell Carcinoma*) (Sano i Oridate 2016).

### 1.1.1. Tumori usne šupljine

Usna šupljina početni je dio probavnog sustava koji zauzima prostor između usana, obraza i zubnih lukova (usno predvorje ili *vestibulum oris*) i prostor između zubi i ždrijela (prava usna šupljina ili *cavum oris*). Oblaže je sluznica koja u kontinuitetu prelazi sa sluznice usni i obraza na sluznicu vanjske strane gingive zubi gornje i donje čeljusti (Jalšovec i Pološki 2005).

Kako bismo jednoznačno okarakterizirali tumore i svrstali ih u pojedine stadije koristimo TNM klasifikaciju (engl. *Tumor, Node, Metastasis classification*), gdje T označava primarni tumor vrijednosti 0-4, N regionalnu metastazu vrijednosti 0-3, a M udaljenu metastazu vrijednosti 0 ili 1. UICC (engl. *International Union Against Cancer*) i AJCC (engl. *American Joint Committee on Cancer*) su 2003. godine dali trenutno važeću klasifikaciju za tumore usne šupljine (Tablica 1.) (Greene i sur. 2002).

**Tablica 1.** TNM klasifikacija tumora usne šupljine

T	Primarni tumor
T1	< 2 cm
T2	> 2 - 4 cm
T3	> 4 cm
T4a	Zahvaćen kortikalis, vanjski mišić jezika, maksilarni sinus, koža
T4b	Zahvaćen mastikatorni prostor, pterigoidni nastavci, baza lubanje oko karotis interne
N	Regionalne metastaze
N0	Nema
N1	Jedan homolateralni čvor do 3 cm
N2a	Jedan homolateralni čvor od 3 do 6 cm
N2b	Više homolateralnih čvorova do 6 cm
N2c	Kontralateralni čvor ili bilateralni čvor
N3	Jedan homolateralni čvor > 6 cm
M	Udaljene metastaze
M0	Nema
M1	Ima
Stadij bolesti	TNM
Stadij 1	T1N0M0
Stadij 2	T2N0M0
Stadij 3	T3N0M0 ili T1-3 N1M0
Stadij 4	T4 ili N2-3 ili M1

### 1.1.2. Tumori orofarinksa

Ždrijelo (*pharynx*) je cjevasti organ smješten između usta i jednjaka, a koji se dijeli na *pars nasalis pharyngis* (*nasopharynx* ili *epipharynx*), *pars oralis pharyngis* (*mezopharynx* ili *oropharynx*) i *pars laryngea pharyngis* (*hypopharynx* ili *laryngopharynx*). Orofarinks ili mezofarinks područje je koje se anatomski proteže od zamišljene horizontalne plohe koju čini meko nepce do zamišljene plohe koja prolazi kroz gornji rub epiglotisa. Područje orofarinksa prekriveno je nekeratinizirajućim pločastim epitelom.

Tumori u području orofarinksa mogu biti benigni i maligni te najčešće zahvaćaju latelarnu stijenku ždrijela te krajnike. Benigni tumori su rijetki, a mogu se pojaviti kao papilomi, fibromi, lipomi, pleomorfni adenomi, hemangiomi, hondromi, limfangiomi te neurinomi. Maligni tumori orofarinksa najčešće su epitelnog podrijetla, među kojima je planocelularni karcinom najčešćiji, dok su rjeđi adenokarcinom i cilindrom (adenoidcistični karcinomi) (Bumber i sur. 2004).

### 1.1.3. Epidemiologija tumora glave i vrata čovjeka

Tumori glave i vrata čovjeka sedmi su po udjelu u ukupnom broju tumora u svijetu (3-5% ukupnog broja tumora), šesta najčešća vrsta tumora u Europi s više od 150 000 novih pacijenata dijagnosticirano svake godine (<http://www.ecpc.org/activities/policy-and-advocacy/policy-initiatives/head-neck-cancer-make-sense-campaign>). Postoje dva osnovna čimbenika rizika za tumore glave i vrata (HNC, engl. *Head and Neck Cancer*): (1) uporaba duhana i alkohola i (2) humani papiloma virus (HPV, *Human papilloma virus*). U prošlosti je većina slučajeva HNC-a bila povezana s uporabom duhana i alkohola, ali tijekom proteklog desetljeća HPV je prepoznat kao još jedan važan uzročnik HNC-a. Učestalost HPV-negativnih, kao i HPV-pozitivnih HNC raste s dobi pacijenta te su obje skupine HNC-a učestalije među muškarcima nego ženama (Gillison 2008).

Tumori usne šupljine te tumori orofarinksa najzastupljeniji su kod muške populacije u Indiji (čini 22,9% svih tumora), dok je kod žena rjeđe zastupljen (Dikshit 2012). Osim u jugoistočnoj Aziji, u Brazilu je također zabilježena visoka stopa pojave tumora usne šupljine, gdje je među muškarcima stopa incidencije 10,64 na 100 000, a među ženama znatno niža te iznosi 3,76 (<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=tabelaestados.asp&UF=BR>).

U Europi najveća stopa incidencije je u centralnoj i istočnoj Europi te Francuskoj (Diz i sur. 2017).

Učestalost HPV-pozitivnih tumora orofarinksa (OPC, engl. *Oropharyngeal Cancer*) i dalje kontinuirano raste, s trostrukim porastom od 1988. do 2004. u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD). U posljednjih 20 godina u SAD detekcija HPV-a u OPC-u povećana je sa 16% na 73% (Chaturvedi i sur. 2011). Procjenjuje se da se 70% do 80% OPC-a sada povezuje s infekcijom HPV-om u SAD-u i zapadnoj Europi, a značajno niži udio HPV-pozitivnih OPC-a zabilježen je u drugim regijama (O'Sullivan 2016). Nadalje, u Švedskoj je udvostručenje incidencije karcinoma krajnika od 1970. do 2007. dovelo do izvještaja o "epidemiji karcinoma izazvanog virusom" (Nasman 2009). Slični trendovi zabilježeni su i u drugim razvijenim zemljama, dok točnih podataka za Hrvatsku nema.

## **1.2. Humani papiloma virus (HPV)**

HPV je uključen u gotovo sve slučajeve raka vrata maternice, 99,7% (Walboomers i sur. 1999). Rani onkoproteini HPV-a, E6 i E7 odgovorni su za zloćudni fenotip, uglavnom putem inaktivacije TS gena, kao što su p53 i pRB. Ranije studije, procjenjujući različite biljege izloženosti i virusne aktivnosti u tumorima, pokazuju da HPV također može igrati ulogu u nekim tumorima usne šupljine i orofarinksa (Shah 1998). U nekoliko studija istraživala se učestalost HPV-a u tim tumorima, ali rezultati detekcije HPV-a uvelike variraju, ovisno o populaciji, vrsti uzorka i metodi otkrivanja. Posebno su zahvaćena područja orofarinksa i krajnika, gdje je najzastupljeniji HPV tip 16 (Gillison i sur. 2000).

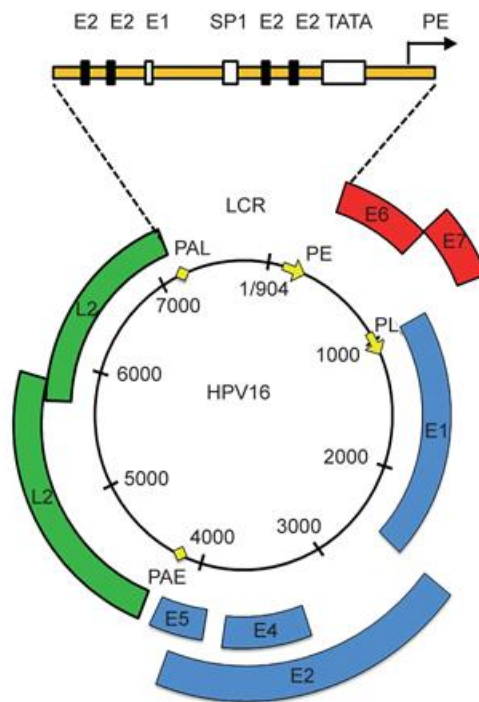
### **1.2.1. Genom HPV-a**

Papiloma virusi, u koje spada HPV, mali DNA-virusi iz porodice *Papillomaviridae*, virusi su bez ovojnice s dvolančanom molekulom DNA, a koji inficiraju stanice sluznice i epitela viših kralješnjaka, ptica i gmazova. Vrsno su specifični te uzrokuju širok spektar dobroćudnih i zloćudnih promjena u stanicama domaćina (de Villiers i sur. 2004).

HPV sadrži kružnu dvolančanu molekulu DNA veličine između 6 800 i 8 000 parova baza. Između dvije glavne regije, rane i kasne, odjeljene kontrolnom regijom

lokusa (LCR, engl. *Locus Control Region*), obično se nalazi 8 otvorenih okvira čitanja (ORF, engl. *Open Reading Frame*) (Doorbar 2006; Zheng i Baker 2006).

Regija LCR, veličine 400-850 pb, sadrži brojne *cis*-aktivirajuće elemente koji predstavljaju niz veznih mjesta za različite transkripcijske faktore koji reguliraju ekspresiju gena HPV-a (Bernard 2002). U tzv. ranoj regiji (E, engl. *Early*) nalaze se geni E1 i E2, koji su neophodni za virusnu replikaciju (Mohr i sur. 1990; Frattini i Laimins 1994). Geni E1 i E2 kodiraju rane proteine koji igraju bitnu ulogu u virusnoj replikaciji i transkripciji. Protein E2 je DNA-vezujući protein koji prepoznaje palindromski slijed 5' AACCG(N)<sub>4</sub>CGG TT3' (Dell i sur. 2003). Protein E1 je DNA-helikaza koja, nakon što protein E2 prepozna palindromski slijed, zajedno s proteinom E2 usmjerava replikacijsku mašineriju DNA stanice domaćina do mjesta početka replikacije virusne DNA (Conger i sur. 1999; Loo i Melendy 2004). Geni E6 i E7 kodiraju za onkoproteine odgovorne za transformaciju i imortalizaciju stanica domaćina (Phelps i sur. 1988.; Scheffner i sur. 1990; Werness i sur. 1990). Iako funkcije ostalih ranih gena nisu u potpunosti razjašnjene, smatra se da protein E4 utječe na citoskelet stanice domaćina (Doorbar i sur. 1991), dok E5 služi kao pomoćni transportni protein (Leptak i sur. 1991). Moguća je i njihova uloga u umnožavanju virusnog genoma (Fehrmann i sur. 2003; Nakahara i sur. 2005). Geni kasne regije, L1 i L2 (L, engl. *Late*), kodiraju za kapsidne proteine virusnih čestica, gdje L1 kodira za glavne, a L2 za sporedne kapsidne proteine (Modis i sur. 2002) (Slika 1.).



**Slika 1.** Organizacija episomskog oblika genoma Humanog papiloma virusa tipa 16  
(preuzeto iz Santos-López i sur. 2015)

### 1.2.2. Klasifikacija genotipova HPV-a

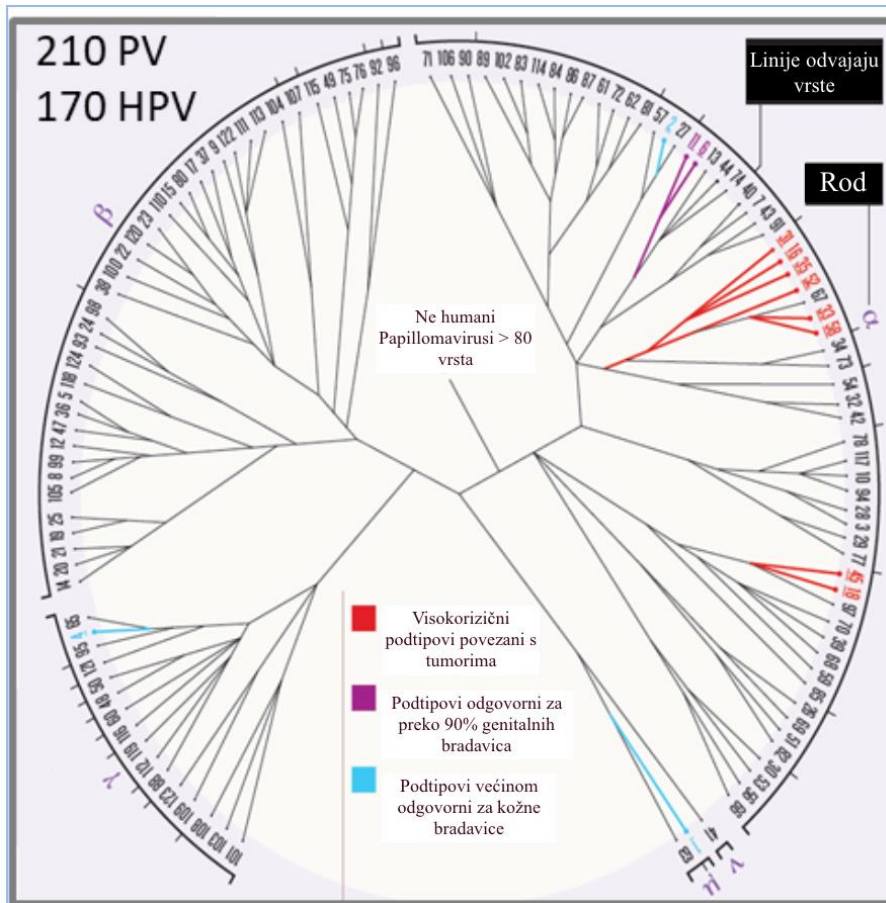
Pošto je nukleotidni slijed L1 područja virusa najkonzerviraniji dio genoma HPV-a, za klasifikaciju ta regija predstavlja temelj za usporedbu slijedova novih izolata (IARC 2007). Papiloma virusi filogenetski se dijele u 29 rodova, gdje je manje od 60% nukleotidnog slijeda gena L1 zajedničko među različitim rodovima (de Villiers i sur. 2004) (Slika 2.).

Prema sukladnosti nukleotidnih nizova L1 područja, HPV viruse dijelimo u kategorije, gdje izolat određenog tipa čiji se slijed nukleotida u tom području razlikuju za više od 10% od nekog drugog tipa dobiva novi broj. Tipove HPV-a dijelimo u rodove Alfa, Beta, Gama, Mu i Nupapillomavirus (Doorbar i sur. 2012). Do danas je poznato 65 tipova HPV-a klasificiranih kao Alfa-papilomavirusi koji inficiraju oralnu sluznicu, sluznicu genitalnog trakta te druge mukozne epitele (Schiffman i sur. 2016). Postoje i genotipovi koji mogu uzrokovati nastanak kožnih bradavica kao što s HPV tip 2, HPV



tip 3, HPV tip 27 i HPV tip 57 te spadaju u Mu- i Nupapilomaviruse (Vince i Židovec-Lepej 2010). Tipovi iz roda Beta najčešće inficiraju kožu (Doorbar 2006). Ukoliko je razlika 2-10% u nukleotidnom slijedu L1 područja, virus se označava kao podtip. Varijantama označavamo izolate istog tipa koji imaju manje od 2% razlike u neukleotidnom slijedu L1 područja u odnosu na referentni tip (Bernard 2005).

Do danas je opisano više od 200 različitih tipova HPV-a, a za njih više od 100 se zna i nukleotidni slijed ([www.hpvcenter.se](http://www.hpvcenter.se)). Identificirano je 15 tipova HPV-a za koje se zna da imaju visokorizični onkogeni potencijal (HPV tipovi: 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 i 70) (Sano i Oridate 2016) te se oni povezuju s nastankom cervikalnih tumora, rijetkih anogenitalnih tumora te orofaringealnih tumora skvamoznih stanica (OSCC, engl. *Oropharyngeal Squamous Cell Cancer*) (Marur i sur. 2010). Postoje i niskorizični tipovi (HPV tipovi: 6, 11, 42, 43 i 44) koji su uglavnom povezani s nastankom dobroćudnih genitalnih bradavica, respiratornom papilomatozom i oralnom fokalnom epitelnom hiperplazijom (Sano i Oridate 2016). HPV tipovi: 26, 53 i 66 svrstavaju se u skupinu tipova s neutvrđenim karcinogenim potencijalom (Schiffman i sur. 2009).



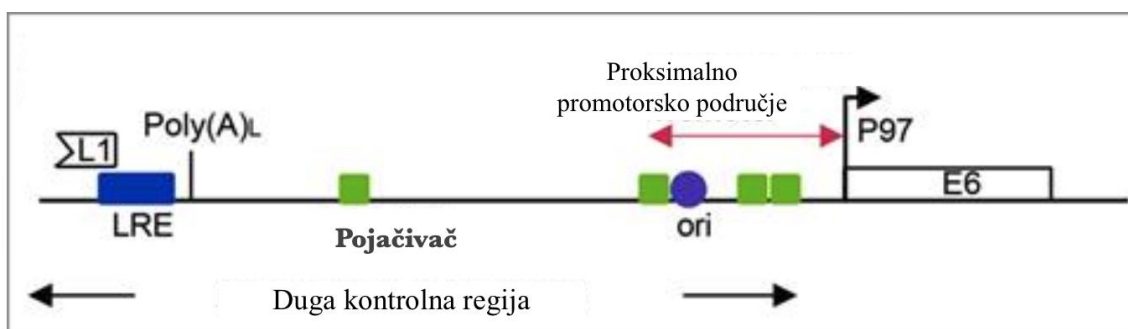
**Slika 2.** Filogenetsko stablo Humanog papiloma virusa; HPV- Humani papiloma virus; PV- Papiloma virusi (preuzeto od Crow 2012.)

### 1.2.3. Regulacija replikacije i transkripcije HPV-a

Genomi HPV-a ne kodiraju polimeraze ili druge enzime potrebne za virusnu replikaciju te zbog toga ovise o proteinima replikacije stanice domaćina. Replikacija papilomavirusa je niža u nediferenciranim stanicama, a raste s povećanjem diferenciranosti stanice. Protein E2 prepoznaje ishodište replikacije (*ori*) koje je dugo 80-140 pb, smješteno unutar regije LCR, djelomično se preklapa s promotorom E6 te sadrži nekoliko veznih mjesta za protein E2. Osim toga, *ori* sadrži vezna mjesta za protein E1, koja su okružena veznim mjestima proteina E2 (Lee i sur. 1998). Protein

E2 prepoznaje *ori*, veže se te privlači protein E1 (Berg i Stenlund 1997). Nakon vezanja proteina E1 za *ori*, protein E2 se otpušta, a heksamer proteina E1 u međudjelovanju s ostalim proteinima stanice domaćina počinje kao helikaza odmatati DNA HPV-a (White i sur. 2001) (Slika 3.).

Na početak replikacije HPV-a utječe prisutnost proteina E1 i E2 te stanični faktori, koji djeluju s E2 i vežu se na vezna mjesta unutar LCR i mijenjaju konformaciju nukleosoma (Lin i sur. 2005).



**Slika 3.** Složenost kontrolne regije lokusa Humanog papiloma virusa tipa 16. Otvoreni okvir čitanja gena *E6* prikazan je kao pravokutnik. Kraj otvorenog okvira čitanja gena *L1* prikazan je kao djelomično otvoreni pravokutnik. Rani promotor (P97) je označen strelicom. Proksimalno promotorsko područje označeno je dvostrukom strelicom crvene boje. Četiri mjesta vezivanja E2 u kontrolnoj regiji lokusa označena su zelenim kvadratima. Početak replikacije (*ori*) na koje se veže E1 prikazano je kao ljubičasti krug. Mjesto kasne poliadenilacije označeno je Poly(A)L i ravnom crtom. Kasni regulatorni element koji kontrolira kasnu ekspresiju gena označen je plavim pravokutnikom (preuzeto od Graham i sur. 2017).

Svi se virusni geni prepisuju s istog lanca molekule DNA (Zheng i Baker 2006). Postoje dva glavna promotora unutar LCR regije (Smotkin i Wettstein 1986) s kojih se prepisuju geni rane regije (promotor p97) i geni kasne regije (promotor p670) (Grassmann i sur. 1996). Istraživanjima provedenim na HPV-u tipa 31 dokazano je da aktivnost promotora za kasne gene raste s povećanjem diferencijacije inficiranih stanica (Ozbun i Meyers 1998; Terhune i sur. 1999). Područje LCR, osim tih promotorskih

regija, sadrži regije pojačivača (Cripe i sur. 1987) i utišivača (Farr i sur. 1995), za koje se vežu različiti stanični proteini, koji na taj način reguliraju transkripciju samog virusa.

#### **1.2.4. Epidemiologija HPV-a u svijetu i u Hrvatskoj**

Raspodjela pojedinih tipova HPV-a različita je kod HNC-a u usporedbi s rakom vrata maternice, budući da se HPV tipa 16 sistemski nalazi u puno većem postotku kod HNC-a nego kod raka vrata maternice. Potvrđujući rezultate nekoliko drugih studija, istraživanja Katalonskog instituta za onkologiju (ICO, engl. *The Catalan Institute of Oncology*) utvrdila su da je HPV tipa 16 najčešće detektirani genotip u tumorima glave i vrata pozitivnim na HPV (75,2%), ali opet sa širokim rasponom prema mjestu pojave raka: 83% u orofarinksu, 68,8% u usnoj šupljini, a 50,8% u larinksu (Castellsagué i sur. 2017).

Na svjetskoj razini, 570 000 slučajeva raka godišnje kod žena i 60 000 slučajeva kod muškaraca pripisuje se HPV-u, odnosno 8,6% i 0,8% svih karcinoma koji se pojavljuju širom svijeta. Među karcinomima koji se mogu pripisati HPV-u dominira rak vrata maternice, koji predstavlja 83% svih slučajeva raka povezanih s HPV-om. Geografska varijacija ističe kontrast između raka vrata maternice (koji se javlja pretežno u manje razvijenim zemljama) i HNC-a povezanog s HPV-om (javlja se uglavnom u Sjevernoj Americi i Sjevernoj Europi). Učestalost pojedinih tipova HPV-a različita je u različitim zemljopisnim područjima (Clifford, i sur. 2003), dok je incidencija infekcije HPV-om najveća u Africi i Južnoj Americi, a najmanja u Europi. Također, infekcija HPV-om je učestalija kod žena u starijoj životnoj dobi te je značajno veća pojavnost infekcije visokorizičnim tipovima nego niskorizičnim tipovima HPV-a (IARC 2007).

Oko 30% tumora orofarinksa (koji se uglavnom odnosi na krajnike i bazu jezika) uzrokuje HPV (29 000 slučajeva godišnje u svijetu). Sama pojavnost ovog karcinoma je vrlo različita u cijelom svijetu; najviša je u razvijenijim zemljama (preko 40% u Europi, Sjevernoj Americi, Australiji, Novom Zelandu, Japanu i Republici Koreji), dok je znatno niža (<20%) u drugim regijama te, u mnogim zemljama, još uvijek neizvjesna. HPV-pozitivni tumori usne šupljine pojavljuju se u 4 400 slučajeva godišnje, a grkljana u 3 800 slučajeva. U Europi i Sjevernoj Americi prosječna učestalost je oko 4% za oba slučaja karcinoma. U ostatku svijeta HPV-pozitivni tumori usne šupljine i grkljana još su rjeđi (1-2%). Za 85% karcinoma glave i vrata globalno

su odgovorni HPV tipovi 16 i 18, dok relativni doprinos HPV tipova: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 i 58 iznosi 90% (Tablica 2.) (de Martel i sur. 2017).

Najučestaliji tip HPV-a kod žena s promjenama vrata maternice u Hrvatskoj je HPV tip 16 s učestalošću od 15,9% (Milutin-Gašperov i sur. 2007). Osim tipa 16, zastupljeni su i HPV tipovi: 31, 6, 11, 33, 18, 52, 45 te 58, redom. Pojavnost visokorizičnih tipova HPV-a smanjuje se s povećanjem dobi ispitanica, a povećava se s većim stupnjem citološke dijagnoze (Milutin Gašperov i sur. 2007; Milutin Gašperov i sur. 2008).

U svijetu, godišnje se dogodi oko 550 000 slučajeva HNSCC-a (engl. *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*) (Fitzmaurice 2017), a u Hrvatskoj je procijenjeno oko 750 slučajeva u 2014. godini (<http://www.iacr.com.fr>). U Hrvatskoj se između 1988. i 2008. godine pokazalo smanjenje ukupne učestalosti HNSCC-a (Znaor 2013; <https://www.hzjz.hr/en/tag/cancer-registry/>). Udio orofaringealnih skvamoznih karcinoma (OPSCC, engl. *Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma*), povezanih s HPV-om sada je približno 70% u zemljama u razvoju, što je značajno povećanje u odnosu na prethodne podatke (Taberna i sur. 2017; Mehanna i sur. 2013).

**Tablica 2.** Relativni doprinos HPV tipova 16 i 18 ili HPV tipova: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58 kod tumora povezanih s HPV-om na osnovi mjesta pojave tumora i spolu; World, 2012.

HPV povezana mjesta pojavnosti tumora (ICD-10 code)	Učestalost pojave tumora <sup>1</sup>	Relativni doprinos HPV tipa 16 i 18 <sup>2</sup>		Relativni doprinos HPV tipova 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58 <sup>2</sup>	
		%	Broj	%	Broj
Maternica (C53)	530000	70,8	370000	89,5	470000
Anus(C21)	35000	87,0	30000	95,9	33000
Stidnica (C51)	8500	72,6	6200	87,1	7400
Vagina (C52)	12000	63,7	7400	85,3	9900
Penis (C60)	13000	70,2	9100	84,6	11000
Glava i vrat (C01-06, C09-10, C32)	38000	84,9	32000	89,7	34000
Ukupno HPV povezanih mjesta kod žena	570000	71,4	410000	89,6	510000
Ukupno HPV povezanih mjesta kod muškaraca	60000	82,3	50000	90,4	55000
Ukupno HPV povezanih mjesta	630000	72,4	460000	89,7	570000

<sup>1</sup>Preuzeto od Plummer, de Martel i sur. 2017.

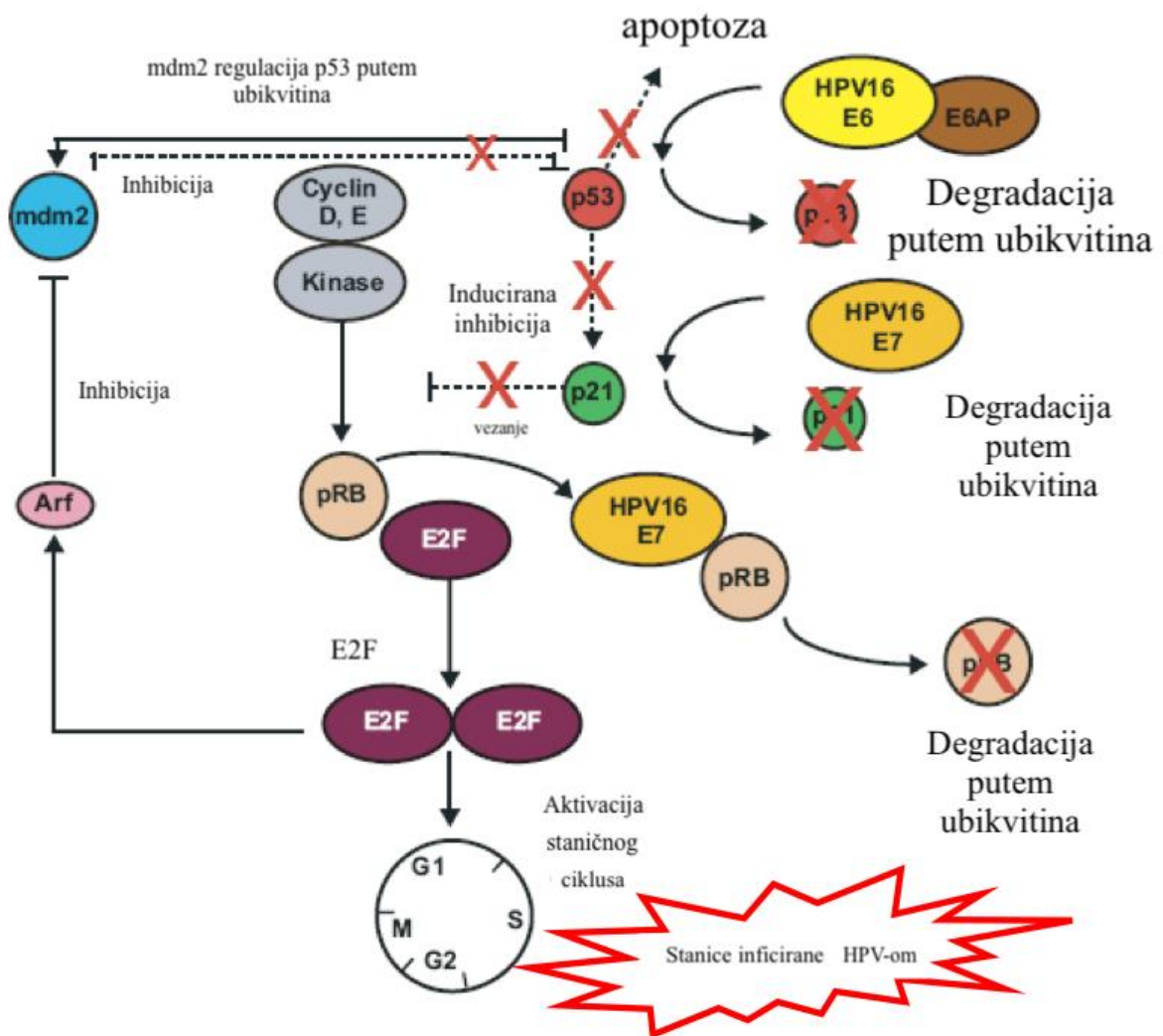
<sup>2</sup>Preuzeto od Serrano i sur. 2018; Alemany i sur. 2015; Castellsaguel i sur. 2017.

### 1.2.5. Onkogeni potencijal HPV-a

Humani papilloma virus inducira proliferaciju bazalnih i parabazalnih stanica, što dovodi do hiperplazije epitela ili papilomatoze s različitim produžecima. Ovaj onkogeni potencijal rezultat je aktivnosti virusnih proteina E5, E6 i E7 (Haller i sur. 2009). Ti onkoproteini rezultiraju kontinuiranim staničnim umnažanjem i nemogućnošću popravljivanja mogućih oštećenja na njihovom genetskom materijalu i na taj način akumuliraju oštećenja, aneuploidije i mutacije koje mogu dovesti do razvoja karcinoma (Vousden 1993; Sandal 2002). Izmijenjeni su brojni putevi proteina normalnih stanica, poput onih koji su uključeni u diobe i apoptotičke procese (Moody i Laimins 2010). Protein E7 veže se na proteine iz porodice TS pRB (engl. *Retinoblastoma protein*) te ih razgrađuje, a kao rezultat dolazi do nekontrolirane aktivacija faktora transkripcije E2F koji potiče aktivaciju staničnog ciklusa, tj. ulazak u S fazu staničnog ciklusa. Nadalje, E7 ulazi u interakciju s p21 i p27, koji su važni

inhibitori ciklin ovisnih kinaza (CDK, engl. *Cyclin - Dependent Kinase*). Glavni cilj CDK je regulacija prijelaza iz G1 u S fazu staničnog ciklusa (Eichten i sur. 2004). Protein E6 također interferira s proteinima pro-apoptotičkih funkcija kao što su Bak, Bax, c-myc i p53 (Finzer i sur. 2002) (Slika 4.). Osim navedenih, kroz različite studije opisane su još mnoge stanične funkcije koje su meta onkoproteina E6 i E7, a uključuju: telomeraznu aktivnost (Duensing i Münger 2002), staničnu diobu (Duensing i sur. 2007) i apoptozu (Garnett i sur. 2006; Garnett i Duerksen-Hughes 2006).

Uloga virusnog proteina E5 u razvoju tumora sve se više istražuje. Aktivnost ovog onkoproteina podržava progresiju tumora, osobito u ranim fazama bolesti jer se funkcija gena E5 izgubi nakon što je virusna DNA integrirana u genom domaćina (DiMaio i Mattoon 2001). Jedna od najpoznatijih E5 posredovanih tumorigeničnih aktivnosti je njegova interakcija s receptorima epidermalnog faktora rasta (EGFR, engl. *Epidermal Growth Factor Receptor*), što dovodi do proliferacije stanica (Dannenberga i sur. 2005). U normalnim stanicama mitogeni signal posredovan EGF-om se zaustavlja razgradnjom EGFR-a u endosomima s niskim pH koji se održava djelovanjem vakuolarnih ATP-aza. Protein E5 djeluje tako da se veže za te vakuolarne ATP-aze, time je inaktivira te u konačnici dovodi do toga da se EGFR ne razgrađuje, a mitogeni signalni put se pojačava (DiMaio i Mattoon 2001).



**Slika 4.** Kontinuirani sinergistički učinak onkoproteina Humanog papilloma virusa tipa 16, E6 i E7, na stanični ciklus (preuzeto od ECCA 2005)

### 1.2.6. Metode detekcije i genotipizacije HPV-a

Metode otkrivanja HPV-a koje se danas koriste mogu se podijeliti na metode ciljanog i signalnog umnažanja. Metode ciljane amplifikacije koriste polimerazu nukleinskih kiselina, ciljane oligonukleotide (početnice) i mješavinu četiri (deoksi)ribonukleotida kako bi se umnožio niz nukleinskih kiselina do razine na kojoj se može lako otkriti pomoću jednog od mnogih sustava za čitanje koji su dostupni. Najčešće korištena metoda koja se temelji na umnažanju je lančana reakcija



polimerazom (PCR, engl. *Polymerase Chain Reaction*), "ciklična" eksponencijalna metoda umnažanja DNA, koja koristi ponavljajuće cikluse s izmjenama temperature za denaturaciju ciljane DNA, vezanje početnica te produženje istih termostabilnom DNA polimerazom. U uporabi je više tipova PCR analiza za detekciju i genotipiziranje HPV-a s različitim sustavima za očitavanje (Brink i sur. 2007). Kod korištenja metode PCR-a, za utvrđivanje prisutnosti DNA HPV-a koristimo univerzalne početnice, koje su komplementarne konzerviranim regijama genoma HPV-a. Pomoću njih možemo utvrditi prisutnost DNA HPV-a, ali ne i o kojem se tipu HPV-a radi. U studijima vezanim za oralnu i orofaringealnu sluznicu, uglavnom se koriste FAP59/FAP64 početnice koje omogućavaju umnažanje L1 regije zajedničke za 67 različitih tipova HPV-a (Forslund i sur. 1999) ili CP65/CP70 i CP66/CP69 početnice za L1 regiju zajedničke barem 19 tipova HPV-a (Berkhout i sur. 1995). Nadalje, o kojem se tipu HPV-a radi možemo odrediti tako da umnoženom produktu odredimo slijed nukleotida sekvenciranjem, zatim analizom fragmenata različite duljine dobivenih cijepanjem restriktivnim enzimima (RFLP, engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Bernard i sur. 1994) te korištenjem specifičnih proba koje hibridiziramo s umnoženim produktom (Gravitt i sur. 1998).

Iako je umnažanje molekule DNA cilj PCR-a, mRNA se također može umnožiti ako reakciji prethodi korak obrnute transkripcije, gdje se prvo stvara komplementarni (cDNA) lanac iz mRNA, metodom koja se naziva RT-PCR (engl. *Reverse Transcription PCR*). Pored toga, razvijene su izotermne metode umnažanja, poput NASBA (engl. *Nucleic acid sequence-based amplification*), koja se izvodi pri konstantnoj temperaturi koja se približava optimumu polimeraze. S obzirom na nedostatak temperaturnih prekidača, ove su metode posebno prikladne za umnažanje mRNA jer nije potreban korak denaturacije toplinom da bi ciljano mjesto bilo dostupno za vezanje početnica (Kievits i sur. 1991). Pokazalo se da su žene s infekcijom HPV-om koje su RNA-pozitivne u većoj opasnosti od progresije bolesti nego one koje su samo DNA-pozitivne (Grce i sur. 2010).

Metode signalnog umnažanja temelje se na početnom koraku hibridizacije nukleinskih kiselina u uzorku s ciljanim probama u tekućoj fazi ili *in situ* na stanicama ili stanicama tkiva, nakon čega se signal (tj. hibridizacija) pojačava i na kraju vizualizira jednom od dostupnih metoda.

Danas je u uporabi i imunohistokemijska metoda dokazivanja koja koristi p16<sup>INK4a</sup> (inhibitor ciklin ovisne kinaze) kao biljeg u svrhu lokalizacije, HPV-om

uzrokovane, displazije (Klaes i sur. 2001). Osim toga, koriste se i rekombinantna (monoklonalna) protutijela za kasne i rane proteine HPV-a (IARC 2007).

Genotipizacija HPV-a se jednostavno može dobiti metodom hibridizacije na traci, gdje su HPV-probe vezane na najlon-traci te dolazi do inverzne hibridizacije produkata PCR-a za te vezane probe. Postoji više komercijalno dostupnih testova za genotipizaciju najčešćih tipova HPV-a, a najviše su u upotrebi *Linear Array HPV Genotyping Test* (Roche) i *INNO-LiPA HPV Genotyping Extra* (Fujirebio). *INNO-LiPA HPV Genotyping Extra* omogućuje razlučivost 32 različitih tipova HPV-a ([www.fujirebio.com](http://www.fujirebio.com)), dok *Linear Array HPV Genotyping Test* omogućuje razlučivost 37 tipova HPV-a (Sabol i sur. 2008).

### **1.3. Epigenetičke promjene**

Klasična genetika ne može objasniti raznolikost fenotipova unutar populacije niti kako, unatoč identičnim slijedovima DNA, monozigotni blizanci ili klonirane životinje mogu imati različite fenotipove i različitu predispoziciju pojave bolesti. Koncept epigenetike nudi djelomično objašnjenje ovih pojava. Prvo predstavljena od strane C.H. Waddington 1939. godine kao "uzročne interakcije između gena i njihovih produkata koji dovode do nastanka fenotipa", epigenetika kasnije biva definirana kao "nasljedne promjene u ekspresiji gena koje nisu posljedica nikakvih izmjena u DNA slijedu".

Najpoznatiji epigenetički marker je metiliranje DNA. Prvobitnom pronalasku globalnog hipometiliranja DNA u tumorima čovjeka (Feinberg i Vogelstein 1983) uslijedila je identifikacija hipermetiliranih TS gena (Greger i sur. 1989; Sakai i sur. 1991; Merlo i sur. 1995), a potom i, u novije vrijeme, otkrivanje inaktivacije gena pomoću mikroRNA (miRNA) (Saito i sur., 2006). Navedeni, kao i drugi primjeri kako epigenetičke promjene mogu modificirati gensku ekspresiju doveli su do projekata ljudskog epigenoma (Jones i Martienssen 2005) i epigenetičkih terapija (Mack 2006). Štoviše, poznato je da se metiliranje DNA odvija u složenoj kromatinskoj mreži i da je povezana s drugim epigenetičkim modifikacijama histona, koje su obično poremećene u stanicama tumora (Meissner 2007).

### 1.3.1. Histonske modifikacije

Kromatin čine nukleosomi sastavljeni od molekule DNA veličine 146 pb omotane oko srži koja se sastoji od po dvije kopije histonskih proteina, H2A, H2B, H3 i H4. Oni su često zahvaćeni post-translacijskim promjenama koje su bitne u regulaciji genske ekspresije i signalnim putevima (Chakravarthy i sur. 2005).

Histoni su podložni velikom broju post-translacijskih modifikacija, uključujući acetiliranje i metiliranje lizina (K) i arginina (R), fosforiliranje serina (S) i treonina (T), sumoiliranje lizina, kao i riboziliranje. Samoj kompleksnosti pridonosi činjenica da svaki ostatak lizina može prihvatiti jednu, dvije ili čak tri metilne skupine, a arginin može biti mono- ili di-metiliran. Većina ovih post-translacijskih modifikacija događa se na amino-terminalnoj i karboksi-terminalnoj domeni histona, iako je identificirano sve više primjera modifikacija unutar središnjih domena histona (Peterson i Laniel 2004).

Acetiliranje histona ovisi o ravnoteži između aktivnosti histon-acetiltransferaze (HAT, engl. *Histone Acetyltransferases*) i histon-deacetilaze (HDAC, engl. *Histone Deacetylases*). HAT dodaje acetilnu skupinu na aminokiselinu lizin, dolazi do prekida interakcije s DNA i u konačnici do odmatanja kromatina, što rezultira lakšim pristupom transkripcijskih faktora molekuli DNA. Zato u eukromatinu nalazimo veći udio acetiliranih histona, dok je manji udio acetiliranih histona prisutan u heterokromatinu (Kuo i Allis 1998).

Proces metiliranja histona na aminokiselinama lizinu (lizin 9 u histonu H3) i arginina (u histonima H3 i H4) kataliziraju enzimi iz nekoliko obitelji histon-metiltransferaza (HTMs, engl. *Histone Methyltransferases*). Metiliranje histona može dovesti do aktivacije ili inaktivacije gena, ovisno o aminokiselini i mjestu metiliranja. Tako metiliranje aminokiseline arginina dovodi do aktivacije gena, a suprotno tome metiliranje aminokiseline lizina 9 i 27 u histonu H3 dovodi do inaktivacije gena (Trievel 2004; Daniel i sur. 2005).

Kod gotovo svih histona zabilježeno je fosforiliranje, koje je ključno prilikom kondenzacije kromatina tijekom diobe stanice, kod popravka DNA i igra bitnu ulogu kod regulacije transkripcije. Fosforiliranje histona sudjeluje u angažiranju ili otpuštanju efektorskih proteina te u daljnjim kaskadnim događajima (Banerjee i Chakravarti 2011). Kod fosforiliranja histona bitnu ulogu imaju kinaze Aurora A i Aurora B koje fizički interagiraju s repom histona H3 i fosforiliraju aminokiselinu serin 10. Spadaju u obitelj serin/treonin kinaza Aurora/AIK te je zabilježeno da se povećano eksprimiraju

u tumorima kod ljudi. Inače, Aurora A i Aurora B sudjeluju u mitozu; kinaza Aurora A regulira stabilnost diobenog vretena, a Aurora B regulira segregaciju kromosoma i diobu citoplazme (Crosio i sur. 2002).

Sumoiliranje i ubikvitiniranje su post-transkripcijske promjene koje se baziraju na dodavanju malih regulatornih proteina na druge proteine. Kod ubikvitiniranja mali protein ubikvitin veže se na aminokiselinu lizin u promijenjenom proteinu te ih tako usmjerava na degradaciju, recikliranje ili mogu biti usmjereni na druga mjesta u stanici. Ovaj proces uključuje ubikvitin-aktivirajući enzim (E1), ubikvitin-konjugirajući enzim (E2) i ubikvitin-proteinske ligaze (E3) (Zhu i Wani 2010). Istraživanja su pokazala da se ubikvitirani histon, H2A, najčešće nalazi u blizini CpG otoka promotora gena koji imaju slabiju ekspresiju, dok ga ne nalazimo u blizini gena koji imaju povećanu ekspresiju (Kallin i sur. 2009).

Kod sumoiliranja dolazi do kovalentnog vezivanja malih proteina sličnih ubikvitinu (SUMO, engl. *Small Ubiquitin-like Modifier*) na druge proteine. To je reverzibilan proces koji se odvija uglavnom u jezgri te kontrolira različite stanične mehanizme, kao što su protein-protein interakcije, transport unutar stanice i mnoge druge (Lomeli i Vazquez 2011). U procesu sumoiliranja uključeni su SUMO-aktivirajući enzim (E1), SUMO-konjugirajući enzim (E2) i SUMO-ligaze (E3s). Suprotno tom procesu, kod uklanjanja SUMO-proteina sudjeluju SUMO-cijepajući proteini. SUMO-protein se najčešće dodaje na aminokiselinu lizin u motivu  $\psi$ KXE;  $\psi$  je izoleucin, leucin ili valin, X je bilo koja aminokiselina, K je lizin i E je glutaminska kiselina.

S obzirom da je kromatin fiziološka osnova za sve DNA-posredovane procese, histonske modifikacije vjerojatno kontroliraju strukturu i funkciju kromatinskih vlakana, s različitim modifikacijama koje daju različite funkcionalne posljedice. Doista, nedavna istraživanja pokazala su da kombinacije histonskih modifikacija, koje su specifične za lokaciju, dobro koreliraju s određenim biološkim funkcijama. Na primjer, kombinacija acetiliranja H4 K8, acetiliranja H3 K14 i fosforiliranja H3 S10 često je povezana s transkripcijom. Suprotno tome, tri-metiliranje H3 K9 i nedostatak acetiliranja H3 i H4 koreliraju s represijom u viših eukariota. Pojedini obrasci modifikacija histona također su u korelaciji s globalnom dinamikom kromatina, jer je diacetiliranje histona H4 na K4 i K12 povezano s taloženjem histona u S fazi, a fosforiliranje histona H2A (kod S1 i T119) i H3 (kod T3, S10 i S28) izgleda da je obilježje kondenziranog mitotskog kromatina (Peterson i Laniel 2004).

### 1.3.2. miRNA

MikroRNA (miRNA) evolucijski su sačuvane, male nekodirajuće molekule RNA, dužine 18-25 nukleotida, koje reguliraju ekspresiju gena vezanjem na 3' UTR (engl. *Untranslated Region*) ciljne mRNA. Vezanje miRNA na ciljnu mRNA obično dovodi do translacijske represije i propadanja mRNA. Procijenjeno je da transkripti više od 60% ljudskih gena nose barem jedno sačuvano mjesto za vezanje miRNA (Friedman i sur. 2009). Biogeneza miRNA kod čovjeka slijedi postupak od dva koraka s nuklearnim i citoplazmatskim cijepanjem. U jezgri se miRNA prepisuje kao dugački transkript koji se naziva pri-miRNA, bilo od strane vlastitih promotora ili dijeljenjem promotora svog domaćeg gena (Lee i sur. 2000). Za većinu miRNA, od dvije RNA polimeraze (RNA pol II i RNA pol III), smatra se da je RNA pol II odgovorna za pri-miRNA transkripciju (Chen i sur. 2004). Nuklearno cijepanje kojim pri-miRNA prelazi u pre-miRNA obavlja RNAza III endonukleaza Drosha (Lee i sur. 2002). Zatim se pre-miRNA transportira u citoplazmu interakcijom exportin-5 i Ran-GTP (Yi i sur. 2003). Sazrijevanje pre-miRNA u citoplazmi dalje vrši RNAza III endonukleaza Dicer. Dvolančana pre-miRNA se cijepa, te se jednolačana miRNA veže u RISC (engl. *RNA Induced Silencing Complex*) koji sadržava katalitičku podjedinicu Argonaut. Ciljano prepoznavanje mRNA od strane miRNA vrši se očuvanom regijom miRNA (Sanghvi i Steel 2011).

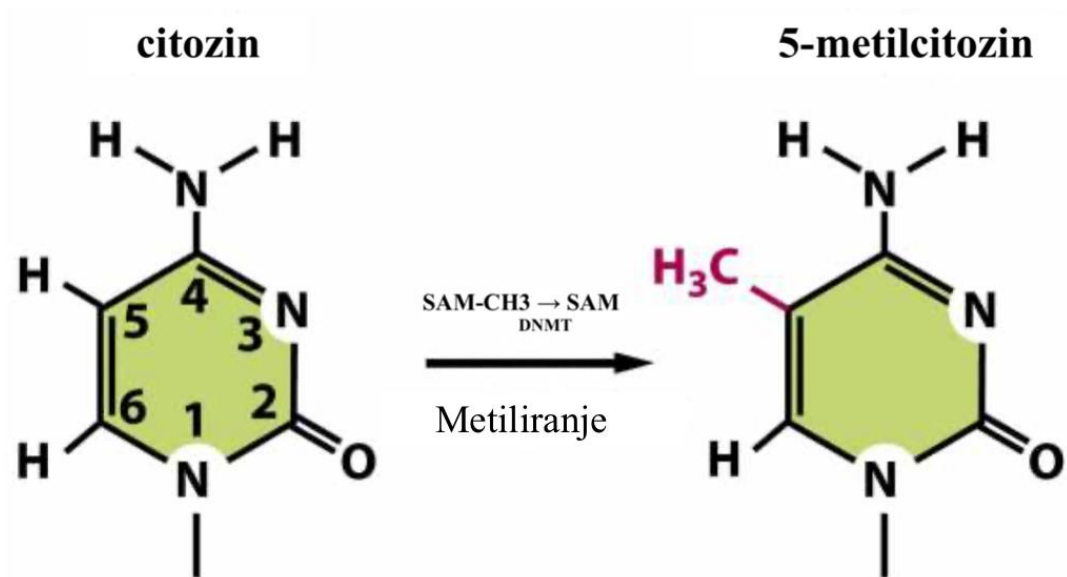
MikroRNA su kratke endogene RNA molekule koje post-transkripcijski moduliraju ekspresiju gena, a promjena u njihovoj ekspresiji primijećena je kod mnogih tumora, uključujući tumore glave i vrata. Poremećena regulacija ekspresije miRNA kod tumora u usporedbi s normalnim tkivima općenita je pojava koja je u velikoj mjeri okarakterizirana u gotovo svim neoplazijama. Smatra se da globalna represija ekspresije miRNA u stanicama tumora inducira nediferencirani fenotip. Doista, pokazano je da u stanicama karcinoma povećanje specifičnih miRNA daje agresivnost i otpornost na staničnu smrt (Di Leva i Croce 2013). Slično kao i kodirajući geni, miRNA mogu biti prekomjerno ili smanjeno eksprimirane. MikroRNA poznate su kao kritični regulatori ekspresije gena, a u karcinomu miRNA igraju ulogu u onkogenezi, metastazama i otpornosti na različite terapije. miRNA se mogu klasificirati kao onkogene („oncomiRNA“ ili „oncomiR“), TS-ske, pro-metastatske („metastamiRNA“ ili „metastamiR“) te miRNA supresori metastaza (van Schooneveld i sur. 2015). Specifični uzorci ekspresije miRNA također predviđaju prognozu i terapijski odgovor

kod HNC. Stoga, miRNA predstavljaju potencijalno obećavajuće biomarkere i terapijske ciljeve kod HNC (Ahmad i sur. 2014).

### 1.3.3. Metiliranje DNA

Metiliranje DNA, kovalentna kemijska promjena, ima kritičnu ulogu u kontroli aktivnosti gena i arhitekturi jezgre stanice. U normalnim stanicama imamo globalnu hipermetiliranost, a promotori TS gena su hipometilirani (Ehrlich, 2002). Pošto metiliranu DNA uglavnom nalazimo u nekodirajućim regijama genoma, kao što su centromerni heterokromatin, raspršeni ponavljajući elementi i drugo, dokazano je da je metiliranje obrambeni mehanizam domaćina od stranog genoma (Bird 1992). Kod ljudi se metiliranje DNA događa na dušičnoj bazi citozinu u CpG mjestima dodavanjem metilne skupine na ugljikov atom uglavnom na položaju 5. Kod biljaka se događa na mjestima CpG, CpNpG i CpNpN (Oakeley i Jost 1996). CpG mjesta nisu nasumično raspoređena u genomu; umjesto toga, postoje regije bogate CpG-ima poznate kao CpG otoci, koji obuhvaćaju 5' kraj regulatornog područja mnogih gena. Ti su otoci obično nemetilirani u normalnim stanicama (Herman i Baylin 2003).

Kod metiliranja DNA bitne su tri metiltransferaze: DNMT1 (*DNA-Methyltransferase 1*), DNMT3a i DNMT3b. DNMT1 održava obrazac metiliranja nakon stanične diobe jer metilira hemi-metiliranu molekulu DNA na CpG dinukleotidima u stanicama kćeri (Howell i sur. 2001; Walton i sur. 2011). DNMT3a i DNMT3b imaju ključnu ulogu u metiliranju DNA *de novo* te imaju isti afinitet za hemi-metiliranu i metiliranu DNA (Okano i sur. 1999; Dueñas- Gonzalez i sur. 2005) (Slika 5.).



**Slika 5.** Princip metiliranja DNA; DNMT: DNA metiltransferaza; SAM: S-adenozilmononukleotid.

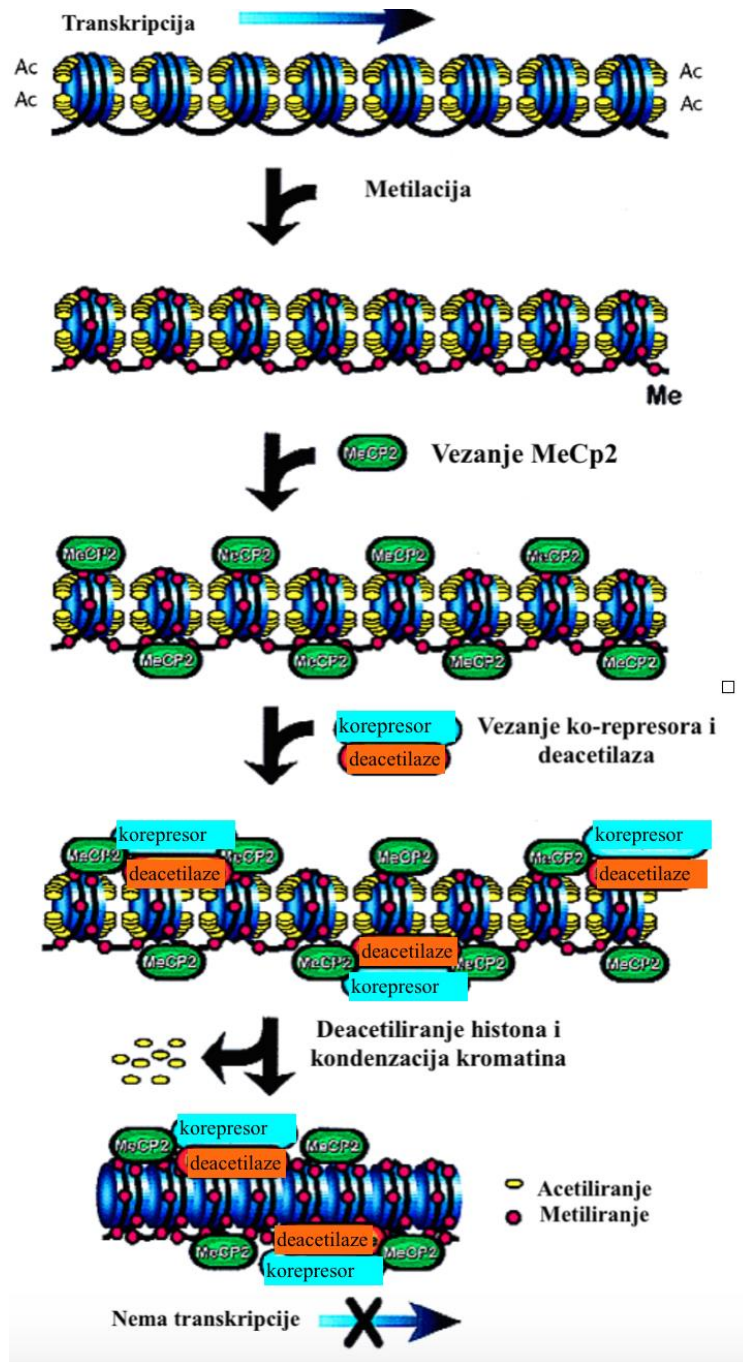
(preuzeto od Alberts i sur. 2008)

#### 1.3.4. Epigenetičke promjene u karcinogenezi

Dinukleotidi CpG meta su otprilike jedne trećine reverzibilnih mutacija koje se pojavljuju kod ljudskih bolesti i tumora. Do danas se broj CpG mjesta znatno smanjio u genomu sisavaca radi metiliranja, što je dovelo do gubitka njihove funkcije i u konačnici i do štetnih posljedica. Metiliranje genoma ima ulogu stabilizacije jer sprječava rekombinaciju između ponavljajućih slijedova nukleotida (Yoder i sur. 1997). Iako u genomu inače imamo globalnu hipermetiliranost, kod karcinogeneze je obrnuta situacija te nalazimo globalnu hipometiliranost. Također je i razlika u metilacijskom statusu CpG otoka jer kod karcinogeneze imamo hipermetiliranost, dok u normalnom stanju hipometiliranost CpG otoka (Malfoy 2000). Dva su načina na koje metiliranje utječe na supresiju aktivacije gena: 1. promjenom veznog mjesta onemogućava vezanje transkripcijskim faktorima, 2. vezanjem proteina za metilirane citozine (npr. MeCP1, MeCP2 (engl. *Methyl-CpG-binding domain Protein 1* i 2) (Robertson i Jones 2000).

Snažan učinak 5-metilcitozina (5mC) u promotorskim regijama sisavaca sugerira da metiliranje DNA inhibira transkripciju, ometajući njezinu inicijaciju. Pokazalo se da metiliranje DNA smanjuje afinitet vezanja faktora transkripcije koji prepoznaju specifični slijed nukleotida (Prendergast i Ziff 1991). Osim toga, proteini koji se vežu za metilirani citozin (Asiedu i sur. 1994), kao što je MDBP (engl. *The Methylated DNA Binding Protein*), mogu djelovati kao represori. Transkripcijska represija metiliranjem DNA može se posredovati putem koji uključuje promjene u strukturi kromatina i razine acetiliranja histona (Bestor 1998). Protein MeCP2 prepoznaje metilirani citozin te se veže. Transkripcijska represija od strane MeCP2 je nelinearna, ovisi o gustoći 5mC i uključuje regrutaciju kompleksa koji sadrži transkripcijski korepresor i histon deacetilazu (Nan i sur. 1998). Deacetiliranjem histona dolazi do kondenzacije kromatina jer gubitkom acetilne skupine histoni postaju pozitivno nabijeni te se vežu za negativno nabijenu DNA (Slika 6.).





**Slika 6.** Mehanizam zaustavljanja transkripcije metiliranjem DNA. Nukleosomi-plavi cilindri oko kojih je omotana DNA; Protein MeCP2 koji se veže na metilirani citozin; crvene točke-metilne skupine; žute točke-acetilne skupine (preuzeto od Jones i Laird 1999).

## 1.4. Metiliranje gena i imunski odgovor u HNC

Jedan od potencijalnih čimbenika odgovornih za nastanak tumora glave i vrata čovjeka je promjena stupnja metiliranosti promotora staničnih gena koji igraju ključnu ulogu u imunskom odgovoru. U ovom poglavlju će biti govora o tome na koji način su promjene u metiliranju DNA povezane s različitim poremećajima, napose HNC, a sve povezano uz nepravilnosti imunskog sustava.

### 1.4.1. Metiliranost gena u karcinomima

Genomska nestabilnost i druge promjene na DNA, uključujući epigenetičke, uzrokuju promjene u ekspresiji gena te je uobičajeno obilježje mnogih karcinoma (Hanahan i Weinberg 2011). Regije različito metilirane u karcinomu često se lokaliziraju na tkivno-specifičnim metiliranim regijama DNA (T-DMR, engl. *Tissue specific Differentially Methylated Regions*). Aberantno stanje metiliranja nekoliko gena domaćina povezanih sa staničnim ciklusom, apoptozom, razvojem, staničnom adhezijom i staničnom signalizacijom analizirano je u kliničkim studijama autora Szalmás i Kónya 2009. te Wentzensen i sur. 2009. Ta istraživanja su također pokazala da postoje velike varijacije u frekvenciji metiliranja DNA. Metiliranje različitih gena, koji djeluju u neovisnim putevima, analizirano je u slučajevima HNC (Sanchez-Cespedes i sur. 2000; Rosas i sur. 2001; Hasegawa i sur. 2002; Ogi i sur. 2002; Fan 2004; Demokan i sur. 2006). Međutim, većina ovih istraživanja usredotočila se na jedan ili na najviše nekoliko gena kandidata, dok zabilježene frekvencije metiliranja i specifičnosti metoda uvelike variraju između studija. Među TS genima koji su do sada analizirani, metiliranje gena DAPK (engl. *Death Associated Protein Kinase*) i RASFF1A (engl. *Ras Association Domain Family 1 isoform A*) najčešće je zabilježena epigenetička promjena u HNC-u (Rosas i sur. 2001; Hasegawa i sur. 2002; Ogi i sur. 2002; Fan 2004).

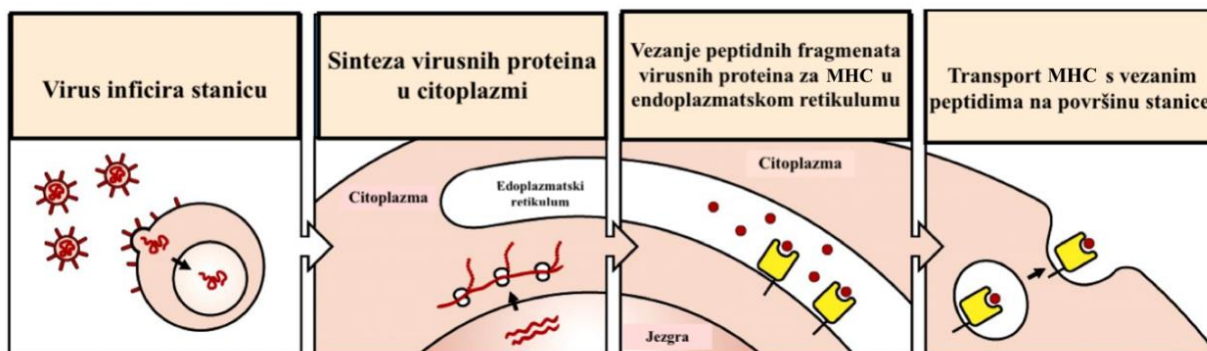
Gen supresor retinoblastoma, RB (engl. *Retinoblastoma Supressor*), prvi je TS gen kod kojeg je utvrđeno utišavanje hipermetiliranjem (Greger i sur. 1989). Općenito kod TS gena, metiliranjem CpG otoka u regijama na 5' kraju gena dolazi do utišavanja njegove transkripcije, odnosno u konačnici do njegove inaktivacije (Jones i Laird 1999; Baylin i sur. 2000; Herman i Baylin 2003). Osim što se hipermetiliranjem utišavaju TS geni, također je onemogućena ekspresija potencijalnih TS gena i gena čija funkcija u zloćudnoj progresiji još nije utvrđena (Suzuki i sur. 2002; Yamashita i sur. 2002;

Ushijima 2005). Tumor-supresor geni (kao što su p16, E-kadherin i dr.) (Santini i sur. 2001) i drugi geni s promijenjenim metilacijskim statusom promotora (većinom su to geni karcinoma debelog crijeva) polazište su za istraživanje gena s promjenom u metiliranju promotora kod različitih tumora.

#### **1.4.2. Imunosni odgovor**

Homeostatski imunosni odgovori općenito se temelje na ravnoteži između odgovora tipa 1, protiv mikrobnih i malignih stanica te odgovora tipa 2, povezanih s alergijama. Imunosni odgovor se može podijeliti na urođeni i stečeni. Urođeni imunosni odgovor kritičan je za uklanjanje virusa. Njegov je mehanizam ključan za poticanje adaptivnog odgovora, sprječavajući razvoj kronične infekcije i razvoj tumora. Virus HPV može uzrokovati utišavanje tih mehanizama, što dovodi do transformacije stanica domaćina (Hibma 2012). Na primjer, u HNSCC primjećuju se male količine limfocita, uz smanjenu aktivnost stanica prirodnih ubojica (NKC, engl. *Natural Killer Cells*) i prezentaciju antigena (Ferris 2015).

Početak infekcije signaliziran je prepoznavanjem molekularnih obrazaca patogena (PAMP-a, engl. *Pathogen-Associated Molecular Pattern*), što signalizira opasnost za imunosni sustav. Mnoge bakterijske i virusne komponente su PAMP i pokreću signalizaciju putem receptora za prepoznavanje obrasca (PRR, engl. *Pattern Recognition Receptors*) na antigen-prezentirajućim stanicama (APCs, engl. *Antigen-Presenting Cells*), pomažući imunosnom sustavu u odluci o pokretanju imunosnog odgovora. Potencijalni HPV PAMP-ovi su kapsida koja sadrži proteine L1 i L2 i dvolančana kružna DNA od 8 kb (Hasan i sur. 2007). Antigen-prezentirajuće stanice na svojoj površini prezentiraju strane peptide pomoću glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC, engl. *Major Histocompatibility Complex*). Stanice prirodne ubojice su jedne od dvije vrste efektorskih stanica, a druge su nepromjenjive NKC (iNKT, engl. *Invariant Natural Killer T*), stanice urođenog imunosnog odgovora, koje mogu doprinijeti čišćenju HPV infekcije nakon što prepoznaju peptide vezane za MHC molekulu. Jedna od funkcija T- i NK-stanica je aktivacija kaspaza u ciljnim stanicama izazivajući apoptozu te stvaraju pore uzrokujući oštećenje i lizu membrane (Lie i sur. 2006; Georgopoulos i sur. 2000) (Slika 7.).



**Slika 7.** Mehanizam izlaganja virusnih peptida na površini inficirane stanice. Glavni histokompatibilni kompleks (MHC) - žuta boja; virusni peptidi - crvene boje (preuzeto od Janeway i sur. 2008.).

### 1.4.3. Poremećaji imunskog sustava kod HNC

Imunološka disfunkcija u HNC-u obuhvaća mnogo različitih fenotipskih i funkcionalnih promjena u imunskim stanicama koje se javljaju s različitom učestalošću u bolesnika s ranim ili kasnim stadijima bolesti (Reichert i sur. 2002). Tumori glave i vrata su jedni od imunosupresivnih tumora čovjeka. Akumulacije klastera diferencijacije 69+ i 4+ (CD, engl. *Cluster of Differentiation*) ili CD3+ i CD8+ efektorskih T-stanica u tumoru koreliraju s boljom prognozom u nekim istraživanjima (Badoual i sur. 2006), dok druga prijavljuju selektivnu apoptozu tumorskim antigenom (TA) aktiviranih specifičnih CD8+ T-stanica, brzi obrat efektorskih T-stanica i funkcionalnu paralizu T-, B-, NK- ili dendritičkih stanica (DC), koje sve predviđaju loš ishod (Reichert i sur. 2002). Akumulacije staničnih ili mijeloidnih supresorskih stanica (MDSC, engl. *Myeloid-Derived Suppressor Cells*) ili regulatornih B-stanica koje proizvode adenzin na mjestu tumora ili u perifernom krvotoku bolesnika s HNC-om, također su povezane s lošim ishodom (Chikamatsu i sur. 2007; Figuerio i sur. 2016).

Imunomodulatorni ligandi ili citokini koji su povišeni u HNC-u mogu kočiti diferencijaciju T-stanica, pridonoseći imunološkoj disfunkciji. Nedavno je zabilježena prisutnost JAG-1 (Jagged1) i Notch liganda, koji sudjeluju u Notch signalnom putu aktivacije gena bitnih za staničnu proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu, kod stanica koje se nalaze unutar tumorskog mikrookruženja (TME, engl. *Tumor MicroEnvironment*) te se njihov negativni utjecaj na imunosne stanice u HNC istražuje (Bell i sur. 2014).

#### 1.4.4. Ciljni geni koji imaju funkciju u imunom sustavu

U ovom istraživanju ćemo proučavati razlike metilacijskog statusa promotora 7 različitih gena koji imaju funkciju u imunom sustavu: *IL12RB*, *MARCO*, *HLA DPB*, *GBP*, *SIGLEC*, *HAVCR2* i *EDARADD*, kod obrisaka zdrave oralne sluznice naspram uzoraka svježeg tkiva oralnih i orofaringealnih tumora čovjeka.

Protein kodiran genom *IL12RB* (engl. *Interleukin 12 Receptor subunit Beta 1*) transmembranski je protein tipa I koji pripada superobitelji receptora hematopoetskih stanica. Ovaj protein se veže na interleukin 12 (IL12) s niskim afinitetom, a smatra se da je dio receptorskog kompleksa IL12. Ovaj protein tvori oligomer povezan disulfidnom vezom, što je potrebno za njegovo vezanje za IL12. Dokazano je da koekspresija ovog i proteina *IL12RB2* dovodi do stvaranja visokoafinitetnog veznog mjesta za interleukin i do uspostave prijašnjeg signala ovisnog o IL12. Mutacije u ovom genu narušavaju razvoj limfocita koji proizvode interleukin-17 te rezultiraju povećanom osjetljivošću na infekcije. Zajedno s *IL23R* tvori interleukin-23 receptor koji funkcionira u transdukciji IL23 signala vjerojatno aktivacijom Jak-Stat signalne kaskade (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/IL12RB1>).

Receptor makrofaga *MARCO* (engl. *Macrophage Receptor with Collagenous Structure*), također poznat i kao receptor makrofaga s kolagenom strukturom, je protein koji je kod ljudi kodiran genom *MARCO* (Elomaa i sur. 1998). Protein *MARCO* receptor je razreda A koji se nalazi na određenim podskupinama makrofaga i prepoznaje veliki broj liganda te ih uklanja. Njihova odrednica je da se vežu na polianione i modificirane oblike tipa kolesterola zvanog lipoprotein niske gustoće (LDL, engl. *Low-Density Lipoprotein*) (Plüddemann i sur. 2007). Protein *MARCO* je u stanju da veže i fagocitira ove ligande i molekularne obrasce povezane s patogenima. Kao dio urođenog imunog sustava *MARCO* uklanja patogene i dovodi do upalnih reakcija. Domena *SRCR* (engl. *Scavenger Receptor Cysteine-Rich*) na kraju izvanstanične strane *MARCO* odgovorna je za vezanje liganda i naknadne imunološke odgovore (Novakowski i sur. 2016).

Protein *HLA-DPB* (engl. *HLA Class II Histocompatibility Antigen, DP(W2) Beta chain*) je heterodimer koji se sastoji od alfa (*DPA*) i beta lanca (*DPB*), oba u membrani, a kodira ga gen *HLA-DPB*. On igra središnju ulogu u imunom sustavu prezentirajući peptide dobivene od izvanstaničnih proteina. Molekule klase II eksprimiraju se na antigen-prezentirajućim stanicama (APC: limfociti B, dendritičke stanice, makrofagi). Beta lanac je otprilike 26-28 kDa, a njegov gen sadrži 6 eksona.

Ekson 1 kodira vodeći peptid, eksoni 2 i 3 kodiraju dvije ekstracelularne domene, ekson 4 kodira transmembransku domenu, a ekson 5 kodira citoplazmatski rep. Unutar molekule DP, alfa lanac i beta lanac sadrže polimorfizme koji određuju specifičnosti vezanja na peptid, što rezultira do četiri različite molekule (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3115>).

Protein GBP (engl. *Guanylate-Binding Protein*) pripada obitelji velikih citokinima-induciranih GTPaza koje su, na osnovu svojih strukturnih i biokemijskih svojstava, velika podobitelj unutar dinamične superobitelji velikih GTPaza. Vjeruje se da ljudi imaju 7 GBP-a (označenih hGBP-1 do 7; engl. *human Guanylate-Binding Protein*), a svi su smješteni unutar jednog klastera na kromosomu 1. Dok se interferonom gama aktivirajuća sekvenca (GAS, engl. *Interferon  $\gamma$  Activation Site*) i elementi odgovora na interferon (ISRE, engl. *Interferon-Stimulated Response Element*) nalaze u promotorima mnogih GBP-a, nemaju svi hGBP-ovi oba ova elementa (Olszewski i ostali 2006), tako da ostaje nejasno da li sve hGBP-ove možemo inducirati s tipom I ili tipom II interferona. Studije na miševima kojima nedostaje IFN (engl. *Interferon*) receptor tipa I ili tipa II sugeriraju da su IFN tipa I odgovorni za obranu od mnogih virusa, dok je IFN tipa II potreban za obranu od unutarstaničnih bakterija i parazita (Van den Broek i sur. 1995). Budući da i IFN tipa I i II aktiviraju GBP, za pretpostaviti je da GBP sudjeluje u obrani domaćina (Vestal i Jeyaratnam 2011).

Gen *SIGLEC* (engl. *Sialic acid-binding Immunoglobulin-type Lectin*) kodira za proteine SIGLEC, koji se nalaze na staničnoj površini i vezuju sijalinsku kiselinu. Nalaze se prvenstveno na površini stanica imunosnog sustava i čine podskup lektina tipa I. Postoji 14 različitih proteina SIGLEC kod sisavaca, koji pružaju niz različitih funkcija temeljenih na interakciji receptora i liganda staničnih površina (Pillai i sur. 2012). Ove interakcije receptora i glikana mogu se koristiti u staničnoj adheziji, staničnoj signalizaciji te ostalom. Funkcija SIGLEC-a ograničena je na njihovu staničnu distribuciju. Najčešće proteini SIGLEC-i ometaju staničnu signalizaciju, inhibirajući aktivaciju stanica imunosnog sustava (Avril i sur. 2004). Većina SIGLEC-a, poput CD22 i obitelji povezane sa CD33, sadrže motiv inhibicije temeljen na imunoreceptoru tirozina (ITIM, engl. *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs*) u svojoj citosolnoj regiji (Crocker i sur. 2007). Protein CD22 se nalazi na B-stanicama te inhibira signalizaciju putem receptora B-stanica (BCR, engl. *B Cell Receptor*). Nadalje, protein SIGLEC-7 nalazimo kod NK-stanica gdje dovodi do stanične inaktivacije kada se jednom veže za ligand koji sadrži sijalinsku kiselinu.

Stanice sisavaca sadrže visoku razinu sijalinske kiseline, pa kada se NK-stanice vežu za takozvane "*self-cells*", one se ne aktiviraju i ne ubijaju stanice domaćina (Angata i sur. 2006).

Gen *HAVCR* (engl. *Hepatitis A Virus Cellular Receptor*) kodira za protein *HAVCR*, poznat još i kao T-stanična imunoglobulin i mucin domena 1 (*TIM-1*, engl. *T-cell Immunoglobulin and Mucin domain 1*) (Feigelstock i sur. 1998). Stanični receptor virusa hepatitisa A (*HAVCR1 / TIM-1*) član je obitelji *TIM* koji igra kritičnu ulogu u regulaciji aktivnosti stanica imunskog sustava, posebno u vezi s odgovorom domaćina na virusne infekcije. Protein *TIM-1* je također uključen u alergijsku reakciju, astmu i toleranciju na transplantaciju (McIntire i sur. 2001). Protein *TIM-1* je preferirano eksprimiran na pomoćničkim limfocitima T (*Th2*, engl. *T helper cells 2*; *CD4+* stanice) i identificiran je kao stimulacijska molekula za aktivaciju T-stanica (Umetsu i sur. 2005). Protein *TIM-3* je preferirano eksprimiran na *Th1* i citotoksičnim limfocitima T (*Tcl*, engl. *cytotoxic T lymphocyte*) i djeluje kao inhibitorna molekula, koja posreduje apoptozu *Th1* i *Tcl* (Zhu i sur. 2005). *TIM-4* se preferirano eksprimira na antigen-prezentirajućim stanicama modulirajući fagocitozu apoptotskih stanica interakcijom s fosfatidilserinom (*PS*, engl. *Phosphatidylserine*) izloženim na površini apoptotskih stanica (Kobayashi i sur. 2007).

Gen *EDARADD* (*Ectodysplasin A Receptor Associated Death Domain*) kodira protein *EDARADD*. Protein *EDARADD* djeluje u interakciji s drugim proteinom, zvanim ektodisplazin A receptor (*EDAR*, engl. *Ectodysplasin A Receptor*), koji pripada superobitelji receptora faktora nekroze tumora (*TNF*, engl. *Tumor Necrosis Factor*). Ova interakcija događa se u regiji koja se naziva domenom smrti, a prisutna je u oba proteina. Protein *EDARADD* djeluje kao adapter, što znači da pomaže *EDAR*-u u pokretanju kemijskih signala unutar stanica. Ovi signali utječu na stanične aktivnosti poput diobe, rasta i sazrijevanja (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/EDARADD>). Protein *EDAR* se aktivira *EDA*-om (engl. *Ectodysplasin A*) i koristi *EDARADD* kao adapter za izgradnju unutarstaničnog kompleksa za prijenos signala koji dovodi do aktiviranja *NF-κB* (engl. *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Kao što je gore opisano, ektodisplazin-*EDAR*-*EDARADD* kompleks djeluje u interakciji s *TRAF 6* (engl. *Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor 6*) i na taj način aktivira kompleks inhibitora *NF-κB* kinaza (*IKK*, engl. *Inhibitor of NF-κB kinase*). Kompleks *IKK* sadrži dvije katalitičke podjedinice, *IKK1* i *IKK2*, i regulatornu podjedinicu, *NEMO* (engl. *NF-κB Essential Modulator*). Ovaj kompleks fosforilira

nizvodni kompleks I $\kappa$ B (engl. *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells Inhibitor*), što rezultira kretanjem NF- $\kappa$ B u jezgru radi aktiviranja transkripcije gena odgovora na podražaj. Naime, transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B regulira ekspresiju gena koji kontroliraju imunosnu i stresnu reakciju, upalnu reakciju, staničnu adheziju i zaštitu od apoptoze (Ghosh i sur. 1998).

### 1.5. Metode otkrivanja metilirane DNA

Razgradnja restrikcijskim enzimima osjetljivim na metiliranje prva je metoda koja se počela primjenjivati za otkrivanje metiliranog citozina u CpG dinucleotidima. Kod ove metode nije potrebno prethodno tretiranje DNA bisulfitom. Nakon same restrikcije, fragmenti se umnažaji metodom PCR-a ili se provodi *Southern blot* analiza kod koje se koriste specifične probe. Restrikcijski enzimi koji se najčešće koriste kod ove metode su *Msp* I i *Hpa* II. *Hpa* II cijepa nemetilirana 5' -CCGG- 3' mjesta, dok *Msp* I cijepa svako 5'-CCGG-3' mjesto (Sneider, 1980). Ograničen broj restrikcijskih mjesta, lažno pozitivni rezultati te velika količina potrebne DNA za analizu neki su od nedostataka metode restrikcijskim enzimima.

Metodom bisulfitnog sekvenciranja produktima PCR reakcije možemo direktno odrediti slijed nukleotida. Za razliku od metode s restrikcijskim enzimima, prije samog PCR-a, fragmente DNA treba tretirati bisulfitom. Kod ove metode metilirani citozini se čitaju kao baza citozin, dok se nemetilirani čitaju kao dušična baza timin (T) (Frommer i sur. 1992). Kao i kod prethodno objašnjene metode, glavni nedostatak bisulfitnog sekvenciranja je zahtjevnost i kompleksnost metode kod većih kliničkih studija.

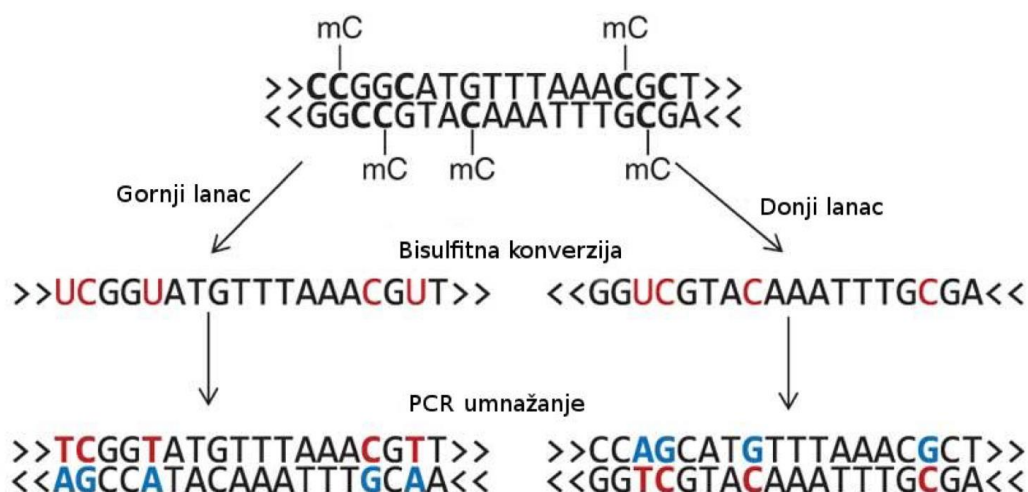
Metoda koja također koristi DNA konvertiranu bisulfitom je metoda pirosekvenciranja, gdje takvu konvertiranu DNA umnažamo s početnicama od kojih jedna ima vezan biotin na 5' kraju. Ugradnjom nukleotida otpušta se pirofosfat koji prelazi u ATP uz pomoć enzima surfurilaze. Drugi enzim reakcije, luciferaza, koristi nastali ATP za proizvodnju svjetlosti, koja se detektira kao svjetlosni signal, a kojeg bilježi kamera. Koliki će biti signal ovisi o metiliranosti DNA (Tost i Gut 2007). Nedostatak ove metode je prilično kratka duljina čitanja.

Metoda PCR-a u stvarnom vremenu kvantitativna je metoda koja se temelji na fluorescenciji (*MethyLight*). DNA umnažamo početnicama koje ne razlikuju metiliranu od nemetilirane DNA te zatim koristimo TaqMan probe koje se specifično vežu na



metiliranu DNA. Ova metoda se najčešće koristi za analizu velikog broja uzoraka i genskih lokusa jer je izrazito osjetljiva (Eads i sur. 2000).

U širokoj upotrebi se danas koristi metoda lančane reakcije polimerazom specifične za metilaciju (MSP, engl. *Methylation Specific PCR*). Sama DNA se također izlaže bisulfitnom tretmanu, gdje se nemetilirani citozini deaminiraju u uracil, a metilirani (mC) ostaju nepromijenjeni. Metoda se sastoji od dvije reakcije; u prvoj reakciji par početnica prepoznaje slijed s nepromijenjenim CpG mjestima, odnosno metilirana CpG mjesta, dok u drugoj reakciji drugi par početnica prepoznaje izmjenjeni slijed, gdje je došlo do toga da je CpG mjesto sada UpG (Slika 8.). Prednosti ove metode su da je jednostavna, brza i s njom možemo detektirati vrlo male količine metilirane DNA (Herman i sur. 1996) (Slika 8.).



**Slika 8.** Shematski prikazana bisulfitna konverzija DNA te PCR umnažanje. Citozin (C); adenin (A); gvanin(G); timin (T); uracil (U); metilirani citozin (mC) (preuzeto od Krueger i sur. 2012).

Za precizna kvantitativna mjerenja metiliranosti DNA na većem broju gena hibridizacijom na pločici koristimo testove *Illumina GoldenGate* (Bibikova i Fan 2009), *Illumina Infinium HumanMethylation27 BeadChip*, *Infinium HumanMethylation450 BeadChip* te najnoviji *Infinium MethylationEPIC BeadChip* test (Zhou i sur. Nucleic

Acids Res. 2017). Razlika između testova je u broju analiziranih CpG mjesta, odnosno gena, pa tako *Illumina GoldenGate* test analizira samo 1.536 CpG mjesta, a *Infinium MethylationEPIC BeadChip* čak 863.904 CpG mjesta, tj. većinu genoma čovjeka. Također i za potrebe ove metode, kao i za prethodno opisane, DNA tretiramo bisulfitom te umnažamo s početnicama koje prepoznaju metilirana ili nemetilirana CpG mjesta. Početnice su specifične za pojedini gen. Sinteza se temelji na dodavanju fluorescencijskom bojom obilježenih baza, dideoksinukleotid trifosfata (ddNTP). Iz omjera fluorescentnih signala metiliranih naspram nemetiliranih CpG mjesta određuje se razina metiliranosti DNA.

Semi-kvantitativna metoda MS-HRM (engl. *Methylation-Sensitive High Resolution Melting*) analizira homogeno metiliranje DNA. Kvantitativno pomoću ove metode možemo određivati heterogenu metiliranost DNA jer se između komplementarnih lanaca, koji se razlikuju u nekoliko CpG mjesta, stvara heterodupleks (Wojdacz i Dobrovic 2007).

Metoda imunoprecipitacije metilirane DNA (MeDIP, engl. *Methylated DNA Immunoprecipitation*) zasniva se na hibridizaciji fluorescentno obilježene DNA na različite čip-platforme. Koriste se protutijela specifična za 5-metilcitozin te se vežu za ultrazvukom fragmentiranu DNA. Za analizu možemo se koristiti i masivnim paralelnim sekvenciranjem, nakon što je DNA ekstrahirana i odvojena od proteina. Nedostatak ove metode je kvaliteta protutijela koja se koriste u reakciji te potreba za jednolančanom DNA (Weber i sur. 2005).

Metoda masene spektrometrije ili MALDI-TOF (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectra*) koristi se za analiziranje prethodno bisulfitom tretirane DNA i umnožene metodom PCR-a kod koje koristimo početnice specifične za pojedine gene. Dobivamo podatak o metilacijskom statusu CpG dinukleotida istraživanog gena. Metoda nam daje kvantitativne rezultate (Ehrich i sur. 2005).

## 2. Cilj i hipoteza istraživanja

Hipoteza ovog istraživanja je da metiliranje DNA, kao i ostale epigenetičke promjene, znatno doprinose pojavi određenih tipova tumora glave i vrata čovjeka, utišavajući ekspresiju gena koji su bitni za održavanje homeostaze organizma. S druge strane, demetiliranjem pojedinih gena, npr. onih koji imaju funkciju u imunskom sustavu čovjeka, dolazi do njihove aktivacije, što se uočilo u slučajevima nekih drugih tumora. Također, smatra se da postoji razlika u metilacijskom statusu promotora gena imunskog sustava između uzoraka zdrave sluznice naspram oralnih i orofaringelnih tumora, obzirom na HPV-status.

Glavni ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. ispitati metilacijski status promotora gena koji imaju funkciju u imunskom sustavu (*EDARADD*, *IL12RB*, *MARCO*, *HLA DPB*, *GBP*, *SIGLEC* i *HAVCR2*) u obriscima zdrave oralne sluznice naspram uzoraka oralnih i orofaringelnih tumora čovjeka s različitim HPV-statusom
2. naći poveznicu kako sama promjena u metiliranju promotora gena *EDARADD*, *IL12RB*, *MARCO*, *HLA DPB*, *GBP*, *SIGLEC* i *HAVCR2* utječe na imunski odgovor te na prognozu tumora glave i vrata čovjeka
3. odrediti koja je poveznica HPV-infekcije i metiliranosti u tumorima glave i vrata čovjeka

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Uzorci

U ovom istraživanju je analizirano 30 uzoraka, od kojih su 15 obrisci zdrave oralne sluznice, a 15 uzorci svježeg tkiva oralnih i orofaringealnih tumora s ranije potvrđenim različitim HPV-statusom. Kao pozitivna i negativna kontrolna DNA korištene su dvije komercijalno dostupne DNA genoma čovjeka prethodno tretirane natrijevim bisulfitom (Qiagen): jedna je kompletno nemetilirana (*EpiTect Control DNA, Unmethylated*; Qiagen), a druga je kompletno metilirana (*EpiTect Control DNA, Methylated*; Qiagen).

U istraživanju metiliranosti promotora staničnih gena korištena je DNA izolirana iz obrisaka zdrave oralne sluznice i iz uzoraka svježeg tkiva oralnih i orofaringealnih tumora, prikupljenih u Kliničkoj bolnici Dubrava, Zagreb. Ispitanici su bili različite dobi, različitog tipa tumora i s različitim HPV-statusom (ranije određenim u Laboratoriju za molekularnu virologiju i bakteriologiju pomoću tip-specifične metode lančane reakcije polimerazom s konsenzus početnicama) (Tablica 3.).

Za svaki uzorak koji se koristio u istraživanju dobiven je informirani pristanak bolesnika. Ispunjen je laboratorijski formular, potpisan od kliničara te suglasnost za sudjelovanje u istraživanju, potpisana od bolesnika. Podaci o pojedinom bolesniku, kao i izolirana DNA iz uzoraka, tijekom i nakon završetka istraživanja drže se u tajnosti.

**Tablica 3.** Laboratorijski oznaka uzoraka, dob ispitanika, tip uzorka, tip tumora i HPV -status ispitanika čiji su uzorci tkiva korišteni u istraživanju.

Broj	Dob	Tip uzorka	Tip tumora	HPV-status
1	53	Zdrava oralna sluznica		-
2	29	Zdrava oralna sluznica		-
3	58	Zdrava oralna sluznica		-
4	33	Zdrava oralna sluznica		-
5	26	Zdrava oralna sluznica		-
6	32	Zdrava oralna sluznica		-
7	24	Zdrava oralna sluznica		-
8	36	Zdrava oralna sluznica		-
9	36	Zdrava oralna sluznica		-
10	33	Zdrava oralna sluznica		-
11	24	Zdrava oralna sluznica		-
12	36	Zdrava oralna sluznica		-
13	40	Zdrava oralna sluznica		-
14	30	Zdrava oralna sluznica		-
15	36	Zdrava oralna sluznica		-
16	66	Karcinom	Orofaringealni	+
17	32	Karcinom	Orofaringealni	+
18	73	Karcinom	Oralni	+
19	61	Karcinom	Oralni	-
20	55	Karcinom	Orofaringealni	-
21	56	Karcinom	Oralni	-
22	31	Karcinom	Oralni	+
23	65	Karcinom	Oralni	-
24	51	Karcinom	Oralni	-
25	62	Karcinom	Oralni	-
26	70	Karcinom	Oralni	-
27	49	Karcinom	Oralni	-
28	58	Karcinom	Oralni	-
29	65	Karcinom	Orofaringealni	-
30	45	Karcinom	Oralni	-

### 3.2. Izolacija DNA

Uzorci briseva zdrave oralne sluznice te svježih tkiva oralnih ili orofaringealnih tumora pohranjeni su u 700  $\mu\text{L}$  TEX pufer (100  $\mu\text{L}$  1M Tris-HCl u konačnoj konc. 1M; 100  $\mu\text{L}$  0,1 mM EDTA u konačnoj konc. 0,1M; 500  $\mu\text{L}$  SDS; 9300  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O za 10mL otopine), u koji je potom dodano 20  $\mu\text{L}$  proteinaze K (Sigma-Aldrich), koncentracije 10 mg/mL, direktno na uzorke.

Nakon prekonoćne inkubacije s proteinazom K (pri 37°C) ili 2 do 3 sata pri temperaturi od 56°C (termomikser Eppendorf 5437), metodom taloženja proteina zasićenom otopinom soli pročišćava se DNA uzoraka s malim brojem stanica, dok se fenol/kloroform koristi za pročišćavanje uzoraka s većim brojem stanica (Sambrook i sur. 1982). Nakon toga, dodaje se 1/3 volumena smjese 5M NaCl te potom i jednaki volumen fenola (destilira i 66% ekvilibriran s 0.1 M Tris-HCl; pH=7.9). Do odvajanja smjese dolazi nakon kratkog centrifugiranja (Eppendorf 5415C), dodatka kloroform-izoamilnog alkohola (24:1) (Kemika, Merck) te ponovnog centrifugiranja. Nakon što je gornja faza prebačena u čistu epruvetu i pročišćena, pročišćenoj vodenoj te ponovno gornjoj fazi doda se 1.4 M NaCl. Nakon prvog i drugog postupka, da bi se istaložila DNA, vodenoj fazi se doda 2 do 2.5 volumena ledenog 96%-tnog etanola (Kemika) te promiješa. Za taloženje virusne DNA, uzorci se preko noći inkubiraju pri - 20°C ili pri -70°C kroz 15 minuta. Nakon toga cetrifugira se na 14 000 g (Eppendorf 5415R), odlije se supernatant, talog se ispere s 2 volumena 70%-tnog hladnog etanola te se ponovno kroz 10 minuta centrifugira na 14 000 g. Odlije se supernatant, a talog DNA se dobro osuši i otopi u sterilnoj tridestiliranoj vodi (Q-voda; Merck).

Približna količina izolirane DNA i njezina kvaliteta ispitana je elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu otopljenom u puferu TEA (0.8 mM Tris-acetat; 0.02 mM EDTA; pH=8). Spektrofotometrijski, na UV/VIS spektrofotometru *Cecil CE 2040* te pri valnoj duljini od 260 nm (DNA, RNA) i 280 nm (proteini), određena je točna koncentracija i čistoća izolirane DNA uzoraka. Čistom DNA smatra se ona za koju izračunati omjer  $A_{260}/A_{280}$  iznosi između 1.65 i 1.85, a ukazuje na razinu onečišćenja DNA s proteinima. Nakon mjerenja optičke gustoće (OD), masena koncentracija računa se prema formuli:  $\gamma = OD \times R \times \epsilon$ ;  $\gamma$  = masena koncentracija izolirane DNA u  $\mu\text{g/mL}$ ; R= razrjeđenje uzoraka u kivetu; OD = optička gustoća pri valnoj duljini od 260 nm;  $\epsilon$ = ekstinkcijski koeficijent za DNA, 50  $\mu\text{g/mL}$ ).

Otopljena DNA pohrani se pri 4°C ili, ukoliko treba dulje čuvanje, pri - 20°C.

### 3.3. Bisulfitna konverzija DNA

Kako bi se odredila metiliranost DNA, izolirana DNA podvrgava se natrijevom bisulfitu (*EpiTect Bisulfite Kit*; Qiagen) prema uputama proizvođača. Kemijska modifikacija ide u nekoliko koraka, a u samom postupku se koristi 1 ng do 2 µg izolirane DNA: a) nemetilirani citozini (C) konvertiraju se u uracil (U) djelovanjem bisulfita; vrijeme izmjene denaturacije i inkubacije je oko 5 sati (aparati *Veriti 96 Well Thermal Cycler*; Applied Biosystems); b) na membranu *EpiTect* kolone vezuje se konvertirana DNA; c) ispiranje puferom BW; d) puferom BD odstranjuju se sulfonatne grupe s DNA vezane na membranu; e) DNA vezana na membranu ispiru se BW puferom; f) elucija puferom EL konvertirane DNA s kolone.

Bez obzira koja će se metoda dalje koristiti u istraživanju metiliranosti, ovakva promijenjena DNA spremna je za daljnje proučavanje. Kod metode bisulfitne konverzije dušična baza citozin zamijeni se s uracilom, a metilcitozin ostaje nepromijenjen.

### 3.4. Metoda lančane reakcije polimerazom specifične za metilaciju (MSP)

Bisulfitom obrađenu DNA umnožena je metodom lančane reakcije polimerazom specifične za metilaciju (MSP, engl. *Methylation Specific PCR*). U metodi su korištene početnice specifične za nemetilirani oblik promotora istraživanih gena (Tablica 4). Nemetilirani par početnica prepoznaje CpG mjesta kod kojih je C prešao u U nakon tretmana s natrijevim bisulfitom, odnosno prepoznaju nemetiliranu DNA. U ovom radu je pomoću ove metode istražena razlika u metilacijskom statusu između DNA izolirane iz obrisaka zdrave oralne sluznice i svježih uzoraka oralnih i orofaringealnih tumora glave i vrata s različitim HPV statusom za promotorske regije 7 staničnih gena: *EDARADD*, *IL12RB*, *MARCO*, *HLA DPB*, *GBP*, *SIGLEC* i *HAVCR2*.

Kao kontrole korištene su dvije komercijalno dostupne DNA genoma čovjeka prethodno tretirane natrijevim bisulfitom (Qiagen): pozitivna kontrola je kompletno nemetilirana (*EpiTect Control DNA, unmethylated*; Qiagen), a negativna kontrola je kompletno metilirana (*EpiTect Control DNA, methylated*; Qiagen) u koncentraciji 25 ng/µL po reakciji MSP. Osim ove dvije kontrole, korištena je još jedna negativna kontrola same MSP reakcije, u koju su dodane sve komponente potrebne za reakciju, osim DNA.

Svaki gen je zasebno podvrgnut MSP reakciji s početnicama koje se vežu za nemetilirani oblik promotora tog gena. Za svaki uzorak je izvedeno 7 reakcija MSP u

volumenu od 10  $\mu$ L. Koncentracija konvertirane DNA je iznosila 25 ng/ $\mu$ L. U svim reakcijama količina dodane *GoTaq Hot Start* polimeraze (Promega) iznosila je 0,04  $\mu$ L po reakciji. Osim polimeraze, u reakciji su korišteni: H<sub>2</sub>O (Q voda; Merck), 5xPCR pufer (*5xGreen GoTaq Flexi Buffer*; Promega), 2,5 mM magnezijev klorid (MgCl<sub>2</sub>; Promega), 0,2 mM deoksiribonukleotidi (dNTP; Roche) i 0,5  $\mu$ M početnice U(f) i U(r) (Sigma-Aldrich). Popis početnica korištenih u metodi MSP naveden je u Tablici 4. Sve komponente reakcije dodaju se u jednakom volumenu, osim početnica (U<sub>r</sub> i U<sub>f</sub>) te Q vode, koji se dodaju ovisno o najboljim uvjetima reakcije za svaki pojedini par početnica, odnosno za svaki gen.

Sama reakcija MSP se provodi prema slijedećim uvjetima, uz početnu denaturaciju od 5 min pri 95°C te ponavljanja od 40-45 ciklusa:

- a) Faza denaturacije: 30 s, pri 95°C
- b) Faza sparivanja: 30 s, pri 56 - 64°C
- c) Faza sinteze: 50 s, pri 72°C

Nakon svih ciklusa ponavljanja, slijedi faza konačne sinteze 7 minuta pri 72°C te naglo hlađenje pri 4°C.

Za svaku početnicu bilo je potrebno izračunati temperaturu sparivanja ( $T_m$ , engl. *melting Temperature*) prema formuli:  $T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$ . U stvarnosti reakcije odstupaju od tog izračuna, pa sam iskustveno došla do temperature sparivanja koje su dale najbolje rezultate. Pojedine početnice (za pojedini gen) su se sparivale pri različitim temperaturama. Pri 62°C su se sparivale početnice za gen *HAVCR2*, dok se se pri 63°C sparivale početnice gena *EDARADD* i *GBP*. Pri temperaturi od 61°C došlo je do sparivanja početnica za gene *SIGLEC* i *HLA DPB*. Pri najnižoj temperaturi od 56°C došlo je do vezanja početnica za gen *IL12RB*, dok je pri najvišoj temperaturi od 64°C došlo do vezanja početnica za gen *MARCO*.

Također, broj ciklusa ponavljanja same reakcije je varirao. Broj ciklusa ponavljanja gdje su korištene početnice za gen *EDARADD* iznosio je 45, dok je za gene *GBP*, *MARCO*, *HAVCR2* i *IL12RB* iznosio 40 ciklusa. U rasponu od 40 do 45 ciklusa ponavljanja se mogla provoditi reakcija s početnicama gena *SIGLEC* i *HLA DPB*, iako su najbolji rezultati dobiveni na 40 ciklusa ponavljanja.



**Tablica 4.** Početnice korištene u metodi lančane reakcije polimerazom specifične za metilaciju za određivanje metiliranosti promotora gena koji imaju funkciju u imunosnom odgovoru.

<b>Ime početnice</b>	<b>Slijed nukleotida (5'-3')</b>	<b>Veličina produkta (pb)</b>
<b>EDARADD-Uf</b>	TTGTTTTGGAATAGTTAGAGGATGG	143
<b>EDARADD-Ur</b>	AAATACCTAAAAAATCTCCACACT	
<b>GBP4-Uf</b>	TGTGTTTGTAGTTTTAGTTATATGG	131
<b>GBP4-Ur</b>	TAAAACAAAATTTCACTCTATCACC	
<b>HAVCR2-Uf</b>	GGTAGGAGTTTTTAGGGAAAAATG	176
<b>HAVCR2-Ur</b>	AAACAACAAAATTTATATCCCCATC	
<b>HLA-DPB1-Uf</b>	GGAAGGTATAGTTTGATTTTTGTTTG	450
<b>HLA-DPB1-Ur</b>	AAACCCTATTTATACAAATCCTCATT	
<b>IL12RB1-Uf</b>	TTAGTTTGGGTTTAGAGTATGATGT	213
<b>IL12RB1-Ur</b>	CAAATAAACTTCTCAAATAACACA	
<b>MARCO-Uf</b>	ATTTAGTGTTTGTTAGGATTGTTGG	111
<b>MARCO-Ur</b>	TAACATCAAAATTTACCACTCATC	
<b>SIGLEC12-Uf</b>	TTGATAATGTAGAAGTTTGTGATGG	115
<b>SIGLEC12-Ur</b>	ACCAATAACCATAAACTAAATCAAA	

### **3.5. Elektroforeza u agaroznom gelu**

Nakon MSP reakcije, umnožene odsječke DNA razdvaja se na 2%-tnom agaroznom gelu. Dodavanjem agaroze (Sigma) u 1 x TAE pufer priprema se 2%-tni gel (w/V). Nakon zagrijavanja, potpunog otapanja agaroze i hlađenja, dodaje se 3  $\mu$ L MIDORI<sup>Green</sup> boje (NIPPON Genetics). Gel se potom izlijeva u plastičnu kadu te se ostavlja da polimerizira. Polimerizirani gel stavlja se u uređaj za elektroforezu, a u jažice se nanose uzorci redom, u volumenu od 10  $\mu$ l. Za određivanje i procjenu veličine PCR produkta na gel se nanosi 2.8  $\mu$ L *Gel Pilot 50bp* DNA biljega (Qiagen). Elektroforeza se odvija u 1xTEA puferu, pri naponu od 120V u vremenu od 25-30 minuta. Za vizualizaciju produkata MSP-a na gelovima korišten je sustav *UVItec Cambridge* (program Alliance 4.7). Veličina produkata reakcije je utvrđena pomoću korištenog DNA biljega.

### **3.6. Određivanje metiliranosti pojedinog genskog promotora**

Udio nemetiliranih promotora za svaki pojedini gen koji ima funkciju u imunosnom odgovoru u proučavanoj skupini je izračunat kao postotak (%), odnosno broj uzoraka kod kojih je utvrđena nemetiliranost promotora za pojedini gen s ukupnim brojem uzoraka te skupine te pomnožen sa 100. Na isti način je, posredno, izračunata metiliranost uzoraka u skupini normalnih oralnih obrisaka te u skupini karcinoma.

## 4. Rezultati

U ovom istraživanju je proučavana metiliranost gena koji imaju funkciju u imunom odgovoru na 30 uzoraka, od kojih su 15 bili obrisci normalne oralne sluznice, a 15 svježe tkivo oralnih i orofaringealnih tumora čovjeka s prethodno određenom različitim HPV-statusom. Tijekom samog istraživanja broj korištenih uzoraka tumora glave i vrata se smanjio na 13 zbog premale količine materijala. Ispitanici su se razlikovali po dobi, tipu tumora i po HPV statusu. Proučavala se razlika u metiliranosti promotora 7 gena koji imaju funkciju u imunom odgovoru: *EDARADD*, *IL12RB*, *MARCO*, *HLA DPB*, *GBP*, *SIGLEC* i *HAVCR2*. Kod svih 7 gena zabilježena je razlika u metiliranosti promotora kad se uspoređivala DNA izolirana iz obrisaka zdrave oralne sluznice naspram DNA izolirane iz tkiva oralnih i orofaringealnih tumora.

### 4.1. Pozitivna i negativna kontrola lančane reakcija specifične za metilaciju

Za ispitivanje metiliranosti promotora svakog pojedinog gena, korištena je i pozitivna i negativna kontrolna komercijalno dostupna genomska DNA. Pošto su u reakciji MSP korištene početnice koje se specifično vežu za nemetilirani oblik DNA, u svim reakcijama smo dobili produkt za kontrolu koja je kompletno nemetilirana, dok za metiliranu DNA nismo dobili rezultat. Također, reakcije su bile negativne u epruvetama u kojima nije bila dodana DNA, što je u skladu s očekivanjem.

### 4.2. Uzorci DNA izolirani iz obrisaka zdrave oralne sluznice

Bisulfitna konverzija bila je uspješna kod svih uzoraka DNA ove skupine, budući da je za svaki uzorak dobiven pozitivan rezultat u nekoj reakciji MSP, a korištenjem različitih početnica za metilirane i/ili nemetilirane oblike pojedinih gena (podaci nisu pokazani u ovom radu). Svi uzorci ove skupine su bili negativni na HPV infekciju. Srednja dob ispitanika ove skupine bila je 35 godina.

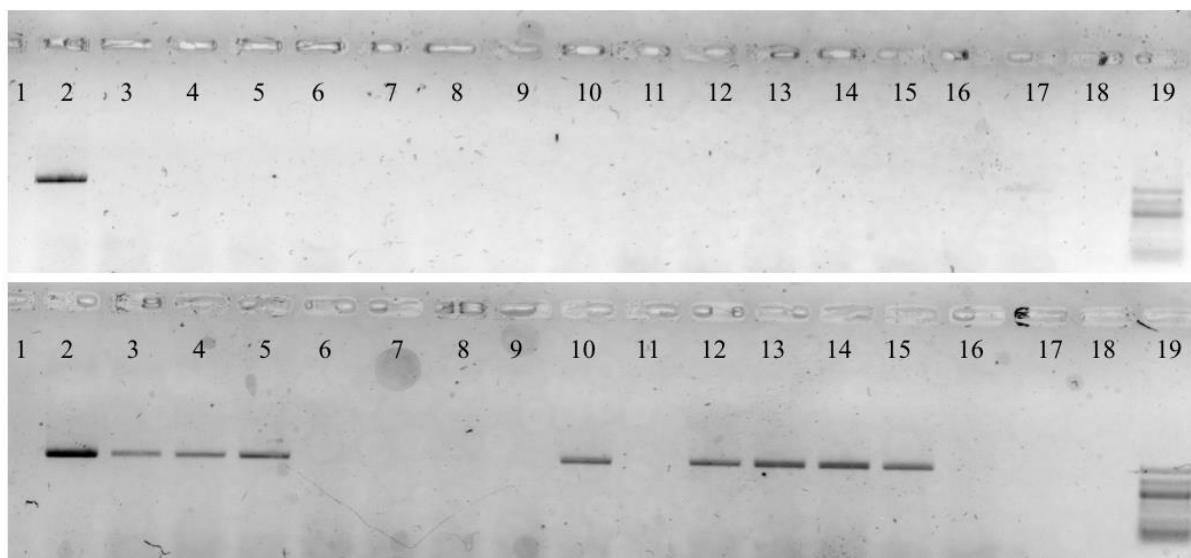
### 4.3. Metiliranost promotora gena imunskog sustava kod obrisaka zdrave oralne sluznice

Kod gotovo svih uzoraka ove skupine nismo dobili produkte reakcije MSP s početnicama za nemetilirane oblike promotora svih 7 proučavanih gena imunološkog

sustava: *EDARADD*, *IL12RB*, *MARCO*, *HLA DPB*, *GBP*, *SIGLEC* i *HAVCR2*. Svi uzorci ove skupine, 15/15 (udio nemetiliranosti 0%), bili su potpuno nemetilirani u promotorima gena *HLA DPB* i *IL12RB*, iz čega možemo zaključiti da je metiliranost u ovim promotorima bila 100%. Na isti način smo indirektno utvrdili da je metiliranost promotora gena *SIGLEC* 73,3 % (11/15), budući da je nemetilirani udio uzoraka iznosio 26,7% (4/15). Sveukupno, kod uzoraka ove skupine zabilježen je visok postotak metiliranosti proučavanih promotora analiziranih gena, a kretao se između 73,3 i 100%. Rezultati ukupne metiliranosti, posredno izračunate, svih gena u uzorcima ove skupine prikazani su u Tablici 5.

**Tablica 5.** Rezultati metiliranosti promotora gena koji imaju funkciju u imunom sustavu kod uzoraka zdrave oralne sluznice.

Promotor gena imunološkog sustava	Broj metiliranih uzoraka (N)	Udio metiliranih uzoraka (%)
<i>GBP</i>	13	87,7
<i>HLA DPB</i>	15	100
<i>MARCO</i>	13	87,7
<i>IL12RB</i>	15	100
<i>EDARADD</i>	14	93,3
<i>HAVCR2</i>	12	80
<i>SIGLEC</i>	11	73,3



**Slika 10.** Rezultati elektroforeza produkata lančane reakcije polimerazom specifične za metilaciju s početnicama specifičnim za nemetilirani oblik promotora gena imunskog sustava *HLA DPB*. Gornji red: pozitivna kontrola (U; *Unmethylated*, jažica 2), uzorci zdrave oralne sluznice (jažice 3-17), negativna kontrola (epruveta bez DNA, jažica 18), DNA biljeg (jažica 19). Donji red: pozitivna kontrola (U; *Unmethylated*; jažica 2), uzorci oralnih i orofaringealnih tumora (jažice 3-17) negativna kontrola (M; *Methylated*; jažica 18), DNA biljeg (jažica 19).

#### 4.4. Uzorci DNA izolirani iz svježeg tkiva oralnih i orofaringealnih tumora čovjeka

Bisulfitna konverzija bila je uspješna u svim uzorcima ove skupine, budući da je za svaki uzorak dobiven pozitivan rezultat u nekoj reakciji MSP, a korištenjem različitih početnica za metilirane i/ili nemetilirane oblike pojedinih gena (podaci nisu pokazani u ovom radu). Srednja dob ispitanika ove skupine bila je 56 godina.

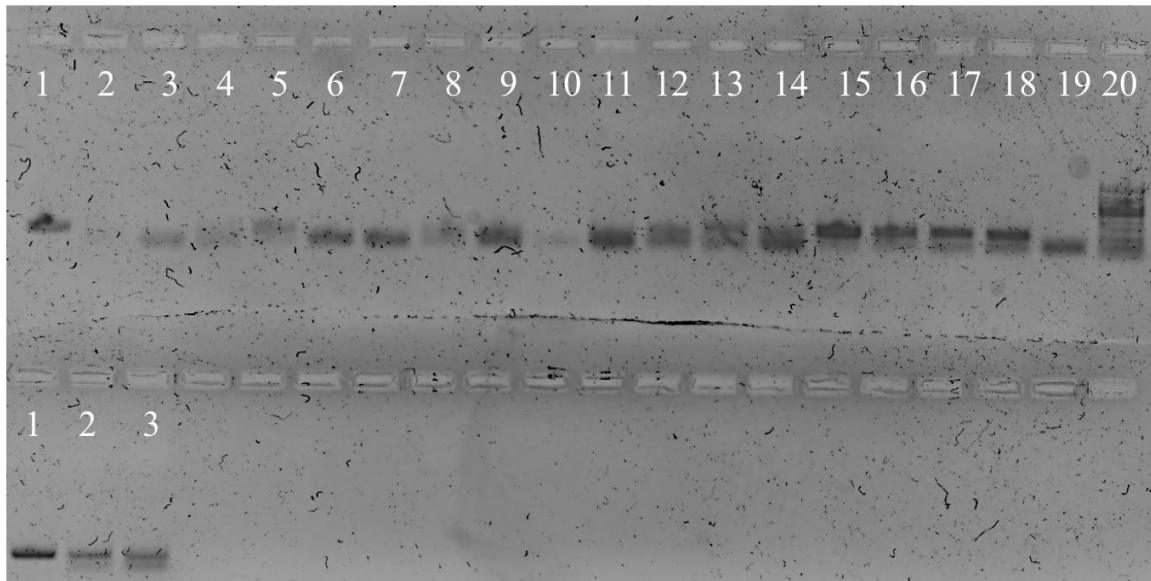
Od ukupno 15 uzoraka svježeg tkiva oralnih i orofaringealnih tumora čovjeka, kod njih 4 je bila zabilježena prisutnost HPV-a, što bi značilo da je udio oralnih i orofaringealnih tumora čovjeka pozitivnih na HPV u ovom istraživanju 26,7%.

#### 4.5. Metiliranost promotora gena imunskog sustava kod oralnih i orofaringealnih tumora čovjeka

Kod uzoraka DNA izoliranih iz oralnih i orofaringealnih tumora čovjeka najveći broj uzoraka bio je metiliran u promotoru gena *HLA DPB*, 7/15 (46,7%), budući da je dobiven udio nemetiliranosti od 53,3% (8/15). Najmanji udio metiliranih uzoraka dobiven je kod promotora gena *EDARADD* (0,1%; 1/15), budući da je dobiven udio nemetiliranosti od 99,9% (14/15). Kod svih korištenih uzoraka ove skupine zabilježen je visok postotak nemetiliranosti proučavanih promotora gena imunskog sustava, u rasponu od 53,3% do 99,9%. Rezultati ukupne metiliranosti, posredno izračunate, svih gena u uzorcima ove skupine prikazani su u Tablici 6.

**Tablica 6.** Rezultati metiliranosti promotora gena koji imaju funkciju u imunskom sustavu kod uzoraka oralnih i orofaringealnih tumora čovjeka.

Promotor gena imunološkog sustava	Broj metiliranih uzoraka (N)	Udio metiliranih uzoraka (%)
<i>GBP</i>	2	13,3
<i>HLA DPB</i>	7	46,7
<i>MARCO</i>	2	13,3
<i>IL12RB</i>	3	13,3
<i>EDARADD</i>	1	0,1
<i>HAVCR2</i>	4	27
<i>SIGLEC</i>	3	20



**Slika 11.** Rezultati elektroforeza produkata lančane reakcije polimerazom specifične za metilaciju s početnicama specifičnim za nemetilirani oblik promotora gena imunskog sustava *EDARADD*. Gornji red: pozitivna kontrola (U; *Unmethylated*; jažica 1), negativna kontrola (M; *Methylated*; jažica 3), negativna kontrola (epruveta bez DNA; jažica 2) uzorci zdrave oralne sluznice (jažice 4-12); uzorci oralnih i orofaringealnih tumora čovjeka (jažice 13-19), DNA biljeg. Donji red: pozitivna kontrola (U; *Unmethylated*; jažica 1), uzorci oralnih i orofaringealnih tumora čovjeka (jažice 2 i 3).

#### **4.6. Metiliranost promotora gena imunskog sustava kod oralnih i orofaringealnih tumora čovjeka obzirom na HPV-status**

Metiliranost gena koji imaju funkciju u imunskom sustavu proučavana je na 15 uzoraka svježeg tkiva HNC čovjeka, od čega 11 oralnih te 4 orofaringealna. Od ukupnog broja, u slučaju 4 tumora (2 oralna i 2 orofaringealna) je zabilježena prisutnost HPV-a.

Udio HPV-pozitivnih tumora koji su nemetilirani u promotorima gena *EDARADD*, *IL12RB*, *HLA DPB*, *HAVCR2* i *GBP* je iznosio 75% (3/4), dok je u promotorima gena *MARCO* i *SIGLEC* udio nemetiliranosti bio 50% (2/4).

Kod HPV-negativnih tumora nemetiliranost varira. Od ukupno 11 HPV-negativnih tumora, njih 5 pokazuje nemetiliranost u promotorima svih ispitanih gena

(45,5%), 3 uzorka imaju nemetilirane promotore gena *HAVCR2*, *MARCO*, *IL12RB*, *SIGLEC*, *EDARADD* i *GBP* (27,3%), 2 uzorka imaju nemetiliran promotor gena *GBP*, *MARCO*, *EDARADD* i *SIGLEC* (18,2%), dok 1 uzorak pokazuje nemetiliranost samo u promotorima gena *IL12RB* i *EDARADD* (0,1%).

Udio nemetiliranih promotora za svaki pojedini proučavani gen kod HPV-pozitivnih tumora iznosi od 50% do 75%, što je znatno više nego kod HPV-negativnih tumora gdje nemetiliranost promotora pojedinih gena iznosi od 0,1 % do 45,5%.



## 5. Rasprava

Glavni cilj ovog istraživanja je bio odrediti razliku u metilacijskom statusu promotora gena koji imaju funkciju u imunom sustavu kod obrisaka zdrave oralne sluznice naspram tumorskog tkiva oralnih i orofaringealnih tumora s različitim HPV-statusom. Tumori glave i vrata čovjeka (HNC) heterogena su skupina tumora koji zahvaćaju kožu glave i vrata, usnice, usnu šupljinu, orofarinks, epi- i hipofarinks, žlijezde slinovnice, larinks, paranazalne sinuse te štitnjaču i paratireoidne žlijezde, a razvijaju se iz višeslojnog pločastog epitela sluznice koja prekriva cijelo to područje. Imunomodulatorni ligandi ili citokini koji su povišeni u HNC-u mogu kočiti diferencijaciju T-stanica, pridonoseći imunološkoj disfunkciji. Onkoproteini E6 i E7 HPV-a odgovorni su za zloćudni fenotip, uglavnom putem inaktivacije tumor supresorskih gena kao što su p53 i pRB. Tumori glave i vrata koji su HPV-pozitivni imaju bolji ishod od HPV-negativnih HNC-a, a nagađa se da je to rezultat bolje aktivnosti imunskog sustava uvjetovanog virusom (Williams i sur. 2009). Metiliranje DNA, kao i druge epigenetičke promjene, ima kritičnu ulogu u kontroli aktivnosti gena i arhitekturi jezgre stanice. Svrha ovog istraživanja je bila utvrditi dolazi li do promjene u metiliranju promotora gena imunskog sustava u tumorima glave i vrata čovjeka te pokušati objasniti te promjene, a napose njihovu povezanost s HPV-infekcijom.

U ovom istraživanju smo metodom MSP proučavali metiliranost promotora 7 gena koji imaju funkciju u imunom sustavu: *EDARADD*, *IL12RB*, *MARCO*, *HLA DPB*, *GBP*, *SIGLEC* i *HAVCR2* kod uzoraka zdrave oralne sluznice ispitanika različite životne dobi. Promotori svih ispitanih gena pokazuju visok stupanj metiliranosti u uzorcima ispitanika sa zdravom oralnom sluznicom. Općenito, zna se da je u normalnim stanicama prisutna hipermetiliranost cjelokupnog genoma, a hipometiliranost gena bitnih za životne funkcije, dok je u karcinomima obrnuta situacija.

Utjecaj metiliranosti promotora gena istraživanih u ovoj studiji još nije u potpunosti istražen, ali su provedena istraživanja na drugim staničnim genima koji imaju ulogu kako u imunom odgovoru tako i u pojavi karcinoma usne šupljine. Naveliko istraživani gen *IL-2* (engl. *Interleukin 2*) bio je jedan od prvih gena za citokine za koji se pokazalo da mu je ekspresija povećana djelovanjem inhibitora metiliranja DNA (Ballas 1984) te je nakon toga postao fokusom epigenetičkih istraživanja. U normalnim T-stanicama, dokazano je da je ovaj gen miran, promotor *IL-2* je metiliran,

a lokus samog gena se nalazi u neaktivnom kromatinu. Dokazano je da metiliranje DNA potiskuje ekspresiju i proteina IL-4 (engl. *Interleukin 4*), a vjerojatno i drugih citokina, barem jednim dijelom posredno, preko proteina koji se vežu na metilirani citozin u CpG mjestu te time dovode do heterokromatizacije (Ward i sur. 1998).

U ovom istraživanju su promotori svih ispitanih gena (*EDARADD*, *IL12RB*, *MARCO*, *HLA DPB*, *GBP*, *SIGLEC* i *HAVCR2*) pokazali visok stupanj nemetiliranosti kod uzoraka ispitanika s oralnim i orofaringealnim tumorima s različitim HPV-statusom te različite životne dobi. Zna se da je metiliranje DNA nasljedna i stabilna epigenetička modifikacija koja se obično događa na mjestu CpG i igra važnu ulogu u regulaciji funkcije proteina, ekspresije gena i obradi RNA. Inače, smatra se da je povišeno metiliranje promotora glavni mehanizam inaktivacije gena povezanih s tumorima (Baylin 2005).

Nekoliko studija pokazalo je da se metiliranje DNA smatra ranim događajem razvoja tumora, a novi radovi fokusirani su na otkrivanje biomarkera za rano otkrivanje tumora, odabir mogućnosti liječenja te prognozu bolesti, posebno u HNC-u (Nair i sur. 2018; Yim i sur., 2018; Pan i sur., 2018). Temeljni mehanizmi koji objašnjavaju razvoj i napredovanje HNC-a zasigurno će se uvelike koristiti u dijagnostičke, terapijske i prognostičke svrhe.

Također, metiliranost gena *HLA klase II* je dobro proučena. Naime, *HLA-DRB1* koji spada u HLA klasu II, kao i gen korišten u našem ispitivanju, *HLA DPB1* (engl. *Major Histocompatibility Complex, class II, DP Beta 1*), ima četiri različito metilirana mjesta (DMR), a dva najveća (DMR3 i DMR4) obuhvaćaju iste CpG-ove koji su povezani s ekspresijom proteina HLA-DRB1 u monocitima. Nadalje, promjena u metiliranju ovog gena doprinosi razvoju multiple skleroze, bolesti središnjeg živčanog sustava (Kular i sur. 2018). Osim toga, nekoliko studija sugerira da metiliranje DNA u regiji gena HLA klase II može posredovati u genetičkoj osjetljivosti na imunološki posredovane bolesti poput reumatoidnog artritisa (RA) (Liu i sur. 2013), dijabetesa tipa 1 i prehrambene alergije (Hong i sur. 2015). U našem slučaju zabilježena je hipometiliranost gena *HLA DBP1* u uzorcima HNC.

Nadalje, metiliranje gena *MARCO* (engl. *Macrophage Receptor with Collagenous Structure*) istraženo je i kod tolerantnih makrofaga. Tolerancija makrofaga može se potaknuti različitim toksičnim signalima, uključujući oštećenje tkiva i komponente mikrobnih patogena kroz različite receptore i signalne putove. U istraživanju ekspresije proteina MARCO u liposaharidima i lipoteihoičnom kiselinom

induciranim tolerantnim makrofagima, potvrđena je pojačana ekspresija proteina MARCO (transkript i stanična ekspresija na površini) te su otkriveni epigenetički tragovi izazvani tolerancijom (trimetilacija H3K4 ostatka u promotoru gena *MARCO*) koje reguliraju ekspresiju gena *MARCO*. Pretpostavlja se da metiliranje DNA u kombinaciji sa modifikacijom histona igra ulogu u regulaciji ekspresije gena *MARCO*. U skladu s tim, modifikacija H3K4me3 na promotorskom području *MARCO* značajno je bila smanjena nakon tretmana demetilirajućim agensom. To je vjerojatno uzrokovano inhibicijom H3K4me3 koja posebno regulira ekspresiju gena u tolerantnim stanicama (Jing i sur. 2013). Hipometilacija ovoga gena u oralnim i orofaringealnim tumorima zabilježena je i u našem istraživanju, što bi značilo da je i kod HNC-a protein MARCO pojačano eksprimiran.

Istraživanja su pokazala da su hipermetiliranje gena *IL12B* (engl. *Interleukin 12 Subunit Beta*) i *IL12RB* (engl. *Interleukin 12 Receptor Subunit Beta*) u kombinaciji s DNA hipermetiliranjem kritičnih faktora transkripcije Th1 vjerojatno glavni faktori koji dovode do smanjene tuberkuloza-specifične proizvodnje citokina interferona gama (IFN $\gamma$ ) (DiNardo i sur. 2018). Inače, IFN $\gamma$  ima izrazito bitnu ulogu kod urođenog i stečenog imunskog odgovora, zbog aktivacije makrofaga i stvaranja kompleksa MHC (Schoenborn i Wilson 2007), čemu u prilog idu i naši rezultati budući da je u uzorcima tumora dokazana značajna hipometiliranost gena *IL12RB* u usporedbi s uzorcima normalnih oralnih sluznica.

Nadalje, potrebno je daljnje istraživanje da bi se utvrdilo je li metiliranje pokazatelj same dobi ili je funkcionalno povezana sa starenjem, no identificirani gen čije se metiliranje proučava u okviru starenja je domena smrti povezana s EDAR (*EDARADD*, engl. *Ectodysplasin-A Receptor-Associated Adapter Protein*), čija su prethodno otkrivena metilirana CpG mjesta u korelaciji s dobi (Vidal-Bralo i sur. 2016). Osim toga, u jednom drugom istraživanju dobiveno hipometiliranje promotora *EDARADD* bilo je povezano s kraćim preživljavanjem povezanim s bolešću NSCLC (engl. *Non-small Cell Lung Cancer*) u usporedbi s onim bolesnicima koji su pokazivali višu razinu metiliranja promotora te to služi kao biomarker ove bolesti (Vizoso i sur. 2015). Ovi rezultati su u koliziji s našim rezultatima, budući da smo uočili značajnu hipometiliranost promotora ovog gena u tumorima naspram normalnih sluznica, no praćenje progresije bolesti kod tih bolesnika bi svakako moglo rasvijetliti rezultate, pogotovo u slučajevima tumora različito metiliranih u promotoru gena *EDARADD*.

Gledanjem statusa metilacije gena *GBP1* (engl. *Interferon-induced Guanylate-Binding Protein 1*), pronađena je različito metilirana regija u regiji gena 5' UTR, koji se hipometilira u uzorcima trostruko negativnih karcinoma dojke (TNBC, engl. *Triple-Negative Breast Cancer*) u usporedbi s normalnim uzorcima (Quintero i sur. 2017). Ovo otkriće pruža potencijalni regulatorni mehanizam koji stoji iza razine povećane ekspresije proteina GBP1 kod TNBC. Mi smo, također, u ovom istraživanju, utvrdili povećanu hipometiliranost gena *GBP* u oralnim i orofaringealnim tumorima. Nadalje, smatra se da je upravo gen *GBP1* povezan je s otpornošću na radioterapiju kod tumora glave i vrata čovjeka (Fukumoto i sur. 2014) i sastavni je dio rezistencije na lijekove kod raka jajnika (Duan i sur. 2006).

Nadalje, prevelika ekspresija proteina HAVCR (engl. *Hepatitis A Virus Cellular Receptor*) zbog hipometiliranosti promotora gena može biti dijagnostički biomarker za kolorektalni karcinom i prognostički marker za duži interval bez bolesti nakon operacije kolorektalnog karcinoma (Wang i sur. 2013). Protein HAVCR-1 je također koristan biomarker za dijagnosticiranje karcinoma bubrežnih stanica i karcinoma bistrnih stanica jajnika (Lin i sur. 2007). Rezultati ovog istraživanja također upućuju na to da bi hipometiliranost promotora gena *HAVCR* u tumorima mogla biti dobar biomarker statusa te, eventualno, prognoze HNC-a.

Gen *SIGLEC* (engl. *Sialic acid-binding Immunoglobulin-type Lectin*) kodira za protein SIGLEC, koji se nalazi na staničnoj površini i vezuje sialinsku kiselinu. Do sada u literaturi nisu zabilježeni podaci o metiliranosti ovog gena, no, u ovom istraživanju zabilježena je značajna hipometiliranost promotora ovoga gena u uzorcima HNC naspram uzoraka normalnih oralnih sluznica.

Još jedno istraživanje koje ide u prilog dobivenim rezultatima provedeno je na uzorcima raka vrata maternice (CC, engl. *Cervical Carcinoma*). U toj su studiji pruženi jaki dokazi da postoji epigenička aktivacija gena uključenih u odgovor imunskog sustava u CC tkivu i, u manjoj mjeri, u uzorcima CIN3 u usporedbi s normalnim tkivom. Skupina gena statistički je bila značajno hipometilirana u CC uzorcima u usporedbi s normalnim tkivom, a svi pripadaju regulatornim genima imunskog odgovora: *AIM2*, *BST2*, *BTN3A3*, *CASP10*, *CLEC2B*, *CST7*, *DAPP1*, *EDARADD*, *FAM26F*, *GBP4*, *HAVCR2*, *HLA-DPBI*, *IGLL1*, *IL12RB1*, *MARCO*, *PIGB*, *PRTN3*, *S1PR4*, *SIGLEC12*, *SPTA1*, *STAT5A* i *VPREB1*. Najviše korelirani geni temeljeni na njihovoj funkciji su imunski efektori (*AIM2*, *BST2*, *BTN3A3* i *IL12RB1*) i geni koji se odnose na antimikrobnu obranu (*AIM2*, *BST2* i *IL12RB1*) (Milutin Gašperov i sur. 2014).

U našem istraživanju korišteno je 15 uzoraka svježeg tkiva oralnih i orofaringelanih tumora koji su bili ili pozitivni ili negativni za HPV. Iz literature je poznato da postoji povezanost hipometiliranosti promotora gena imunskog sustava i prisutnosti HPV-a. Naime, dokazano je da su geni imunskog sustava značajno hipometilirani i u CC u usporedbi s normalnim tkivom što ukazuje na to da je aktivacija imunskog sustava najvjerojatnije odgovor na HPV onkogene E6 i E7 koji su izrazito izraženi kod uznapredovalog karcinoma (IARC 2005). Ranija istraživanja su pokazala da proteini HPV-a, E6 i E7, pojačavaju metiliranje povećanjem regulacije ekspresije DNMT1 degradacijom p53 i izravnom interakcijom s proteinom DNMT1 (Yeung i sur. 2010). Nadalje, druge studije su pokazale da je regulacija metiliranja DNA domaćina od strane proteina E7 HPV tipa 16 povezana sa supresijom imunskog sustava domaćina tijekom progresije tumora povezanog s HPV-om (Cicchini i sur. 2016). Zanimljivo je da je nedavno kliničko ispitivanje pokazalo da je liječenje inhibitorima metiliranja DNA potisnulo rast HPV-pozitivnih HNC-a. Značajno je da je HPV-pozitivnih HNC osjetljiviji na liječenje DNA-demetilirajućim sredstvom 5-aza-2'-deoksicitidinom u odnosu na HPV-negativne HNC (Biktasova i sur. 2014). Ovi nalazi sugeriraju da se disregulacija metiliranja DNA uzrokovana HPV-om može preokrenuti pomoću demetilirajućih sredstava kao ciljane terapije za tumor povezan s HPV infekcijom. Značaj infekcije visokorizičnim HPV-om i njegova povezanost s prognozom bolesnika i dalje je važno pitanje, posebno uzimajući u obzir kontradiktorne rezultate koji su prisutni u različitim studijama u literaturi. Nadalje, nekoliko studija je pokazalo da je prisutnost DNA HPV-a povoljan prognostički faktor s obzirom na recidiv i preživljavanje (Lindel i sur. 2001; Lindquist i sur. 2007). Suprotno tome, druge studije su pokazale da su bolesnici s pozitivnošću na visokorizični HPV imali lošiju prognozu (Hansson i sur. 2005; Rosenquist 2005) ili nisu pokazali značajnu povezanost između visokorizične HPV infekcije i kliničkih ishoda (Morshed 2010; Bozdayi i sur. 2009).

Williams i sur. su 2009. istraživali mogu li HPV-specifični imunski mehanizmi rezultirati odstranjenjem tumora. U tu svrhu su pregledali imuno-kompetentne i imunološki nesposobne miševe sa ili bez HPV-a. U skupini koja je bila imuno-kompetentna, trećina HPV-pozitivnih miševa očistila je svoje tumore u usporedbi s HPV-negativnim miševima. Štoviše, miševi HPV-pozitivni imali su znatno duže preživljavanje od HPV-negativnih miševa. U skupini miševa kojoj je nedostajao imunitet B- i T- stanica, nije bilo razlike u obrascu rasta ili preživljavanju između HPV-

pozitivnih i HPV-negativnih grupe. Stoga je za pretpostaviti da je razlika između HPV-pozitivnih i HPV-negativnih miševa imunosno posredovana. Otkriveno je da su T-stanice CD4+ i CD8+ potrebne za izgradnju ovog imunosnog odgovora. Isti autori su također pokazali da limfociti miševa koji više nisu imali tumor mogu pružiti zaštitni imunitet imuno-inkompetentnim životinjama (Williams i sur. 2009).

Osim toga, potvrđeno je da HPV također regulira NF- $\kappa$ B put. Protein E7 HPV-a povezuje se s kompleksom I $\kappa$ B kinaze i smanjuje aktivnosti IKK-a kako bi se smanjila aktivacija NF- $\kappa$ B (Spitkovsky i sur. 2002). Richards i sur. 2015. su također dokazali da protein E7 smanjuje nuklearnu translokaciju i acetiliranje p65 podjedinice NF- $\kappa$ B. Za protein E6 i E7 prijavljeno je da se natječu s NF- $\kappa$ B/p65 za vezanje na koaktivator ekspresije p300/CBP (engl. *CREB-binding protein*) da bi smanjili ekspresiju IL-8 (Huang i McCance 2002). Zanimljivo je da je istodobno objavljeno da protein E6 HPV tipa 16 pojačava ekspresiju genskih proizvoda ovisnih o putu signaliziranja NF- $\kappa$ B (Nees i sur. 2001). Sve u svemu, učinci proteina HPV-a na aktivaciju NF- $\kappa$ B su složeni, ali su izrazito važni za virusnu patogenezu.

Prethodne studije ekspresije gena na uzorcima tkiva vrata maternice i HNC-a otkrivaju da su brojni geni povezani sa imunosnim sustavom disregulirani u HPV-pozitivnih karcinomima u usporedbi s normalnim tkivima i HPV-negativnih karcinoma (Cicchini i sur. 2016; Pyeon i sur. 2007). Da bi se utvrdilo utječe li HPV izravno na ekspresiju tih imunološki povezanih gena, nedavno je napravljena globalna analiza genske ekspresije (Cicchini i sur. 2016; 2017). Dvije najreguliranije skupine gena bile su one koje su uključene u imunosnu regulaciju i organizaciju izvanstaničnog matriksa. Nadalje, mnogi od ovih imunosnih gena bili su posebno regulirani onkoproteinom E7 HPV tipa 16, za koji je prethodno sugerirano da suzbija antitumorske imunološke odgovore (Cicchini i sur. 2017).

Zaključno, na temelju dosadašnjih te ovog istraživanja, pokazano je da kod tumora glave i vrata čovjeka dolazi do aktivacije imunosnog odgovora hipometiliranjem određenih gena, što bi u konačnici trebalo dovesti do sprječavanja napredovanja tih tumora, a samim time i do bolje prognoze bolesti za bolesnike kod kojih se to dogodi.

## 5. Zaključak

U ovom istraživanju utvrđena je razlika u metilacijskom statusu promotora gena koji imaju funkciju u imunom sustavu: *EDARADD*, *IL12RB*, *MARCO*, *HLA DPB*, *GBP*, *SIGLEC* i *HAVCR2* u uzorcima zdrave oralne sluznice naspram uzoraka svježeg tkiva oralnih i orofaringealnih tumora kod ispitanika različite životne dobi i HPV-statusa. Potvrđeno je da epigenetička promjena metiliranja DNA, utječe na aktivaciju imunog odgovora, što može biti jedan od glavnih mehanizama obrane organizma od nastanka i proliferacije tumora.

U skorije vrijeme tek počinjemo shvaćati ulogu normalnog metiliranja DNA u razvoju i funkciji imunog sustava te ulogu koje promijenjeno metiliranje DNA igra u patološkim stanjima. Bolje razumijevanje čimbenika koji uzrokuju imunološku supresiju u tumorima glave i vrata skvamoznih stanica moglo bi biti od značaja za razvoj novih terapijskih ili profilaktičkih antikancerogenih pristupa. Lošija prognoza ovih karcinoma gotovo sigurno mora biti povezana s činjenicom da ti tumori snažno utječu na imunski sustav domaćina.

Također, ostaje jedno od glavnih pitanja: što bi se dogodilo kada bi se imunski sustav, konkretno promotori gena značajnih za imunski odgovor, demetiliranjem ili nekom drugom epigenetičkom promjenom aktivirali ranije? Osim toga, demetiliranje promotora gena imunog sustava bi moglo dati objašnjenje zbog čega se samo kod određenih HPV-pozitivnih osoba pojave tumori glave i vrata, dok se kod nekih HPV-pozitivnih nikad ne razviju tumori. Nadalje, dobiveni rezultati mogu poslužiti kao temelj daljnjih istraživanja ovih tumora te u konačnici i korištenja ciljanih terapija koje bi spriječile njihovu pojavu. Dodatna istraživanja vezana za promotore gena imunog sustava su svakako potrebna, no važnost demetiliranja te skupine gena i na taj način njihove aktivacije je već sada uočena te je moguće da ima ključnu ulogu u razvoju i prognozi kako tumora glave i vrata, tako i drugih tumora.

Zaključci dobiveni ovim istraživanjem:

1. U uzorcima zdrave oralne sluznice kod ispitanika različite životne dobi dokazano je, posredno, da su promotori gena koji imaju funkciju u imunom sustavu *EDARADD*, *IL12RB*, *MARCO*, *HLA DPB*, *GBP*, *SIGLEC* i *HAVCR2* metilirani u visokom postotku (73,3-100%)

2. U uzorcima oralnih i orofaringealnih tumora glave i vrata kod ispitanika različite životne dobi te HPV-statusa dokazano je, posredno, da su promotori gena koji imaju funkciju u imunom sustavu *EDARADD*, *IL12RB*, *MARCO*, *HLA DPB*, *GBP*, *SIGLEC* i *HAVCR2* metilirani u niskom postotku (0,1%-46,7%)
3. Dokazano je značajno hipometiliranje promotora gena koji imaju funkciju u imunom sustavu u uzorcima tumora naspram zdravih oralnih sluznica, iz čega se može zaključiti da u tumorima ti geni postaju aktivni
4. Aktivirani geni koji imaju funkciju u imunom sustavu vjerojatno igraju bitnu ulogu u pokušaju obrane organizma od tumora glave i vrata čovjeka te, moguće, u prognozi bolesti
5. Hipometiliranost gena koji imaju funkciju u imunom odgovoru bi mogao biti dobar prognostički čimbenik u tumorima glave i vrata
6. Nemetiliranost promotora gena koji imaju funkciju u imunom sustavu, ispitanih u ovom radu, veća je kod HPV-pozitivnih tumora nego kod HPV-negativnih tumora, što ukazuje na to da je njihova aktivacija demetiliranjem najvjerojatnije odgovor na onkogene E6 i E7 HPV-a.



## 7. Literatura

1. Ahmad P., Sana J., Slavik M., Slampa P., Smilek P., Slaby O. (2017): MicroRNAs involvement in radioresistance of head and neck cancer. Disease markers, 2017.
2. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008): Molecular biology of the cell 5th edition: 316-317; 467-476.
3. Alemany L., Saunier M., Alvarado-Cabrero I., Quirós B., Salmeron J., Shin H. R., Clavero O. I sur. (2015): Human papillomavirus DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide. International journal of cancer **136(1)**: 98-107.
4. Angata T., Hayakawa T., Yamanaka M., Varki A., Nakamura M. (2006): Discovery of Siglec-14, a novel sialic acid receptor undergoing concerted evolution with Siglec-5 in primates. The FASEB Journal **20(12)**: 1964-1973.
5. Asiedu C. K., Scotto L., Assoian R. K., Ehrlich, M. (1994): Binding of AP-1CREB proteins and of MDBP to contiguous sites downstream of the human TGF- $\beta$ 1 gene. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression **1219(1)**: 55-63.
6. Avril T., Floyd H., Lopez F., Vivier E., Crocker P.R. (2004): The membrane-proximal immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif is critical for the inhibitory signaling mediated by Siglecs-7 and -9, CD33-related Siglecs expressed on human monocytes and NK cells. Journal of Immunology **173(11)**: 6841-9.
7. Badoual C., Hans S., Rodriguez J., Peyrard S., Klein C., Agueznay N. E. H., Brasnu D. F. i sur. (2006): Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. Clinical cancer research **12(2)**: 465-472.
8. Ballas Z. K. (1984): The use of 5-azacytidine to establish constitutive interleukin 2-producing clones of the EL4 thymoma. The Journal of Immunology **133(1)**: 7-9.
9. Banerjee T., Chakravarti D. (2011): A peek into the complex realm of histone phosphorylation. Molecular and cellular biology **31(24)**: 4858-4873.
10. Baylin S. B. (2005): DNA methylation and gene silencing in cancer. Nature Reviews Clinical Oncology **2**.
11. Baylin S. B., Belinsky S. A., Herman J. G. (2000): Aberrant methylation of gene promoters in cancer—concepts, misconcepts, and promise.
12. Bell D., Hanna E. Y., Miele L., Roberts D., Weber R. S., El-Naggar A. K. (2014): Expression and significance of notch signaling pathway in salivary adenoid cystic carcinoma. Annals of diagnostic pathology **18(1)**: 10-13.
13. Berg M., Stenlund A. (1997): Functional interactions between papillomavirus E1 and E2 proteins. Journal of Virology **71(5)**: 3853-3863.
14. Berkhout R. J., Tieben L. M., Smits H. L., Bavinck J. N., Vermeer B. J., Ter Schegget J. (1995): Nested PCR approach for detection and typing of

- epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus types in cutaneous cancers from renal transplant recipients. *Journal of clinical microbiology* **33(3)**: 690-695.
15. Bernard H. U., Chan S. Y., Manos M. M., Ong C. K., Villa L. L., Delius H., Wheeler C. M. i sur. (1994): Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *Journal of Infectious Diseases* **170(5)**: 1077-1085.
  16. Bernard H. U. (2002): Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antiviral therapy* **7(4)**: 219-237.
  17. Bernard H. U. (2005): The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of clinical virology* **32**: 1-6.
  18. Bibikova M., Fan J. B. (2009): GoldenGate® assay for DNA methylation profiling. In *DNA Methylation*. Humana Press: 149-163.
  19. Biktasova A., Hajek M., Sewell A., Gary C., Bellinger G., Deshpande H. A., Yarbrough W. G. i sur. (2017): Demethylation therapy as a targeted treatment for human papillomavirus-associated head and neck Cancer. *Clinical Cancer Research* **23(23)**: 7276-7287.
  20. Bird A. (1992): The essentials of DNA methylation. *Cell* **70(1)**: 5-8.
  21. Bestor T. H. (1998): Gene silencing: Methylation meets acetylation. *Nature* **393(6683)**: 311.
  22. Bozdayi G., Kemaloglu Y., Ekinci O., Dogan B., Ilhan M. N., Aydil U., Rota S. i sur. (2009): Role of human papillomavirus in the clinical and histopathologic features of laryngeal and hypopharyngeal cancers. *Journal of Otolaryngology--Head & Neck Surgery* **38(1)**.
  23. Brink A. A., Snijders P. J., Meijer C. J. (2007): HPV detection methods. *Disease markers* **23(4)**: 273-281.
  24. Bumber Ž., Katić V., Nikšić-Ivančić M., Pegan B., Petric V., Šprem N. i sur. (2004): *Otorinolaringologija*. 1. izd. Zagreb. Naklada Ljevak.
  25. Castellsagué X., Mena M., Alemany L. (2017): Epidemiology of HPV-Positive Tumors in Europe and in the World. In *HPV Infection in Head and Neck Cancer* Springer, Cham: 27-35.
  26. Chakravarthy S., Park Y. J., Chodaparambil J., Edayathumangalam R. S., Luger K. (2005): Structure and dynamic properties of nucleosome core particles. *FEBS letters*, **579(4)**: 895-898.
  27. Chaturvedi A.K., Engels E.A., Pfeiffer R.M. i sur. (2011): Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol.* **29**: 4294- 4301.
  28. Chen C. Z., Li L., Lodish H. F., Bartel, D. P. (2004): MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *science* **303(5654)**: 83-86.
  29. Chikamatsu K., Sakakura K., Whiteside T. L., Furuya N. (2007): Relationships between regulatory T cells and CD8+ effector populations in patients with

- squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck* **29(2)**: 120-127.
30. Cicchini L., Blumhagen R. Z., Westrich J. A., Myers M. E., Warren C. J., Siska C., Pyeon D. i sur. (2017): High-risk human papillomavirus E7 alters host DNA methylome and represses HLA-E expression in human keratinocytes. *Scientific reports* **7(1)**: 3633.
  31. Cicchini L., Westrich J. A., Xu T., Vermeer D. W., Berger J. N., Clambey E. T., Lee J. H. i sur. (2016): Suppression of antitumor immune responses by human papillomavirus through epigenetic downregulation of CXCL14. *MBio* **7(3)**: e00270-16.
  32. Clifford G. M., Smith J. S., Aguado T., Franceschi S. (2003): Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *British journal of cancer* **89(1)**: 101.
  33. Conger K. L., Liu J. S., Kuo S. R., Chow L. T., Wang T. S. F. (1999): Human papillomavirus DNA replication interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase  $\alpha$ /primase. *Journal of Biological Chemistry* **274(5)**: 2696-2705.
  34. Cripe T. P., Haugen T. H., Turk J. P., Tabatabai F., Schmid P. D., Dürst M., Turek L. P. i sur. (1987): Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *The EMBO journal* **6(12)**: 3745-3753.
  35. Crocker P. R., Paulson J. C., Varki A. (2007): Siglecs and their roles in the immune system. *Nature Reviews Immunology* **7(4)**: 255.
  36. Crosio C., Fimia G. M., Loury R., Kimura M., Okano Y., Zhou H., Sassone-Corsi P. i sur. (2002): Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Molecular and cellular biology* **22(3)**: 874-885.
  37. Crow J. M. (2012): HPV: The global burden. *Nature* **488(7413)**: S2–S3.
  38. Daniel J. A., Pray-Grant M. G., Grant P. A. (2005): Effector proteins for methylated histones: an expanding family. *Cell Cycle* **4(7)**: 919-926.
  39. Dannenberg A. J., Lippman S. M., Mann J. R., Subbaramaiah K., DuBois R. N. (2005): Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic targets for chemoprevention. *Journal of clinical oncology* **23(2)**: 254-266.
  40. Dell G., Wilkinson K. W., Tranter R., Parish J., Brady R. L., Gaston K. (2003): Comparison of the structure and DNA-binding properties of the E2 proteins from an oncogenic and a non-oncogenic human papillomavirus. *Journal of molecular biology* **334(5)**: 979-991.
  41. De Martel C., Plummer M., Vignat J., Franceschi S. (2017): Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *International journal of cancer* **141(4)**: 664-670.

42. Demokan S., Suoglu Y., Demir D., Gozeler M., Dalay N. (2006): Microsatellite instability and methylation of the DNA mismatch repair genes in head and neck cancer. *Annals of oncology* **17(6)**: 995-999.
43. De Villiers E. M., Fauquet C., Broker T. R., Bernard H. U., Zur Hausen H. (2004): Classification of papillomaviruses. *Virology* **324(1)**: 17-27.
44. Dikshit R., Gupta P. C., Ramasundarahettige C., Gajalakshmi V., Aleksandrowicz L., Badwe R., Mallath M. I sur. (2012): Cancer mortality in India: a nationally representative survey. *The Lancet* **379(9828)**: 1807-1816.
45. Di Leva G., Croce C. M. (2013): miRNA profiling of cancer. *Current opinion in genetics & development* **23(1)**: 3-11.
46. DiMaio D., Mattoon, D. (2001): Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene* **20(54)**: 7866.
47. DiNardo A. R., Nishiguchi T., Mace E. M., Rajapakshe K., Mtetwa G., Kay A., Coarfa C. i sur. (2018). Schistosomiasis Induces Persistent DNA Methylation and Tuberculosis-Specific Immune Changes. *The Journal of Immunology* **201(1)**: 124-133.
48. Diz P., Meleti M., Diniz-Freitas M., Vescovi P., Warnakulasuriya S., Johnson N. W., Kerr A. R. (2017): Oral and pharyngeal cancer in Europe: Incidence, mortality and trends as presented to the Global Oral Cancer Forum. *Translational Research in Oral Oncology* **2**: 2057178X17701517.
49. Doorbar J., Ely S., Sterling J., McLean C., Crawford L. (1991): Specific interaction between HPV-16 E1–E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* **352(6338)**: 824.
50. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stole M, Broke TR, Stanley MA. (2012): The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine* **30**: F55-F70.
51. Dorić A., Grahovac M. (2005): Infekcije humanim papiloma virusom-epidemiološke pretpostavke i pokazatelji. *Medix: specijalizirani medicinski dvomjesečnik* **11(58)**: 62-66.
52. Duan Z., Foster R., Brakora K. A., Yusuf R. Z., Seiden M. V. (2006): GBP1 overexpression is associated with a paclitaxel resistance phenotype. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **57(1)**: 25-33.
53. Dueñas-González, A., Lizano, M., Candelaria, M., Cetina, L., Arce, C., & Cervera, E. (2005). Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Molecular cancer* **4(1)**: 38.
54. Duensing S., Münger K. (2002): The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer research* **62(23)**: 7075-7082.
55. Duensing A., Liu Y., Perdreau S. A., Kleylein-Sohn J., Nigg E. A., Duensing S. (2007): Centriole overduplication through the concurrent formation of multiple daughter centrioles at single maternal templates. *Oncogene* **26(43)**: 6280.

56. Eads C. A., Danenberg K. D., Kawakami K., Saltz L. B., Blake C., Shibata D., Laird P. W. i sur. (2000): MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic acids research* **28(8)**: e32-00.
57. Ehrlich M., Nelson M. R., Stanssens P., Zabeau M., Liloglou T., Xinarianos G., van den Boom D. i sur. (2005): Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102(44)**: 15785-15790.
58. Ehrlich M. (2002): DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* **21(35)**: 5400.
59. Eichten A., Rud D. S., Graca M., Piboonniyom S. O., Zacny V., Münger, K. (2004): Molecular pathways executing the “trophic sentinel” response in HPV-16 E7-expressing normal human diploid fibroblasts upon growth factor deprivation. *Virology* **319(1)**: 81-93.
60. Elomaa O., Sankala M., Pikkarainen T., Bergmann U., Tuuttila A., Raatikainen-Ahokas A., Tryggvason, K. i sur. (1998): Structure of the human macrophage MARCO receptor and characterization of its bacteria-binding region. *Journal of Biological Chemistry* **273(8)**: 4530-4538.
61. Fan C. Y. (2004): Epigenetic alterations in head and neck cancer: prevalence, clinical significance, and implications. *Current oncology reports* **6(2)**: 152-161.
62. Farr A., Pattison S., Youn B. S., Roman A. (1995): Detection of silencer activity in the long control regions of human papillomavirus type 6 isolated from both benign and malignant lesions. *Journal of general virology* **76(4)**: 827-835.
63. Fehrman F., Laimins L. A. (2003): Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* **22(33)**: 5201.
64. Ferlay J., Shin H. R., Bray F., Forman D., Mathers C., Parkin D. M. (2010): Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer* **127(12)**: 2893-2917.
65. Feinberg A. P., Vogelstein, B. (1983): Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301(5895)**: 89.
66. Feigelstock D., Thompson P., Mattoo P., Zhang Y., Kaplan G. G. (1998): The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *Journal of virology* **72(8)**: 6621-6628.
67. Figueiro F., Muller L., Funk S., Jackson E. K., Battastini A. M. O., Whiteside T. L. (2016): Phenotypic and functional characteristics of CD39high human regulatory B cells (Breg). *Oncoimmunology* **5(2)**: e1082703.
68. Finzer P., Aguilar-Lemarroy A., Rösl F. (2002): The role of human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 in apoptosis. *Cancer letters* **188(1-2)**: 15-24.
69. Fitzmaurice C., Allen C., Barber R. M., Barregard L., Bhutta Z. A., Brenner H., Fleming T. I sur. (2017): Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted

- life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA oncology* **3(4)**: 524-548.
70. Frommer M., McDonald L. E., Millar D. S., Collis C. M., Watt F., Grigg G. W., Paul C. L. i sur. (1992): A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89(5)**: 1827-1831.
  71. Forslund O., Antonsson A., Nordin P., Stenquist B. O., Hansson B. G. (1999): A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *Journal of General Virology* **80(9)**: 2437-2443.
  72. Frattini M. G., Laimins L. A. (1994): Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91(26)**: 12398-12402.
  73. Friedman J. M., Liang G., Liu C. C., Wolff E. M., Tsai Y. C., Ye W., Jones P. A. i sur. (2009): The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2. *Cancer research* **69(6)**: 2623-2629.
  74. Fukumoto M., Amanuma T., Kuwahara Y., Shimura T., Suzuki M., Mori S., Sano K. i sur. (2014): Guanine nucleotide-binding protein 1 is one of the key molecules contributing to cancer cell radioresistance. *Cancer science* **105(10)**: 1351-1359.
  75. Garnett T. O., Duerksen-Hughes P. J. (2006): Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *Archives of virology* **151(12)**: 2321-2335.
  76. Garnett T. O., Filippova M., Duerksen-Hughes P. J. (2006): Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell death and differentiation* **13(11)**: 1915.
  77. Georgopoulos N. T., Proffitt J. L., Blair G. E. (2000): Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. *Oncogene* **19(42)**: 4930.
  78. Ghosh S., May M. J., Kopp E. B. (1998): NF- $\kappa$ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology* **16(1)**: 225-260.
  79. Gillison M. L., Koch W. M., Capone R. B., Spafford M., Westra W. H., Wu L., Shah K. V. i sur. (2000): Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute* **92(9)**: 709-720.
  80. Gillison M. L., D'Souza G., Westra W., Sugar E., Xiao W., Begum S., Viscidi R. (2008): Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute* **100(6)**: 407-420.

81. Graham S. V. (2017): The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clinical science* **131(17)**: 2201-2221.
82. Grassmann K., Rapp B., Maschek H., Petry K. U., Iftner T. (1996): Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *Journal of virology* **70(4)**: 2339-2349.
83. Gravitt P. E., Peyton C. L., Apple R. J., Wheeler C. M. (1998): Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *Journal of clinical microbiology* **36(10)**: 3020-3027.
84. Grce M., Matovina M., Milutin-Gašperov N., Sabol I. (2010): Advances in cervical cancer control and future perspectives. *Collegium antropologicum* **34(2)**: 731-736.
85. Greene F. L., Balch C. M., Fleming I. D., Fritz A., Haller D. G., Morrow M., Page D. L. (Eds.). (2002): *AJCC cancer staging handbook: TNM classification of malignant tumors*. Springer Science & Business Media.
86. Greger V., Passarge E., Höpping W., Messmer E., Horsthemke B. (1989): Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Human genetics* **83(2)**: 155-158.
87. Haller K., Stubenrauch F., Pfister H. (1995): Differentiation-dependent transcription of the epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus type 5 in benign lesions. *Virology* **214(1)**: 245-255.
88. Hanahan D., Weinberg R. A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144(5)**: 646-674.
89. Hansson B. G., Rosenquist K., Antonsson A., Hansson B. G., Rosenquist K., Antonsson A., Andersson G. i sur. (2005): Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Acta oto-laryngologica* **125(12)**: 1337-1344.
90. Hasan U. A., Bates E., Takeshita F., Biliato A., Accardi R., Bouvard V., Sideri M. i sur. (2007): TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *The Journal of Immunology* **178(5)**: 3186-3197.
91. Hasegawa S., Sato T., Akazawa H., Okada H., Maeno A., Ito M., Yamauchi Y. i sur. (2002): Apoptosis in neural crest cells by functional loss of APC tumor suppressor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99(1)**: 297-302.
92. Herman J. G., Graff J. R., Myöhänen S. B. D. N., Nelkin B. D., Baylin S. B. (1996): Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the national academy of sciences* **93(18)**: 9821-9826.

93. Herman J. G., Baylin, S. B. (2003): Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *New England Journal of Medicine* **349(21)**: 2042-2054.
94. Hibma M. H. (2012): The Immune Response to Papillomavirus During Infection Persistence and Regression. *The open virology journal* **6**: 241.
95. Hong X., Hao K., Ladd-Acosta C., Hansen K. D., Tsai H. J., Liu X., Sun Y. i sur. (2015). Genome-wide association study identifies peanut allergy-specific loci and evidence of epigenetic mediation in US children. *Nature communications* **6**: 6304.
96. Howell C. Y., Bestor T. H., Ding F., Latham K. E., Mertineit C., Trasler J. M., Chaillet J. R. (2001): Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell* **104(6)**: 829-838.
97. Howlader N. A. M. N., Noone A. M., Krapcho M., Garshell J., Miller D., Altekruse S. F., Mariotto A. i sur. (2014): SEER cancer statistics review, 1975–2011. Bethesda, MD, National Cancer Institute, 19.
98. Huang S. M., McCance D. J. (2002): Down regulation of the interleukin-8 promoter by human papillomavirus type 16 E6 and E7 through effects on CREB binding protein/p300 and P/CAF. *Journal of virology* **76(17)**: 8710-8721.
99. IARC (2005): Cervix cancer screening. *Diamond Pocket Books Vol. 10*
100. IARC (2007): IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans volume 90 Human papillomaviruses. Iarc Press, Lyon, France.
101. Jalšovec D., Pološki N. (2005): Sustavna i topografska anatomija čovjeka. Školska knjiga.
102. Janeway C., Murphy K. P., Travers P., Walport, M. (2008): Janeway's immuno biology 7th Edition.
103. Jing J., Yang I. V., Hui L., Patel J. A., Evans C. M., Prikeris R., Schwartz D. A. i sur. (2013): Role of macrophage receptor with collagenous structure in innate immune tolerance. *The Journal of Immunology* **190(12)**: 6360-6367.
104. Jones P. A., Laird P. W. (1999): Cancer-epigenetics comes of age. *Nature genetics* **21(2)**: 163.
105. Jones P. A., Martienssen R. (2005): A blueprint for a human epigenome project: the AACR human epigenome workshop. *Cancer research* **65(24)**: 11241-11246. Joosten S. A., Sullivan L. C., Ottenhoff T. H. (2016): Characteristics of HLA-E restricted T-cell responses and their role in infectious diseases. *Journal of immunology research*.
106. Kallin E. M., Cao R., Jothi R., Xia K., Cui K., Zhao K., Zhang Y. (2009): Genome-wide H2A localization analysis highlights Bmi1-dependent deposition of the mark at repressed genes. *PLoS genetics* **5(6)**: e1000506.
107. Kievits T., van Gemen B., van Strijp D., Schukkink R., Dircks M., Adriaanse H., Lens P. I sur. (1991): NASBATM isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *Journal of virological methods* **35(3)**: 273-286.



108. Klaes R., Friedrich T., Spitkovsky D., Ridder R., Rudy W., Petry U., von Knebel Doeberitz M. i sur. (2001): Overexpression of p16INK4A as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *International journal of cancer* **92(2)**: 276-284.
109. Kobayashi N., Karisola P., Peña-Cruz V., Dorfman D. M., Jinushi M., Umetsu S. E., Sharpe A. H. i sur. (2007): TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity* **27(6)**: 927-940.
110. Krueger F., Kreck B., Franke A., Andrews S. R. (2012): DNA methylome analysis using short bisulfite sequencing data. *Nature methods* **9(2)**: 145.
111. Kular L., Liu Y., Ruhrmann S., Zheleznyakova G., Marabita F., Gomez-Cabrero D., Aeinehband S. i sur. (2018): DNA methylation as a mediator of HLA-DRB1\* 15: 01 and a protective variant in multiple sclerosis. *Nature communications* **9(1)**: 2397.
112. Kuo M. H., Allis C. D. (1998): Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* **20(8)**: 615-626.
113. Lee K. Y., Broker T. R., Chow L. T. (1998): Transcription factor YY1 represses cell-free replication from human papillomavirus origins. *Journal of virology* **72(6)**: 4911-4917.
114. Lee Y., Jeon K., Lee J. T., Kim S., Kim V. N. (2002): MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal* **21(17)**: 4663-4670.
115. Lee Y., Jeon K., Lee J. T., Kim S., Kim V. N. (2002): MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal* **21(17)**: 4663-4670.
116. Leptak C., y Cajal S. R., Kulke R., Horwitz B. H., Riese D., Dotto G. P., DiMaio D. (1991): Tumorigenic transformation of murine keratinocytes by the E5 genes of bovine papillomavirus type 1 and human papillomavirus type 16. *Journal of virology* **65(12)**: 7078-7083.
117. Lindel K., Beer K. T., Laissue J., Greiner R. H., Aebersold D. M. (2001): Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer* **92(4)**: 805-813.
118. Lindquist D., Romanitan M., Hammarstedt L., Näsman A., Dahlstrand H., Lindholm J., Dalianis T. i sur. (2007): Human papillomavirus is a favourable prognostic factor in tonsillar cancer and its oncogenic role is supported by the expression of E6 and E7. *Molecular Oncology* **1(3)**: 350-355.
119. Li H., Ou X., Xiong J., Wang T. (2006): HPV16E7 mediates HADC chromatin repression and downregulation of MHC class I genes in HPV16 tumorigenic cells through interaction with an MHC class I promoter. *Biochemical and biophysical research communications* **349(4)**: 1315-1321.
120. Lin F., Zhang P. L., Yang X. J., Shi J., Blasick T., Han W. K., Bonventre J. V. i sur. (2007): Human kidney injury molecule-1 (hKIM-1): a useful immunohistochemical marker for diagnosing renal cell carcinoma and ovarian

- clear cell carcinoma. *The American journal of surgical pathology* **31(3)**: 371-381.
121. Lin B. Y., Broker T. R., Chow L. T. (2005): Analysis of HPV DNA replication using transient transfection and cell-free assays. *Methods Mol. Med.* **119**: 331-348.
122. Liu Y., Aryee M. J., Padyukov L., Fallin M. D., Hesselberg E., Runarsson A., Shchetynsky K. i sur. (2013): Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis. *Nature biotechnology* **31(2)**: 142.
123. Lomelí H., Vázquez M. (2011): Emerging roles of the SUMO pathway in development. *Cellular and Molecular Life Sciences* **68(24)**: 4045-4064.
124. Loo Y. M., Melendy T. (2004): Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *Journal of virology* **78(4)**: 1605-1615.
125. Mack G. S. (2006). Epigenetic cancer therapy makes headway. *Journal of the National Cancer Institute* **98(20)**: 1443-1444.
126. Malfoy B. (2000): The revival of DNA methylation. *Journal of cell science* **113(22)**: 3887-3888.
127. Marur S., D'Souza G., Westra W. H., Forastiere A. A. (2010): HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *The lancet oncology* **11(8)**: 781-789.
128. McIntire J. J., Umetsu S. E., Akbari O., Potter M., Kuchroo V. K., Barsh G. S., DeKruyff R. H. i sur. (2001): Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nature immunology* **2(12)**: 1109.
129. Mehanna H., Beech T., Nicholson T., El-Hariry I., McConkey C., Paleri V., Roberts S. (2013): Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer—systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head & neck* **35(5)**: 747-755.
130. Meissner A. (2007): Lander es: the mammalian epigenome. *Cell* **128**: 669-681.
131. Merlo A., Herman J. G., Mao L., Lee D. J., Gabrielson E., Burger P. C., Sidransky D. i sur. (1995): 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nature medicine* **1(7)**: 686.
132. Milutin-Gašperov N., Sabol I., Halec G., Matovina M., Grce M. (2007): Retrospective study of the prevalence of high-risk human papillomaviruses among Croatian women. *Collegium antropologicum* **31(2)**: 89-96.
133. Milutin-Gašperov N., Sabol I., Matovina M., Spaventi Š., Grce M. (2008): Detection and typing of human papillomaviruses combining different methods: polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism, line probe assay and sequencing. *Pathology and Oncology Research* **14(4)**: 355-363.

134. Milutin-Gašperov N., Farkas S. A., Nilsson T. K., Grce M. (2014): Epigenetic activation of immune genes in cervical cancer. *Immunology letters* **162(2)**: 256-257.
135. Milutin-Gašperov N., Sabol I., Planinić P., Grubišić G., Fistončić I., Čorušić A., Grce M. (2015): Methylated host cell gene promoters and human papillomavirus type 16 and 18 predicting cervical lesions and cancer. *PloS one* **10(6)**: e0129452.
136. Modis Y., Trus B. L., Harrison S. C. (2002): Atomic model of the papillomavirus capsid. *The EMBO journal* **21(18)**: 4754-4762.
137. Mohr I. J., Clark R., Sun S., Androphy E. J., MacPherson P., Botchan M. R. (1990): Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* **250(4988)**: 1694-1699.
138. Moody C. A., Laimins L. A. (2010): Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer* **10(8)**: 550.
139. Morshed K. (2010): Association between human papillomavirus infection and laryngeal squamous cell carcinoma. *Journal of medical virology* **82(6)**: 1017-1023.
140. Nair V. S., Toor S. M., Taha R. Z., Shaath H., Elkord E. (2018): DNA methylation and repressive histones in the promoters of PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, TIGIT, PD-L1, and galectin-9 genes in human colorectal cancer. *Clinical epigenetics* **10(1)**: 104.
141. Nakahara T., Peh W. L., Doorbar J., Lee D., Lambert P. F. (2005): Human papillomavirus type 16 E1/E4 contributes to multiple facets of the papillomavirus life cycle. *Journal of virology* **79(20)**: 13150-13165.
142. Nakić M., Žižić V. (2001): Biljezi i citološke osobitosti tumora. *Medicus* **10.2**: 147-155.
143. Nan X., Ng H. H., Johnson C. A., Laherty C. D., Turner B. M., Eisenman R. N., Bird A. (1998): Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393(6683)**: 386.
144. Näsman A., Attner P., Hammarstedt L., Du J., Eriksson M., Giraud G., Ramqvist T. i sur. (2009): Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *International Journal of Cancer* **125(2)**: 362-366.
145. Nees M., Geoghegan J. M., Hyman T., Frank S., Miller L., Woodworth C. D. (2001): Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF- $\kappa$ B-responsive genes in cervical keratinocytes. *Journal of virology* **75(9)**: 4283-4296.
146. Novakowski K.E., Huynh A., Han S., Dorrington M.G., Yin C., Tu Z., Pelka P., Whyte P., Guarné A., Sakamoto K., Bowdish D.M. (2016): A naturally

- occurring transcript variant of MARCO reveals the SRCR domain is critical for function. *Immunology and Cell Biology* **94** (7): 646–55.
147. Oakeley E. J., Jost J. P. (1996): Non-symmetrical cytosine methylation in tobacco pollen DNA. *Plant molecular biology* **31**(4): 927-930.
  148. Ogi K., Toyota M., Ohe-Toyota M., Tanaka N., Noguchi M., Sonoda T., Tokino T. i sur. (2002): Aberrant methylation of multiple genes and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research* **8**(10): 3164-3171.
  149. Okano M., Bell D. W., Haber D. A., Li E. (1999): DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**(3): 247-257.
  150. Olszewski M. A., Gray J., Vestal D. J. (2006): In silico genomic analysis of the human and murine guanylate-binding protein (GBP) gene clusters. *Journal of interferon and cytokine research* **26**(5): 328-352.
  151. O'Sullivan B., Huang S. H., Su J., Garden A. S., Sturgis E. M., Dahlstrom K., Adelstein D. I sur. (2016): Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. *The Lancet Oncology* **17**(4): 440-451.
  152. Ozawa S., Kato Y., Komori R., Maehata Y., Kubota E., Hata R. I. (2006): BRAK/CXCL14 expression suppresses tumor growth in vivo in human oral carcinoma cells. *Biochemical and biophysical research communications* **348**(2): 406-412.
  153. Ozbun M. A., Meyers C. (1998): Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b. *Journal of virology* **72**(4): 2715-2722.
  154. Peterson C. L., Laniel M. A. (2004): Histones and histone modifications. *Current Biology* **14**(14): R546-R551.
  155. Phelps W. C., Yee C. L., Münger K., Howley P. M. (1988): The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* **53**(4): 539-547.
  156. Pillai S., Netravali I.A., Cariappa A., Mattoo H. (2012): Siglecs and immune regulation. *Annual Review of Immunology* **30**: 357–92.
  157. Plüddemann A., Neyen C., Gordon S. (2007): Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods* **43**(3): 207-217.
  158. Pyeon D., Newton M. A., Lambert P. F., Den Boon J. A., Sengupta S., Marsit C. J., Kelsey K. T. i sur. (2007): Fundamental differences in cell cycle deregulation in human papillomavirus–positive and human papillomavirus–negative head/ neck and cervical cancers. *Cancer research* **67**(10): 4605-4619.
  159. Quintero M., Adamoski D., dos Reis L. M., Ascensão C. F. R., de Oliveira K. R. S., de Almeida Gonçalves K., Dias S. M. G. (2017): Guanylate-binding protein-1 is a potential new therapeutic target for triple-negative breast cancer. *BMC cancer* **17**(1): 727.

160. Reichert T. E., Strauss L., Wagner E. M., Gooding W., Whiteside T. L. (2002): Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma. *Clinical cancer research* **8(10)**: 3137-3145.
161. Richards K. H., Wasson C. W., Watherston O., Doble R., Blair G. E., Wittmann M., Macdonald A. (2015): The human papillomavirus (HPV) E7 protein antagonises an Imiquimod-induced inflammatory pathway in primary human keratinocytes. *Scientific reports* **5**: 12922.
162. Robertson K. D., A. Jones P. (2000): DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* **21(3)**: 461-467.
163. Rosas S. L., Koch W., da Costa Carvalho M. G., Wu L., Califano J., Westra W., Sidransky D. i sur. (2001): Promoter hypermethylation patterns of p16, MGMT, and DAPK in tumor and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res* **61**: 939-942.
164. Rosenquist K. (2005): Risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Swedish dental journal. Supplement* (179): 1-66.
165. Prendergast G. C., Ziff E. B. (1991): Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science* **251(4990)**: 186-189.
166. Sabol I., Salakova M., Smahelova J., Pawlita M., Schmitt M., Milutin Gašperov N., Tachezy R. i sur. (2008): Evaluation of different techniques for identification of human papillomavirus types of low prevalence. *Journal of clinical microbiology* **46(5)**: 1606-1613.
167. Saito Y., Liang G., Egger G., Friedman J. M., Chuang J. C., Coetzee G. A., Jones P. A. (2006): Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer cell* **9(6)**: 435-443.
168. Sakai T., Toguchida J., Ohtani N., Yandell D. W., Rapaport J. M., Dryja T. P. (1991): Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *American journal of human genetics* **48(5)**: 880.
169. Sanchez-Cespedes M., Esteller M., Wu L., Nawroz-Danish H., Yoo G. H., Koch W. M., Sidransky D. i sur. (2000): Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer research* **60(4)**: 892-895.
170. Sandal T. (2002): Molecular aspects of the mammalian cell cycle and cancer. *The oncologist* **7(1)**: 73-81.
171. Sanghvi V. R., Steel L. F. (2011): The cellular TAR RNA binding protein, TRBP, promotes HIV-1 replication primarily by inhibiting the activation of double-stranded RNA-dependent kinase PKR. *Journal of virology* **85(23)**: 12614-12621.
172. Sano D., Oridate N. (2016): The molecular mechanism of human papillomavirus -induced carcinogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *International journal of clinical oncology* **21(5)**: 819-826.

173. Santini V., Kantarjian H. M., Issa J. P. (2001): Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Annals of internal medicine* **134**(7): 573-586.
174. Santos-López G., Márquez-Domínguez L., Reyes-Leyva J., Vallejo-Ruiz V. (2015): General aspects of structure, classification and replication of human papillomavirus. *Revista médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* **53**: S166.
175. Schiffman M., Clifford G., Buonaguro F. M. (2009): Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infectious agents and cancer* **4**(1): 8.
176. Schiffman M., Doorbar J., Wentzensen N., De Sanjosé S., Fakhry C., Monk B. J., Franceschi S. i sur. (2016): Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature reviews Disease primers* **2**(1): 1-20.
177. Scheffner M., Werness B. A., Huibregtse J. M., Levine A. J., Howley P. M. (1990): The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**(6): 1129-1136.
178. Schoenborn J. R., Wilson C. B. (2007): Regulation of interferon- $\gamma$  during innate and adaptive immune responses. *Advances in immunology* **96**: 41-101.
179. Serrano B., Brotons M., Bosch F. X., Bruni L. (2018): Epidemiology and burden of HPV-related disease. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* **47**: 14-26.
180. Shah K. V. (1998): Do human papillomavirus infections cause oral cancer? *Journal of the National Cancer Institute* **90**(21): 1585-1586.
181. Smotkin D., Wettstein F. O. (1986): Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**(13): 4680-4684.
182. Sneider T. W. (1980): The 5'-cytosine in CCGG 1 is methylated in two eukaryotic DNAs and Msp I is sensitive to methylatlon at this site. *Nucleic acids research* **8**(17): 3829-3840.
183. Spitkovsky D., Hehner S. P., Hofmann T. G., Möller A., Schmitz M. L. (2002): The human papillomavirus oncoprotein E7 attenuates NF- $\kappa$ B activation by targeting the I $\kappa$ B kinase complex. *Journal of Biological Chemistry* **277**(28): 25576-25582.
184. Suzuki H., Gabrielson E., Chen W., Anbazhagan R., Van Engeland M., Weijnenberg M. P., Baylin S. B. i sur. (2002): A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nature genetics* **31**(2): 141.
185. Szalmás, A., Kónya J. (2009): Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis. In *Seminars in cancer biology* Vol. **19**, No. 3. Academic Press: 144-152.

186. Terhune S. S., Milcarek C., Laimins L. A. (1999): Regulation of human papillomavirus type 31 polyadenylation during the differentiation-dependent life cycle. *Journal of virology* **73(9)**: 7185-7192.
187. Tessema M., Klinge D. M., Yingling C. M., Do K., Van Neste L., Belinsky S. A. (2010): Re-expression of CXCL14, a common target for epigenetic silencing in lung cancer, induces tumor necrosis. *Oncogene* **29(37)**: 5159.
188. Tost J., Gut I. G. (2007): DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nature protocols* **2(9)**: 2265.
189. Trievel R. C. (2004): Structure and function of histone methyltransferases. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression* **14(3)**.
190. Umetsu S. E., Lee W. L., McIntire J. J., Downey L., Sanjanwala B., Akbari O., DeKruyff R. H. i sur. (2005): TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. *Nature immunology* **6(5)**: 447.
191. Ushijima T. (2005): Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nature Reviews Cancer* **5(3)**: 223.
192. Van den Broek M. F., Müller U., Huang S., Aguet M., Zinkernagel R. M. (1995): Antiviral defense in mice lacking both alpha/beta and gamma interferon receptors. *Journal of virology* **69(8)**: 4792-4796.
193. van Schooneveld E., Wildiers H., Vergote I., Vermeulen P. B., Dirix L. Y., Van Laere S. J. (2015): Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management. *Breast cancer research* **17(1)**: 21.
194. Vestal D. J., Jeyaratnam J. A. (2011): The guanylate-binding proteins: emerging insights into the biochemical properties and functions of this family of large interferon-induced guanosine triphosphatase. *Journal of Interferon & Cytokine Research* **31(1)**: 89-97.
195. Vidal-Bralo L., Lopez-Golan Y., Gonzalez A. (2016): Simplified assay for epigenetic age estimation in whole blood of adults. *Frontiers in genetics* **7**: 126.
196. Vince A, Židovec-Lepej S. (2010.): Klinička značajnost molekularne analize humanih papilomavirusa. *Infektološki glasnik* **30**: 123–129.
197. Vizoso M., Puig M., Carmona F. J., Maqueda M., Velásquez A., Gómez A., Trepát X. i sur. (2015): Aberrant DNA methylation in non-small cell lung cancer-associated fibroblasts. *Carcinogenesis* **36(12)**: 1453-1463.
198. Vlock D. R. (1991): Immunobiologic aspects of head and neck cancer: clinical and laboratory correlates. *Hematology/oncology clinics of North America* **5(4)**: 797-820.
199. Vousden K. (1993): Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. *The FASEB journal* **7(10)**: 872-879.
200. Waddington C. H. (1939): Preliminary notes on the development of the wings in normal and mutant strains of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **25(7)**: 299.

201. Walboomers J. M., Jacobs M. V., Manos M. M., Bosch F. X., Kummer J. A., Shah K. V. i sur. (1999): Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology* **189(1)**: 12-19.
202. Walton E. L., Francastel C., Velasco G. (2011): Maintenance of DNA methylation: Dnmt3b joins the dance. *Epigenetics* **6(11)**: 1373-1377.
203. Wang Y., Martin T. A., Jiang W. G. (2013): HAVcR-1 expression in human colorectal cancer and its effects on colorectal cancer cells in vitro. *Anticancer research* **33(1)**: 207-214.
204. Wang K., Ling T., Wu H., Zhang, J. (2013): Screening of candidate tumor-suppressor genes in 3p21. 3 and investigation of the methylation of gene promoters in oral squamous cell carcinoma. *Oncology reports* **29(3)**: 1175-1182.
205. Ward S. B., Hernandez-Hoyos G., Chen F., Waterman M., Reeves R., Rothenberg E. V. (1998): Chromatin remodeling of the interleukin-2 gene: distinct alterations in the proximal versus distal enhancer regions. *Nucleic acids research* **26(12)**: 2923-2934.
206. Weber M., Davies J. J., Wittig D., Oakeley E. J., Haase M., Lam W. L., Schuebeler D. (2005): Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nature genetics* **37(8)**: 853.
207. Wentzensen N., Sherman M. E., Schiffman M., Wang S. S. (2009): Utility of methylation markers in cervical cancer early detection: appraisal of the state-of-the-science. *Gynecologic oncology* **112(2)**: 293-299.
208. Werness B. A., Levine A. J., Howley P. M. (1990): Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248(4951)**: 76-79.
209. White P. W., Pelletier A., Brault K., Titolo S., Welchner E., Thauvette L., Archambault J. I sur. (2001): Characterization of Recombinant HPV6 and 11 E1 helicases: effect of ATP on the interaction of E1 with E2 and mapping of a minimal helices domain. *Journal of Biological Chemistry* **276(25)**: 22426-22438.
210. Williams R., Lee D. W., Elzey B. D., Anderson M. E., Hostager B. S., Lee J. H. (2009): Preclinical models of HPV+ and HPV- HNSCC in mice: an immune clearance of HPV+ HNSCC. *Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck* **31(7)**: 911-918.
211. Wojdacz T. K., Dobrovic A. (2007): Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic acids research* **35(6)**: e41.
212. Yamashita K., Upadhyay S., Osada M., Hoque M. O., Xiao Y., Mori M., Sidransky D. i sur. (2002): Pharmacologic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer cell* **2(6)**: 485-495.



213. Yeung A., Lam C., Tsang W. P., Tsang T. Y., Co N. N., Yau P. L., Kwok T. T. (2010): HPV-16 E6 upregulation of DNMT1 through repression of tumor suppressor p53. *Oncology reports* **24(6)**: 1599-1604.
214. Yi R., Qin Y., Macara I. G., Cullen B. R. (2003): Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development* **17(24)**: 3011-3016.
215. Yoder J. A., Walsh C. P., Bestor T. H. (1997): Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in genetics* **13(8)**: 335-340.
216. Zheng Z. M., Baker C. C. (2006): Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* **11**: 2286.
217. Zhu C., Anderson A. C., Schubart A., Xiong H., Imitola J., Khoury S. J., Kuchroo V. K. i sur. (2005): The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nature immunology* **6(12)**: 1245.
218. Zhu Q., Wani A. A. (2010): Histone modifications: crucial elements for damage response and chromatin restoration. *Journal of cellular physiology* **223(2)**: 283-288.
219. Znaor T., Vucemilo L., Kulis T., Znaor A. (2013): Incidence and mortality trends of head and neck cancer in Croatia in the period 1988–2008. *Acta otolaryngologica* **133(3)**: 305-312.
220. Zur Hausen H. (2002): Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature reviews cancer* **2(5)**: 342.

### **Web izvori:**

<http://www.iacr.com.fr/>

<http://www.ecpc.org/activities/policy-and-advocacy/policy-initiatives/head-neck-cancer-make-sense-campaign>

<http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en>

<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=tabelaestados.asp&UF=BR>

<http://www.cdc.gov/cancer/hpv/statistics/index.htm>.

<https://www.hzjz.hr/en/tag/cancer-registry/>

<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/IL12RB1>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3115>

<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/EDARADD>

[www.hpvcenter.se](http://www.hpvcenter.se)

[www.fujirebio.com](http://www.fujirebio.com)

## 8. ŽIVOTOPIS

Petra Anić je rođena 29.02.1996. godine u Osijeku. Osnovnu školu je pohađala u OŠ Ljudevita Gaja u Osijeku. Srednju školu je završila u I. gimnaziji u Osijeku.

Preddiplomski studij biologije na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera na Odjelu za biologije u Osijeku je završila 2017.god. Završni rad pod nazivom „Mutacije i bolesti“ je izradila pod voditeljstvom doc.dr.sc. Ivane Štolfe Čamagajevac.

Laboratorijsku stručnu praksu je napravila na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za molekularnu virologiju i bakteriologiju Zavoda za molekularnu medicinu. U istom laboratoriju je naposljetku izradila i ovaj diplomski rad.