

UNIVERZITET U BEOGRADU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Jelena M. Čarkić

TELOMERE KAO FAKTOR GENOMSKE
NESTABILNOSTI KOD ORALNIH
PLANOCELULARNIH KARCINOMA

Doktorska disertacija

Beograd, 2016. godina

**UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE**

Jelena M. Čarkić

**TELOMERES AS CONTRIBUTING FACTORS OF
GENOME INSTABILITY IN ORAL SQUAMOUS
CELL CARCINOMAS**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2016.

PODACI O MENTORU I ČLANOVIMA KOMISIJE

MENTOR

Prof. dr Branka Popović

Vanredni profesor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE

Prof. dr Marko Babić

Redovni profesor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Doc. dr Milan Petrović

Docent Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Doc. dr Sanja Radojević-Škodrić

Docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: _____2016.godine

Zahvalnost

Najsrdajnije se zahvaljujem svom mentoru prof. dr Branki Popović na ukazanom poverenju, pomoći i usmeravanju u svim fazama eksperimentalnog rada i pisanja ove doktorske teze.

Zahvaljujem se prof. dr Marku Babiću, doc. dr Milanu Petroviću i doc. dr Sanji Radojević-Škodrić na čitanju teze i konstruktivnim primedbama.

Zahvalnost dugujem prof. dr Jeleni Milašin na predusretljivosti i korisnim savetima u toku izvođenja eksperimenata u Laboratoriji za humanu genetiku Stomatološkog fakulteta.

Najiskrenije se zahvaljujem svim mojim drugarima iz laboratorije, posebno Nađi, Jeleni i Bošku na nesebičnoj pomoći i uvek zabavnoj radnoj atmosferi.

Zahvaljujem se Katarini Zeljić na podršci i strpljivim odgovorima na moja brojna pitanja.

Hvala prijateljima što su me trpeli u svim raspoloženjima tokom izrade ove teze.

Mami hvala na sjajnoj genetičkoj osnovi, a tati što je oduvek znao da je život u nauci sjajna stvar. Ovaj rad posvećujem vama.

Telomere kao faktor genomske nestabilnosti kod oralnih planocelularnih karcinoma

Rezime

Uvod. Oralni planocelularni karcinom (OPCK) karakteriše se visokom incidencom i niskom stopom preživljavanja, što ukazuje na neophodnost pronalaženja novih dijagnostičkih i terapijskih markera. U poslednjoj deceniji, pored analize mutacionog statusa oralnih karcinoma, sve veći značaj se pridaje i naslednoj predispoziciji kao faktoru rizika za razvoj ovog tipa maligniteta. Generalno, oralna patogeneza je posledica progresivne genomske nestabilnosti, a koja je jednim delom određena i dužinom telomera i nivoom aktivnosti telomeraze. Telomere su nukleoproteinske strukture lokalizovane na krajevima hromozoma, koje se skraćuju određenom stopom sa ćelijskim deobama, dok se ne dostigne određena kritična dužina koja ili onemogućava dalje deobe i uvodi ćeliju u replikativno starenje i apoptozu, ili dovodi do sticanja sposobnosti neograničenih deoba zahvaljujući aktivnosti telomeraze. Enzim telomeraza predstavlja ribonukleoproteinski kompleks izgrađen od proteinske subjediniice i RNK matrice (TR), čija je uloga sinteza telomernih ponovaka. Istraživanja pokazuju da značajnu ulogu u modulaciji aktivnosti telomeraze imaju polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (SNP) u TERT-CLPTM1L genskom regionu-5p.15.33. U okviru ovog lokusa nalazi se TERT gen koji kodira katalitičku subjedinicu telomeraze i gen za CLPTM1L protein koji je uključen u proces apoptoze. Polimorfizmi ovih gena su u brojnim studijama asocijacije dovedeni u vezu sa rizikom od različitih tipova kancera, uključujući i OPCK. Takođe, s obzirom na blisku lokalizaciju često pokazuju visok nivo gametske neravnoteže vezanosti (LD).

Cilj. Cilj ove doktorske disertacije bio je ispitivanje asocijacije TERT-CLPTM1L polimorfizama sa rizikom od OPCK, kao i odnosa između analiziranih polimorfizama, relativne dužine telomera, ekspresije telomeraze i kliničko-patoloških karakteristika OPCK.

Materijal i metode. Studijska grupa obuhvatila je 93 pacijenta sa dijagnostikovanim OPCK i 100 zdravih osoba. Iz parafinskih isečaka tumorskog tkiva i briseva bukalne

sluzokože zdravih osoba izolovana je DNK. Genotipovi TERT-CLPTM1L polimorfizama određeni su PCR-RFLP metodom, relativna dužina telomera real-time PCR-om, a ekspresija telomeraze imunohistochemijskim bojenjem. Rezultati su obrađeni statističkim programom SPSS, dok je Haploview korišćen za analizu neravnoteže vezanosti i prisustvo haplotipova. Sve *p* vrednosti manje od 0.05 smatrane su statistički značajnim.

Rezultati. Dva ispitivana polimorfizma (TERT rs2736100 i CLPTM1L rs402710) dovedena su u vezu sa sa povišenim rizikom od OPCK (OR=2.89, $p<0.05$ i OR=4, $p<0.005$; logistička regresiona analiza i Fišerov test), dok je treći (TERT rs2736098) pokazao asocijaciju sa sniženim rizikom od OPCK (OR=0.24, $p<0.005$; logistička regresiona analiza i Fišerov test). Neravnoteža vezanosti (LD) bila je slabo izražena u svim grupama, i nijedan haplotipski blok nije identifikovan. Imunohistochemijska ekspresija telomeraze bila je prisutna kod 74% analiziranih uzoraka tumora. Ekspresija telomeraze nije bila povezana sa kliničko-patološkim karakteristikama tumora, osim kod tumora sa recidivom, koji su imali veću ekspresiju ($p<0.05$; χ^2 test). Trend dužih telomera bio je zabeležen kod manjih tumora, nižih gradusa, ranijih stadijuma, tumora bez metastaza, sa recidivima, kao i kod tumora sa ekspresijom telomeraze. Kraće preživljavanje, statistički značajno ($p<0.05$, log-rank test), uočeno je kod većih tumora, viših gradusa, tumora sa prisustvom metastaza i recidiva, kao i kod tumora sa kraćim telomerama. Logističkom i linearnom regresionom analizom izdvojena je veličina tumora kao prediktor ekspresije telomeraze ($p=0.049$, OR=2.50, 95%CI=1.00-6.26), dok su metastaze bile označene kao prediktor dužine telomera ($R^2=0.164$, $p=0.021$, 95%CI=0.069-0.819).

Zaključak. Polimorfizmi TERT rs2736100 i CLPTM1L rs402710 mogu biti označeni faktori rizika za razvoj OPCK, dok TERT rs2736098 može imati protektivni efekat. Ekspresija telomeraze u ranim fazama kancerogeneze može dovesti do produženja telomera, što se može povezati sa sprečavanjem veće genomske nestabilnosti tumora. Prisustvo kraćih telomera kod tumora u kasnijim stadijumima, može biti pokazatelj loše prognoze.

Ključne reči: oralni planocelularni karcinom, TERT-CLPTM1L polimorfizmi, dužina telomera, telomeraza

Naučna oblast: Stomatološke nauke

Uža naučna oblast: Genetika

UDK: 577.22:616.31-006(043.3)

Telomeres as contributing factors of genome instability in oral squamous cell carcinomas

Abstract

Introduction. High incidence and low survival rate of oral squamous cell carcinoma (OSCC) indicate the importance of finding new diagnostic and therapeutical markers for this disease. Apart from mutational analyses, in recent years greater emphasis is placed on hereditary factors as risk contributors. Generally, oral cancerogenesis occurs as a result of progressive genome instability which is partly defined by telomere length and telomerase activity. Telomeres are nucleoprotein structures localized at the ends of the chromosomes, shortening with each cell division until threshold length is reached and the cells either undergo replicative senescence and apoptosis, or achieve immortality due to the activation of telomerase. The enzyme telomerase is a ribonucleoprotein complex consisting of protein component and RNA component (TR), with a role in compensating telomere attrition. Studies implicate Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of TERT-CLPTM1L 5p.15.33 gene locus as very important modulators of telomerase activity. This locus contains TERT gene encoding the catalytic subunit of telomerase, and gene for CLPTM1L protein, involved in the process of apoptosis. Cancer GWAS have shown that SNPs of 5p15.33 locus are associated with risk of many types of malignancies, including OSCC. Due to their close localization, SNPs of these genes are often in strong Linkage Disequilibrium (LD).

Aim. The aim of this dissertation was the assessment of TERT-CLPTM1L polymorphisms as risk factors for OSCC development, and investigation of the relationship between analyzed polymorphisms, relative telomere length (RTL), telomerase expression and clinicopathological characteristics of OSCC.

Materials and Methods. Study group included 93 patients with OSCC and 100 cancer free controls. Genome DNA was isolated from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues in OSCC group and from buccal swabs in control group. Genotyping of polymorphisms was performed using PCR-RFLP method, relative telomere length measurement by real-time PCR, and telomerase expression by immunohistochemistry.

All statistical analyses were done using SPSS. Linkage disequilibrium (LD) and haplotype frequencies were determined using Haploview. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results. Two genotyped polymorphisms (TERT rs2736100 and CLPTM1L rs402710) were associated with increased risk of OSCC (OR=2.89, $p<0.05$ i OR=4, $p<0.005$; logistic regression analyses and Fisher exact test), and the third (TERT rs2736098) with decreased risk (OR=0.24, $p<0.005$; logistic regression analyses and Fisher exact test). None of the analyzed SNPs was found to be in linkage disequilibrium (LD) and no haplotype blocks were found. Positive telomerase expression was found in 74% of the OSCCs. There was no association with any of the clinicopathological characteristics, except tumors with recurrence who showed significantly higher telomerase expression ($p<0.05$; chi-square test). A trend toward longer telomeres was present in smaller tumors, lower grades, early stages, in the absence of metastases and presence of recurrence, and in tumors with positive telomerase expression. Overall survival was significantly shorter in larger tumors, higher grades, presence of metastases and recurrence, and tumors with shorter telomeres ($p<0.05$, log-rank test). Logistic and linear regression determined tumor size as a predictor of telomerase expression ($p=0.049$, OR=2.50, 95%CI=1.00-6.26), and presence of metastases as a predictor of telomere length ($R^2=0.164$, $p=0.021$, 95%CI=0.069-0.819).

Conclusion. Two SNPs, TERT rs2736100 and CLPTM1L rs402710, may represent risk factors for OSCC, while TERT rs2736098 might have protective effect. Telomerase expression in the early stages of oral carcinogenesis could lead to telomere elongation, and therefore cause inhibition of genome instability in cancer cells. Presence of shorter telomeres in later stages may indicate poor outcome.

Key words: oral squamous cell carcinoma, TERT-CLPTM1L polymorphisms, telomere length, telomerase

Scientific field: Dental Sciences

Narrower scientific field: Genetics

UDC: 577.22:616.31-006(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Oralni planocelularni karcinom.....	2
1.1.1. Molekularno-genetička osnova OPCK.....	4
1.2. Telomere.....	5
1.2.1. Građa telomera.....	5
1.2.2. Održavanje dužine telomera.....	8
1.3. Građa i funkcija telomeraze.....	9
1.4. TERT-CLPTM1L genski region.....	13
1.4.1. Polimorfizmi nukleotidne sekvence i studije asocijacije.....	14
1.4.2. Gametska neravnoteža vezanosti i haplotipski blokovi.....	17
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	18
3. MATERIJAL I METODE.....	20
3.1. Studijska grupa.....	21
3.2. Izolacija i merenje koncentracije DNK.....	21
3.3. Reakcija lančane polimeraze (PCR metoda).....	22
3.4. Gel elektroforeza.....	23
3.5. Analiza polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (RFLP).....	24
3.6. Analiza haplotipova.....	25
3.7. Real time PCR i određivanje relativne dužine telomera.....	26
3.7.1. Real time PCR.....	26
3.7.2. Određivanje relativne dužine telomera.....	27
3.8. Imunohistohemija.....	30
3.9. Statistička analiza.....	32
4. REZULTATI.....	33
4.1. Opšte karakteristike studijske grupe.....	34
4.1.1. Distribucija prema starosti.....	34
4.1.2. Distribucija prema polu.....	35
4.2. Karakteristike tumora.....	36

4.3. Analiza polimorfizama u TERT-CLPTM1L genskom regionu.....	39
4.3.1. Analiza CLPTM1L rs402710 polimorfizma.....	39
4.3.2. Analiza TERT rs2736100 polimorfizma.....	40
4.3.3. Analiza TERT rs2736098 polimorfizma.....	42
4.4. Analiza haplotipova.....	43
4.5. Imunohistohemijska ekspresija telomeraze.....	45
4.6. Relativna dužina telomera.....	53
4.7. Analiza ukupnog preživljavanja.....	62
4.8. Logistička i linearna regresija.....	69
5. DISKUSIJA.....	70
5.1. TERT-CLPTM1L polimorfizmi.....	71
5.2. Ekspresija telomeraze.....	76
5.3. Dužina telomera.....	78
6. ZAKLJUČCI.....	82
7. LITERATURA.....	85
8. BIOGRAFIJA AUTORA.....	107
9. PRILOZI.....	109

1. Uvod

1.1.Oralni planocelularni karcinom

Oralni planocelularni karcinom (OPCK) čini više od 95% svih malignih tumora glave i vrata, dok je u protekloj deceniji zabeležen porast ovog maligniteta za 50%. Uprkos napretku dijagnostičkih i terapijskih procedura stopa petogodišnjeg preživljavanja je i dalje niska (oko 50%) (Rivera i Venegas 2014), a što najviše zavisi od stadijuma tumora (kod ranih 80%; kod kasnih 20%) (Seethalakshmi 2013). Prema izveštaju Instituta za javno zdravlje “Dr Milan Jovanović Batut” o incidenci i stopi smrtnosti od malignih oboljenja na teritoriji centralne Srbije, usna duplja sa farinksom nalazi se na 8. mestu među vodećim lokalizacijama malignih oboljenja (Institute of Public Health of Serbia “ Dr Milan Jovanović - Batut” 2009).

Takođe, iako brojni epidemioloski pokazatelji vezuju OPCK za stariju uzrasnu dob dominantno muškaraca, poslednjih godina na globalnom nivou odnos obolelih muškaraca i žena je 2:1, a sve češće oboljevaju i mlađe osobe (Papagerakis i sar. 2014).

Najčešće lokalizacije OPCK-a su na usni, jeziku i podu usta, a sa manjom incidencom se mogu javiti na mekom i tvrdom nepcu, sluzokoži obraza i gingivi (Bagan i sar. 2010; Rivera i Venegas 2014) (Slika1). OPCK vodi poreklo od pločasto slojevitog epitela usne duplje, koji nekontrolisanom deobom vremenom može ostvariti invazivni karakter. U ranim razvojnim fazama patološki izmenjenog skvamoznog epitela, najčešće se uočavaju eritroplakije/leukoplakije koje se mogu razviti u maligne lezije, ili geneza OPCK može biti nezavisna od premalignih lezija (Scully i Bagan 2009a). Nasuprot retkim simptomima u ranim fazama bolesti, u odmaklim stadijumima može biti prisutan bol, pokretljivost zuba, krvarenje, otežano disanje, gutanje i govor, trizmus i parestezije, fistule, anemija i kaheksija (Milian i sar. 1993; Haya-Fernández i sar. 2004). Invazivni karakter OPCK ogleda se u prisustvu ranih i učestalih metastaza u limfnim čvorovima, kao i u sklonosti ka razvijanju brojnih recidiva (da Silva i sar. 2011).



Slika 1. OPCK jezika (levo) i OPCK gingive (desno)

(preuzeto: Bagan i sar., 2011)

Kao i većina sporadičnih kancera, OPCK predstavlja multifaktorsko oboljenje, kod kog se kao važan faktor rizika izdvaja način života, pored naslednog faktora. U odnosu na brojne etiopatološke faktore koji se dovode vezu sa razvojem OPCK, mogu se pre svega izdvojiti: konzumacija alkohola i duvana, virusne infekcije (HPV, HSV, EBV) i UV zračenje. Pored navedenih glavnih kancerogena, nije zanemarljiva uloga i drugih faktora, potencijalno odgovornih za oralnu patogenezu, kao što su: nutritivni faktori, imunski status, neadekvatne protetske nadoknade, istorija malignih oboljenja i genetski faktori (Scully i Bagan 2009b).

Prema opšteprihvaćenom modelu patogeneze OPCK, do razvoja ovog maligniteta dolazi usled akumulacije brojnih izmena u naslednoj osnovi, kao posledice dejstva potentnih kancerogena, pre svega, duvana i alkohola. Pored ključnih indukovanih molekularno-genetičkih izmena koje generišu nekontrolisan rast, modulišući efekat u razvoju malignog potencijala u velikoj meri se pripisuje i naslednoj predispoziciji.

1.1.1. Molekularno-genetička osnova OPCK

Kao što je opšte poznato, kancer nastaje kao posledica heterogenih genetičkih i epigenetičkih promena, koje omogućavaju ćelijama da izbegnu mehanizme koji regulišu balans između proliferacije i apoptoze (Hanahan i Weinberg 2000). Promene koje vode nekontrolisanoj deobi, mogu biti rezultat izmenjene ekspresije brojnih gena, pri čemu se kao najznačajniji činioci mogu izdvojiti geni koji kontrolišu ćelijski ciklus: tumor supresorni geni, onkogeni i geni za popravku DNK (Scully i Bagan 2009b).

Regulatori ćelijskog rasta, tumor supresorni geni (TSG), pored ključne uloge u blokadi proliferacije, imaju ulogu i u kontroli apoptoze, diferencijacije, angiogeneze i popravke DNK. Stoga aberacije TSG u vidu delecija i/ili mutacija, kao i njihovo utišavanje putem epigenetskih modifikacija, mogu rezultovati odsustvom kontrolora ćelijskog rasta i posledično uvođenjem ćelija u nekontrolisano umnožavanje. Najznačajniji tumor supresorni geni koji se dovode u vezu sa OPCK su: TP53, Rb i p16. Ključni gen, TP53, označen kao "čuvar genoma", svoju ulogu inhibicije proliferacije može izgubiti najčešće putem mutacija, a koje su zabeležene kod skoro svih tipova kancera koji se dovode u vezu sa lošom prognozom (Herceg i Hainaut 2007). Takođe, brojne studije pokazuju veliki udeo Rb i p16 mutacija u razvoju oralnih tumora (Massano i sar. 2006; Khan i Bisen 2013).

Pored TSG, onkogeni potencijal poseduju i protoonkogeni. Protoonkogeni su normalni geni koji stimulišu ćelijski rast i preživljavanje, dok njihova nepravovremena ili povećana ekspresija, uzrokovana genetskim ili epigenetskim izmenama, može dovesti do razvoja kancera. Sumirajući rezultate dosadašnjih istraživanja, dominantnu ulogu u razvoju OPCK imaju protoonkogeni: EGFR, MYC, RAS i MMP (Scully i Bagan 2009b; Khan i Bisen 2013).

Takođe, važnu grupu gena potencijalno odgovornih za tumorigenezu, čine i geni za popravku DNK. Preciznije, produkti gena za reparaciju DNK uključeni su u procese prepoznavanja i odstranjivanja lezija na DNK molekulu, tokom replikacije, kao i u okviru pre i postreplikativnih reparativnih mehanizmima (Ronen i Glickman 2001).

Međutim, dodatni otežavajući faktor u definisanju mutacionih događaja koji određuju patogenezu OPCK, predstavlja činjenica da genetičke osnove tumora istog histološkog porekla, mogu činiti palete različitih mutiranih kancer gena. Uprkos genetičkoj heterogenosti kancera, postoji određen broj zajedničkih karakteristika koje se odnose na funkcionalnu sposobnost i stanje svih malignih ćelija. Ova obeležja obuhvataju: aktiviranje signala za rast, zaobilaženje programirane ćelijske smrti (apoptoze) i starenja, neograničen replikativni potencijal, sposobnost indukcije angiogeneze, invazija tkiva i metastaziranje, zaobilaženje imunosupresije, prisustvo stresa (metaboličkog, mitotičkog, replikativnog, oksidativnog i toksičnog) i genomska nestabilnost (Hanahan i Weinberg 2000; Negrini i sar. 2010)

Genomska nestabilnost karakteristika je skoro svih malignih tumora i ima važnu ulogu u njihovom nastanku i progresiji. Ona se može manifestovati na nekoliko različitih nivoa, od promena sekvence DNK (mutacije baznih parova, nestabilnost mikrosatelita) do promena u strukturi i broju hromozoma, koje su najčešći oblik genomske nestabilnosti (Negrini i sar. 2010). S obzirom na to da održavanje telomera predstavlja najvažniji mehanizam očuvanja integriteta hromozoma (Chen i Chen 2011), izuzetno je značajna i njihova uloga u genomskoj nestabilnosti tumora.

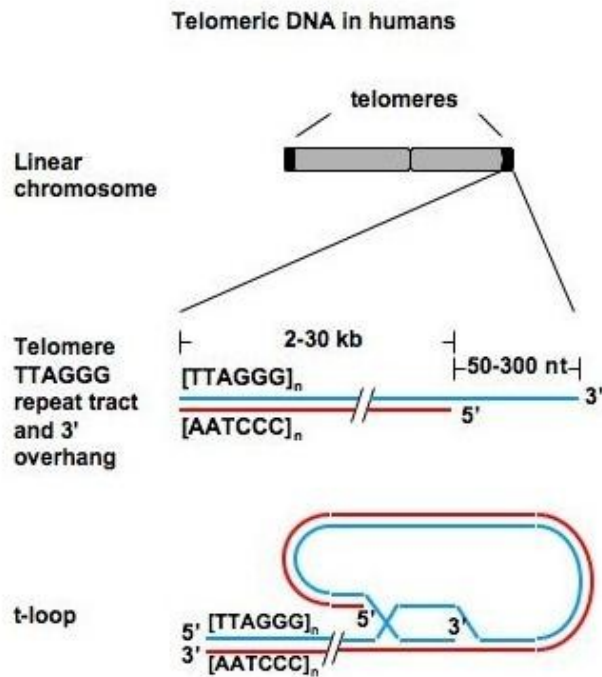
1.2. Telomere

1.2.1. Građa telomera

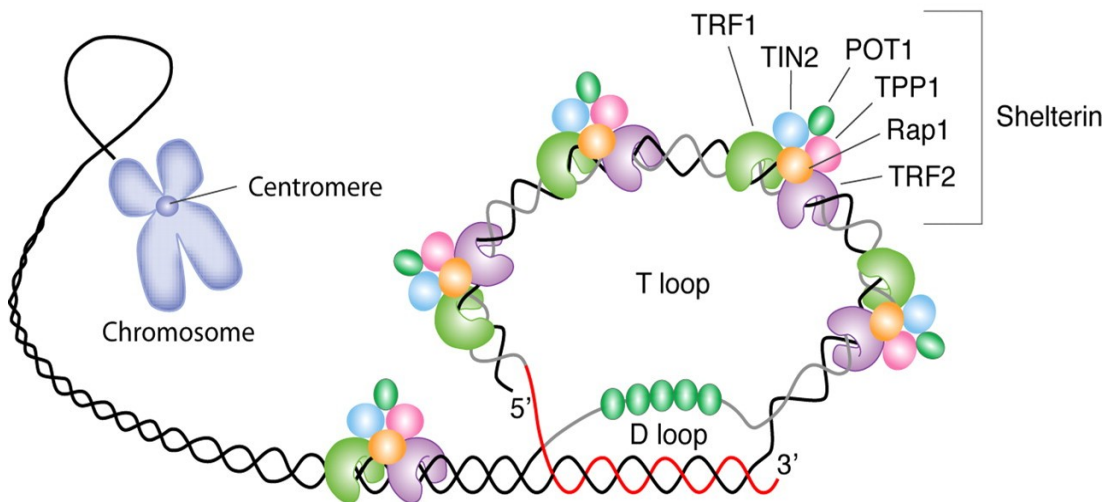
Telomere su ribonukleoproteinske strukture lokalizovane na krajevima hromozoma (Slika 2). Čine ih dvolančani TTAGGG ponovci dužine od 9 do 15 kb, pri čemu terminalni deo čini jedan duži (vodeći) i jedan kraći lanac (zaostajući). Duži vodeći lanac svojim 3' krajem formira strukturu pod nazivom G rep. G rep čini oko 50 do 300 nesparenih nukleotida, sekvence-TTAGGG, sa ulogom da zaštiti krajeve hromozoma putem savijanja G repa u tzv. T omču. Ovako formirana zaštitna struktura definiše kraj hromozoma i krije telomernu nekompletno sparenu DNK od mašinerije za popravku DNK (O'Sullivan i Karlseder 2010).

Specifičnost replikacije telomernih segmenata posledica je nefunkcionalnosti DNK polimeraze na samim krajevima hromozoma. S obzirom na to da DNK polimeraza ima sposobnost sinteze DNK samo u 5'-3'smeru, sinteza kraćeg zaostajućeg lanca ostaje nedovršena, što je poznato kao "problem replikacije završetaka". Nerešavanjem "problema replikacije završetaka" dolazi do postepenog skraćivanja hromozoma posle svake replikacije DNK do tačke koja će uvesti ćelije u proces starenja ili apoptozu. Nasuprot ovome, skraćeni i nezaštićeni krajevi hromozoma sa dvolančanim prekidima mogu aktivirati mehanizme za popravku DNK, čime se ćelije mogu uvesti u imortalizaciju (Sumida i Hamakawa 2001).

Pored TTAGGG ponovaka, telomere čini i određen broj proteina koji grade telomerni kompleks (Slika 3). Sam kompleks, kod sisara, naziva se šeltern (*engl. Shelterin Complex*) i sastoji se od 6 proteina: vezujući faktor 1 (*engl. Telomeric Repeat-Binding Factor 1*, TRF1), vezujući faktor 2 (*engl. Telomeric Repeat-Binding Factor 2*, TRF2), represorni i aktivirajući protein 1 (*engl. Repressor and Activator Protein 1*, RAP1), nuklearni protein 2 koji interaguje sa TRF1 (*engl. TRF1-Interacting Nuclear Protein 2*, TIN2), zaštitnik telomera (*engl. Protection of Telomeres*, POT1) i protein koji interaguje sa POT1 i TIN2 (*engl. POT1-and TIN2-Interacting Protein*, TPP1). Šelternski kompleks ima značajne, iako još uvek ne sasvim ispitane uloge u regulaciji dužine telomera, zaštiti od i aktiviranju određenih enzima, kao i kontroli različitih signalnih kaskada (O'Sullivan i Karlseder 2010).



Slika 2. Građa telomera (preuzeto:<http://novebiologije.wikia.com/wiki/Telomeri>)



Slika 3. Šelterinski kompleks (preuzeto:<http://www.bloodjournal.org/>)

Specifični telomerni nukleo-proteinski kompleks ulazi u sastav oko 80% telomerne DNK koja je upakovana u transkripciono neaktivnu heterohromatinsku

strukturu (Pisano i sar. 2008). Ubacivanje reporter gena u susedne (subtelomerne) regione dovodi do njihovog transkripcionog utišavanja, poznatog kao pozicioni efekat telomera (*engl. Telomere Position Effect, TPE*) (Caslini 2010). Međutim, stanovište da telomere nemaju nikakavu transkripcionalnu aktivnost, promenilo se otkrićem telomerne RNK pod nazivom TERRA (Schoeftner i Blasco 2008). TERRA predstavlja nekodirajuću RNK koja nastaje transkripcijom telomerne i subtelomerne DNK. Njene funkcije su nedovoljno ispitane ali poznato je da učestvuje u održavanju telomera i remodelovanju hromatina tokom ćelijskog ciklusa i diferencijacije (Luke i Lingner 2009).

1.2.2. Održavanje dužine telomera

Dužina telomera veoma je varijabilna i zavisi pre svega od vrste tkiva i starosti organizma. Generalno, sa starošću dužina telomera se smanjuje, i specifična je u ćelijama različitih tkiva. Na primer, broj TTAGGG ponovaka iznosi od 300 do 1300 (2 do 8 kb) u perifernoj krvi (Valdes i sar. 2005), dok je u muškim polnim ćelijama oko 3300 (preko 20 kb) (Baird i sar. 2006), odnosno u proseku od 4 do 14 kb u organizmu (Cesare i Reddel 2010). Uticaj nasledne komponente na dužinu telomera po nekim procenama iznosi od 30-80%, pri čemu je primećena veća korelacija sa očevom dužinom telomera (Savage i Bertuch 2010). Ovo bi moglo biti posledica genetičkog imprintinga, s obzirom na to da je od 12 gena koji su dovedeni u vezu sa dužinom telomera i čija je ekspresija regulisana genetičkim imprintingom, čak 7 pokazalo ekspresiju samo alela poreklom od oca (Buxton i sar. 2014).

Tačna dužina telomera koja dovodi do gubitka njihove zaštitne funkcije nije određena, a pre nekoliko godina otkriveno je prisustvo ultra kratkih telomera od oko 13 TTAGGG ponovaka, takozvanih T patrljaka (*engl. T stump*), koji su efikasno štitili krajeve hromozoma (Xu i Blackburn 2007). Na osnovu navedenih podataka, može se zaključiti da je ograničenje ćelijskih deoba putem telomera, mnogo kompleksniji proces nego što je inicijalno pretpostavljeno.

Zbog problema replikacije završetaka hromozoma, prilikom svake ćelijske deobe dolazi do gubitka od 100 do 200 bp telomernih ponovaka, tako da ćelija može proći kroz određen broj deoba (fenomen nazvan Hajflikov limit) pre nego što telomere postanu kritično kratke, izgube svoja zaštitna svojstva i uvedu ćeliju u stanje replikativnog starenja ili izazovu ćelijsku smrt (O'Sullivan i Karlseder 2010). Mehanizam normalnog skraćivanja hromozoma sa svakom deobom, ograničava replikativni kapacitet ćelija, sprečavajući ih na taj način da postanu besmrtni.

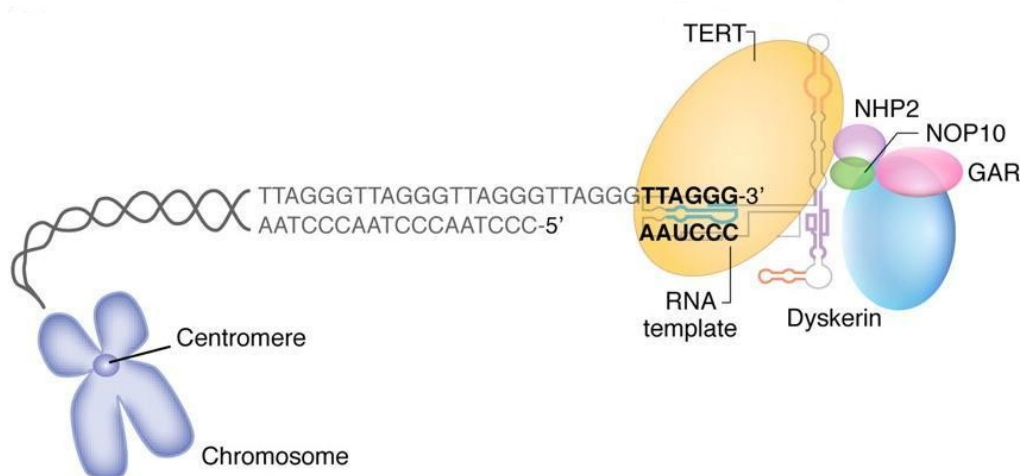
Međutim, onkogeneza se zasniva na nekontrolisanoj deobi ćelija, između ostalog i na izbegavanju skraćivanja telomera i replikativnog starenja. Prema dostupnim podacima, postoje dva enzimska mehanizma koja su zadužena za održavanje dužine telomera u ćelijama kancera: enzim telomeraza i alternativni mehanizmi za produžavanje telomera (ALT mehanizmi, *engl. Alternative Lengthening of Telomeres*). ALT mehanizmi su do sada dokumentovani samo kod 10-15% tumora, pre svega mezehimalnog porekla (Henson i sar. 2005) i nekih genetički modifikovanih organizama, ali još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Naime, prema jednom istraživačkom modelu, nejednaka razmena telomera između sestrinskih hromatida, a zatim njihova segregacija, dovode do formiranja ćelija sa dužim telomerama koje poseduju neograničen replikativni potencijal. Prema drugom modelu, ALT mehanizam predstavlja sintezu nove telomerne DNK posredstvom rekombinacije, odnosno korišćenjem telomera sa homologog hromozoma kao matrice (Cesare i Reddel 2010). Ipak, najprisutniji način održavanja dužine telomera u ćelijama kancera je svakako putem aktivnosti enzima telomeraze.

1.3. Građa i funkcija telomeraze

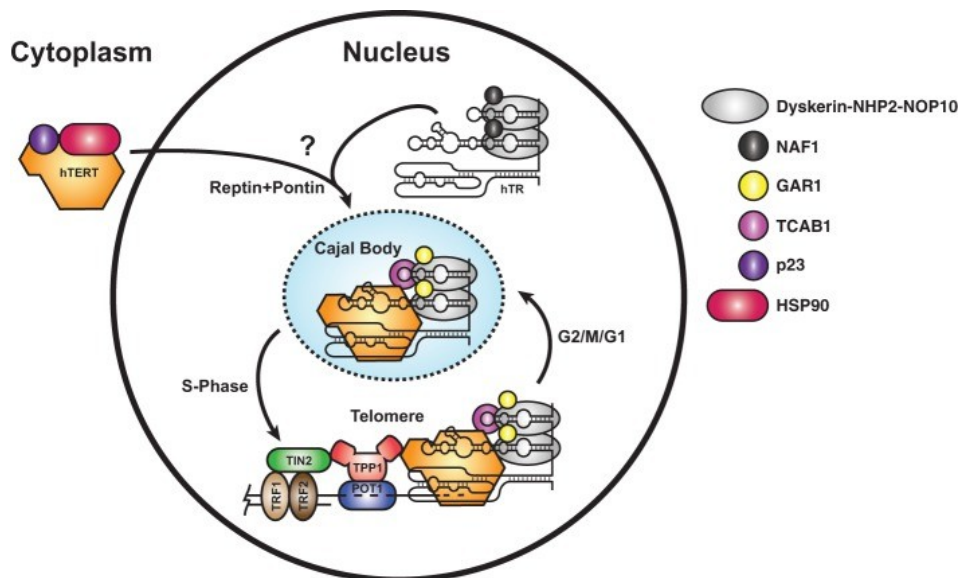
Telomeraza predstavlja holoenzim koji čine: katalitička subjedinica-telomeraza reverzna transkriptaza (Bisschop i sar.), RNK subjedinica-telomerazna RNK (TR) i tetramerni proteinski kompleks (diskerin-NOP10-NHP2-GAR1). Telomerazna RNK, sa varijabilnim brojem nukleotida kod različitih vrsta (u proseku oko 150), formira sekundarnu strukturu sa domenima za: matricu za reverznu transkripciju-AAUCCC,

vezivanje TERT-a, i vezivanje tetramernog proteinskog kompleksa koji stabilizuje RNK u nukleusu (Slika 4) (Schmidt i Cech 2015). TERT proteinska subjedinica poseduje 4 domena: TEN (prepoznavanje telomera), TRBD (vezivanje za telomeraznu RNK), RT (sinteza telomernih ponovaka), i CTE (katalitička komponenta telomeraze) (Blackburn i Collins 2011).

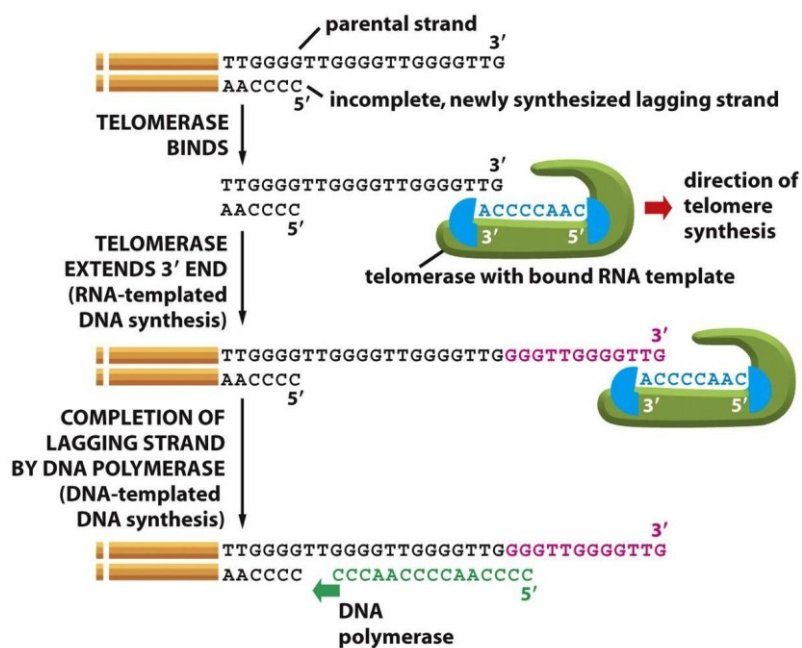
TERT subjedinica telomeraze sintetiše se u citoplazmi, a zatim povezuje sa TR subjedinicom u katalitički aktivan enzim, pri čemu tačna subcelularna lokalizacija u kojoj se kompletira enzim nije potvrđena. Telomeraza biva regrutovana od strane jedarnih Kajalnih telašaca (*engl. Cajal bodies, CBs*) gde ostaje tokom najvećeg dela ćelijskog ciklusa, da bi u S fazi bila transportovana do telomera (Slika 5) (Schmidt i Cech 2015). Nakon prepoznavanja i vezivanja za nukleo-proteinski telomerni kompleks, za jednolančani G rep, sekvence 5'**TTAGGG**3', po principu komplementarnosti vezuje se telomerna RNK (TR), sekvence 3'**CAAUCCCAAUC**5' (Sumida i Hamakawa 2001), pri čemu se TTAGGG telomerni ponovci dodaju na vodeći lanac, da bi zatim DNK polimeraza sintetisala kraći zaostajući lanac (Slika 6).



Slika 4. Građa telomeraze (preuzeto: Calado i Young, 2008, modifikovano)



Slika 5. Transport telomeraze u ćeliji (preuzeto: Schmidt i Cech, 2015)



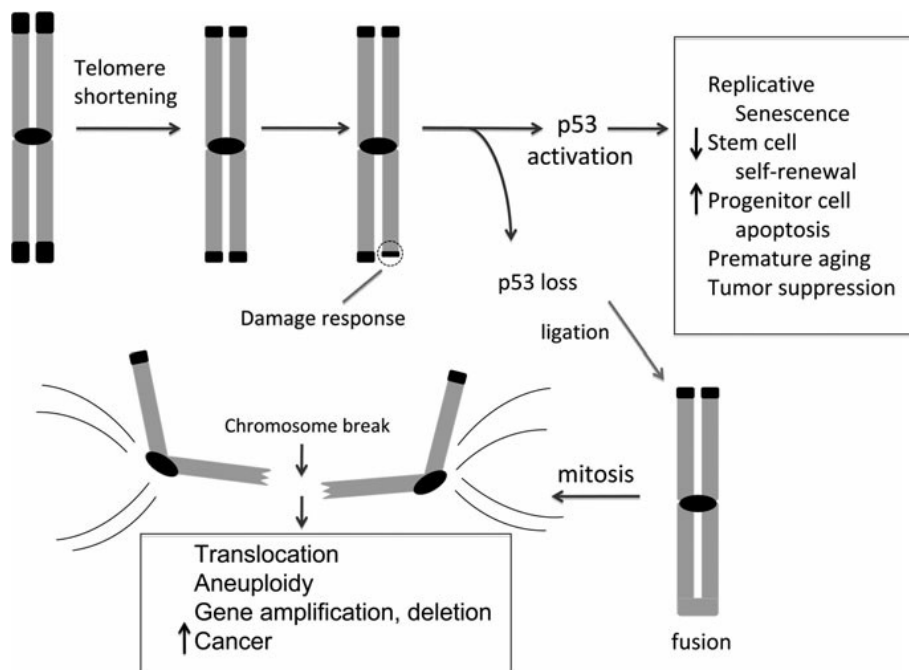
Slika 6. Funkcija telomeraze u sintezi telomera (preuzeto: Alberts i sar., 2002)

Osim uloge u održavanju dužine telomera i genomske stabilnosti, poslednjih godina otkrivene su i druge moguće aktivnosti telomeraze kako u jedru, tako i u citoplazmi i mitohondrijama. U jedarne funkcije se ubrajaju još i regulacija remodelovanja hromatina i genske ekspresije, popravka DNK dodavanjem telomernih

ponovaka *de novo*, utišavanje gena putem sinteze dvolančane RNK i učešće u različitim signalnim putevima. Citoplazmatska TERT subjedinica ima ulogu u vezivanju molekula nastalih oksidativnim stresom, kao i u interakciji sa signalnim kaskadama, dok se mitohondrijska funkcija telomeraze dovodi u vezu sa inhibicijom apoptoze, smanjenjem reaktivnih oksidativnih molekula, poboljšanjem respiratornih procesa, zaštitom mitohondrijske DNK i interakcijom sa tRNK (Saretzki 2014).

Brojna istraživanja pokazala su da iako telomeraza nije aktivna u većini normalnih ćelija, izuzev embrionalnih i adultnih koje se ubrzano dele (kostna srž, aktivirani limfociti, tkivo gastrointestinalnog trakta i dr.), 85 do 90% malignih tumora pokazuju izraženu ekspresiju ovog enzima (Chen i Chen 2011).

Aktivacija telomeraze može se desiti u kasnijim fazama progresije tumora ili može biti prisutna već na nivou karcinoma *in situ*, pa čak i prekancerozne lezije (Chen i Chen 2011). S obzirom na to da su intaktne telomere neophodne za deobu i preživljavanje ćelija, ubrzana replikacija u odsustvu telomeraze dovodi do progresivnog skraćivanja telomera i dostizanja tzv. Hajflikovog limita. Gubitak zaštitne funkcije telomera pokreće mašineriju za popravku DNK i aktivira p53 TSG protein, koji između ostalog uvodi ćeliju u fazu replikativnog starenja i apoptozu, na taj način sprečavajući dalje deobe i potencijalno stvaranje ćelija sa oštećenjima. Ukoliko funkcija p53 proteina nije očuvana (najčešće zbog mutacije), ćelije sa kritično kratkim telomerama ipak nastavljaju da se dele. To dalje dovodi do fuzije nezaštićenih krajeva homologih ili nehomologih hromozoma, njihovih nasumičnih prekida tokom mitoze i nejednake distribucije naslednog materijala u ćerke ćelije. Ciklično ponavljanje ovih fuzija i prekida hromozoma, ima za posledicu multiple neregularne translokacije, aneuploidije, genske delecije i duplikacije, tj. genomsku nestabilnost (Slika 7). Aktivacija telomeraze u kasnijoj fazi, nakon formiranja brojnih izmena u naslednom materijalu, dovodi do stabilizacije telomera i besmrtnosti ćelija u prisustvu genomske nestabilnosti, odnosno do propagacije malignog fenotipa (Artandi i DePinho 2010; O'Sullivan i Karlseder 2010).



Slika 7. Uloga telomera u genomskoj nestabilnosti i kancerogenezi (preuzeto: Artandi i DePinho, 2010)

Međutim, ukoliko se telomeraza aktivira ranije, pre nego što telomere postanu kritično kratke, ne dolazi do fuzija i prekida hromozoma, a samim tim ni do hromozomskih aberacija i genomske nestabilnosti, uprkos tendenciji ka nekontrolisanim deobama. Ovaj noviji model uloge telomeraze u kancerogenezi, iako kontroverzan, značio bi da ona može imati ulogu i u sprečavanju nastanka tumora (O'Sullivan i Karlseder 2010).

1.4. TERT-CLPTM1L genski region

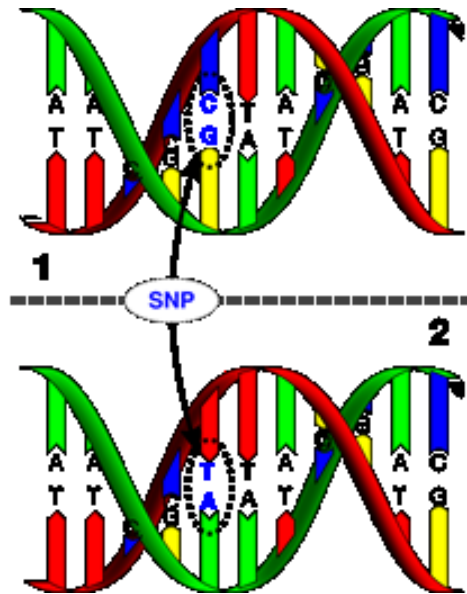
Brojna istraživanja su pokazala da aktivnost telomeraze pre svega zavisi od ekspresije gena koji kodiraju TERT i TR subjediniice, odnosno njihove transkripcije, alternativnog splajsinga, fosforilacije i metilacije gena, maturacije i modifikacije proteina, pri čemu su promene u genu za TERT najvažniji regulatorni element (Daniel i sar. 2012).

Gen za TERT subjedinicu telomeraze lociran je na hromozomu 5 (5p.15.33 genski lokus), veličine oko 40 Kb i sastoji se od 16 egzona i 15 introna (Cukusić i sar. 2008). Na istom 5p.15.33 genskom lokusu nalazi se gen za CLPTM1L protein (*engl. Cleft Lip and Palate Transmembrane 1-Like Protein*), poznat i kao CRR9 protein (*engl. Cisplatin Resistance-Related Protein*). CLPTM1L gen, veličine oko 2.5 Kb, poseduje 17 egzona i 16 introna (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). CLPTM1L protein eksprimiran je u normalnim tkivima, kao i u malignim, i doveden je u vezu sa apoptotskim odgovorom ćelija ovarijalnog kancera na cis-platinijum (Yamamoto i sar. 2001). S obzirom na blisku lokalizaciju pomenutih gena u okviru 5p.15.33 lokusa, on je poznat i kao TERT-CLPTM1L genski region.

Brojne studije pokazuju da prisustvo polimorfizama nukleotidne sekvence u TERT-CLPTM1L genskom regionu, predstavlja važan faktor regulacije njegove ekspresije, a samim tim i aktivnosti telomeraze i dužine telomera (Matsubara i sar. 2006; Kote-Jarai i sar. 2013; Lan i sar. 2013; Killedar i sar. 2015).

1.4.1. Polimorfizmi nukleotidne sekvence i studije asocijacije

Polimorfizmi nukleotidne sekvence (*engl. Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs*) predstavljaju najčešći tip DNK polimorfizma i odnose se na promene pojedinačnih nukleotida u sekvenci DNK sa učestalošću većom od 1% u populaciji (Slika 8). Mogu se javiti u kodirajućim i nekodirajućim delovima gena kao i u intergenskim sekvencama. Prisustvo intragenskih SNP-a može se odraziti na nivo genske transkripcije, kao i na promenu primarne strukture proteina (Shastry 2002).



Slika 8. Polimorfizmi nukleotidne sekvence (preuzeto: www.dnabaser.com)

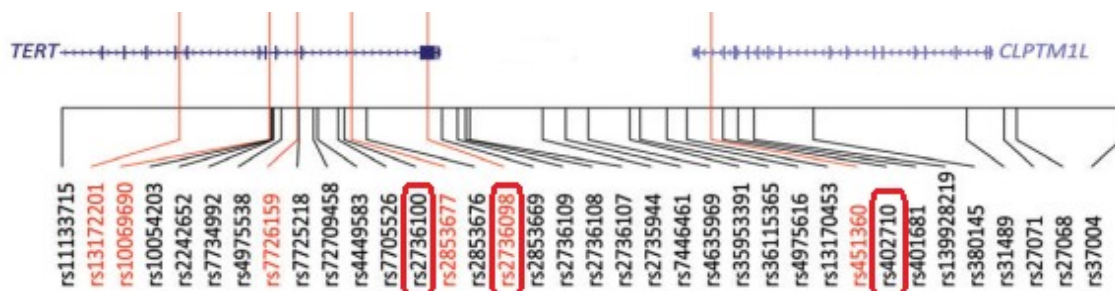
Studije koje se bave ispitivanjem različitih polimorfizama i njihove veze sa zdravim odnosno bolesnim fenotipom kod ljudi, nazivaju se studije asocijacije. One se najčešće izvode na nivou dve grupe ispitanika, gde jednu grupu predstavljaju pacijenti, a drugu zdrave kontrole (*engl. case-control studies*), sa ciljem da se odredi potencijalna razlika u frekvenci alelskih varijanti među grupama, odnosno njihova asocijacija sa predispozicijom za dato oboljenje. Da bi kontrolna grupa predstavljala reprezentativni uzorak populacije sa slobodnim ukrštanjem bez selektivnog pritiska, frekvencija genotipova mora biti u Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži. Danas široko primenjivano i sveobuhvatnije sagledavanje uloge većeg broja SNP-ova kod određenih bolesti, predstavljaju studije asocijacije celog genoma (*engl. Genome Wide Association Studies, GWAS*). Iako postoje oprečni rezultati kada su u pitanju GWAS studije, njihova informativnost usled pronalaženja "markera" oboljenja, putem analize velikog broja SNP-ova na nivou celokupnog genoma, može imati važnu ulogu u dijagnozi i terapiji određenih oboljenja (Koveljić i sar. 2013.).

Brojne studije asocijacije celog genoma pokazale su da polimorfizmi u okviru TERT-CLPTM1L genskog regiona mogu predstavljati značajne markere rizika za bar

10 različitih tipova kancera, a dovedeni su u vezu i sa promenama u dužini telomera (Matsubara i sar. 2006; Mocellin i sar. 2012; Lan i sar. 2013).

Tačan mehanizam kojim polimorfizmi TERT-CLPTM1L genskog regiona dovode do povećanog rizika od nastanka tumora nije poznat, ali novija istraživanja pokazuju da SNP-ovi ovih gena, mogu dovesti do nastanka alternativnih splajsing varijanti iRNK, koje kodiraju katalitički inaktivne proteine. Izmenjeni TERT-CLPTM1L proteini deluju kao inhibitori aktivnosti telomeraze, a samim tim utiču i na nemogućnost stabilizacije telomera, genetičku nestabilnost i povećan rizik od nastanka tumora (Killedar i sar. 2015). Broj do sada identifikovanih polimorfizama u TERT-CLPTM1L genskom regionu je izuzetno veliki i iznosi preko 3000 SNP-ova (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>).

Od tri polimorfizma ispitivana u okviru ove studije, dva se nalaze u okviru TERT gena (rs2736100 i rs2736098), a jedan pripada CLPTM1L genu (rs402710) (Slika 9).



Slika 9. Polimorfizmi TERT-CLPTM1L genskog regiona (preuzeto: Wang i sar., 2014, modifikovano)

TERT rs2736100 (A>C) SNP lokalizovan je u intronu broj 2 i najviše je proučavan polimorfizam TERT gena. Doveden je u vezu sa povišenim rizikom od kancera pluća, bešike, pankreasa, testisa i CNS-a (Mocellin i sar. 2012). Asocijacija sa OPK do sada nije ispitivana.

TERT rs2736098 (G>A) SNP, lokalizovan u egzonu broj 2, takođe je pokazao vezu sa različitim kancerima, ali rezultati su donekle kontroverzni. U nekim slučajevima je čak asociran sa smanjenim rizikom od nekih tumora, uključujući i planocelularni karcinom glave i vrata (Liu i sar. 2010).

CLPTM1L rs402710 (C>T) SNP, lokalizovan u intronu broj 4, doveden je u vezu sa povišenim rizikom od kancera uopšte (Li i sar. 2013), kao i različitim tipovima tumora (Wang i sar. 2012; Zheng i sar. 2012). Međutim, iako je najviše ispitivan u vezi sa tumorima pluća, rezultati su oprečni (Jin i sar. 2009; Liang i sar. 2014; Zhao i sar. 2014).

1.4.2. Gametska neravnoteža vezanosti i haplotipski blokovi

Gametska neravnoteža vezanosti (*engl. Linkage Disequilibrium, LD*) odnosi se na neslučajnu asocijaciju alela ili polimorfizama i njihovu vezanu (zajedničku) segregaciju u gamete. Procenjeno je da oko 70 do 80% genoma poseduje regione visokog LD-a, odnosno LD (haplotipske) blokove kod kojih je stepen homologe rekombinacije vrlo nizak. Dužina ovih blokova je vrlo varijabilna i iznosi od samo nekoliko Kb do preko 100 Kb. Između njih nalaze se regioni niskog LD-a u kojima je stepen homologe rekombinacije vrlo visok (*engl. recombination hot-spots*). Ukoliko su SNP-ovi lokalizovani unutar jednog LD (haplotipskog) bloka, velika je verovatnoća da će se nasleđivati zajedno, kao i da dobijena asocijacija jednog SNP-a sa nekim oboljenjem može ukazati na asocijaciju drugih SNP-ova unutar bloka. Parametri kojima se izražava jačina LD-a su najčešće r^2 i D' , pri čemu su vrednosti za oba u rasponu od 0 (odsustvo vezanosti-neravnoteže) do 1 (potpuna vezanost-neravnoteža) (Wang i sar. 2005).

Istraživanja pokazuju da se CLPTM1L rs402710 (C>T) SNP, a verovatno i ceo kodirajući region CLPTM1L gena, nalaze u regionu visokog LD koji uključuje i promotor TERT gena, ali su rezultati kontradiktorni (Li i sar. 2013).

2. Ciljevi istraživanja

Osnovni ciljevi istraživanja:

1. Utvrditi frekvencu različitih polimorfizama TERT i CLPTM1L gena kod dve grupe ispitanika (zdrave osobe i pacijenti sa oralnim planocelularnim karcinomom).
2. Ispitati asocijaciju pojedinačnih polimorfizama TERT i CLPTM1L gena, kao i njihovih haplotipova, sa rizikom za nastanak oralnih planocelularnih karcinoma.
3. Odrediti nivo ekspresije enzima telomeraze, i ispitati postojanje korelacije sa kliničkim i patohistološkim parametrima.
4. Proceniti dužine telomera i korelisati ih sa kliničkim i patohistološkim parametrima.
5. Ispitati asocijaciju između analiziranih polimorfizama, ekspresije telomeraze i dužine telomera.

Hipoteza istraživanja

Polimorfizmi gena: TERT, rs2736100 (A>C) i rs2736098 (G>A); CLPTM1L, rs402710 (C>T), predstavljaju faktore rizika za nastanak oralnih planocelularnih karcinoma, dovodeći do povećanja nivoa ekspresije enzima telomeraze i promena u dužini telomera sa progresijom tumora.

3. Materijal i metode

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije realizovan je u Laboratoriji za Humanu genetiku Stomatološkog fakulteta i Laboratoriji za imunohistohemiju i histohemiju Instituta za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Etički aspekti. Etički komitet Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu odobrio je izvođenje ove studije (broj odobrenja 36/07, februar 2014. godine). Svi učesnici u studiji potpisali su informisani pristanak.

3.1. Studijska grupa

U studiju je uključeno 93 pacijenta sa dijagnostikovanim oralnim planocelularnim karcinomom (OPCK), lečenih na Klinici za Maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu i 100 zdravih osoba bez prethodno dijagnostikovanih kancera. U grupi pacijenata bilo je 74 (79.6%) muškarca i 19 (20.4%) žena, prosečne starosti 61.4 ± 11.1 godina, medijana 62 godine. Kontrolnu grupu činilo je 63 (63%) muškaraca i 37 (37%) žena, prosečne starosti 63.1 ± 8.4 , medijana 62 godine. Učesnici obe studijske grupe pripadali su populaciji sa teritorije Srbije. Informacije o kliničko-patološkim karakteristikama tumora dobijene su iz medicinskih istorija pacijenata. Pouzdani podaci o konzumaciji alkohola i duvana nisu bili dostupni.

3.2. Izolacija i merenje koncentracije DNK

Genomska DNK dobijena je iz isečaka tumorskog tkiva fiksiranog u formalinu i ukalupljenog u parafinu (*engl. Formalin Fixed Paraffin Embedded, FFPE*) kod pacijenata sa OPCK, i iz briseva bukalne sluzokože u kontrolnoj grupi. Za izolaciju DNK korišćen je KAPA Express Extract Kit (Kapa Biosystems, Inc, Wilmington, MA, USA) prema preporukama proizvođača. Nakon izolacije, genomska DNK je čuvana na temperaturi od -20°C .

Koncentracija i kvalitet izolovane DNK određeni su spektrofotometrijskom metodom (BioPhotometer Plus, Eppendorf, Nemačka). Nakon rastvaranja DNK (1 μ l DNK u 50 μ l vode) određena je apsorbancu na 260 nm (koncentracija DNK) i 280 nm (kvalitet DNK, odnosno prisustvo proteina). Na osnovu odnosa $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ moguća je procena čistoće uzorka (R). Ukoliko je $R \geq 1.6$, izolovana DNK je u dovoljno visokoj koncentraciji i nije kontaminirana proteinima. Čistoća uzoraka korišćenih u ovoj studiji bila je zadovoljavajuća (oko 1.7 za DNK iz parafinskih kalupa i oko 1.8 za DNK iz briseva).

3.3. Reakcija lančane polimeraze (PCR metoda)

Reakcija lančane polimeraze (*engl. Polymerase Chain Reaction, PCR*) predstavlja *in vitro* sintezu i amplifikaciju definisane sekvence DNK. Ovaj proces podrazumeva ciklična ponavljanja denaturacije DNK, hibridizacije prajmera i ekstenzije hibridizovanih prajmera posredstvom termostabilne *Taq* polimeraze, što kao rezultat ima milionsko umnožavanje (10^6 - 10^9) specifičnog fragmenta DNK.

PCR metodom amplifikovani su ciljni segmenti TERT-CLPTM1L genskog regiona koji sadrže ispitivane polimorfizme. Lista korišćenih prajmera (Jin i sar. 2009; Zhang i sar. 2013) data je u Tabeli 1. U reakcijama PCR-a korišćen je KAPA Master Mix (Kapa Biosystems, Inc, Wilmington, MA, USA) prema uputstvu proizvođača.

Tabela 1. Sekvence, temperature hibridizacije prajmera korišćenih za amplifikaciju ciljnih segmenata TERT-CLPTM1L genskog regiona i dužine dobijenih PCR produkata

POLIMORFIZAM	Prajmer (5`- 3`)	Temperature hibridizacije prajmera (°C)	Dužina PCR produkta (Yi i sar.)
CLPTM1L/rs402710 (C>T)	F:5'ACATTTGCTTTCAGTGGCTCA3'	50	473
	R: 5'CCGTTGGCTTGGTTAGGTT3'		
TERT/rs2736100 (A>C)	F: 5'CCCCACAAGCTAAGCATTAT3'	51	152
	R: 5'GAAGAACCACGCAAAGGAC3'		
TERT/rs2736098 (G>A)	F: 5'GCCAGACCCGCCGAAGAAG3'	60	379
	R: 5'GCGCGTGGTTCCCAAGCAG3'		

3.4. Gel elektroforeza

Provera uspešnosti amplifikacije ciljnih genskih regiona vršena je vertikalnom poliakrilamidnom gel elektroforezom (Papagerakis i sar.). Ova metoda zasniva se na različitoj pokretljivosti biomolekula u električnom polju u odnosu na njihovu molekulsku masu, prostornu konformaciju i naelektrisanje. Zbog svog negativnog naelektrisanja PCR produkti se kroz poliakrilamidni gel kreću od katode ka anodi.

Provera uspešnosti PCR reakcije vršena je na 8% poliakrilamidnom (PAA) gelu u 1xTBE puferu, pri naponu struje od 220V, u trajanju od 30 do 45 minuta. Nakon toga, gel je potapan u vodeni rastvor etidijum bromida i analiziran pod UV svetlom transiluminatora (Vilber Lourmat, France).

3.5. Analiza polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (RFLP)

Analiza polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (*engl. Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP*) korišćena je za uvrđivanje genotipova analiziranih polimorfizama TERT-CLPTM1L genskog regiona. RFLP analiza obuhvata digestiju amplifikovanih sekvenci DNK restrikcionim enzimima i proveru veličine produkata na PAA gelu. Restrikcioni enzimi usled svoje endonukleazne aktivnosti prepoznaju specifične DNK sekvence, dužine 4-6 bp, i isecaju DNK molekul u okviru ili u neposrednoj blizini tih specifičnih sekvenci. Prisustvo ili odsustvo restrikcionog mesta ukazuje na prisustvo ili odsustvo analiziranog polimorfizma.

Za sva tri ispitivana polimorfizma korišćeni su Fast Digest enzimi, tako da su dobijeni PCR produkti tretirani restrikcionim endonuklezama u trajanju od 10 minuta na temperaturi od 37°C. Nakon provere na PAA gelu, analizirane su dužine dobijenih fragmenata odnosno genotipovi (divlji tip gena - WT, heterozigot za mutaciju - HET ili izmenjeni tip gena - MUT). Lista restrikcionih enzima, dužine dobijenih fragmenata i genotipovi dati su u Tabeli 2.

Tabela 2. RFLP analiza - restrikcioni enzimi, dužine DNK fragmenata i dobijeni genotipovi

POLIMORFIZAM	Restrikcioni enzim	Dužina restrikcionih fragmenata (Yi i sar.)	Genotip
CLPTM1L/rs402710 (C>T)	Pvu II*	473	WT (CC)
		473, 263, 210	HET (CT)
		263, 210	MUT (TT)
TERT/rs2736100 (A>C)	Sfc (Bmf I)*	152	WT (AA)
		152, 104, 48	HET (AC)
		104, 48	MUT (CC)
TERT/rs2736098 (G>A)	Bsp120 I*	289, 90	WT (GG)
		379, 289, 90	HET (GA)
		379	MUT (AA)

3.6. Analiza haplotipova

Za analizu haplotipova korišćen je Haploview (Barrett i sar. 2005). Ovaj program, na osnovu dobijenih genotipova za ispitivane polimorfizme, omogućava dobijanje proračuna i grafičkih prikaza vrednosti neravnoteže povezanosti (LD, *engl. Linkage Disequilibrium*) i haplotipskih blokova. Za identifikaciju haplotipskih blokova korišćena je opcija *solid spine block definition*, prema kojoj se u okviru LD grafikona članovi haplotipskog bloka pozicionirani na krajevima trougla nalaze u jakom LD-u, dok se članovi između njih nalaze u slabijem LD-u. Haploview takođe omogućava računanje učestalosti haplotipova u analiziranim grupama nesrodnih osoba (pacijenti i

kontrola), primenom matematičkog EM (*engl. Expectation Maximisation*) algoritma (Fallin i Schork 2000).

3.7. Real time PCR i određivanje relativne dužine telomera

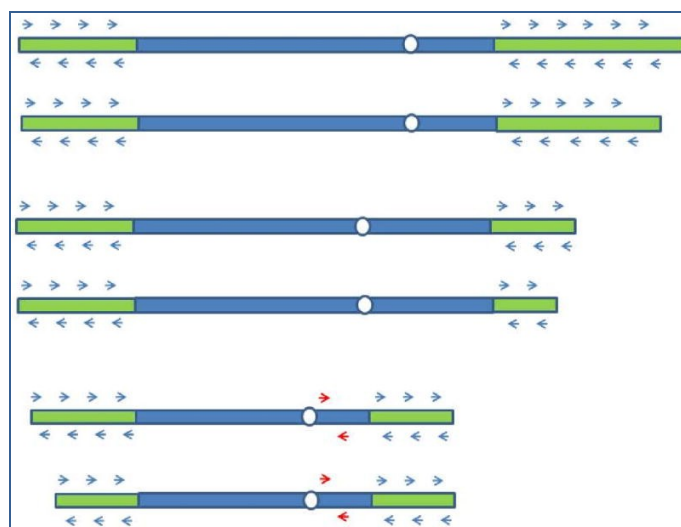
3.7.1. Real time PCR

Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (*engl. Real time PCR, Quantitative PCR*) omogućava grafičko praćenje toka reakcije na osnovu registrovanog porasta svetlosnog signala, emitovanog od strane fluorescentnih boja koje se vezuju za PCR produkte. U širokoj upotrebi su dve vrste hemikalija: Syber Green boja i TaqMan probe. Za razliku od TaqMan-ovih proba koje detektuju specifične segmente DNK, Syber Green boja se vezuje nespecifično za dvolančane DNK segmente. U našem radu korišćena je Syber Green boja. Aparat u kom je izvođena *Real Time PCR* reakcija poseduje pobuđivač i detektor fluorescence, tako da se na kraju svakog ciklusa u fazi elongacije, detektuje nivo ugrađenog Syber Green-a, odnosno PCR prinos. Trenutak kada umnožavanje ciljnog PCR produkta ulazi u eksponencijalnu fazu, označava se kao Ct vrednost (*engl. Cycle threshold*), ciklus u kome se prelazi prag fluorescence. Što je veća količina DNK u uzorku, vreme potrebno da se dostigne prag fluorescence je kraće, tj. Ct vrednost je manja.

3.7.2. Određivanje relativne dužine telomera

Real time PCR metoda korišćena je za određivanje relativne dužine telomera (Manneras-Holm i sar.), putem određivanja odnosa broja telomernih ponovaka prema endogenoj kontroli tj. genu prisutnom u jednostrukoj dozi (*engl. relative Telomere-to-Single copy gene (T/S) ratio*), na osnovu ranije opisane metode uz manje modifikacije (Cawthon 2002). Gen za β -globin (HBG) korišćen je kao endogena kontrola.

Telomerni PCR signal predstavlja meru dužine telomera, pošto je broj parova prajmera koji se vezuju za telomerne ponovke na početku reakcije, direktno proporcionalan ukupnoj dužini telomera u ćeliji. PCR fluorescentni signal poreklom od gena u jednostrukoj dozi (β -globin), predstavlja meru broja ćelija, jer se samo dva para prajmera za ovaj gen mogu vezati u jednoj ćeliji na početku reakcije. Na taj način, prosečna dužina telomera u ćeliji dobija se kada se nivo PCR telomernog signala podeli nivoom PCR signala endogene kontrole (Lan i sar. 2009). Na Slici 10 telomerni regioni prikazani su zelenom bojom, prajmeri za telomerne ponovke plavim strelicama, a prajmeri za gen u jednostrukoj dozi crvenom bojom na hromozomu br.11.



Slika 10. Princip određivanja RDT real-time PCR metodom (preuzeto: Lan i sar, 2009).

Zbog razlike u temperaturnim profilima, qPCR reakcija morala je biti izvedena odvojeno za telomere i HBG. Sekvence i koncentracije prajmera date su u Tabeli 3, a temperaturni profili u Tabeli 4.

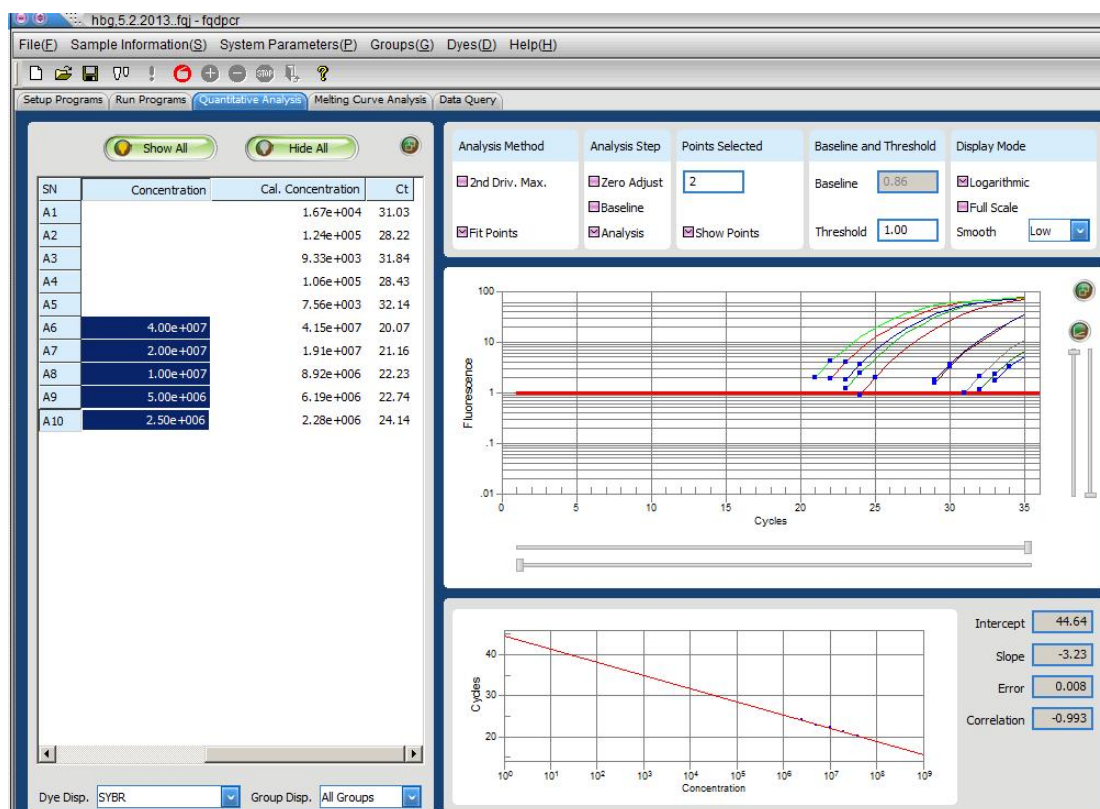
Tabela 3. qPCR - sekvence i koncentracije prajmera za telomere i HBG

OZNAKA PRAJMERA	Sekvenca prajmera (5' - 3')	Konc. prajmera (nM)
TEL 1	F:CGGTTTGTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT	100
TEL 2	R: GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT	900
HBG 1	F: TCTGACACA ACTGTGTTCACTAGC	300
HBG 2	R: CACCAACTTCATCCACGTTCCACC	700

Tabela 4. qPCR - temperaturni profili za telomere i HBG

qPCR	TEMPERATURNI PROFILI		
Telomere	95°C, 5 min	30 ciklusa	
		95°C, 15 s	56°C, 1 min
HBG	95°C, 5 min	35 ciklusa	
		95°C, 15 s	54°C, 1 min.

U obe qPCR reakcije zapremina reakcione smeše iznosila je 25 μ l, a komponente smeše činili su: 12,5 μ l SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA), prajmeri za telomere ili HBG, i 10ng DNK. U svakoj qPCR reakciji korišćena je referentna tumorska DNK (293T) u serijskom razblaženju, 2.5 ng/ μ l-5ng/ μ l-10ng/ μ l-20ng/ μ l-40ng/ μ l, u cilju dobijanja standardne krive i praćenja efikasnosti reakcije. Svi uzorci rađeni su u duplikatu, i svaki je analiziran dva puta. Nagib standardne krive iznosio je od -3.2 do -3.7, a koeficijent linearne korelacije (R^2) za svaku standardnu krivu bio je ≥ 0.98 (Slika 11). Ct vrednosti (srednja vrednost) dobijene za telomere i HBG korišćene su za računanje T/S odnosa (broj telomernih ponovaka/broj gena prisutnog u jednoj kopiji). Relativni T/S odnos dobijen je upotrebom $T/S = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ formule, gde je $\Delta\Delta Ct = (Ct_{telomere} - Ct_{HBG})$ uzorka - $(Ct_{telomere} - Ct_{HBG})$ referentne DNK (razblaženje od 10 ng/ μ l na standardnoj krivi). Na ovaj način, dobijena je relativna dužina telomera (Manneras-Holm i sar.) za svaki uzorak OPCK.



Slika 11. qPCR za HBG – dobijanje standardne krive na osnovu Ct vrednosti referentne DNK u serijskom razblaženju

3.8. Imunohistohemija

Imunohistohemijska obrada uzoraka urađena je u Laboratoriji za imunohistohemiju i histohemiju Instituta za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Proces imunohistohemijske obrade uzoraka tumora fiksiranih u formalinu i ukalupljenih u parafinu obuhvata nekoliko faza:

- 1) Deparafinizaciju
- 2) Proteolitičku digestiju
- 3) Blokiranje endogene peroksidaze
- 4) Imunohistohemijsko bojenje primenom streptavidin-biotin tehnike

1) Deparafinizacija

Sečenjem parafinskih kalupa dobijeni su preseci debljine 5 μ m koji su, nakon sušenja na 56°C u trajanju od 16h, deparafinirani ispiranjem u ksilolu, 100% alkoholu, 96% alkoholu i destilovanoj vodi.

2) Proteolitička digestija (demaskiranje antigena)

Deparafinirani preseci su potopljeni u 0.01mol/L citratni pufer (pH=6.0) i kuvani u mikrotalasnoj pećnici 20 minuta na 620 W, zatim 30 minuta hladjeni na sobnoj temperaturi i na kraju su isprani destilovanom vodom.

3) Blokiranje endogene peroksidaze

Preparati su potopljeni u 3% vodonik-peroksid (rastvoren u destilovanoj vodi), isprani destilovanom vodom i preliveni 0.02mol/L fosfatnim puferom (*engl. Phosphate-Buffered Saline, PBS*) (pH=7.0).

4) Imunohistohemijsko bojenje primenom streptavidin-biotin tehnike

Za imunohistochemijsko bojenje korišćen je komercijalni kit (Labelled streptavidin-biotin- LSAB+ kit, DAKO, Glostrup, Denmark), po preporuci proizvođača.

- Inkubacija preko noći na 4°C u primarnom antitelu (mišije monoklonalno antitelo, telomeraza reverzna transkriptaza, klon 2C4, razblaženje 1:150, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA)
- Inkubacija u trajanju od 15 minuta u sekundarnom antitelu (zečije anti-mišije IgG antitelo, razblaženje 1:500, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA)
- Inkubacija u trajanju od 30 minuta u streptavidin-peroksidazi
- Bojenje upotrebom hromogena diaminobenzidina
- Kontrastiranje upotrebom Mayer-ovog hematoksilina

Tkivo dobijeno nakon tonzilektomije služilo je kao pozitivna kontrola, dok je inkubacija u rastvoru bez primarnog antitela predstavljala negativnu kontrolu. Mesta specifičnog vezivanja antitela bojila su se smeđe, za razliku od nespecifičnog vezivanja hematoksilina koje je plave boje.

Imunohistochemijsko bojenje analizirano je na svetlosnom mikroskopu (Bx50F4, Olympus Optical, Japan), primenom digitalne kamere (DP70, Olympus, Japan) i softvera (Imaging Software cell F, Opticus, Japan).

Ekspresija telomerase detektovana je kao smeđa prebojenost jedra ili citoplazme.

Brojanje ćelija vršeno je u 10 vidnih polja na uveličanju 40X. Ekspresija telomerase predstavljala je procenat obojenih ćelija (jedara ili citoplazme) od 1000 prebrojanih. Ukoliko je uzorak imao 15% ili više ćelija sa obojenim nukleusom, to je predstavljalo pozitivnu nuklearnu ekspresiju telomerase. Citoplazmatska ekspresija određena je semikvantitativno: manje od 5% obojenih ćelija (nema ekspresije; -); 5%-35% obojenih ćelija (fokalna ekspresija; +), 36%-65% obojenih ćelija (umerena ekspresija; ++), i više od 65% pozitivnih ćelija (difuzna ekspresija; +++). Za potrebe statističke analize

slučajevi sa nuklearnom i citoplazmatskom ekspresijom objedinjeni su u jednu grupu i poređeni sa uzorcima bez ekspresije.

3.9. Statistička analiza

Statistička obrada dobijenih rezultata urađena je primenom statističkog programa SPSS 17.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, Illinois). Za deskripciju podataka korišćeni su apsolutni i relativni brojevi (%), mere centralne tendencije (aritmetička sredina i medijana) i mere disperzije (standardna devijacija, minimum i maksimum). Kategoričke varijable poređene su upotrebom Hi kvadrat (χ^2) testa. Neparametarski podaci analizirani su upotrebom Kraskal-Volisovog i Man-Vitnijevog testa. Univarijantna i multivarijantna logistička regresija korišćena je za dihotomne varijable, a univarijantna i multivarijantna linearna regresija za numeričke varijable. Ukupno preživljavanje analizirano je Kaplan-Majerovom metodom, a krive preživljavanja su međusobno poređene log-rank testom. Sve prikazane p vrednosti su bile *two-sided* i asocijacije su smatrane statistički značajnim ako je p vrednost bila manja od 0.05.

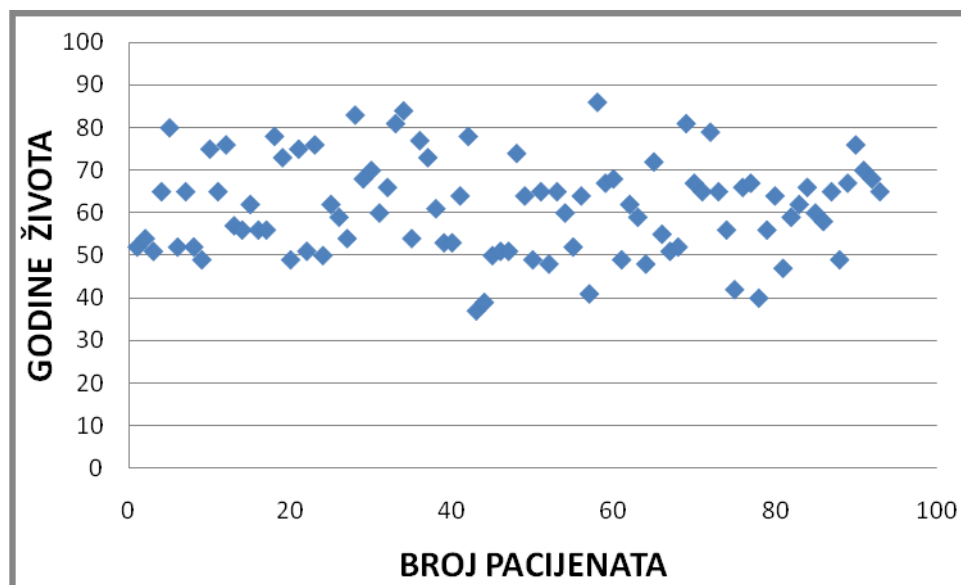
4. Rezultati

4.1. Opšte karakteristike studijske grupe

4.1.1. Distribucija prema starosti

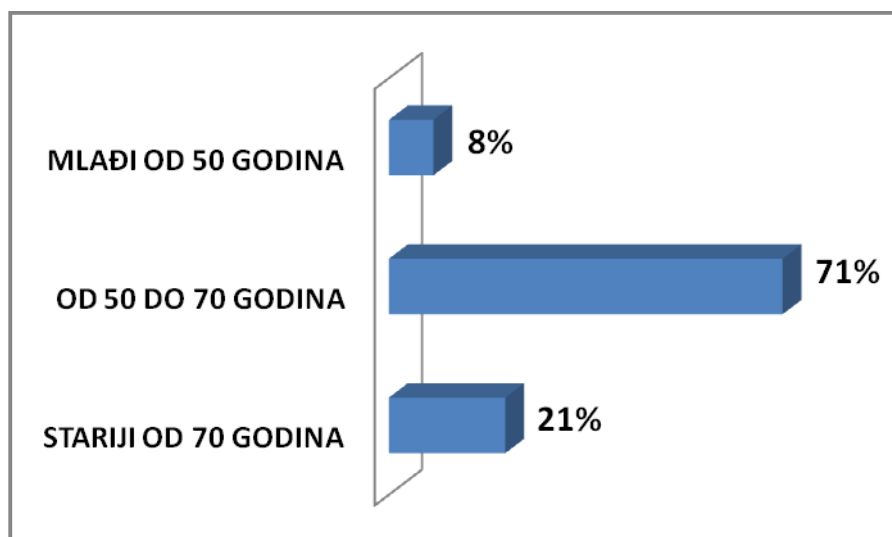
U studiju su bila uključeno 193 ispitanika, od toga 93 pacijenta sa oralnim planocelularnim karcinomom (OPCK) lečenih na Klinici za Maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, i 100 zdravih osoba bez prethodno dijagnostikovanih kancera.

Grupa pacijenata obuhvatala je muškarce i žene starosti od 37 do 86 godina, prosečne starosti 61.4 ± 11.2 godina, medijana 62 godine, što potvrđuje da je OPCK i u našoj populaciji češći kod starijih osoba (Slika 12). Kontrolnu grupu činili su muškarci i žene od 44 do 84 godine, prosečne starosti 63.1 ± 8.4 , medijana 62 godine. Statistički značajna razlika u distribuciji godina između pacijenata i kontrola nije bila prisutna ($p=0.243$).



Slika 12. Distribucija pacijenata sa OPCK u odnosu na godine života

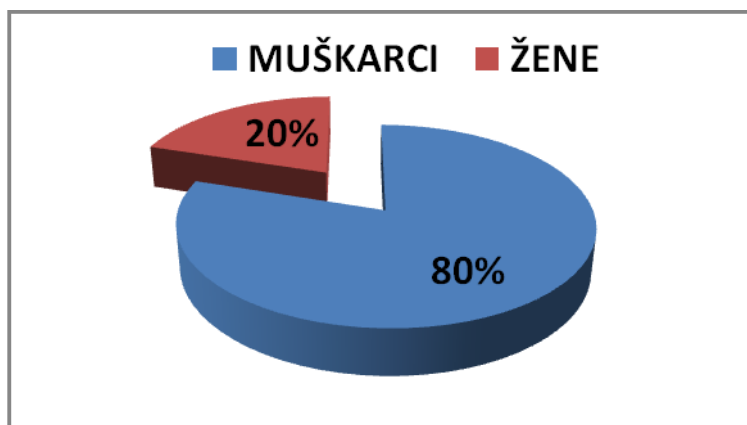
U cilju statističke obrade podataka, pacijenti su podeljeni u tri starosne grupe, pri čemu je najviše pacijenata bilo u grupi od 50 do 70 godina (Slika 13).



Slika 13. Distribucija pacijenta sa OPCK po starosnim grupama

4.1.2. Distribucija prema polu

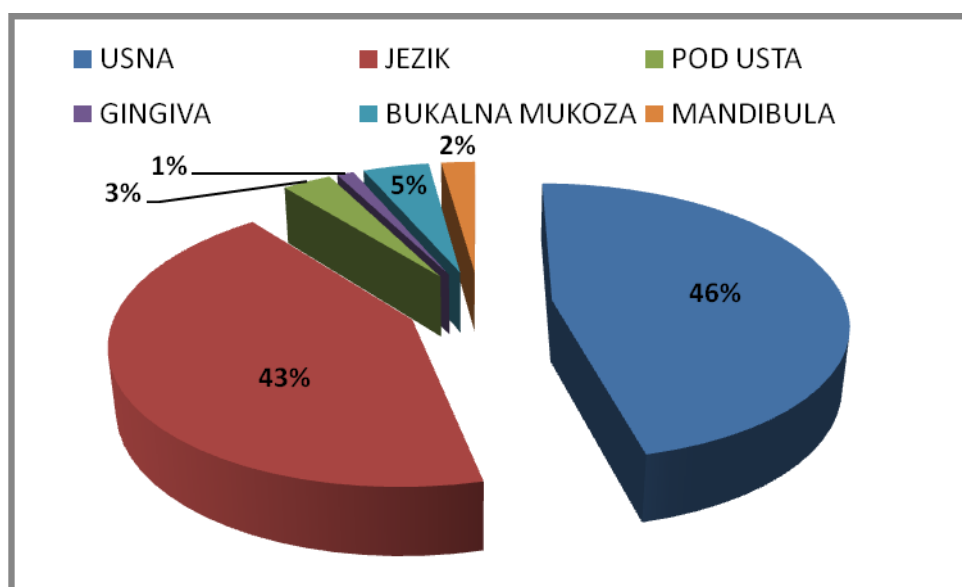
U grupi pacijenata bilo je 74 (79.6%) muškaraca i 19 žena (20.4%) (Slika 14), a u kontrolnoj grupi 63 (63%) muškarca i 37 (37%) žena, tako da je postojala statistički značajna razlika u distribuciji pola među grupama ($p=0.017$). Veća zastupljenost muškaraca u grupi pacijenata u skladu je sa literaturnim podacima o većoj incidenci oboljevanja muškaraca od OPCK u odnosu na žene (Livi i Johan 2012.).



Slika 14. Distribucija pacijenata sa OPCK prema polu

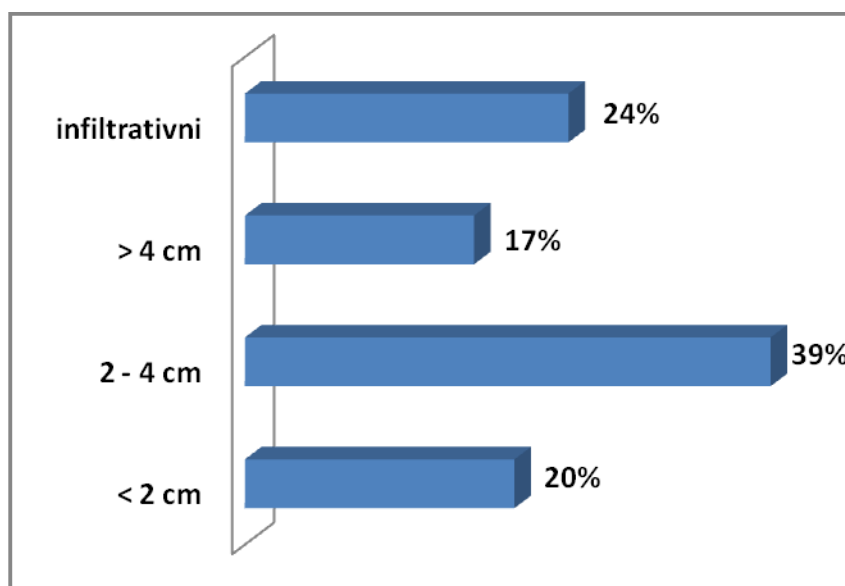
4.2. Karakteristike tumora

Od 93 tumora, najveći broj je bio poreklom sa usne (46%) i jezika (43%), dok su ostale lokalizacije bile zastupljene u manjem procentu (Slika 15).



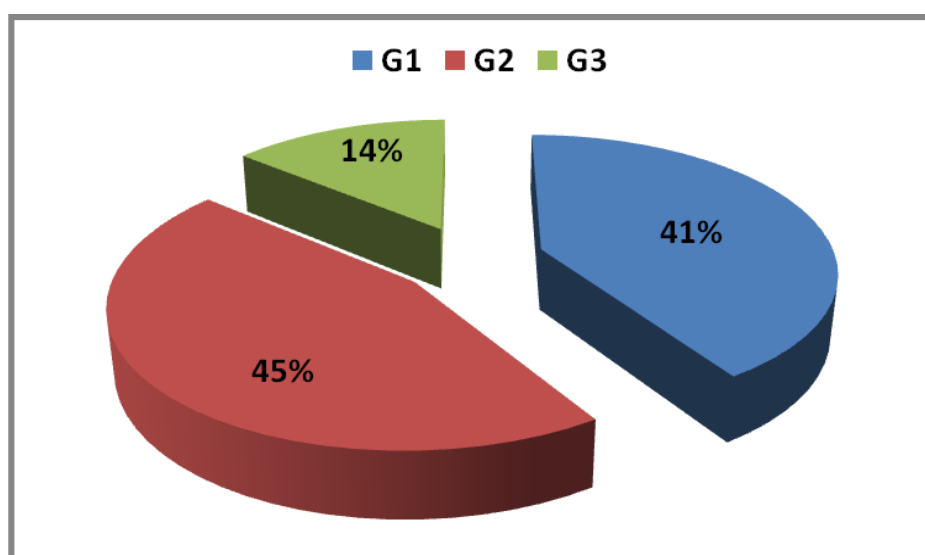
Slika 15. Distribucija tumora prema lokalizaciji

Na osnovu veličine, tumori su podeljeni u 4 grupe: manji od 2 cm (20%), od 2 do 4 cm (39%), veći od 4 cm (17%) i infiltrativni (24%) (Slika 16).



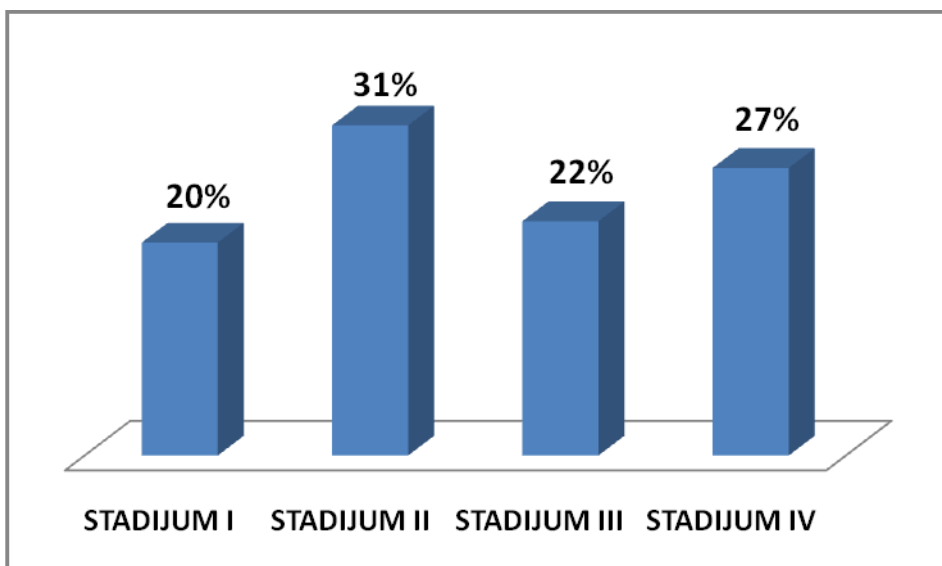
Slika 16. Distribucija tumora prema veličini

Najviše tumora pripadalo je G1 (41%) i G2 (45%) histološkom gradusu, dok je nediferentovanih (G3) bilo manje (14%) (Slika 17).



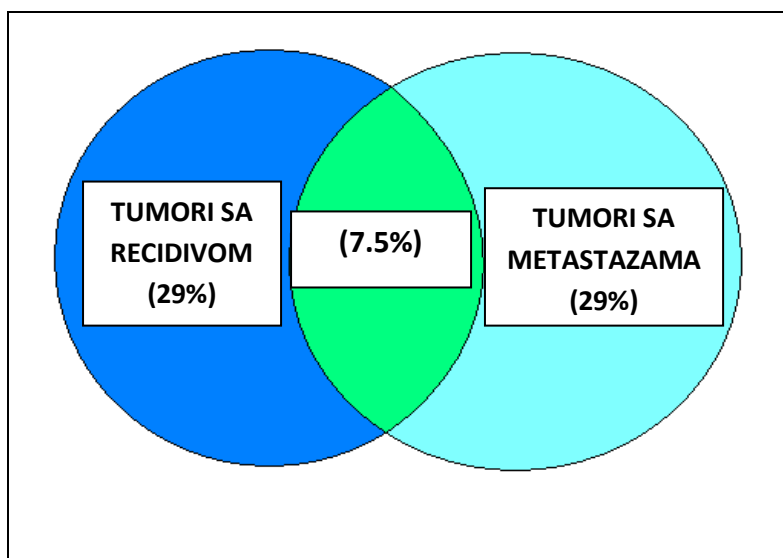
Slika 17. Distribucija tumora prema histološkom gradusu

Distribucija prema stadijumima prikazana je na Slici 18.



Slika 18. Distribucija tumora prema stadijumima

Učestalost recidiva i metastaza je bila ista (29%), dok su istovremeno recidivi i metastaze bili prisutni samo kod 7 tumora (7.5%) (Slika 19). Kod preostalih tumora (42%) nije bilo ni recidiva ni metastaza.

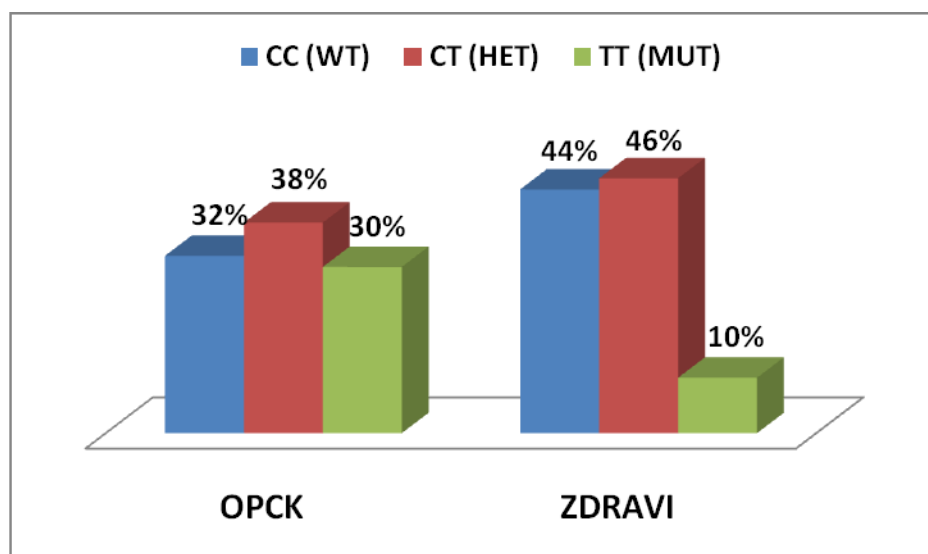


Slika 19. Prisustvo recidiva i metastaza

4.3. Analiza polimorfizama u TERT-CLPTM1L genskom regionu

4.3.1. Analiza CLPTM1L rs402710 polimorfizma

Za utvrđivanje potencijalne razlike u distribuciji genotipova CLPTM1L rs402710 polimorfizma, primenom RFLP metode analizirano je 68 uzoraka pacijenata sa OPCK i 100 uzoraka kontrola. Zbog tehničkih ograničenja (degradovana DNK) nije bilo moguće uraditi amplifikaciju ciljnog segmenata CLPTM1L gena kod svih tumorskih uzoraka. Na osnovu distribucije genotipova uočava se veće prisustvo TT genotipova među pacijentima nego u kontrolnoj grupi (Slika 20).



Slika 20. Distribucija genotipova za CLPTM1L rs402710 polimorfizam

Logističkom regresionom analizom primenom dominantnog modela i Fišerovim testom potvrđeno je da prisustvo TT genotipa (OR=4, $p<0.005$), kao i T alela (OR=1.95, $p<0.05$), predstavlja faktor rizika za OPCK (Tabela 5).

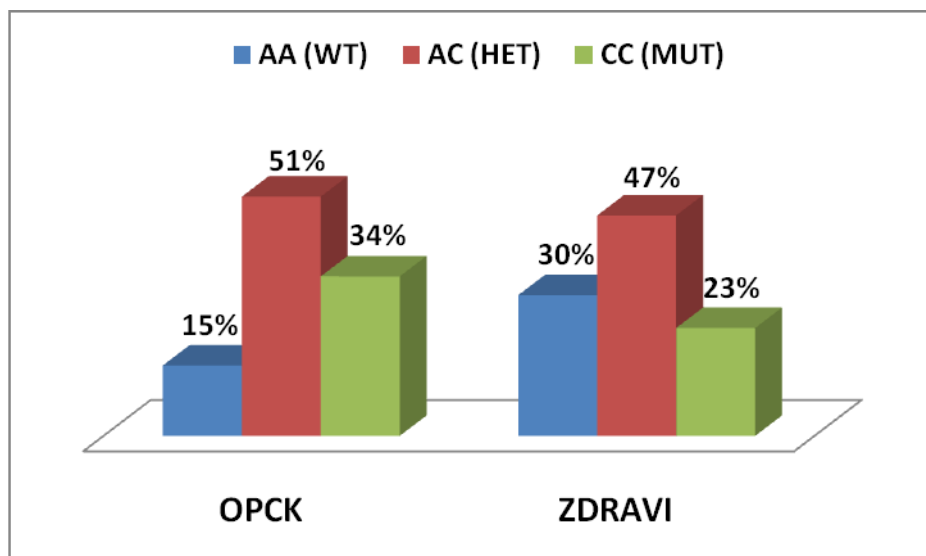
Tabela 5. Učestalost genotipova za CLPTM1L rs402710 polimorfizam kod pacijenata i kontrola i njihova asocijacija sa rizikom od OPCK

CLPTM1L rs402710 genotipovi	Pacijenti (%) N=68	Kontrole (%) N=100	OR (95%CI)	P
CC	22 (32.4)	44 (44)	1.00	
CT	26 (38.2)	46 (46)	1.13 (0.56-2.28)	0.73
TT	20 (29.4)	10 (10)	4 (1.60-9.99)	<0.005*
CT+TT	46 (67.6)	56 (56)	1.64 (0.86-3.13)	0.15
Učestalost T alela	0.49	0.33	1.95 (1.10-3.45)	<0.05*

4.3.2. Analiza TERT rs2736100 polimorfizma

Procena TERT rs2736100 polimorfizma je izvršena na osnovu analize 91 uzorka OPCK i 100 kontrolnih uzoraka. Distribucija genotipova prikazana je na Slici 21.

Logistička regresiona analiza primenom dominantnog modela i Fišerov test doveli su u vezu prisustvo CC (OR=2.89, $p<0.05$) i AC+CC genotipova (OR=2.36, $p<0.05$) sa povećanim rizikom od OPCK (Tabela 6).



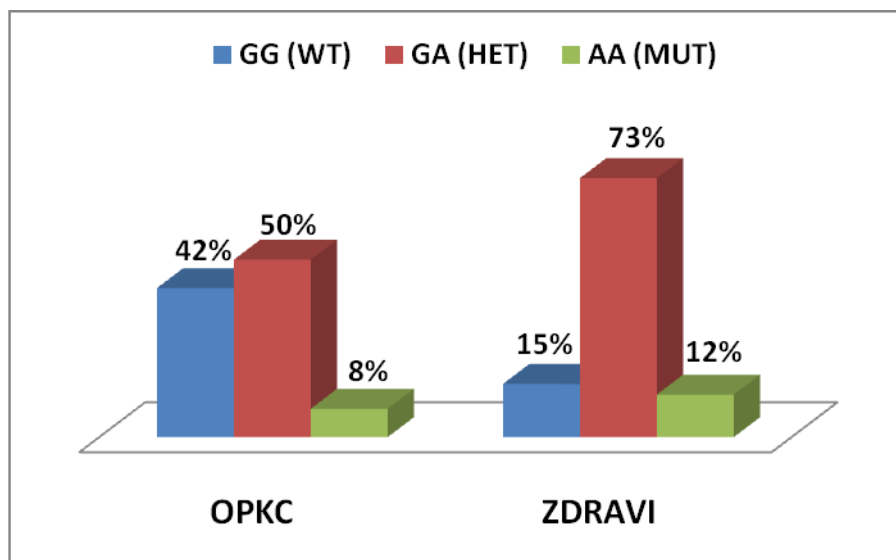
Slika 21. Distribucija genotipova za TERT rs2736100 polimorfizam

Tabela 6. Učestalost genotipova za TERT rs2736100 polimorfizam kod pacijenata i kontrola i njihova asocijacija sa rizikom od OPCK

TERT rs2736100 genotipovi	Pacijenti (%) N=91	Kontrole (%) N=100	OR (95%CI)	P
AA	14 (15.4)	30 (30)	1.00	
AC	46 (50.5)	47 (47)	2.09 (0.99-4.46)	0.054
CC	31 (34.1)	23 (23)	2.89 (1.26-6.64)	<0.05*
AC+CC	77 (84.6)	70 (70)	2.36 (1.16-4.81)	<0.05*
Učestalost C alela	0.60	0.47	1.69 (0.96-2.96)	0.089

4.3.3. Analiza TERT rs2736098 polimorfizma

RFLP metodom analizirana je distribucija genotipova za TERT rs2736098 polimorfizam kod 90 pacijenata sa OPCK i 100 kontrola (Slika 22).



Slika 22. Distribucija genotipova za TERT rs2736098 polimorfizam

Logistička regresiona analiza primenom dominantnog modela i Fišerov test pokazali su asocijaciju između prisustva A alela i značajno sniženog rizika od OPCK (Tabela 7). Na osnovu dobijenih podataka, TERT rs2736098 polimorfizam mogao bi imati protektivnu ulogu, međutim, ove rezultate treba posmatrati sa oprezom, s obzirom na to da u kontrolnoj grupi genotipovi nisu bili u Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži ($p < 0.001$).

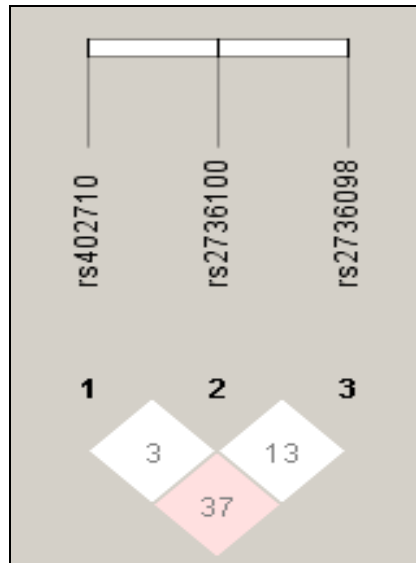
Tabela 7. Učestalost genotipova za TERT rs2736098 polimorfizam kod pacijenata i kontrola i njihova asocijacija sa rizikom od OPCK

TERT rs2736098 genotipovi	Pacijenti (%) N=90	Kontrole (%) N=100	OR (95%CI)	P
GG	38 (42.2)	15 (15)	1.00	
GA	45 (50)	73 (73)	0.24 (0.12-0.49)	<0.0001*
AA	7 (7.8)	12 (12)	0.23 (0.08-0.69)	<0.05
GA+AA	52 (57.8)	85 (85)	0.24 (0.12-0.48)	<0.0001*
Učestalost A alela	0.33	0.48	0.53 (0.30-0.94)	<0.05*

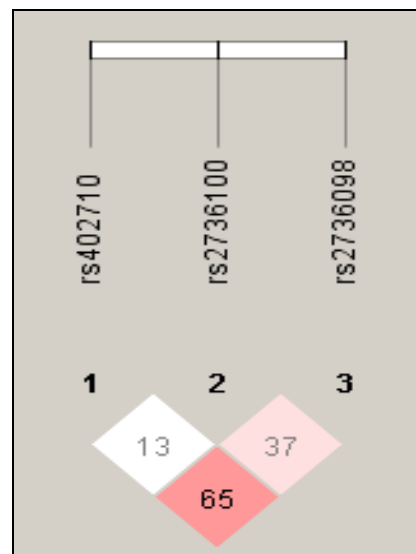
4.4. Analiza haplotipova

Neravnoteža vezanosti (LD) ispitivana je kod sva tri polimorfizma i izražena preko parametra D' (procentualne vrednosti su prikazane u kvadratićima) za celu studijsku grupu, pacijente sa OPCK i kontrole. Za definiciju haplotipskih blokova korišćena je *solid spine* opcija.

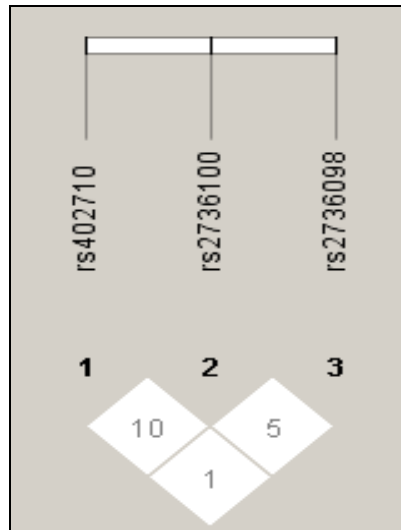
Neravnoteža vezanosti (LD) bila je slabo izražena u svim grupama (nije se približila vrednosti $D=1$). Najjače povezani su bili rs402710 i rs2736098 polimorfizmi u kontrolnoj grupi ($D=0.65$) (Slika 23). Nivo LD između rs402710 i rs2736098 u celoj studijskoj grupi (Slika 24) bio je jednak vezanosti rs2736100 i rs2736098 u kontrolnoj grupi ($D=0.37$) (Slika 25). Kod pacijenata sa OPCK LD je bio veoma nizak ($D'=0.10$) (Slika 25). Ni u jednoj grupi nije identifikovan haplotipski blok.



Slika 23. Neravnoteža vezanosti (LD) u celoj studijskoj grupi



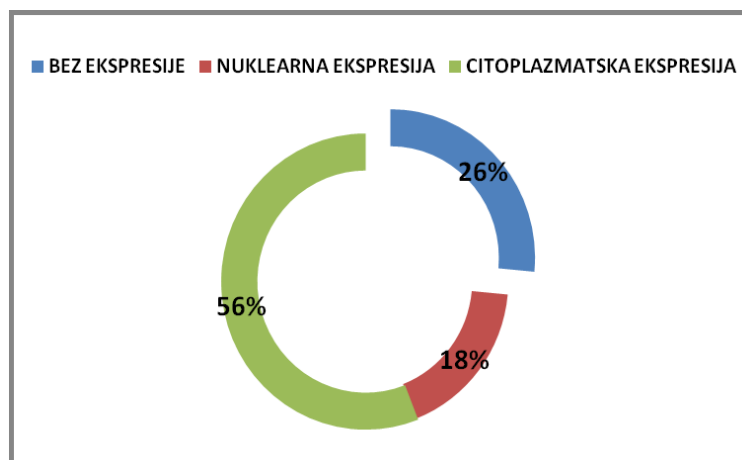
Slika 24. Neravnoteža vezanosti (LD) u kontrolnoj grupi



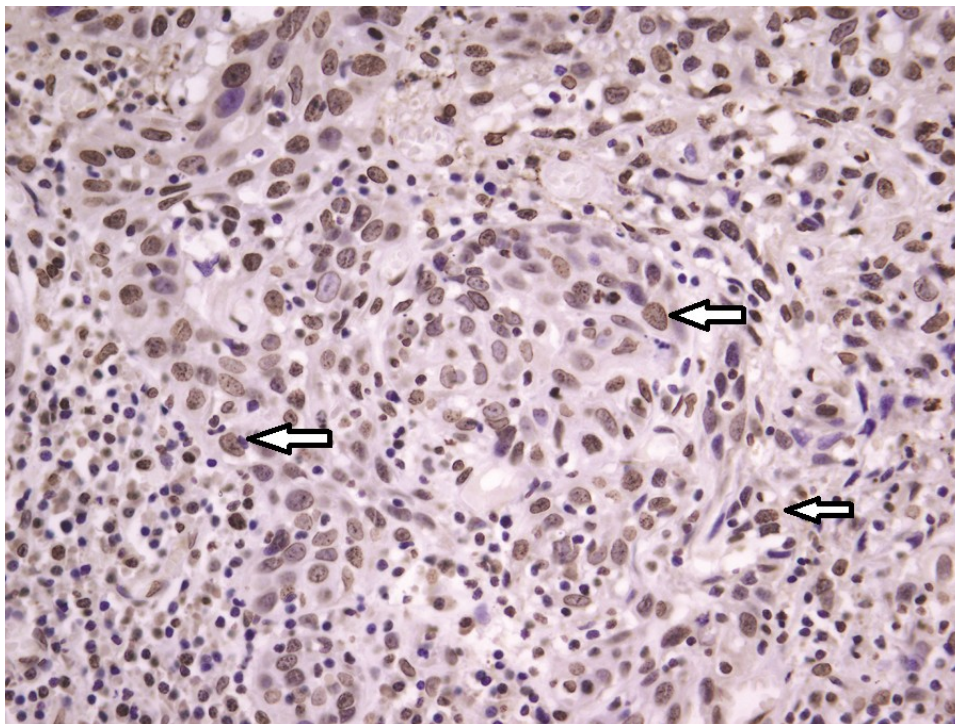
Slika 25. Neravnoteža vezanosti (LD) u grupi pacijenata sa OPCK

4.5. Imunohistohemijska ekspresija telomeraze

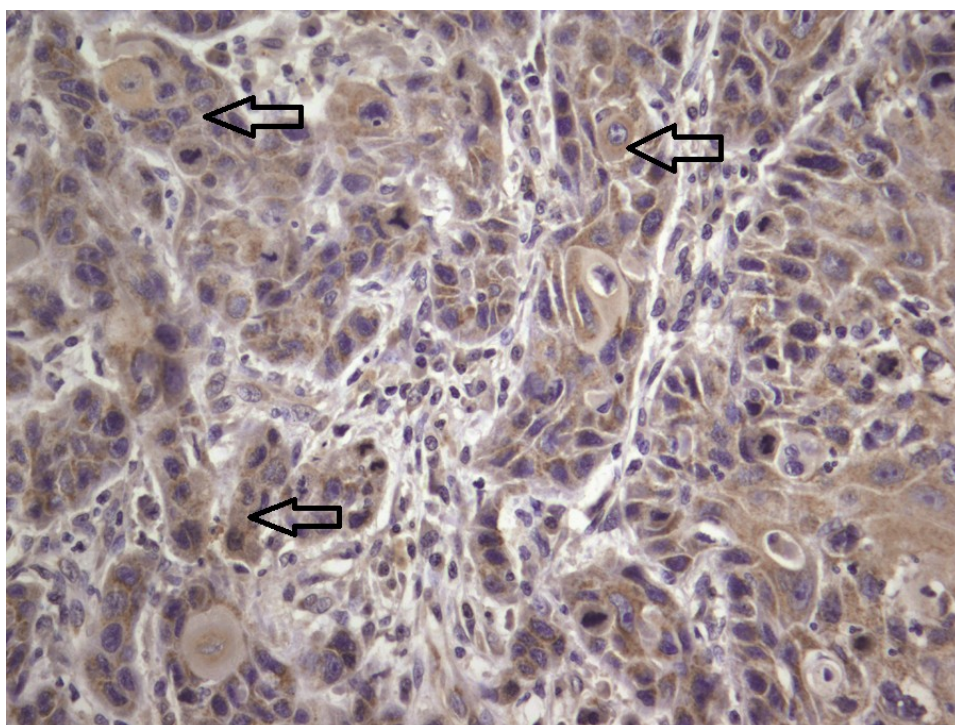
Imunohistohemijska analiza ekspresije telomeraze (hTERT-a) urađena je na 34 uzorka OPCK. Od 34 uzorka 25 (74%) je pokazalo ekspresiju telomeraze, od toga 6 (18%) nuklearnu, a 19 (56%) citoplazmatsku ekspresiju (Slika 26, 27, 28 i 29).



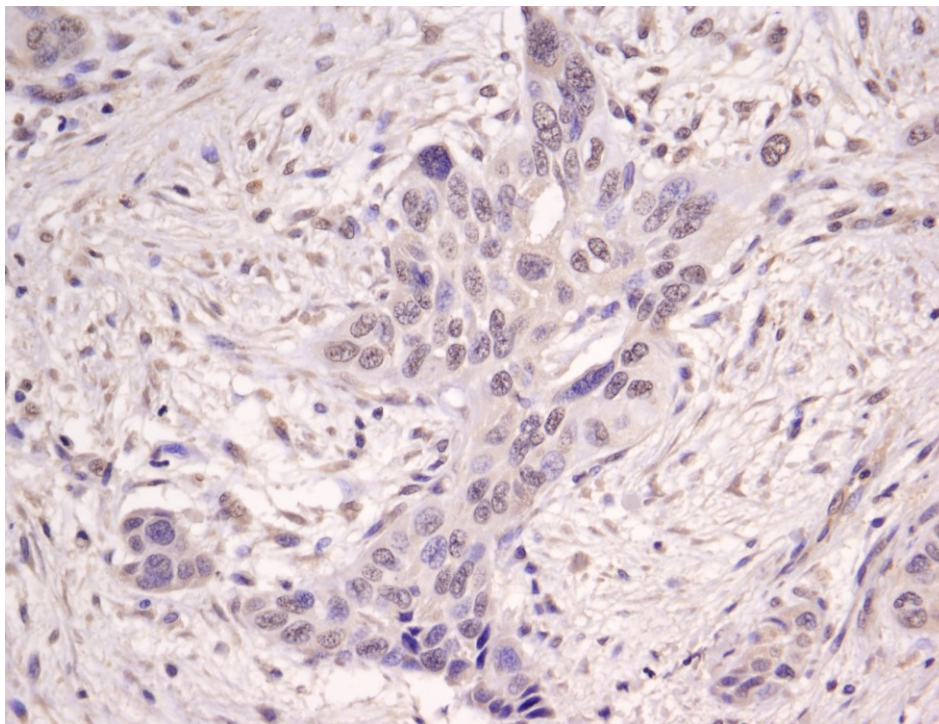
Slika 26. Imunohistohemijska ekspresija telomeraze kod OPCK



Slika 27. Nuklearna ekspresija telomeraze kod OPCK (40X)



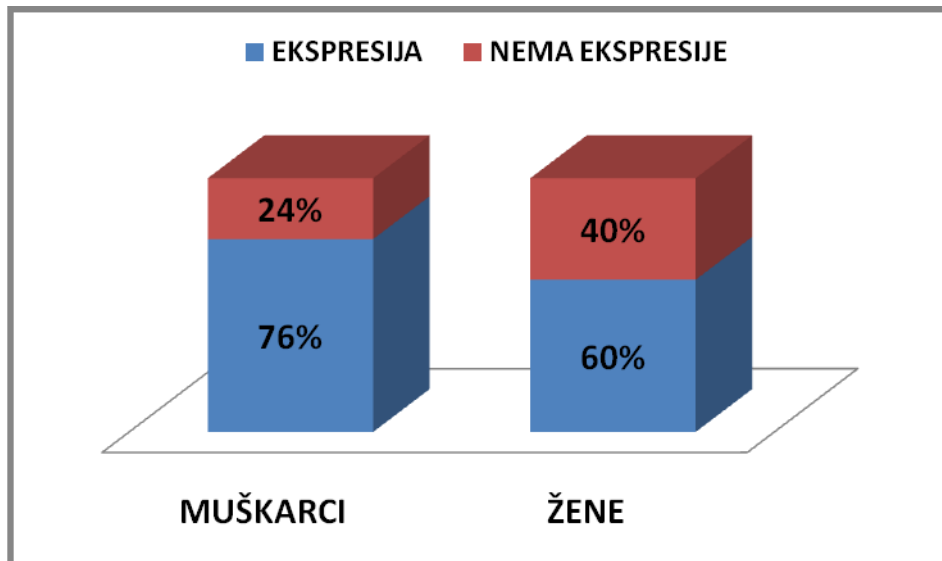
Slika 28. Citoplazmatska ekspresija telomeraze kod OPCK (40X)



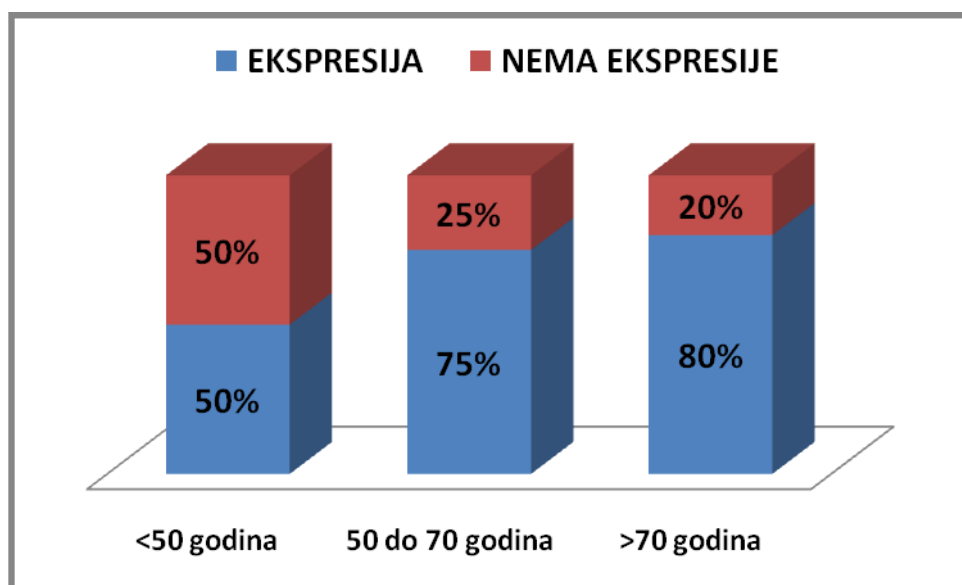
Slika 29. Negativna ekspresija telomeraze kod OPCK (40X)

Za potrebe statističke analize, zbog malog broja uzoraka, nuklearna i citoplazmatska ekspresija spojene su u jednu grupu (pozitivna ekspresija), a zatim je ispitivana potencijalna asocijacija sa kliničko-patološkim i molekularno-genetičkim parametrima.

Ekspresija telomeraze nije bila statistički različita kod muškaraca i žena sa OPCK ($p=0.40$) (Slika 30), kao ni kod različitih starosnih grupa ($p=0.503$) (Slika 31).

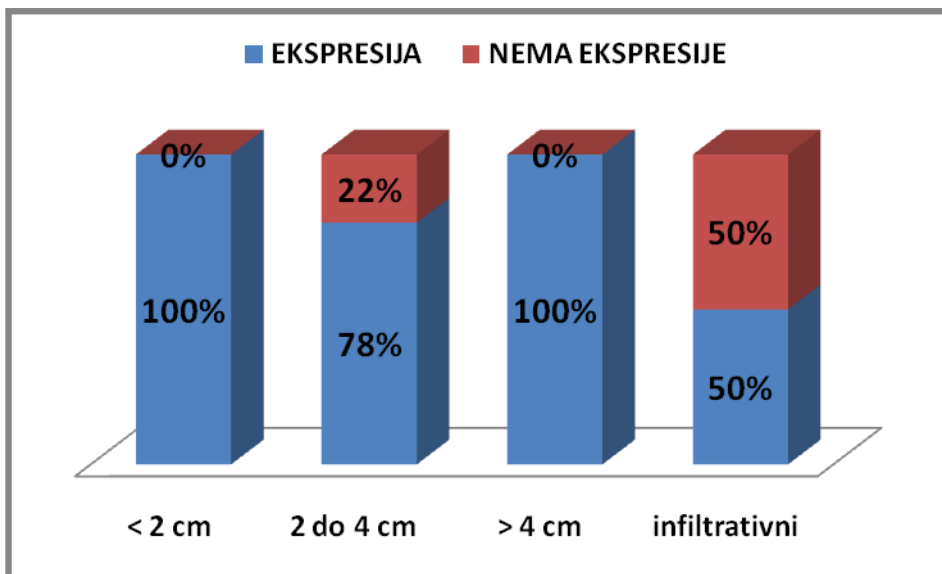


Slika 30. Ekspresija telomeraze u OPCK kod muškaraca i žena

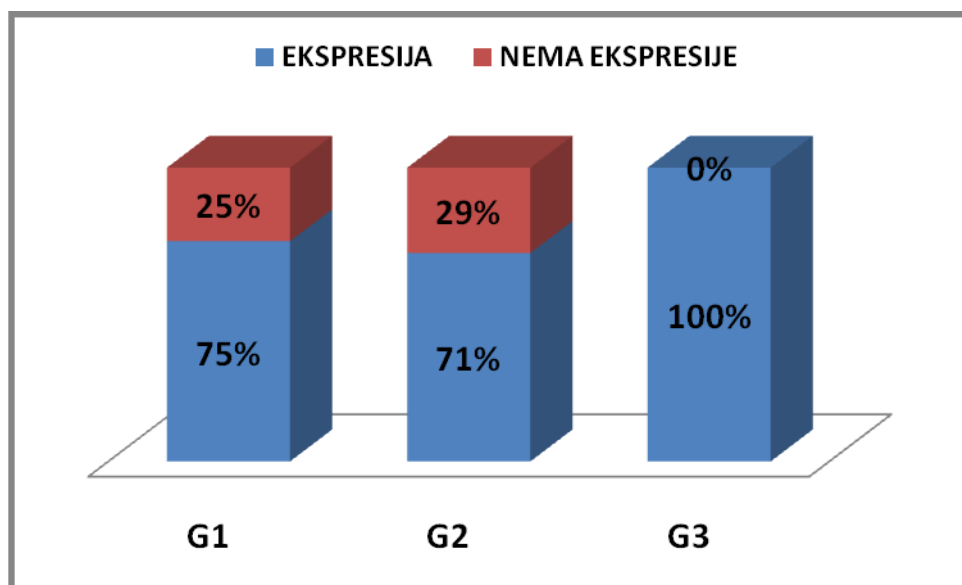


Slika 31. Ekspresija telomeraze u OPCK kod različitih starosnih grupa

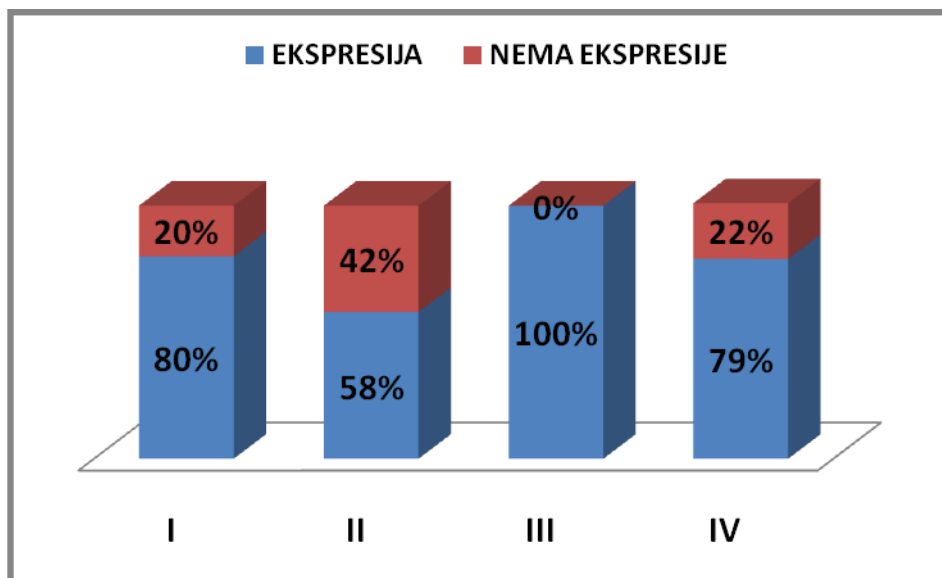
Statistički značajna razlika u ekspresiji nije bila prisutna ni kod različitih veličina tumora ($p=0.16$), histoloških gradusa ($p=0.79$) i stadijuma tumora ($p=0.42$) (Slika 32, 33 i 34).



Slika 32. Ekspresija telomeraze kod različitih veličina tumora

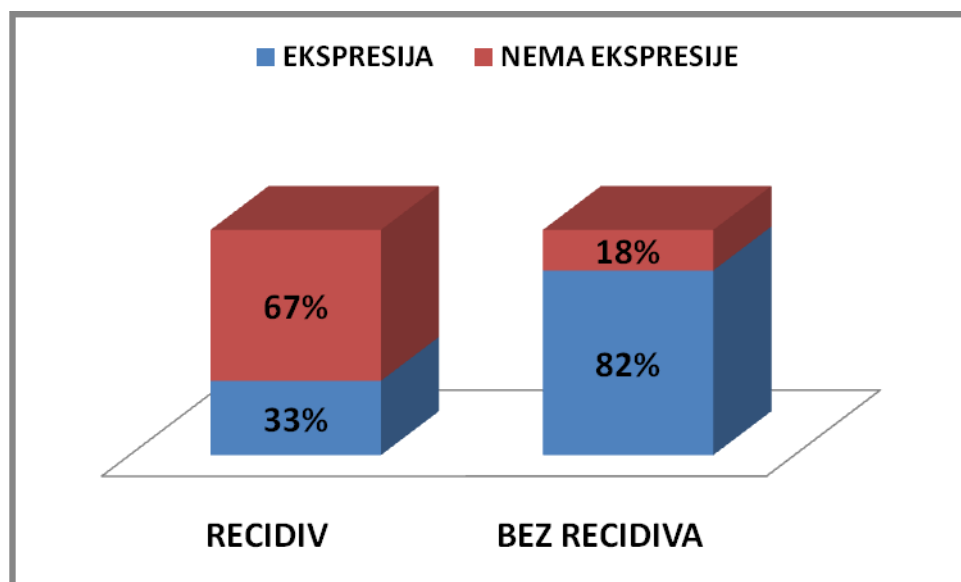


Slika 33. Ekspresija telomeraze kod različitih histoloških gradusa OPCK

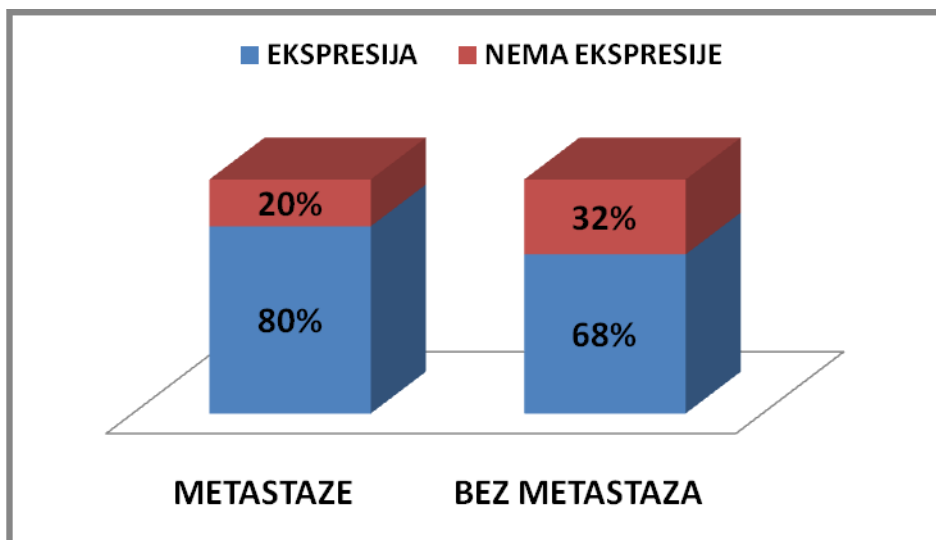


Slika 34. Ekspresija telomeraze kod različitih stadijuma OPCK

Ekspresija telomeraze bila je statistički značajno veća kod tumora bez recidiva ($p < 0.05$) ali ne i u odnosu na prisustvo metastaza ($p = 0.69$) (Slika 35 i 36).

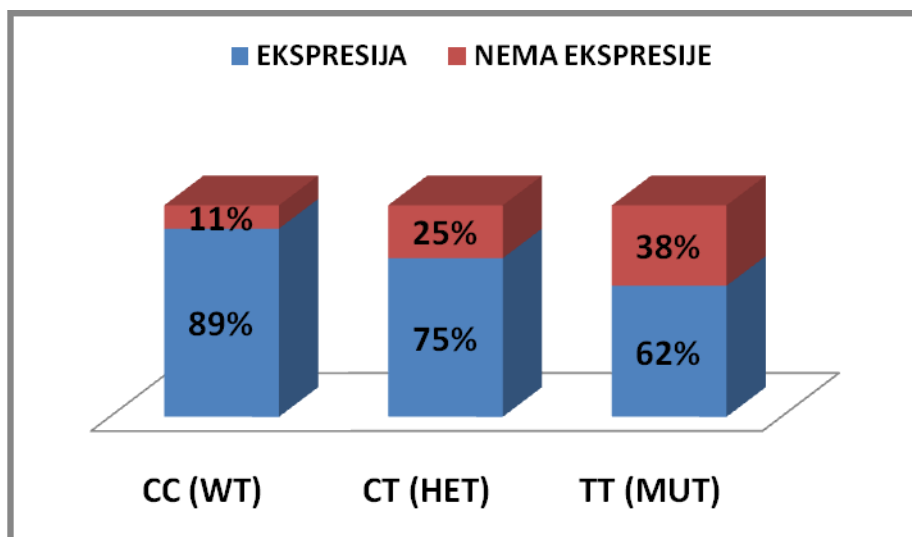


Slika 35. Ekspresija telomeraze kod OPCK sa i bez recidiva

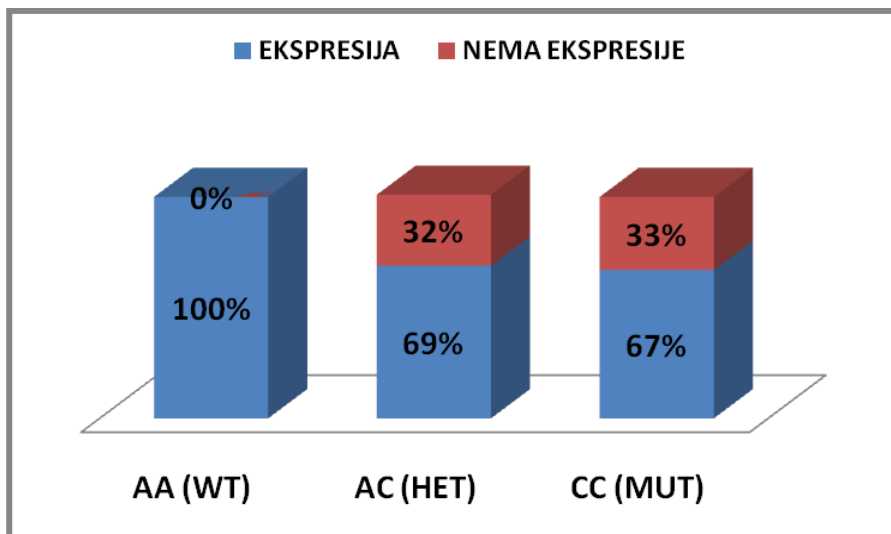


Slika 36. Ekspresija telomeraze kod OPCK sa i bez metastaza

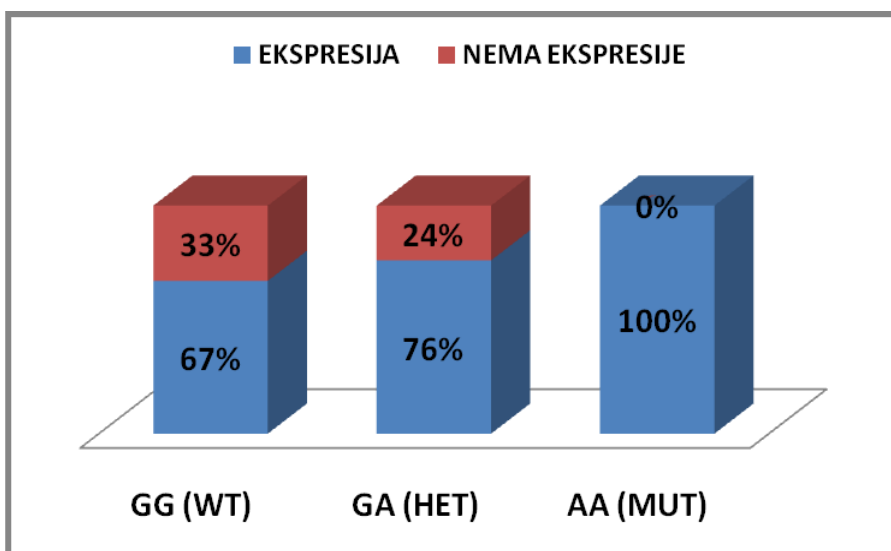
Statistička analiza nije pokazala značajnu razliku u ekspresiji telomeraze kod različitih genotipova ni za jedan od tri ispitivana polimorfizma ($p=0.35$ za CLPTM1L rs402710, $p=0.267$ za TERT rs2736100, $p=0.56$ za TERT rs2736098) (Slika 37, 38 i 39)



Slika 37. Ekspresija telomeraze kod različitih genotipova CLPTM1L rs274010 polimorfizma



Slika 38. Ekspresija telomeraze kod različitih genotipova TERT rs2736100 polimorfizma



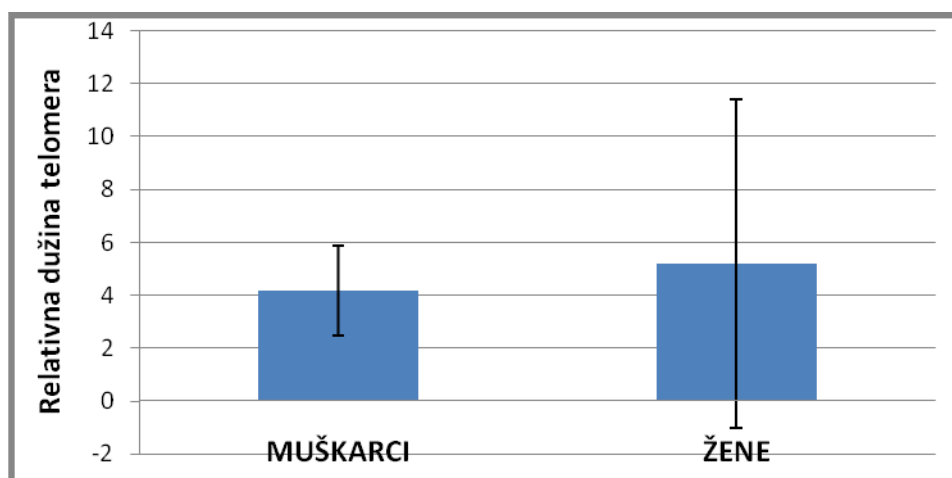
Slika 39. Ekspresija telomeraze kod različitih genotipova TERT rs2736098 polimorfizma

4.6. Relativna dužina telomera

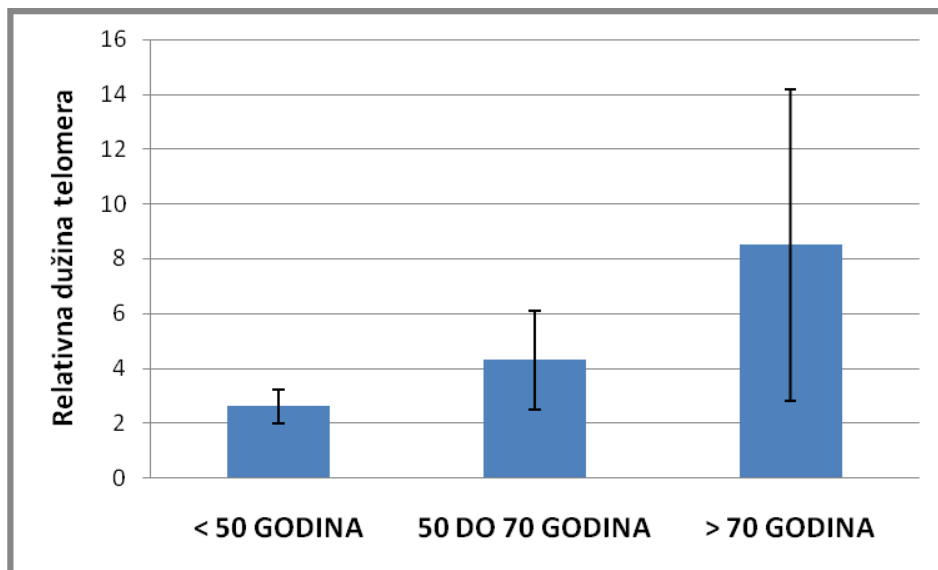
Iako je dužina telomera u tumorima bila veća kod žena nego kod muškaraca, razlika nije bila statistički značajna ($p=0.262$) (Tabela 8, Slika 40). Međutim, stariji pacijenti su imali značajno duže tumorske telomere od mlađih ($p<0.05$) (Tabela 8, Slika 41).

Tabela 8. RDT u odnosu na pol i starost pacijenata

	PACIJENTI N=60 (%)	RDT Aritmet.sredina±SD	RDT Medijana (opseg)	p#
Pol				
Muški	47(78.3)	4.19±3.4	3.39(0.82-17.71)	0.262
Ženski	13(21.7)	8.50±12.47	3.22(1.86-47.41)	
Starosne grupe (godine)				
< 50	7(11.7)	2.54±1.19	2.11(1.63-4.76)	0.034*
50-70	38(63.3)	4.28±3.62	3.31(0.82-17.71)	
> 70	15(25)	8.48±11.50	5.43(1.98-47.41)	



Slika 40. RDT kod OPCK u odnosu na pol

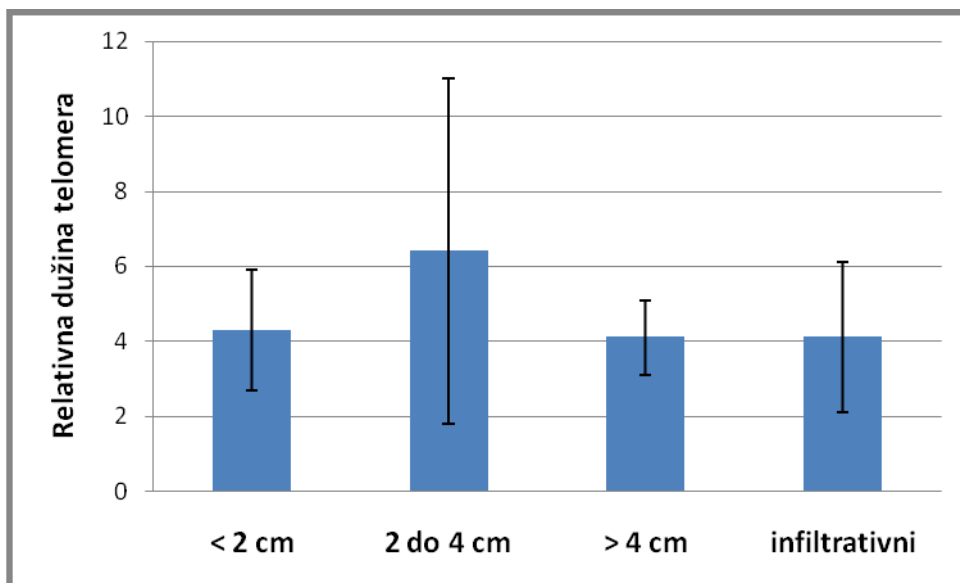


Slika 41. RDT kod OPCK u odnosu na starost pacijenata

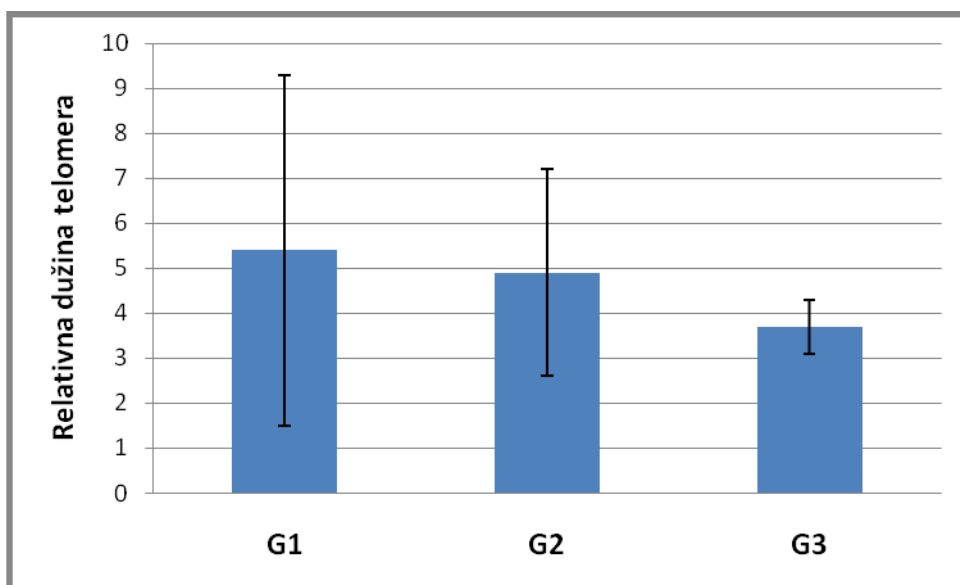
Nijedna od kliničko-patoloških karakteristika tumora nije pokazala značajnu razliku u dužini telomera (Tabela 9). Međutim, trend veće RDT bio je prisutan kod manjih tumora (Slika 42), nižih gradusa (Slika 43), ranijih stadijuma (Slika 44), tumora sa recidivima (Slika 45), i kod OPCK bez metastaza (Slika 46). Zanimljivo je povećanje dužine telomera od I do II stadijuma, a zatim smanjenje od II do IV stadijuma.

Tabela 9. RDT u odnosu na kliničko-patološke karakteristike tumora

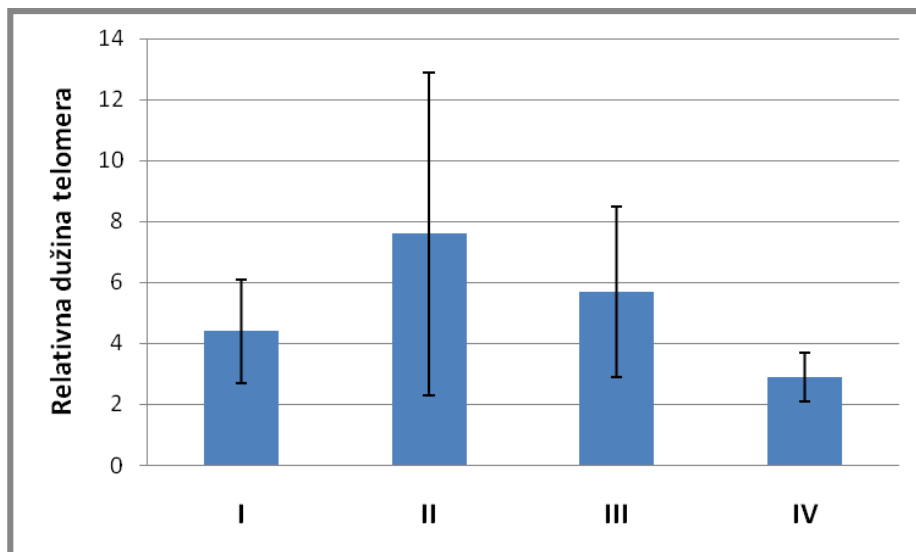
KLINIČKO-PAT. PARAMETRI	PACIJENTI N=60 (%)	RDT Aritmet. sredina±SD	RDT Medijana (opseg)	p#
Veličina tumora				
< 2 cm	17(28.3)	4.26±3.26	3.49(0.82-15.45)	0.632
2-4 cm	26(43.3)	6.37±9.19	3.45(1.34-47.41)	
>4 cm	2(3.3)	4.12±2.02	4.12(2.69-5.54)	
Infiltrativni	15(5)	4.08±4.02	2.29(1.08-16.84)	
Histološki gradus				
G 1	35(58.3)	5.36±7.87	3.39(1.53-47.41)	0.861
G 2	23(38.3)	4.89±4.62	3.22(0.82-17.71)	
G 3	2 (3.3)	3.68±1.31	3.68(2.76-4.61)	
Stadijum tumora				
I	17(28.3)	4.45±3.32	3.49(1.34-15.45)	0.166
II	19(31.7)	7.62±10.52	4.39(1.63-47.41)	
III	6 (10)	5.71±5.64	3.91(1.37-16.84)	
IV	18(30)	2.93±1.65	2.34(0.82-6.48)	
Recidiv				
Da	16(26.7)	6.94±11.10	3.77(0.82-47.41)	0.467
Ne	44(73.3)	4.47±3.94	3.10(1.08-17.71)	
Metastaze				
Da	22(36.7)	3.13±1.62	2.73(0.82-6.48)	0.067
Ne	38(37.3)	6.28±8.04	3.59(1.34-47.41)	



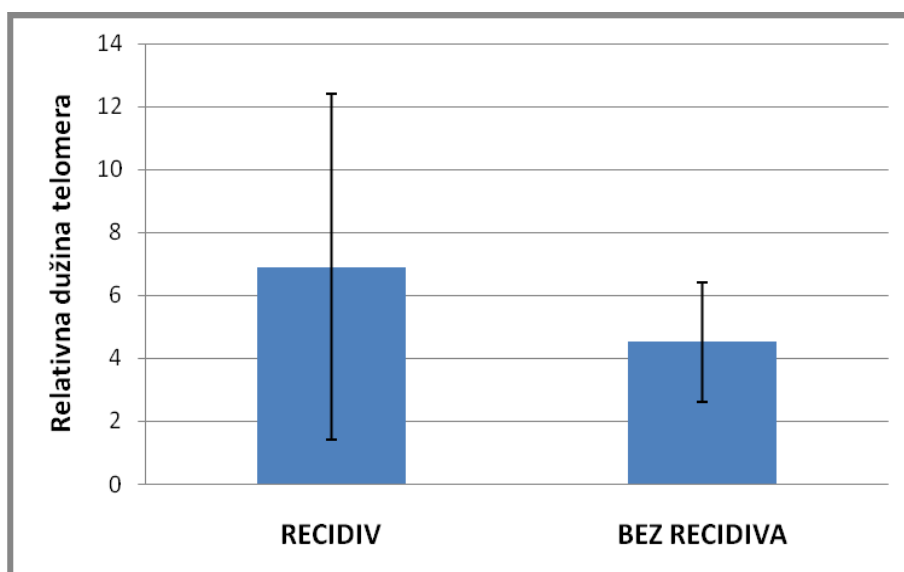
Slika 42. RDT u odnosu na veličinu OPCK



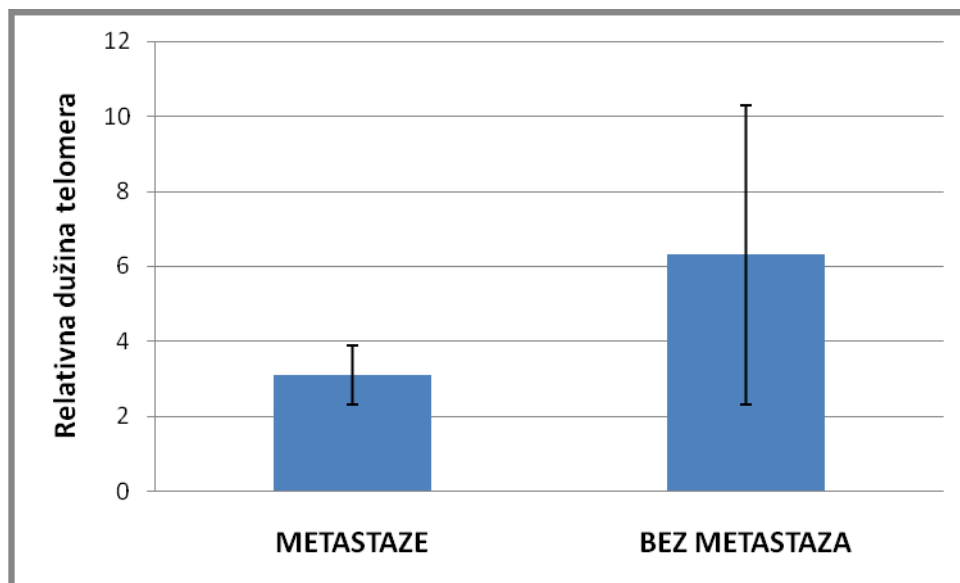
Slika 43. RDT u odnosu na histološki gradus OPCK



Slika 44. RDT u odnosu na stadijum OPCK



Slika 45. RDT u odnosu na prisustvo recidiva OPCK

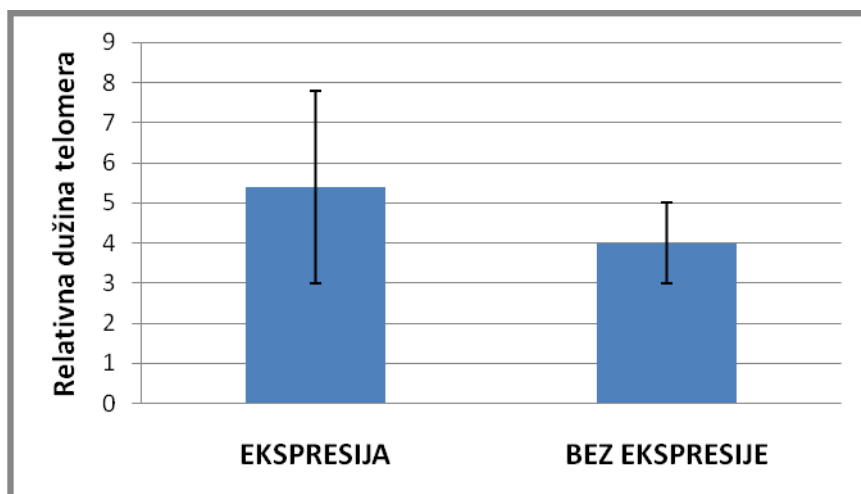


Slika 46. RDT u odnosu na prisustvo metastaza OPCK

Takođe, ekspresija telomeraze nije pokazala značajan uticaj na RDT ($p=0.730$), iako su nešto duže telomere bile prisutne kod tumora sa ekspresijom (Tabela 10, Slika 47).

Tabela 10. RDT kod OPCK u odnosu na ekspresiju telomeraze

EKSPRESIJA TELOMERAZE	PACIJENTI N=60 (%)	RDT Aritmet. sredina±SD	RDT Medijana (opseg)	p#
Da	25 (74)	5.37±4.91	3.67(1.34-17.71)	0.730
Ne	9 (26)	4.02±2.07	4.76(1.08-7.36)	

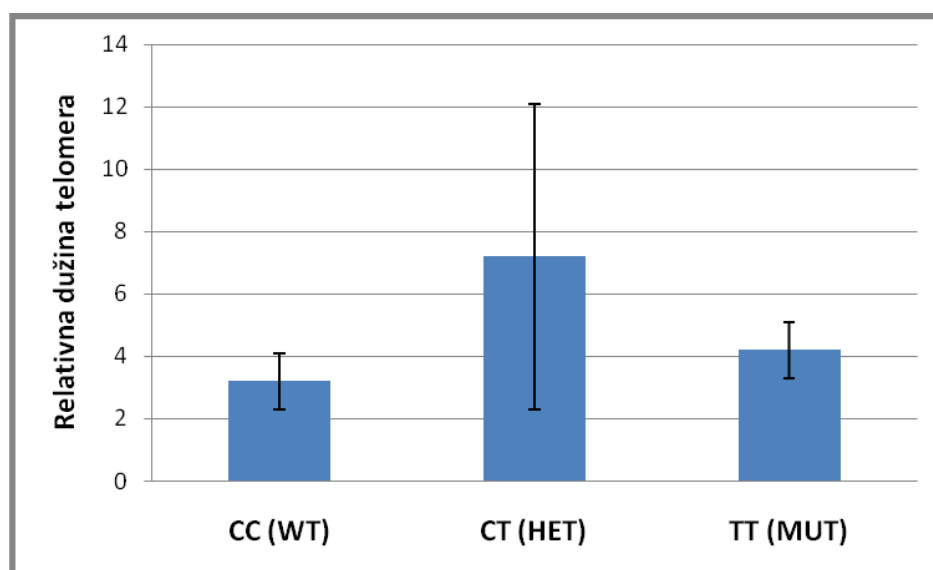


Slika 47. RDT u odnosu na ekspresiju telomeraze

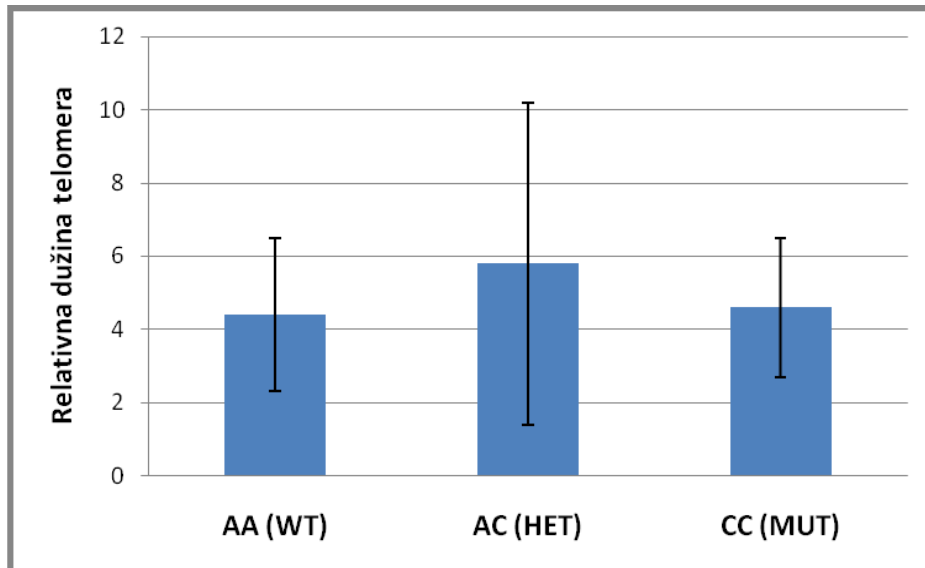
Nijedan od genotipova za tri analizirana polimorfizma nije pokazao statistički značajnu razliku u dužini telomera (Tabela 11, Slike 48, 49 i 50).

Tabela 11. RDT u odnosu na CLPTM1L-TERT genotipove

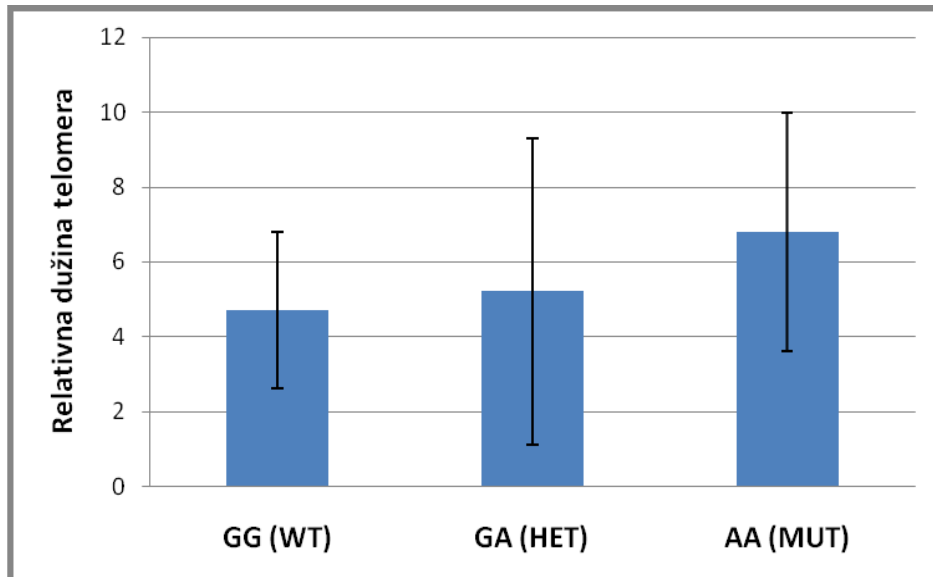
POLIMORFIZAM	PACIJENTI N=60 (%)	RDT Aritm. sredina±SD	RDT Medijana (opseg)	p#
CLPTM1L rs402710				
WT (CC)	16 (26.7)	3.20±1.97	2.62 (1.65-9.79)	0.363
HET (CT)	24 (40)	7.16±9.97	3.06 (0.82-47.41)	
MUT (TT)	20 (33.3)	4.22±1.90	4.49 (1.63-9.05)	
TERT rs2736100				
WT (AA)	13(21.67)	4.42±4.24	2.78 (1.68-17.71)	0.961
HET (AC)	28 (46.67)	5.83±8.79	3.60 (0.82-47.41)	
MUT (CC)	19 (31.66)	4.57±3.78	2.81 (1.08-15.45)	
TERT rs2736098				
WT (GG)	24 (40)	4.73±4.18	2.86 (1.37-17.71)	0.817
HET (GA)	31 (51.67)	5.15±8.18	3.39 (0.82-47.41)	
MUT (AA)	5 (8.33)	6.85±6.33	4.32 (1.34-16.84)	



Slika 48. RDT u odnosu na CLPTM1L rs402710 genotipove



Slika 49. RDT u odnosu na TERT rs2736100 genotipove

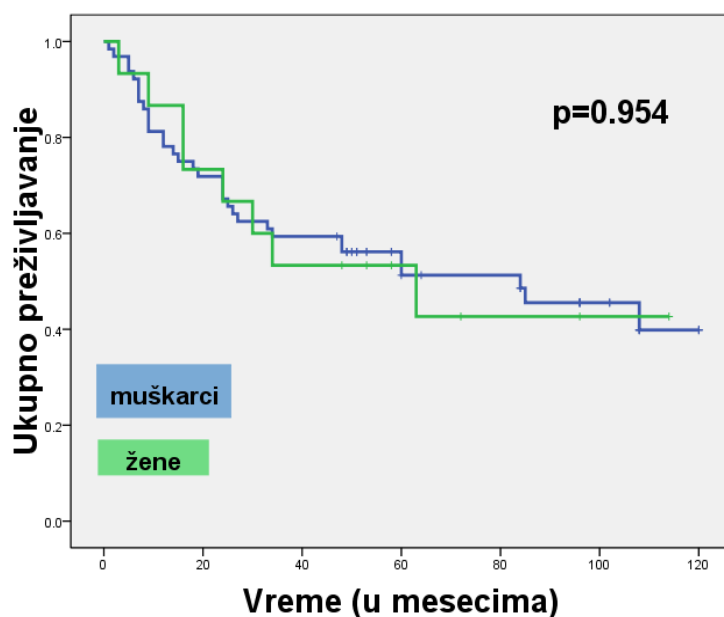


Slika 50. RDT u odnosu na TERT rs2736098 genotipove

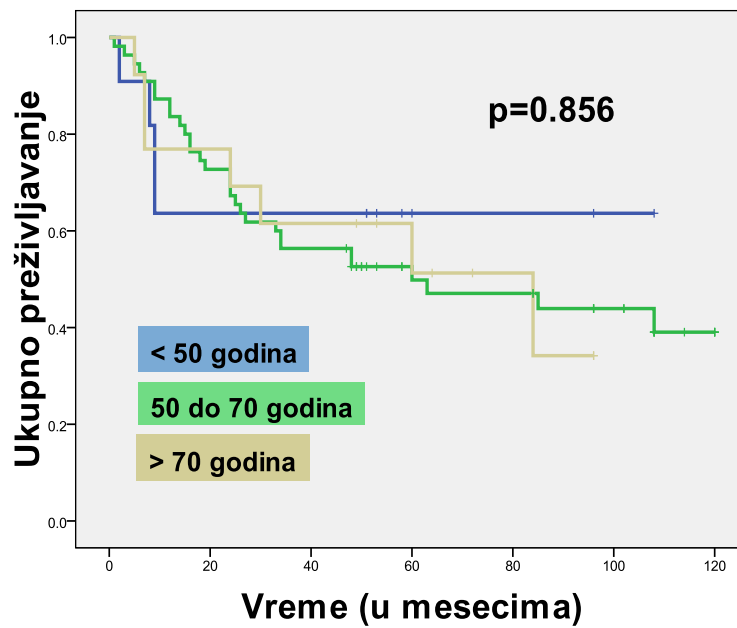
4.7. Analiza ukupnog preživljavanja

Pacijenti su praćeni u periodu od 120 meseci, a za analizu ukupnog preživljavanja korišćene su Kaplan-Majerove krive sa log-rank testom.

U odnosu na pol i starost nije bilo statistički značajne razlike u ukupnom preživljavanju pacijenata ($p=0.954$ i $p=0.856$) (Slika 51 i 52).

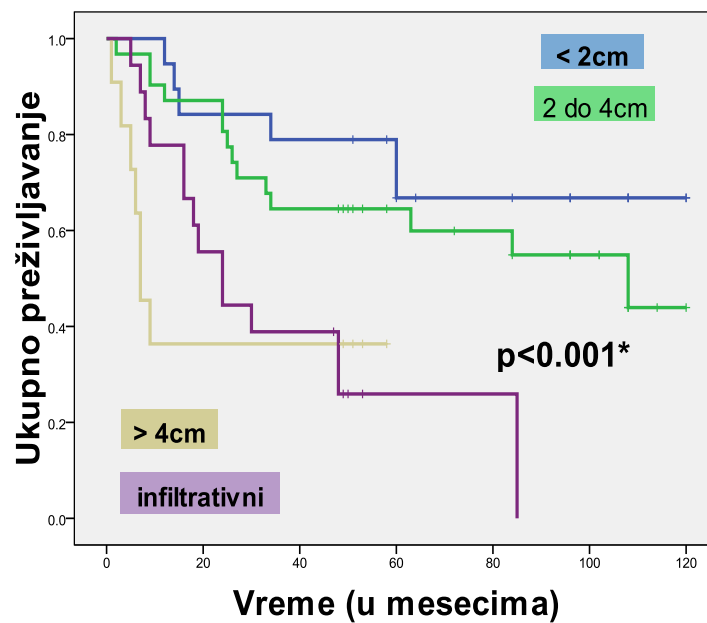


Slika 51. Ukupno preživljavanje u odnosu na pol

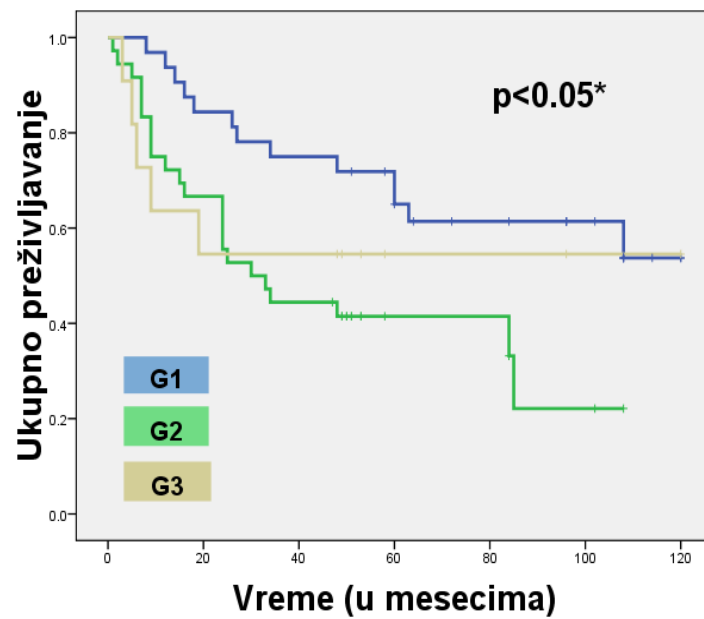


Slika 52. Ukupno preživljavanje u odnosu na starosne grupe

Značajno smanjenje preživljavanja bilo je prisutno kod pacijenata sa većim tumorima ($p < 0.001$) i višim histološkim gradusom ($p < 0.05$) (Slika 53 i 54).

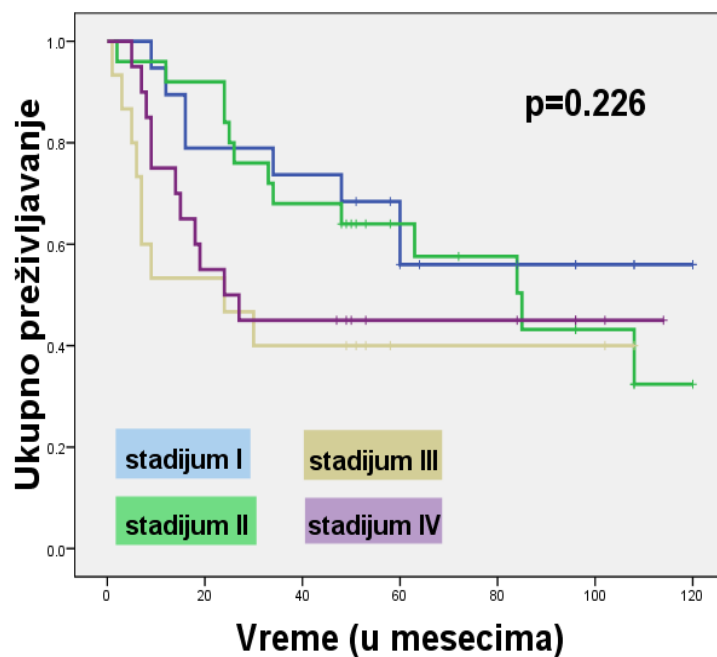


Slika 53. Ukupno preživljavanje u odnosu na veličinu tumora

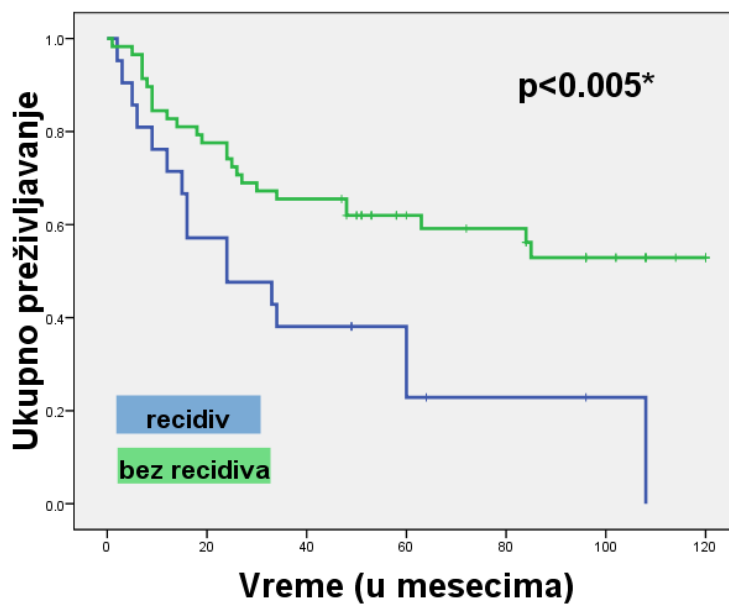


Slika 54. Ukupno preživljavanje u odnosu na histološki gradus

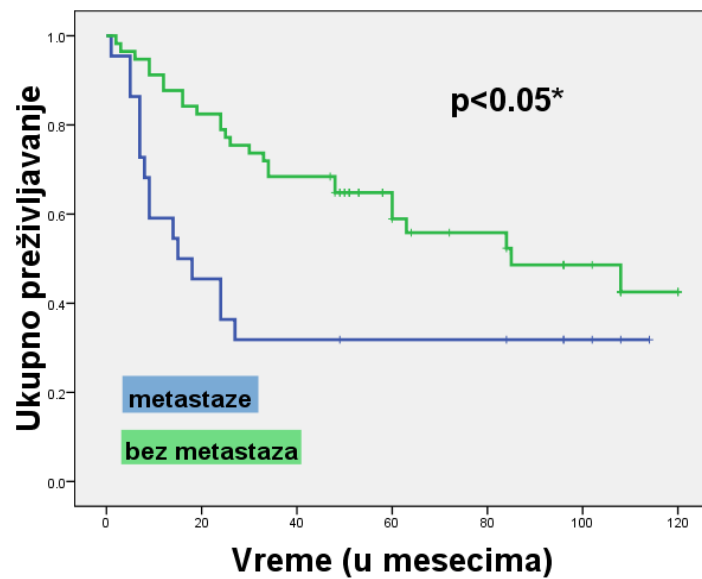
Iako viši stadijumi bolesti nisu pokazali razliku u preživljavanju u poređenju sa nižim ($p=0.226$), pacijenti sa recidivima i metastazama su živeli značajno kraće ($p < 0.05$ i $p < 0.005$) (Slika 55, 56 i 57).



Slika 55. Preživljavanje u odnosu na stadijum bolesti

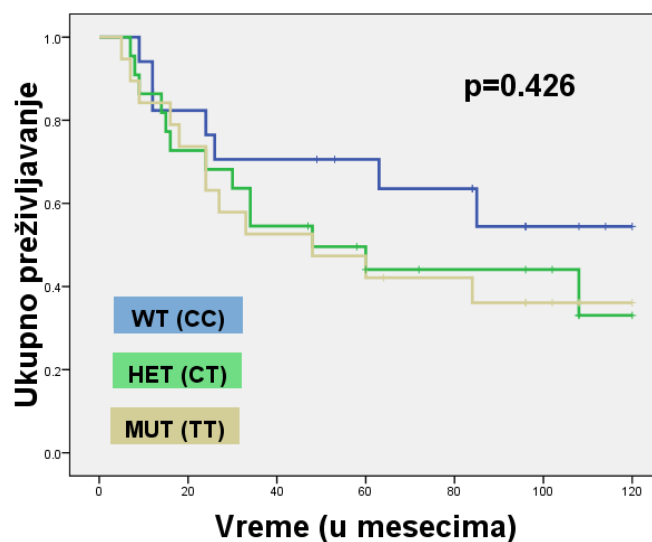


Slika 56. Preživljavanje u odnosu na prisustvo recidiva

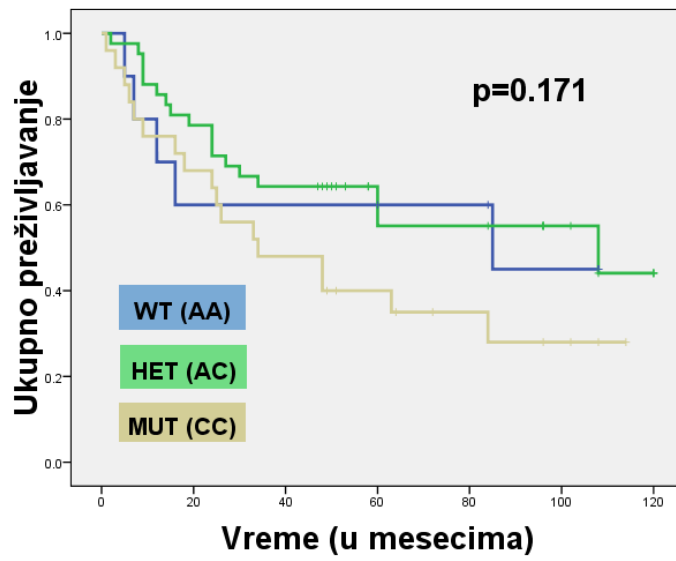


Slika 57. Preživljavanje u odnosu na prisustvo metastaza

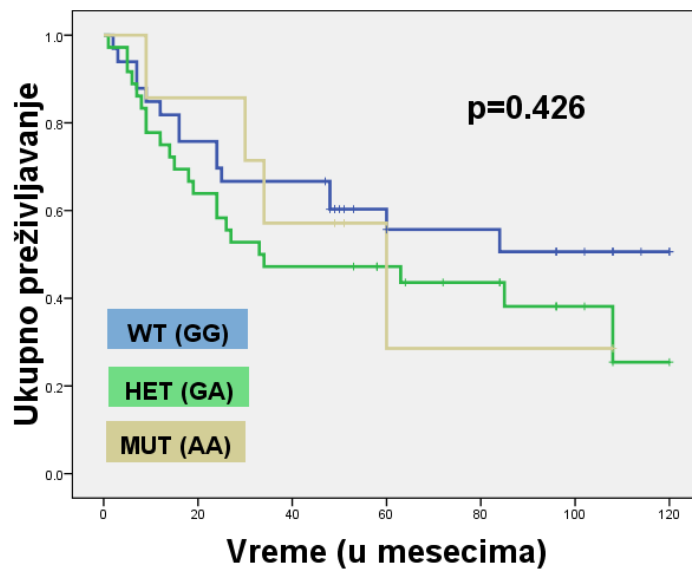
Iako nijedan od ispitivanih polimorfizama nije pokazao statistički značajan uticaj na ukupno preživljavanje pacijenata ($p=0.426$ za CLPTM1L rs402710, $p=0.171$ za TERT rs2736100, $p=0.426$ za TERT rs2736098), kraće preživljavanje kod mutantnog genotipa bilo je prisutno kod sva tri polimorfizma (Slika 58, 59 i 60).



Slika 58. Preživljavanje u odnosu na CLPTM1L rs402710 polimorfizam

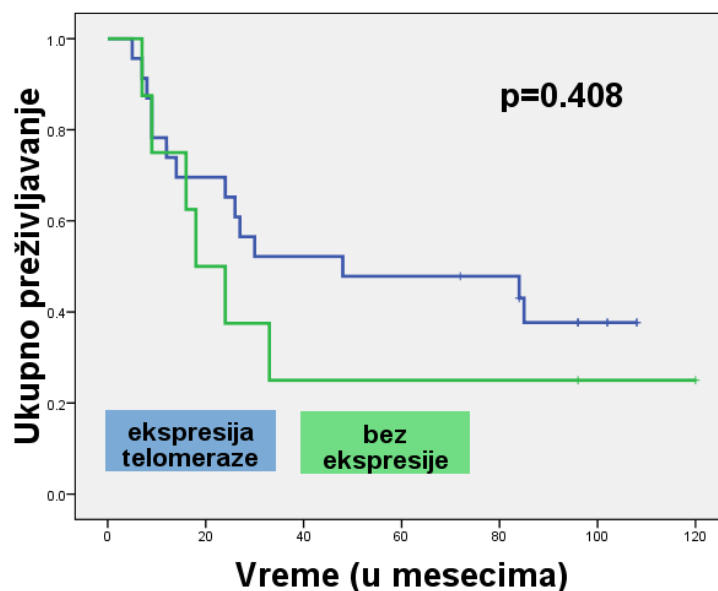


Slika 59. Preživljavanje u odnosu na TERT rs2736100 polimorfizam

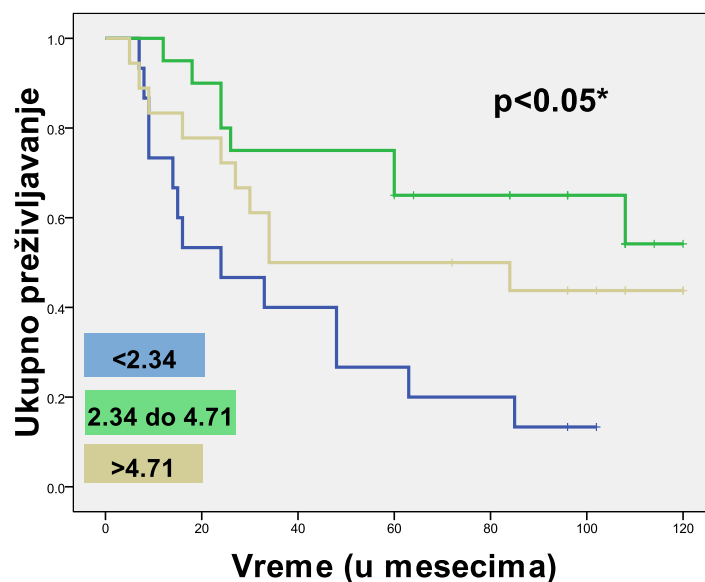


Slika 60. Preživljavanje u odnosu na TERT rs 2736098 polimorfizam

Iako se ekspresija telomeraze nije odrazila na ukupno preživljavanje pacijenata sa OPCK ($p=0.408$) (Slika 61), značajno kraće su živeli pacijenti sa kraćim telomerama ($p<0.05$) (Slika 62)



Slika 61. Preživljavanje u odnosu na ekspresiju telomeraze



Slika 62. Preživljavanje u odnosu na dužinu telomera

4.8. Logistička i linearna regresija

Univarijantna logistička regresija korišćena je za određivanje mogućih prediktora ekspresije telomeraze i od svih analiziranih varijabli (starost, pol, veličina tumora, histološki gradus, stadijum tumora, recidiv, metastaze, TERT-CLPTM1L genotipovi, relativna dužina telomera i ukupno preživljavanje), samo se veličina tumora izdvojila kao prediktor ekspresije ($p=0.049$, $OR=2.50$, $95\%CI=1.00-6.26$).

Univarijantna linearna regresija korišćena je za analizu pomenutih varijabli kao potencijalnih prediktora relativne dužine telomera. Nakon što su se starost pacijenata i prisustvo metastaza izdvojili u univarijantnom modelu, analizirani su u multivarijantnom regresionom modelu i definisani kao prediktori relativne dužine telomera ($R\ square=0.164$, $p=0.021$, $95\%CI=0.069-0.819$).

Rezultati ukratko:

- ❖ CLPTM1L rs402710 i TERT rs2736100 polimorfizmi asocirani su sa povišenim rizikom, a TERT rs2736098 sa sniženim rizikom od OPCK
- ❖ LD među polimorfizmima bio je nisko izražen, i nijedan haplotipski blok nije identifikovan
- ❖ Ekspresija telomeraze bila je statistički značajno veća kod tumora bez recidiva
- ❖ Trend dužih telomera bio je prisutan kod manjih tumora, nižih gradusa i stadijuma, tumora bez metastaza i sa recidivima, kao i kod tumora sa ekspresijom telomeraze
- ❖ Kraće preživljavanje uočeno je kod većih tumora i viših histoloških gradusa, prisustva metastaza i recidiva, kao i kod tumora sa kraćim telomerama
- ❖ Veličina tumora izdvojila se kao prediktor ekspresije, a starost pacijenata i metastaze kao prediktori RDT

5. Diskusija

Visok nivo učestalosti i niska stopa preživljavanja pacijenata sa OPCK, ukazuju na potrebu za pronalaženjem pouzdanih prediktivnih i prognostičkih markera oralne kancerogeneze. Pored već poznatih egzogenih faktora rizika kao što su pušenje i konzumacija alkohola, važnu ulogu u nastanku OPCK predstavljaju endogeni mehanizmi, tako da se posebna pažnja poslednjih decenija pridaje otkrivanju markera na molekularno-genetičkom nivou.

U okviru ove studije ispitivani su polimorfizmi TERT-CLPTM1L genskog regiona kao potencijalni modulatori rizika za nastanak OPCK, kao i ekspresija telomeraze i dužina telomera u funkciji mogućih dijagnostičkih i prognostičkih markera OPCK.

5.1. TERT-CLPTM1L polimorfizmi

Polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (SNP) kao normalne genetičke varijacije među individuama, predmet su mnogih studija koje ih dovode u vezu sa različitim oboljenjima, uključujući i kancer. Polimorfizmi TERT-CLPTM1L genskog regiona pokazali su asocijaciju sa bar 10 različitih tipova kancera u okviru studija asocijacije celog genoma (Kote-Jarai i sar.) (Wang i sar. 2014).

U ovoj studiji ispitivana su tri polimorfizma u okviru 5p.15.33 genskog lokusa: rs2736100, rs2736098 i rs402710.

TERT rs2736100 (A>C) SNP lokalizovan je u intronu broj 2 i najviše je proučavan polimorfizam TERT gena. Mutirani alel je najčešće pokazivao asocijaciju sa tumorima pluća (Hu i sar. 2011; Lan i sar. 2013; Nie i sar. 2014; Wu i Zhu 2014; Yin i sar. 2014b), a takođe i sa gliomima (Di Stefano i sar. 2013; Labussière i sar. 2014; Zhou i sar. 2014), kancerom bešike (Ma i sar. 2013), kancerom grlića materice (Wang i sar. 2012), kolorektalnim tumorima (Kinnersley i sar. 2012), kancerom testisa (Turnbull i sar. 2010) i ezofagealnim karcinomom (Zhou i sar. 2015). Međutim, asocijacija sa hepatocelularnim kancerom (Ding i sar. 2011) i tumorima dojke (Zheng i sar. 2012) nije bila prisutna. Meta analiza iz 2012. godine dovela je u vezu mutirani alel sa značajno

sniženim rizikom od karcinoma testisa (Mocellin i sar. 2012), suprotno od prethodno navedenih rezultata kod istog tipa maligniteta, od strane autora Turnbull i sar., dok se snižen rizik za razvoj karcinoma urinarnog trakta, samo kod heterozigota, navodi u studiji Yuan i sar. (Yuan i sar. 2016). Prema podacima dostupnim iz literature, naša studija je prva koja se bavila ispitivanjem ovog polimorfizma kod OPCK, i pokazala je značajnu asocijaciju CC (OR=2.89, 95%CI 1.26-6.64) genotipova kao i AC+CC (OR=2.36, 95%CI 1.16-4.81) sa rizikom od OPCK. Tačan mehanizam uticaja ovog polimorfizma na ekspresiju telomerase i dužinu telomera nije poznat, ali studija Choi i sar. pokazala je značajnu asocijaciju mutiranog alela rs2736100 SNP-a i visokog nivoa ekspresije TERT gena i dužih telomera kod gastričkog kancera (Choi i sar. 2015). Još jedno istraživanje pokazalo je genotip-zavisni uticaj ovog polimorfizma na ekspresiju TERT-a, pri čemu je mutirani alel takođe asociiran sa povišenom ekspresijom ovog gena (Zhou i sar. 2015).

TERT rs2736098 (G>A) SNP lokalizovan u egzonu broj 2 TERT gena, takođe je doveden u vezu sa povišenim rizikom od brojnih tipova kancera uključujući kancer pluća (Li i sar. 2013), gliome (Chen i sar. 2011), tumore bešike (Gago-Dominguez i sar. 2011), hepatocelularni (Zhang i sar. 2013) i nazofaringealni kancer (Zhang i sar. 2016). Druge studije, međutim, nisu pokazale vezu ovog polimorfizma sa rizikom od kolorektalnog (Hofer i sar. 2012), ezofaringealnog kancera (Yin i sar. 2014a) kao i planocelularnog karcinoma glave i vrata (Liu i sar. 2011). Dve meta analize iz 2012 god. ne dovode nosioce mutiranog genotipa u vezu sa rizikom od kancera kod Evropljana, ali je u azijskoj populaciji ova asocijacija pokazana (Qi i sar. 2012; Zhang i sar. 2012).

Naša studija pokazala je asocijaciju između prisustva mutantnog A alela i značajno sniženog rizika od OPCK (OR=0.53, 95%CI 0.30-0.94), što bi značilo da rs2736098 polimorfizam ima protektivnu ulogu u našoj populaciji, ali s obzirom na to da genotipovi u kontrolnoj grupi nisu bili u Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži ($p < 0.001$), ove rezultate treba posmatrati sa oprezom i ponoviti analizu na većem broju uzoraka. Međutim, slični rezultati dobijeni su i u okviru drugih studija. Dva istraživanja koja su se bavila kancerom dojke (Savage i sar. 2007; Ledwon i sar. 2013) takođe su asociirala mutantni alel rs2736098 polimorfizma sa sniženim rizikom, dok je još jedna studija

sprovedena na planocelularnim karcinomima glave i vrata, pokazala smanjenje rizika kod nosilaca ovog polimorfizma, na granici statističke značajnosti (Liu i sar. 2010).

Kada je pitanju CLPTM1L gen, rs402710 (C>T) SNP, lokalizovan u intronu 4, prema dostupnim podacima iz literature, prvi put je ispitivan u ovoj studiji sa ciljem da se utvrdi njegova eventualna asocijacija sa rizikom od OPCK. Naši rezultati su pokazali statistički značajan rizik za nosioce mutiranog TT genotipa. Ranija istraživanja dovela su u vezu ovaj polimorfizam sa povišenim rizikom od kancera dojke (Zheng i sar. 2012), cerviksa (Wang i sar. 2012), nazofaringealnog kancera (Zhang i sar. 2016), kao i rizikom od kancera uopšte (Li i sar. 2013). Ipak, ovaj polimorfizam najviše je ispitivan u vezi sa karcinomima pluća, pri čemu su neke studije pokazale povišen rizik (Wu i Zhu 2014; Zhao i sar. 2014), a druge snižen (Liang i sar. 2014; Xun i sar. 2014). Iako uloga ovog polimorfizma u modulaciji rizika za nastanak kancera nije poznata, s obzirom na ulogu CLPTM1L proteina u apoptozi, moguće je da T alel dovodi do manje efikasnog apoptotskog odgovora i samim tim do veće verovatnoće za razvoj tumora.

Ovi, u izvesnoj meri suprotstavljeni rezultati istraživanja, u vezi sa uticajem polimorfizama na rizik od formiranja kancera, mogli bi se objasniti faktorima kao što su: veličina uzoraka, etnička pripadnost učesnika u studiji, tipovi ispitivanih tumora koji variraju od studije do studije, uticaj sredine, stil života, kao i brojni genetički i epigenetički mehanizmi. Na taj način moguće je da isti polimorfizam bude doveden u vezu sa kako povišenim tako i sniženim rizikom kod istog tipa tumora u okviru različitih istraživanja. Na primer, isti genotip rs2736098 polimorfizma – AA, pokazao je asocijaciju sa kancerom kod azijske populacije ali ne i kod Evropljana, gde je čak moguća njegova protektivna uloga u kancerogenezi. Takođe, moguće je da isti genotip u okviru 5p.15.33 lokusa, može imati oprečne uloge u modulaciji rizika za razvoj kancera u različitim tkivima. Tako na primer, rs2736100 polimorfizam, u mnogim studijama je pokazao asocijaciju sa povišenim rizikom od kancera pluća, ali ne i sa hepatocelularnim i kancerom dojke, dok je rizik od karcinoma urinarnog trakta i testisa bio snižen. Neki autori osim ranije navedenih činilaca, kao objašnjenje navode i postojanje tkivno specifičnih faktora koji takođe moduliraju podložnost određenog tkiva tumorima (Wang i sar. 2014).

Takođe, moguće je da iako ispitivani polimorfizam pokazuje asocijaciju sa rizikom od nastanka nekog kancera, on u stvari nije kauzalni (funkcionalni) SNP, već se nalazi u regionu visokog LD-a sa drugim funkcionalnim SNP-om, koji je u stvari odgovoran za modulaciju rizika od datog tumora. Prethodne studije pokazale su da se CLPTM1L rs402710 nalazi u regionu visokog LD-a koji uključuje druge CLPTM1L polimorfizme, pre svega CLPTM1L rs401681, kao i ceo promotorni region TERT gena (Li i sar. 2013). Studija sprovedena na poljskoj populaciji pokazala je visok LD između CLPTM1L rs402710 i TERT rs2736098 ($D'=0.89$), ali ne CLPTM1L rs402710 i TERT rs2736100 SNP-a ($D'=0.181$) (Jaworowska i sar. 2011). Takođe, nivo povezanosti TERT rs2736100 i rs2736098 SNP-ova, u studiji sprovedenoj na kineskoj populaciji, bio je relativno nizak ($D'=0.53$) (Wang i sar. 2012), što je u skladu sa našim rezultatima koji takođe pokazuju slab nivo vezanosti ovih polimorfizama. Mada nijedan haplotip nije identifikovan u okviru ove studije, haplotipovi koji uključuju polimorfizme TERT-CLPTM1L genskog regiona, dovedeni su u vezu sa povišenim rizikom od kancera pluća (Liu i sar. 2015), leukemije (Sheng i sar. 2013), kolorektalnog kancera (Hofer i sar. 2012) i glioma (Zhao i sar. 2012).

Iako tačan mehanizam uticaja polimorfizama na rizik od kancera nije poznat, Kiledar i sar. prvi su dali detaljnije objašnjenje u vezi sa SNP-ovima 5p.15.33 lokusa i povećanim rizikom od formiranja tumora. Proučavanjem rs10069690 polimorfizma TERT gena, istraživači su došli do zaključka da mutirani alel ovog polimorfizma dovodi do formiranja alternativne splajsing varijante iRNK TERT gena, koja kodira katalitički inaktivan INS1b protein. Ovaj protein ne predstavlja funkcionalnu TERT subjedinicu, ali poseduje sposobnost vezivanja za RNK subjedinicu telomeraze delujući kao njen inhibitor. Smanjenje aktivnosti telomeraze zatim dovodi do smanjenja dužine telomera, a vremenom i do povećanja genomske nestabilnosti i nastanka kancera (Killedar i sar. 2015).

Kada je u pitanju asocijacija TERT-CLPTM1L polimorfizama sa dužinom telomera, važno je napomenuti da je u okviru istraživanja koja su se bavila ovom problematikom, dužina telomera uglavnom određivana ne u samom tumorskom tkivu kao u našoj studiji, već u ćelijama periferne krvi kako kontrolnih subjekata tako i obolelih (Mirabello i sar. 2010; Nan i sar. 2011; Terry i sar. 2012; Lan i sar. 2013), što

donekle otežava poređenje rezultata, s obzirom na to da promene RDT u krvi ne moraju biti u skladu sa promenama u tumorskom tkivu. Takođe, u svojoj meta analizi Mocellin i sar. napominju da su uprkos obilju studija koje dovode u vezu TERT-CLPTM1L polimorfizme i rizik od različitih tipova kancera, podaci u vezi sa asocijacijom ovih SNP-ova i dužinom telomera vrlo oskudni (Mocellin i sar. 2012). Naši rezultati nisu pokazali značajnu vezu između analiziranih SNP-ova i relativne dužine telomera, što je u skladu sa podacima Liu i sar. koji nisu doveli u vezu TERT-CLPTM1L polimorfizme (uključujući rs2736098) i RDT pacijenata sa planocelularnih karcinoma glave i vrata (Liu i sar. 2011). Takođe, Mirabello i sar. nisu pokazali asocijaciju SNP-ova ovog genskog regiona (među njima rs2736100 i rs402710) i dužine telomera kod kancera prostate i dojke (Mirabello i sar. 2010). Naravno, kod tumačenja rezultata različitih studija moraju se uzeti u obzir i faktori kao što su tip tumora, etnička pripadnost ispitanika, starost i loše navike, koji mogu dovesti do značajnih varijacija uticaja jednog polimorfizma na dužinu telomera. Tako, na primer, rs2736100 nije doveden u vezu sa dužinom telomera kod osteosarkoma u evropskoj populaciji (Mirabello i sar. 2011), ali jeste kod kineske dece sa leukemijom, pri čemu je mutantni genotip bio asociiran sa dužim telomerama (Sheng i sar. 2013). Takođe, kada su TERT rs2736098 polimorfizam i relativna dužina telomera ispitivani kod zdravih kontrola različitih starosnih grupa i navika, pokazana je asocijacija mutiranog alela sa kraćim telomerama kod starijih žena nepušača, dok je kod mlađih žena nepušača, isti alel bio povezan sa dužim telomerama (Rafnar i sar. 2009).

Uzimajući u obzir sve ranije navedene faktore, nije neočekivano što nijedan od ispitivanih polimorfizama u okviru ovog istraživanja nije pokazao asocijaciju sa kliničko-patološkim karakteristikama tumora, dužinom telomera i ekspresijom telomeraze. Sa druge strane, uočen je trend smanjenog preživljavanja pacijenata nosilaca mutiranog alela, kod rs2736100 i rs402710 polimorfizama, što je u skladu sa njihovom asocijacijom sa značajno povišenim rizikom od OPCK. Međutim, isti trend uočen kod rs2736098 polimorfizma, ne može se povezati sa njegovom potencijalnom protektivnom ulogom.

Premda su dosadašnja istraživanja svakako pokazala da TERT-CLPTM1L genski region ima značajnu ulogu u modulaciji rizika za brojne tipove kancera, pri

tumačenju i donošenju zaključaka na osnovu rezultata različitih studija, mora se imati u vidu da polimorfizmi predstavljaju samo jedan od brojnih činilaca koji se dovode u vezu sa formiranjem kancera, kao i da nije poznato u kojoj meri prisustvo jednog izmenjenog alela kod individue može zaista uticati na razvoj, tok bolesti i prognozu.

5.2. Ekspresija telomeraze

Prema literaturnim podacima, oko 80 do 90% oralnih planocelularnih karcinoma pokazuje ekspresiju telomeraze, što potvrđuje njenu značajnu ulogu u održavanju dužine telomera kod ovog tipa neoplazmi (Sumida i Hamakawa 2001). Oko 74% uzoraka ispitivanih u okviru ove studije bili su imunohistohemijski pozitivni na telomerazu, što je u skladu sa rezultatima drugih studija, u kojima je pokazan visok nivo ekspresije telomeraze u oralnim karcinomima (Freier i sar. 2007; Pannone i sar. 2007; Abrahao i sar. 2011). Međutim, treba napomenuti da je veći broj naših uzoraka pokazao citoplazmatsku (76%) nego nuklearnu ekspresiju (24%). Ovaj podatak je zanimljiv s obzirom na to da je telomeraza pre svega jedarni enzim (Chen i sar. 1999), sa prevashodnom funkcijom održavanja dužine telomera. Prema nekim autorima, citoplazmatsko bojenje telomeraze ne odražava telomeraznu ulogu stabilisanja telomera proliferativno aktivnih ćelija (Freier i sar. 2007). Međutim, druge studije su pozitivnu ekspresiju definisale uzimajući u obzir ne samo nuklearno već i citoplazmatsko prisustvo telomeraze (Chen i sar. 2007; Abrahao i sar. 2011). Takođe, autori koji su kreirali hTERT antitelo korišćeno u ovoj studiji (2C4), navode da ono prepoznaje isključivo enzimski aktivnu telomerazu, primarno lokalizovanu u nukleusima ćelija kancera (Masutomi i sar. 2003; Fabricius i sar. 2009), dok se u studiji Fabriciusa i sar. upotrebom istog antitela, registruje citoplazmatsko bojenje telomeraze (Fabricius i sar. 2009). Poznato je da se TERT subjedinica telomeraze sintetiše u citoplazmi, u jedru povezuje sa TR subjedinicom u katalitički aktivan enzim, a zatim biva regrutovana od strane jedarnih Kajalnih telašaca (*engl. Cajal bodies, CBs*) gde ostaje tokom najvećeg dela ćelijskog ciklusa, da bi tek u S fazi bila transportovana do telomera (Schmidt i Cech 2015). Stoga je moguće da visok nivo citoplazmatske ekspresije u ćelijama kancera znači da je telomeraza u procesu transporta ka jedru, gde će zatim obavljati

svoju funkciju u održavanju dužine telomera. Takođe, citoplazmatska lokalizacija telomeraze može se objasniti njenom ulogom u stimulisanju nekontrolisane deobe, putem interakcije sa brojnim signalnim molekulima van jedra, koji kontrolišu diferencijaciju, apoptozu, oksidativni stres, metabolizam i angiogenezu (Saretzki 2014).

U okviru ove studije, asocijacija nivoa ekspresije telomeraze sa svim kliničko-patološkim karakteristikama kancera (osim prisustva recidiva) nije bila statistički značajna, ali je visok nivo ekspresije kod manjih tumora i u ranim kliničkim stadijumima, ukazivao na aktivaciju enzima u početnim fazama razvoja tumora. U prilog ovom zapažanju, ide i činjenica da se veličina tumora sa statističkom značajnošću izdvojila kao prediktor ekspresije telomeraze. S obzirom na to da je jedino kod tumora bez recidiva, ekspresija telomeraze bila statistički značajno veća u odnosu na tumore sa recidivom, nameće se zaključak da rana aktivacija enzima može imati inhibitornu ulogu u razvoju tumora. Takođe, duže preživljavanje pacijenata sa ekspresijom telomeraze u odnosu na pacijente bez ekspresije, iako ne statistički značajno, moglo bi predstavljati posledicu ove moguće inhibitorne uloge enzima u kancerogenezi. Kao potvrda našim zapažanjima o ulozi telomeraze u tumorogenezi, O'Sullivan i sar. i Saretzki i sar., iznose hipotezu o različitoj ulozi telomeraze u zavisnosti od vremena njene aktivacije (O'Sullivan i Karlseder 2010; Saretzki 2014). Naime, po ovoj hipotezi, rano aktivirana telomeraza pre kritičnog smanjenja telomera, doprinosi genomskoj stabilnosti, putem aktiviranja kontrolnih mehanizama koji onemogućavaju ispoljavanje onkogenih mutacija i formiranje kompleksnih hromozomskih aberacija. Suprotno tome, ukoliko se ćelijama sa brojnim strukturnim aberacijama, pridruže i mutacije p53 i Rb gena, kasno aktivirana telomeraza doprinosi održavanju genomske nestabilnosti i razvoju tumorskog potencijala. Naravno, za potvrdu ove hipoteze neophodno bi bilo ponoviti analize na većem broju uzoraka.

Slično našim rezultatima, Chen i sar. takođe su zaključili da se aktivacija telomeraze odvija u ranim fazama razvoja OPCK, kao i da nivo njene ekspresije može biti koristan marker za razvoj i prognozu kancera (Chen i sar. 2007). Nalaz visoke ekspresije telomeraze kod hiperplastičnog i aplastičnog epitela u studiji Abrahao i sar., može predstavljati dodatni pokazatelj uključenosti ovog enzima u ranim fazama razvoja oralnog kancera (Abrahao i sar. 2011). Slično prethodnim podacima, aktivacija

telomeraze u ranim fazama kancera, dovedena je u vezu sa povećanim proliferativnim kapacitetom oralnih kancera (Sumida i Hamakawa 2001), dok je u kasnijim fazama razvoja glioblastoma sa povećanjem veličine tumora, dolazilo do smanjenja nivoa ekspresije (Falchetti i sar. 2000). Suprotno prethodnim navodima, Panone i sar., u svojoj studiji nisu pokazali asocijaciju ekspresije telomeraze i kliničko-patoloških odlika oralnih kancera (Pannone i sar. 2007), a takođe, i u studiji Freier i sar., nivo ekspresije telomeraze nije doveden u vezu sa stadijumima tumora (Freier i sar. 2007). Posmatrajući druge histološke entitete, Shigeishi i sar., pokazali su izraženu ekspresiju telomeraze kod različitih tipova salivarnih tumora, pri čemu je ekspresija bila statistički značajno veća, samo kod viših gradusa mukoepidermoidnih karcinoma (Shigeishi i sar. 2011). U prilog zapažanju o porastu ekspresije telomeraze sa progresijom tumora, idu i podaci studije o planocelularnim karcinomima glave i vrata, gde se značajno viši nivo ekspresije uočava kod viših histoloških gradusa, uznapredovalih kliničkih stadijuma i tumora sa metastazama (Boscolo-Rizzo i sar. 2015).

Rezultati dosadašnjih studija, iako ne međusobno saglasni, svakako potvrđuju mogućnost aktivacije telomeraze u različitim fazama razvoja kancera, što bi za posledicu moglo imati ne samo stimulaciju već i inhibiciju kancerogeneze.

5.3. Dužina telomera

Dužina telomera kod pacijenata sa malignim oboljenjima bila je predmet proučavanja velikog broja studija, kako u samim kancerskim ćelijama, tako i u okolnom neizmenjenom tkivu i ćelijama periferne krvi, pri čemu je većina studija pokazala prisustvo kraćih telomera u tumorima nego u okolnom zdravom tkivu (Meeker i sar. 2004; Sainger i sar. 2007; Aida i sar. 2010). Međutim, s obzirom na to da je za genomsku nestabilnost tumora presudna dužina telomera u samim ćelijama kancera, a ne odnos dužine u tumorskim i zdravim tkivima, u ovoj studiji ispitivana je samo relativna dužina telomera (Manneras-Holm i sar.) u uzorcima malignih tumora.

Analiza naših podataka pokazala je statistički značajnu razliku u dužini telomera kod različitih starosnih grupa pacijenata, pri čemu je RDT bila veća u tumorima starijih

pacijenata nego kod mlađih, tako da se starost pacijenata izdvojila kao prediktor dužine telomera. Mada je ovo u suprotnosti sa principom skraćivanja telomera tokom života, treba imati na umu da se ova dužina telomera odnosi na tumorska tkiva, i da ne mora biti u skladu sa promenama telomera u normalnim tkivima.

Iako nijedna od kliničko-patoloških karakteristika tumora nije pokazala značajnu razliku u dužini telomera, trend veće RDT bio je prisutan kod manjih tumora, nižih gradusa, ranijih stadijuma i odsustva metastaza, što je u skladu sa ranom aktivacijom telomeraze i njenom mogućom inhibitornom ulogom u razvoju i širenju tumora. U prilog ovoj tvrdnji ide i podatak da statistički značajno duže preživljavanje imaju pacijenti sa dužim telomerama, u odnosu na pacijente sa kraćim telomerama. Dodata potvrda o važnosti regulatornih mehanizama u održavanju dužine telomera u zavisnosti od razvojnog stadijuma, predstavlja rezultat ove studije, gde su metastaze (odsustvo/prisustvo) označene kao prediktori dužine telomera sa statističkom značajnošću. Takođe, naši rezultati mogu ukazati na važnost uključivanja telomeraze u održavanju dužine telomera, jer se kod tumora sa ekspresijom telomeraze uočava trend dužih telomera u odnosu na tumore bez ekspresije telomeraze, a koji pokazuju nešto manju dužinu telomera.

U globalu, rezultati naše studije su u suprotnosti sa opštim modelom uloge telomera u kancerogenezi, a koji podrazumeva inicijalno skraćenje telomera i aktivaciju telomeraze u kasnijim razvojnim fazama tumora (Aida i sar. 2010; Mu i sar. 2012). Međutim, određen broj istraživanja navodi rezultate slične dobijenim u ovoj studiji, a koji se odnose na asocijaciju dužih telomera sa: odsustvom metastaza kod OPCK (Sainger i sar. 2007), nižim stadijumima intrakranijalnih tumora (Maes i sar. 2007), dužim preživljavanjem kod kancera pluća (Jeon i sar. 2014), i nižim rizikom od mortaliteta kod tumora prostate (Heaphy i sar. 2013). Isto tako postoje i literaturni podaci o odsustvu korelacije između dužine telomera i kliničko-patoloških karakteristika tumora, a koji se odnose na tumore dojke (Martinez-Delgado i sar. 2013), kolorektalne karcinome (Feng i sar. 2012) i tumore glave i vrata (Patel i sar. 2002).

Kako je važan aspekt ovog istraživanja bila veza između dužine telomera i ekspresije telomeraze, slično našim rezultatima, i kod hepatocelularnih karcinoma pokazana je značajna asocijacija između dužih telomera i višeg nivoa ekspresije

telomeraze (Oh i sar. 2008). Suprotno ovim pokazateljima, u studiji Boscolo-Rizzo i sar., viši nivo ekspresije telomeraze, kod uznapredovalih planocelularnih karcinoma glave i vrata, nije bio u korelaciji sa dužim telomera (Boscolo-Rizzo i sar. 2015). Interesantan podatak predstavljaju rezultati Hsu i sar., gde se ne uočava značajna razlika u dužini telomera između karcinoma ezofagusa sa pozitivnom i negativnom ekspresijom telomeraze (Hsu i sar. 2005).

Očigledno je da ne postoji uvek jasna korelacija između aktivnosti telomeraze, dužine telomera i kliničko-patoloških karakteristika kancera. Međutim, većina studija dovela je u vezu promene dužine telomera sa lošijom kliničkom slikom i prognozom bolesti. Da li će ove promene biti u vidu njihovog skraćivanja ili pak produžavanja, zavisi od brojnih faktora, između ostalog i samog tipa tumora. Tako je meta analiza iz 2015. god. koja se bavila asocijacijom dužine telomera i prognoze različitih tipova kancera, pokazala da su kratke telomere bile prediktor loše prognoze kod leukemije i kolorektalnog kancera, ali sa druge strane i prediktor bolje prognoze, s obzirom na smanjenu stopu mortaliteta kod ezofagealnog kancera (Zhang i sar. 2015). Asocijacija kraćih telomera i lošijeg ishoda, mogla bi biti posledica velikog proliferativnog kapaciteta a samim tim i invazivnosti tumora, u kome čak ni aktivnost telomeraze ne može nadoknaditi progresivni gubitak telomera i sprečiti genomsku nestabilnost. Nasuprot tome, duže telomere u tumorima sa lošijom kliničkom slikom i prognozom, mogle bi biti posledica visokog nivoa aktivnosti telomeraze, koja uprkos nekontrolisanim deobama uspeva da stabilizuje telomere i na taj način stimuliše progresiju tumora (Svenson i Roos 2009).

Rezultati naših istraživanja nameću mogući model telomerazom uslovljene tumorogeneze, gde skraćenje telomera ne mora biti jedan od inicijalnih događaja, već se aktivacija telomeraze i produženje telomera može odigrati i u ranim fazama razvoja tumora. Iznetu hipotezu potvrđuju rezultati određenog broja drugih studija, gde se prisustvo telomeraze i duže telomere, mogu predstaviti kao rani dijagnostički i prognostički markeri, a istovremeno se sugeriše da telomeraza može posedovati inhibicioni uticaj na progresiju tumora.

Uzimajući u obzir sve moguće egzogene i endogene mehanizme, koji mogu dovesti do transformacije normalne ćelije u tumorsku, u novije vreme posebna pažnja se

pridaje i ulozi telomeraze u razvoju mnogih bolesti, pri čemu se izdvajaju tumori. Naime, u potrazi za ciljnom terapijom koja bi poboljšala ishod bolesti, telomeraza bi mogla da predstavlja idealan molekularni marker u terapiji tumora. Stoga uprkos nesumnjivo značajnoj ulozi telomeraze u regulisnju proliferativnog kapaciteta tumorskih ćelija, bilo posredno preko telomera, ili neposredno delujući na ekspresiju gena za deobu, status ovog enzima u kombinaciji sa statusom glavnih kancer gena (na pr. TP53, Rb), može da ima veoma bitnu ulogu u onkološkoj dijagnostici.

6. Zaključci

Na osnovu rezultata dobijenih u okviru ove doktorske disertacije izvedeni su sledeći zaključci:

- Najveći broj pacijenata imao je oko 60 godina a obolelih muškaraca bilo je značajno više od žena, što potvrđuje veću učestalost OPCK kod starijih osoba i muškaraca u našoj populaciji. Tumori su bili najčešće poreklom sa usne i jezika, bez značajne razlike u distribuciji među stadijumima bolesti, a oko 30% tumora pokazalo je prisustvo recidiva i metastaza.
- Distribucija genotipova kod kontrola i obolelih pokazala je statistički značajnu asocijaciju mutiranih alela CLPTM1L rs402710 i TERT rs2736100 polimorfizama sa povišenim rizikom od OPCK, dok je mutirani alel TERT rs2736098 polimorfizma, pokazao potencijalno protektivnu ulogu u našoj populaciji.
- Nivo povezanosti (LD) među analiziranim polimorfizmima bio je nisko izražen, a nijedan haplotipski blok nije identifikovan.
- Nijedan od polimorfizama nije pokazao asocijaciju sa kliničko-patološkim karakteristikama tumora, ekspresijom telomeraze i dužinom telomera. Iako nije postojala statistički značajna razlika, mutirani homozigoti za sva tri ispitivana polimorfizma, pokazuju trend kraćeg preživljavanja.
- Ekspresija telomeraze bila je prisutna u većini uzoraka (74%), što ukazuje na njen značaj u razvoju oralnih tumora.
- Ekspresija telomeraze pokazala je statističku značajnu asocijaciju sa odsustvom recidiva, što može da sugeriše na moguću ulogu enzima u sprečavanju genomske nestabilnosti tumora.
- Od svih kliničko-patoloških parametara, jedino se sa statističkom značajnošću, izdvojila veličina tumora kao prediktor ekspresije telomeraze; kod manjih tumora registrovana je veća ekspresija telomeraze nego kod većih lezija.

- Trend dužih telomera bio prisutan kod manjih tumora, nižih gradusa i stadijuma, tumora bez metastaza i sa recidivima, pri čemu se prisustvo metastaza sa statističkom značajnošću izdvaja kao prediktor dužine telomera.
- Trend veće relativne dužine telomera zabeležen je kod tumora sa ekspresijom telomerase u odnosu na tumore bez ekspresije enzima, a što se može povezati sa uticajem telomerase na održavanje dužine telomera kod OPCK.
- Značajno kraće preživljavanje uočeno je kod pacijenata sa većim tumorima, višim gradusima, prisustvom metastaza i recidiva, kao i sa kraćim telomerama u tumorskom tkivu, što ukazuje na mogući uticaj kraćih telomera na lošiju prognozu.

7. Literatura

A

Abrahao A, Bonelli B, Nunes F, Dias E, Cabral M. 2011. Immunohistochemical expression of p53, p16 and hTERT in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders. *Brazilian Oral Research* 25: 34-41.

Aida J, Izumo T, Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Matsuura M, Poon S, Fujiwara M, Sawabe M, Arai T, Takubo K. 2010. Telomere lengths in the oral epithelia with and without carcinoma. *European Journal of Cancer* 46: 430-438.

Artandi SE, DePinho RA. 2010. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 31: 9-18.

B

Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. 2010. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol* 46: 414-417.

Baird DM, Britt-Compton B, Rowson J, Amso NN, Gregory L, Kipling D. 2006. Telomere instability in the male germline. *Hum Mol Genet* 15: 45-51.

Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21: 263-265.

Bisschop PH, Dekker MJ, Osterthun W, Kwakkel J, Anink JJ, Boelen A, Unmehopa UA, Koper JW, Lamberts SW, Stewart PM, Swaab DF, Fliers E. 2013. Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the human hypothalamus. *Journal of neuroendocrinology* 25: 425-432.

Blackburn EH, Collins K. 2011. Telomerase: an RNP enzyme synthesizes DNA. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3

Boscolo-Rizzo P, Rampazzo E, Perissinotto E, Piano M, Giunco S, Baboci L, Spinato G, Spinato R, Tirelli G, Da Mosto M, Del Mistro A, De Rossi A. 2015. Telomere shortening in mucosa surrounding the tumor: Biosensor of field cancerization and prognostic marker of mucosal failure in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 51: 500-507.

Buxton JL, Suderman M, Pappas JJ, Borghol N, McArdle W, Blakemore AI, Hertzman C, Power C, Szyf M, Pembrey M. 2014. Human leukocyte telomere length is associated with DNA methylation levels in multiple subtelomeric and imprinted loci. *Sci Rep* 4: 4954.

C

Caslini C. 2010. Transcriptional regulation of telomeric non-coding RNA: implications on telomere biology, replicative senescence and cancer. *RNA Biol* 7: 18-22.

Cawthon R. 2002. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Research* 30: e21.

Cesare AJ, Reddel RR. 2010. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet* 11: 319-330.

Chen CH, Chen RJ. 2011. Prevalence of telomerase activity in human cancer. *J Formos Med Assoc* 110: 275-289.

Chen H, Chen Y, Zhao Y, Fan W, Zhou K, Liu Y, Zhou L, Mao Y, Wei Q, Xu J, Lu D. 2011. Association of sequence variants on chromosomes 20, 11, and 5 (20q13.33,

11q23.3, and 5p15.33) with glioma susceptibility in a Chinese population. *Am J Epidemiol* 173: 915-922.

Chen H, Yu C, Wang J, Liu B, Wang Y, Sun A, Tsai T, Chiang C. 2007. Expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein is significantly associated with the progression, recurrence and prognosis of oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *Oral Oncology* 43: 122-129.

Chen YK, Huang HC, Lin LM, Lin CC. 1999. Primary oral squamous cell carcinoma: an analysis of 703 cases in southern Taiwan. *Oral Oncol* 35: 173-179.

Choi BJ, Yoon JH, Kim O, Choi WS, Nam SW, Lee JY, Park WS. 2015. Influence of the hTERT rs2736100 polymorphism on telomere length in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 21: 9328-9336.

Cukusić A, Skrobot Vidacek N, Sopta M, Rubelj I. 2008. Telomerase regulation at the crossroads of cell fate. *Cytogenet Genome Res* 122: 263-272.

D

da Silva SD, Ferlito A, Takes RP, Brakenhoff RH, Valentin MD, Woolgar JA, Bradford CR, Rodrigo JP, Rinaldo A, Hier MP, Kowalski LP. 2011. Advances and applications of oral cancer basic research. *Oral Oncol* 47: 783-791.

Daniel M, Peek GW, Tollefsbol TO. 2012. Regulation of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* 498: 135-146.

Di Stefano A, Enciso-Mora V, Marie Y, Desestret V, Labussire M, Boisselier B, Mokhtari K, Idbaih A, Hoang-Xuan K, Delattre J, Houlston R, Sanson M. 2013.

Association between glioma susceptibility loci and tumour pathology defines specific molecular etiologies. *Neuro-Oncology* 15: 542-547.

Ding CY, Hu LM, Hu ZB, Shen HB. 2011. [The relationship between gene polymorphism of telomerase reverse transcriptase and susceptibility to hepatocellular carcinoma]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 45: 593-596.

F

Fabricius EM, Kruse-Boitschenko U, Khoury R, Wildner GP, Raguse JD, Klein M. 2009. Immunohistochemical determination of the appropriate anti-hTERT antibodies for in situ detection of telomerase activity in frozen sections of head and neck squamous cell carcinomas and tumor margin tissues. *Int J Oncol* 34: 1257-1279.

Falchetti M, Pallini R, D'Ambrosio E, Pierconti F, Martini M, Cimino-Reale G, Verna R, Maira G, Larocca L. 2000. In situ detection of telomerase catalytic subunit mRNA in glioblastoma multiforme. *International Journal of Cancer* 88: 895-901.

Fallin D, Schork NJ. 2000. Accuracy of haplotype frequency estimation for biallelic loci, via the expectation-maximization algorithm for unphased diploid genotype data. *Am J Hum Genet* 67: 947-959.

Feng T, Cai L, Qian K, Qi C. 2012. Reduced Telomere Length in Colorectal Carcinomas. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 13: 443-446.

Freier K, Pungs S, Flechtenmacher C, Bosch F, Lichter P, Joos S, Hofele C. 2007. Frequent high telomerase reverse transcriptase expression in primary oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 36: 267-272.

G

Gago-Dominguez M, Jiang X, Conti DV, Castelao JE, Stern MC, Cortessis VK, Pike MC, Xiang YB, Gao YT, Yuan JM, Van Den Berg DJ. 2011. Genetic variations on chromosomes 5p15 and 15q25 and bladder cancer risk: findings from the Los Angeles-Shanghai bladder case-control study. *Carcinogenesis* 32: 197-202.

H

Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.

Haya-Fernández MC, Bagán JV, Murillo-Cortés J, Poveda-Roda R, Calabuig C. 2004. The prevalence of oral leukoplakia in 138 patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 10: 346-348.

Heaphy CM, Yoon GS, Peskoe SB, Joshu CE, Lee TK, Giovannucci E, Mucci LA, Kenfield SA, Stampfer MJ, Hicks JL, De Marzo AM, Platz EA, Meeker AK. 2013. Prostate cancer cell telomere length variability and stromal cell telomere length as prognostic markers for metastasis and death. *Cancer Discov* 3: 1130-1141.

Henson JD, Hannay JA, McCarthy SW, Royds JA, Yeager TR, Robinson RA, Wharton SB, Jellinek DA, Arbuckle SM, Yoo J, Robinson BG, Learoyd DL, Stalley PD, Bonar SF, Yu D, Pollock RE, Reddel RR. 2005. A robust assay for alternative lengthening of telomeres in tumors shows the significance of alternative lengthening of telomeres in sarcomas and astrocytomas. *Clin Cancer Res* 11: 217-225.

Herceg Z, Hainaut P. 2007. Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis. *Mol Oncol* 1: 26-41.

Hofer P, Baierl A, Bernhart K, Leeb G, Mach K, Micksche M, Gsur A. 2012. Association of genetic variants of human telomerase with colorectal polyps and colorectal cancer risk. *Mol Carcinog* 51 Suppl 1: E176-182.

Hsu C, Lee L, Shai S, Chen C. 2005. Clinical significance of telomerase and its associate genes expression in the maintenance of telomere length in squamous cell carcinoma of the esophagus. *World Journal of Gastroenterology* 11: 6941-6947.

Hu Z, Wu C, Shi Y, Guo H, Zhao X, Yin Z, Yang L, Dai J, Hu L, Tan W, Li Z, Deng Q, Wang J, Wu W, Jin G, Jiang Y, Yu D, Zhou G, Chen H, Guan P, Chen Y, Shu Y, Xu L, Liu X, Liu L, Xu P, Han B, Bai C, Zhao Y, Zhang H, Yan Y, Ma H, Chen J, Chu M, Lu F, Zhang Z, Chen F, Wang X, Jin L, Lu J, Zhou B, Lu D, Wu T, Lin D, Shen H. 2011. A genome-wide association study identifies two new lung cancer susceptibility loci at 13q12.12 and 22q12.2 in Han Chinese. *Nat Genet* 43: 792-796.

I

Institute of Public Health of Serbia “Dr Milan Jovanović - Batut” CfPaCoND, Department for Prevention and Control of Noncommunicable Diseases. 2009. Cancer Incidence and Mortality in Central Serbia 2006, Report No. 8.: Belgrade, Serbia

J

Jaworowska E, Trubicka J, Lener MR, Masojć B, Złowocka-Perłowska E, McKay JD, Renard H, Oszutowska D, Wokolorczyk D, Lubiński J, Grodzki T, Serwatowski P, Nej-Wołosiak K, Tołoczko-Grabarek A, Sikorski A, Słojewski M, Jakubowska A, Cybulski C, Scott RJ. 2011. Smoking related cancers and loci at chromosomes 15q25, 5p15, 6p22.1 and 6p21.33 in the Polish population. *PLoS One* 6: e25057.

Jeon H, Choi Y, Choi J, Lee W, Lee E, Yoo S, Lee S, Lee J, Cha S, Kim C, Park J. 2014. Telomere length of tumor tissues and survival in patients with early stage non-small cell lung cancer. *Molecular Carcinogenesis* 53: 272-279.

Jin G, Xu L, Shu Y, Tian T, Liang J, Xu Y, Wang F, Chen J, Dai J, Hu Z, Shen H. 2009. Common genetic variants on 5p15.33 contribute to risk of lung adenocarcinoma in a Chinese population. *Carcinogenesis* 30: 987-990.

K

Khan Z, Bisen PS. 2013. Oncoapoptotic signaling and deregulated target genes in cancers: special reference to oral cancer. *Biochim Biophys Acta* 1836: 123-145.

Killedar A, Stutz MD, Sobinoff AP, Tomlinson CG, Bryan TM, Beesley J, Chenevix-Trench G, Reddel RR, Pickett HA. 2015. A Common Cancer Risk-Associated Allele in the hTERT Locus Encodes a Dominant Negative Inhibitor of Telomerase. *PLoS Genet* 11: e1005286.

Kinnersley B, Migliorini G, Broderick P, Whiffin N, Dobbins SE, Casey G, Hopper J, Sieber O, Lipton L, Kerr DJ, Dunlop MG, Tomlinson IP, Houlston RS, Registry CCF. 2012. The TERT variant rs2736100 is associated with colorectal cancer risk. *Br J Cancer* 107: 1001-1008.

Kote-Jarai Z, Saunders EJ, Leongamornlert DA, Tymrakiewicz M, Dadaev T, Jugurnauth-Little S, Ross-Adams H, Al Olama AA, Benlloch S, Halim S, Russell R, Russel R, Dunning AM, Luccarini C, Dennis J, Neal DE, Hamdy FC, Donovan JL, Muir K, Giles GG, Severi G, Wiklund F, Gronberg H, Haiman CA, Schumacher F, Henderson BE, Le Marchand L, Lindstrom S, Kraft P, Hunter DJ, Gapstur S, Chanock S, Berndt SI, Albanes D, Andriole G, Schleutker J, Weischer M, Canzian F, Riboli E, Key TJ, Travis RC, Campa D, Ingles SA, John EM, Hayes

RB, Pharoah P, Khaw KT, Stanford JL, Ostrander EA, Signorello LB, Thibodeau SN, Schaid D, Maier C, Vogel W, Kibel AS, Cybulski C, Lubinski J, Cannon-Albright L, Brenner H, Park JY, Kaneva R, Batra J, Spurdle A, Clements JA, Teixeira MR, Govindasami K, Guy M, Wilkinson RA, Sawyer EJ, Morgan A, Dicks E, Baynes C, Conroy D, Bojesen SE, Kaaks R, Vincent D, Bacot F, Tessier DC, Easton DF, Eeles RA, Initiative C-CG-EPoG-O, Oncology UGPCSCBAoUSSo, Collaborators UPS, Consortium P. 2013. Fine-mapping identifies multiple prostate cancer risk loci at 5p15, one of which associates with TERT expression. *Hum Mol Genet* 22: 2520-2528.

Kuveljić J, Đurić T, Jovanović I, Živković M, Stanković A. 2013. Osnove primene analize DNK u medicini. *Srce i krvni sudovi* 32: 104-109.

L

Labussière M, Di Stefano AL, Gleize V, Boisselier B, Giry M, Mangesius S, Bruno A, Pattera R, Marie Y, Rahimian A, Finocchiaro G, Houlston RS, Hoang-Xuan K, Idbaih A, Delattre JY, Mokhtari K, Sanson M. 2014. TERT promoter mutations in gliomas, genetic associations and clinico-pathological correlations. *Br J Cancer* 111: 2024-2032.

Lan Q, Cawthon R, Gao Y, Hu W, Hosgood HD, Barone-Adesi F, Ji BT, Bassig B, Chow WH, Shu X, Cai Q, Xiang Y, Berndt S, Kim C, Chanock S, Zheng W, Rothman N. 2013. Longer telomere length in peripheral white blood cells is associated with risk of lung cancer and the rs2736100 (CLPTM1L-TERT) polymorphism in a prospective cohort study among women in China. *PLoS One* 8: e59230.

Lan Q, Cawthon R, Shen M, Weinstein SJ, Virtamo J, Lim U, Hosgood HD, Albanes D, Rothman N. 2009. A prospective study of telomere length measured by monochrome multiplex quantitative PCR and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res* 15: 7429-7433.

Ledwon J, Hennig E, Maryan N, Goryca K, Nowakowska D, Niwinska A, Ostrowski J. 2013. Common low-penetrance risk variants associated with breast cancer in Polish women. *Bmc Cancer* 13: 510.

Li C, Yin Z, Wu W, Li X, Zhou B. 2013. Genetic variants in TERT-CLPTM1L genetic region associated with several types of cancer: a meta-analysis. *Gene* 526: 390-399.

Liang Y, Thakur A, Gao L, Wang T, Zhang S, Ren H, Meng J, Geng T, Jin T, Chen M. 2014. Correlation of CLPTM1L polymorphisms with lung cancer susceptibility and response to cisplatin-based chemotherapy in a Chinese Han population. *Tumor Biology* 35: 12075-12082.

Liu SG, Ma L, Cen QH, Huang JS, Zhang JX, Zhang JJ. 2015. Association of genetic polymorphisms in TERT-CLPTM1L with lung cancer in a Chinese population. *Genet Mol Res* 14: 4469-4476.

Liu Z, Li G, Wei S, Niu J, Wang LE, Sturgis EM, Wei Q. 2010. Genetic variations in TERT-CLPTM1L genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 31: 1977-1981.

Liu Z, Ma H, Wei S, Li G, Sturgis EM, Wei Q. 2011. Telomere length and TERT functional polymorphisms are not associated with risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20: 2642-2645.

Liviu F, Johan L. 2012. Oral Squamous Cell Carcinoma: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. *Journal of Cancer Therapy* 3: 263-268.

Luke B, Lingner J. 2009. TERRA: telomeric repeat-containing RNA. *EMBO J* 28: 2503-2510.

M

Ma Z, Hu Q, Chen Z, Tao S, Macnamara L, Kim ST, Tian L, Xu K, Ding Q, Zheng SL, Sun J, Xia G, Xu J. 2013. Systematic evaluation of bladder cancer risk-associated single-nucleotide polymorphisms in a Chinese population. *Mol Carcinog* 52: 916-921.

Maes L, Van Neste L, Van Damme K, Kalala JP, De Ridder L, Bekaert S, Cornelissen M. 2007. Relation between telomerase activity, hTERT and telomere length for intracranial tumours. *Oncol Rep* 18: 1571-1576.

Manneras-Holm L, Leonhardt H, Kullberg J, Jennische E, Oden A, Holm G, Hellstrom M, Lonn L, Olivecrona G, Stener-Victorin E, Lonn M. 2011. Adipose tissue has aberrant morphology and function in PCOS: enlarged adipocytes and low serum adiponectin, but not circulating sex steroids, are strongly associated with insulin resistance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96: E304-311.

Martinez-Delgado B, Gallardo M, Tanic M, Yanowsky K, Inglada-Perez L, Barroso A, Rodriguez-Pinilla M, Canamero M, Blasco M, Benitez J. 2013. Short telomeres are frequent in hereditary breast tumors and are associated with high tumor grade. *Breast Cancer Research and Treatment* 141: 231-242.

Massano J, Regateiro FS, Januário G, Ferreira A. 2006. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 102: 67-76.

Masutomi K, Yu EY, Khurts S, Ben-Porath I, Currier JL, Metz GB, Brooks MW, Kaneko S, Murakami S, DeCaprio JA, Weinberg RA, Stewart SA, Hahn WC.

2003. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 114: 241-253.

Matsubara Y, Murata M, Yoshida T, Watanabe K, Saito I, Miyaki K, Omae K, Ikeda Y. 2006. Telomere length of normal leukocytes is affected by a functional polymorphism of hTERT. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 128-131.

Meeker A, Hicks J, Iacobuzio-Donahue C, Montgomery E, Westra W, Chan T, Ronnett B, De Marzo A. 2004. Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clinical Cancer Research* 10: 3317-3326.

Milian A, Bagan JV, Vera F. 1993. Squamous cell carcinoma of the oral cavity: a follow up study of 85 cases and analysis of prognostic variables. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol* 36: 29-35.

Mirabello L, Richards EG, Duong LM, Yu K, Wang Z, Cawthon R, Berndt SI, Burdett L, Chowdhury S, Teshome K, Douglass C, Savage SA, Group NOES. 2011. Telomere length and variation in telomere biology genes in individuals with osteosarcoma. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2: 19-29.

Mirabello L, Yu K, Kraft P, De Vivo I, Hunter DJ, Prescott J, Wong JY, Chatterjee N, Hayes RB, Savage SA. 2010. The association of telomere length and genetic variation in telomere biology genes. *Hum Mutat* 31: 1050-1058.

Mocellin S, Verdi D, Pooley KA, Landi MT, Egan KM, Baird DM, Prescott J, De Vivo I, Nitti D. 2012. Telomerase reverse transcriptase locus polymorphisms and cancer risk: a field synopsis and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 104: 840-854.

Mu Y, Zhang Q, Mei L, Liu X, Yang W, Yu J. 2012. Telomere shortening occurs early during gastrocarcinogenesis. *Medical Oncology* 29: 893-898.

N

Nan H, Qureshi AA, Prescott J, De Vivo I, Han J. 2011. Genetic variants in telomere-maintaining genes and skin cancer risk. *Hum Genet* 129: 247-253.

Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. 2010. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 220-228.

Nie W, Zang Y, Chen J, Xiu Q. 2014. TERT rs2736100 polymorphism contributes to lung cancer risk: a meta-analysis including 49,869 cases and 73,464 controls. *Tumour Biol* 35: 5569-5574.

O

O'Sullivan RJ, Karlseder J. 2010. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 171-181.

Oh B, Kim H, Park Y, Yoo J, Choi J, Kim K, Lee J, Park C. 2008. High telomerase activity and long telomeres in advanced hepatocellular carcinomas with poor prognosis. *Laboratory Investigation* 88: 144-152.

P

Pannone G, De Maria S, Zamparese R, Metafora S, Serpico R, Morelli F, Rubini C, Farina E, Carteni M, Staibano S, De Rosa G, Lo Muzio L, Bufo P. 2007. Prognostic value of human telomerase reverse transcriptase gene expression in oral carcinogenesis. *Int J Oncol* 30: 1349-1357.

Papagerakis S, Pannone G, Zheng L, About I, Taqi N, Nguyen NP, Matossian M, McAlpin B, Santoro A, McHugh J, Prince ME, Papagerakis P. 2014. Oral epithelial stem cells - implications in normal development and cancer metastasis. *Exp Cell Res* 325: 111-129.

Patel MM, Parekh LJ, Jha FP, Sainger RN, Patel JB, Patel DD, Shah PM, Patel PS. 2002. Clinical usefulness of telomerase activation and telomere length in head and neck cancer. *Head Neck* 24: 1060-1067.

Pisano S, Galati A, Cacchione S. 2008. Telomeric nucleosomes: forgotten players at chromosome ends. *Cell Mol Life Sci* 65: 3553-3563.

Q

Qi HY, Zou P, Zhao L, Zhu J, Gu AH. 2012. TERT rs2736098 polymorphism and cancer risk: results of a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 13: 3483-3488.

R

Rafnar T, Sulem P, Stacey SN, Geller F, Gudmundsson J, Sigurdsson A, Jakobsdottir M, Helgadóttir H, Thorlacius S, Aben KK, Blöndal T, Thorgeirsson TE, Thorleifsson G, Kristjansson K, Thorisdóttir K, Ragnarsson R, Sigurgeirsson B, Skuladóttir H, Gudbjartsson T, Isaksson HJ, Einarsson GV, Benediksdóttir KR, Agnarsson BA, Olafsson K, Salvarsdóttir A, Bjarnason H, Asgeirsdóttir M, Kristinsson KT, Matthíasdóttir S, Sveinsdóttir SG, Polidoro S, Höiom V, Botella-Estrada R, Hemminki K, Rudnai P, Bishop DT, Campagna M, Kellen E, Zeegers MP, de Verdier P, Ferrer A, Isla D, Vidal MJ, Andres R, Saez B, Juberias P, Banzo J, Navarrete S, Tres A, Kan D, Lindblom A, Gurzau E, Koppova K, de Vegt F, Schalken JA, van der Heijden HF, Smit HJ, Termeer RA, Oosterwijk E, van Hooij O, Nagore E, Porru S, Steineck G, Hansson J, Buntinx F, Catalona WJ,

Matullo G, Vineis P, Kiltie AE, Mayordomo JI, Kumar R, Kiemeny LA, Frigge ML, Jonsson T, Saemundsson H, Barkardottir RB, Jonsson E, Jonsson S, Olafsson JH, Gulcher JR, Masson G, Gudbjartsson DF, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. 2009. Sequence variants at the TERT-CLPTM1L locus associate with many cancer types. *Nat Genet* 41: 221-227.

Rivera C, Venegas B. 2014. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncol Lett* 8: 7-11.

Ronen A, Glickman BW. 2001. Human DNA repair genes. *Environ Mol Mutagen* 37: 241-283.

S

Sainger RN, Telang SD, Shukla SN, Patel PS. 2007. Clinical significance of telomere length and associated proteins in oral cancer. *Biomark Insights* 2: 9-19.

Saretzki G. 2014. Extra-telomeric functions of human telomerase: cancer, mitochondria and oxidative stress. *Curr Pharm Des* 20: 6386-6403.

Savage SA, Bertuch AA. 2010. The genetics and clinical manifestations of telomere biology disorders. *Genet Med* 12: 753-764.

Savage SA, Chanock SJ, Lissowska J, Brinton LA, Richesson D, Peplonska B, Bardin-Mikolajczak A, Zatonski W, Szeszenia-Dabrowska N, Garcia-Closas M. 2007. Genetic variation in five genes important in telomere biology and risk for breast cancer. *Br J Cancer* 97: 832-836.

Schmidt JC, Cech TR. 2015. Human telomerase: biogenesis, trafficking, recruitment, and activation. *Genes Dev* 29: 1095-1105.

Schoeftner S, Blasco MA. 2008. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* 10: 228-236.

Scully C, Bagan J. 2009a. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol* 45: 301-308.

Scully C, Bagan J. 2009b. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis* 15: 388-399.

Seethalakshmi C. 2013. Early Detection of Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) - Role of Genetics: A Literature Review. *J Clin Diagn Res* 7: 1824-1826.

Shastry BS. 2002. SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet* 47: 561-566.

Sheng X, Tong N, Tao G, Luo D, Wang M, Fang Y, Li J, Xu M, Zhang Z, Wu D. 2013. TERT polymorphisms modify the risk of acute lymphoblastic leukemia in Chinese children. *Carcinogenesis* 34: 228-235.

Shigeishi H, Sugiyama M, Tahara H, Ono S, Kumar Bhawal U, Okura M, Kogo M, Shinohara M, Shindoh M, Shintani S, Hamakawa H, Takata T, Kamata N. 2011. Increased telomerase activity and hTERT expression in human salivary gland carcinomas. *Oncol Lett* 2: 845-850.

Sumida T, Hamakawa H. 2001. Telomerase and oral cancer. *Oral Oncology* 37: 333-340.

Svenson U, Roos G. 2009. Telomere length as a biological marker in malignancy. *Biochim Biophys Acta* 1792: 317-323.

T

Terry KL, Tworoger SS, Vitonis AF, Wong J, Titus-Ernstoff L, De Vivo I, Cramer DW. 2012. Telomere length and genetic variation in telomere maintenance genes in relation to ovarian cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21: 504-512.

Turnbull C, Rapley EA, Seal S, Pernet D, Renwick A, Hughes D, Ricketts M, Linger R, Nsengimana J, Deloukas P, Huddart RA, Bishop DT, Easton DF, Stratton MR, Rahman N, Collaboration UTC. 2010. Variants near DMRT1, TERT and ATF7IP are associated with testicular germ cell cancer. *Nat Genet* 42: 604-607.

V

Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, Kimura M, Oelsner E, Cherkas LF, Aviv A, Spector TD. 2005. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* 366: 662-664.

W

Wang S, Wu J, Hu L, Ding C, Kan Y, Shen Y, Chen X, Shen H, Guo X, Hu Z. 2012. Common genetic variants in TERT contribute to risk of cervical cancer in a Chinese population. *Mol Carcinog* 51 Suppl 1: E118-122.

Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. 2005. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet* 6: 109-118.

Wang Z, Zhu B, Zhang M, Parikh H, Jia J, Chung CC, Sampson JN, Hoskins JW, Hutchinson A, Burdette L, Ibrahim A, Hautman C, Raj PS, Abnet CC, Adjei AA, Ahlbom A, Albanes D, Allen NE, Ambrosone CB, Aldrich M, Amiano P, Amos C, Andersson U, Andriole G, Andrulis IL, Arici C, Arslan AA, Austin MA, Baris D, Barkauskas DA, Bassig BA, Beane Freeman LE, Berg CD, Berndt SI, Bertazzi PA, Biritwum RB, Black A, Blot W, Boeing H, Boffetta P, Bolton K, Boutron-Ruault MC, Bracci PM, Brennan P, Brinton LA, Brotzman M, Bueno-de-Mesquita HB, Buring JE, Butler MA, Cai Q, Cancel-Tassin G, Canzian F, Cao G, Caporaso NE, Carrato A, Carreon T, Carta A, Chang GC, Chang IS, Chang-Claude J, Che X, Chen CJ, Chen CY, Chen CH, Chen C, Chen KY, Chen YM, Chokkalingam AP, Chu LW, Clavel-Chapelon F, Colditz GA, Colt JS, Conti D, Cook MB, Cortessis VK, Crawford ED, Cussenot O, Davis FG, De Vivo I, Deng X, Ding T, Dinney CP, Di Stefano AL, Diver WR, Duell EJ, Elena JW, Fan JH, Feigelson HS, Feychting M, Figueroa JD, Flanagan AM, Fraumeni JF, Freedman ND, Fridley BL, Fuchs CS, Gago-Dominguez M, Gallinger S, Gao YT, Gapstur SM, Garcia-Closas M, Garcia-Closas R, Gastier-Foster JM, Gaziano JM, Gerhard DS, Giffen CA, Giles GG, Gillanders EM, Giovannucci EL, Goggins M, Gokgoz N, Goldstein AM, Gonzalez C, Gorlick R, Greene MH, Gross M, Grossman HB, Grubb R, Gu J, Guan P, Haiman CA, Hallmans G, Hankinson SE, Harris CC, Hartge P, Hattinger C, Hayes RB, He Q, Helman L, Henderson BE, Henriksson R, Hoffman-Bolton J, Hohensee C, Holly EA, Hong YC, Hoover RN, Hosgood HD, Hsiao CF, Hsing AW, Hsiung CA, Hu N, Hu W, Hu Z, Huang MS, Hunter DJ, Inskip PD, Ito H, Jacobs EJ, Jacobs KB, Jenab M, Ji BT, Johansen C, Johansson M, Johnson A, Kaaks R, Kamat AM, Kamineni A, Karagas M, Khanna C, Khaw KT, Kim C, Kim IS, Kim JH, Kim YH, Kim YC, Kim YT, Kang CH, Jung YJ, Kitahara CM, Klein AP, Klein R, Kogevinas M, Koh WP, Kohno T, Kolonel LN, Kooperberg C, Kratz CP, Krogh V, Kunitoh H, Kurtz RC, Kurucu N, Lan Q, Lathrop M, Lau CC, Lecanda F, Lee KM, Lee MP, Le Marchand L, Lerner SP, Li D, Liao LM, Lim WY, Lin D, Lin J, Lindstrom S, Linet MS, Lissowska J, Liu J, Ljungberg B, Lloreta J, Lu D, Ma J, Malats N, Mannisto S, Marina N, Mastrangelo G, Matsuo K, McGlynn KA, McKean-Cowdin R, McNeill LH, McWilliams RR, Melin BS, Meltzer PS, Mensah

JE, Miao X, Michaud DS, Mondul AM, Moore LE, Muir K, Niwa S, Olson SH, Orr N, Panico S, Park JY, Patel AV, Patino-Garcia A, Pavanello S, Peeters PH, Peplonska B, Peters U, Petersen GM, Picci P, Pike MC, Porru S, Prescott J, Pu X, Purdue MP, Qiao YL, Rajaraman P, Riboli E, Risch HA, Rodabough RJ, Rothman N, Ruder AM, Ryu JS, Sanson M, Schned A, Schumacher FR, Schwartz AG, Schwartz KL, Schwenn M, Scotlandi K, Seow A, Serra C, Serra M, Sesso HD, Severi G, Shen H, Shen M, Shete S, Shiraishi K, Shu XO, Siddiq A, Sierrasesumaga L, Sierri S, Loon Sihoe AD, Silverman DT, Simon M, Southey MC, Spector L, Spitz M, Stampfer M, Stattin P, Stern MC, Stevens VL, Stolzenberg-Solomon RZ, Stram DO, Strom SS, Su WC, Sund M, Sung SW, Swerdlow A, Tan W, Tanaka H, Tang W, Tang ZZ, Tardon A, Tay E, Taylor PR, Tettey Y, Thomas DM, Tirabosco R, Tjonneland A, Tobias GS, Toro JR, Travis RC, Trichopoulos D, Troisi R, Truelove A, Tsai YH, Tucker MA, Tumino R, Van Den Berg D, Van Den Eeden SK, Vermeulen R, Vineis P, Visvanathan K, Vogel U, Wang C, Wang J, Wang SS, Weiderpass E, Weinstein SJ, Wentzensen N, Wheeler W, White E, Wiencke JK, Wolk A, Wolpin BM, Wong MP, Wrensch M, Wu C, Wu T, Wu X, Wu YL, Wunder JS, Xiang YB, Xu J, Yang HP, Yang PC, Yatabe Y, Ye Y, Yeboah ED, Yin Z, Ying C, Yu CJ, Yu K, Yuan JM, Zanetti KA, Zeleniuch-Jacquotte A, Zheng W, Zhou B, Mirabello L, Savage SA, Kraft P, Chanock SJ, Yeager M, Landi MT, Shi J, Chatterjee N, Amundadottir LT. 2014. Imputation and subset-based association analysis across different cancer types identifies multiple independent risk loci in the TERT-CLPTM1L region on chromosome 5p15.33. *Hum Mol Genet* 23: 6616-6633.

Wu H, Zhu R. 2014. Quantitative assessment of common genetic variants on chromosome 5p15 and lung cancer risk. *Tumor Biology* 35: 6055-6063.

X

Xu L, Blackburn EH. 2007. Human cancer cells harbor T-stumps, a distinct class of extremely short telomeres. *Mol Cell* 28: 315-327.

Xun X, Wang H, Yang H, Wang B, Kang L, Jin T, Chen C. 2014. CLPTM1L genetic polymorphisms and interaction with smoking and alcohol drinking in lung cancer risk: a case-control study in the Han population from northwest China. *Medicine (Baltimore)* 93: e289.

Y

Yamamoto K, Okamoto A, Isonishi S, Ochiai K, Ohtake Y. 2001. A novel gene, CRR9, which was up-regulated in CDDP-resistant ovarian tumor cell line, was associated with apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 1148-1154.

Yi CX, Foppen E, Abplanalp W, Gao Y, Alkemade A, la Fleur SE, Serlie MJ, Fliers E, Buijs RM, Tschop MH, Kalsbeek A. 2012. Glucocorticoid signaling in the arcuate nucleus modulates hepatic insulin sensitivity. *Diabetes* 61: 339-345.

Yin J, Wang L, Zheng L, Wang X, Shi Y, Shao A, Ding G, Liu C, Chen S, Tang W, Gu H. 2014a. TERT-CLPTM1L Rs401681 C>T polymorphism was associated with a decreased risk of esophageal cancer in a Chinese population. *PLoS One* 9: e100667.

Yin Z, Cui Z, Ren Y, Zhang H, Yan Y, Zhao Y, Ma R, Wang Q, He Q, Zhou B. 2014b. Genetic polymorphisms of TERT and CLPTM1L, cooking oil fume exposure, and risk of lung cancer: a case-control study in a Chinese non-smoking female population. *Med Oncol* 31: 114.

Yuan X, Meng Y, Li P, Ge N, Kong F, Yang L, Björkholm M, Zhao S, Xu D. 2016. The association between the TERT rs2736100 AC genotype and reduced risk of upper tract urothelial carcinomas in a Han Chinese population. *Oncotarget*

Z

Zhang C, Chen X, Li L, Zhou Y, Wang C, Hou S. 2015. The Association between Telomere Length and Cancer Prognosis: Evidence from a Meta-Analysis. *PLoS One* 10: e0133174.

Zhang C, Tian YP, Wang Y, Guo FH, Qin JF, Ni H. 2013. hTERT rs2736098 genetic variants and susceptibility of hepatocellular carcinoma in the Chinese population: a case-control study. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 12: 74-79.

Zhang XJ, Xu Z, Gong YL, Tang CJ, Chen JF. 2012. Association of TERT rs2736098 polymorphism with cancer risk: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 13: 4943-4946.

Zhang Y, Zhang X, Zhang H, Zhai Y, Wang Z, Li P, Yu L, Xia X, Zeng Y, He F, Zhou G. 2016. Common variations in TERT-CLPTM1L locus are reproducibly associated with the risk of nasopharyngeal carcinoma in Chinese populations. *Oncotarget* 7: 759-770.

Zhao D, Yang C, Zhou X, Ding J, Jiang G. 2014. Association between CLPTM1L polymorphisms (rs402710 and rs401681) and lung cancer susceptibility: evidence from 27 case-control studies. *Molecular Genetics and Genomics* 289: 1001-1012.

Zhao Y, Chen G, Song X, Chen H, Mao Y, Lu D. 2012. Fine-mapping of a region of chromosome 5p15.33 (TERT-CLPTM1L) suggests a novel locus in TERT and a CLPTM1L haplotype are associated with glioma susceptibility in a Chinese population. *Int J Cancer* 131: 1569-1576.

Zheng Y, Ogundiran TO, Adebamowo C, Nathanson KL, Domchek SM, Rebbeck TR, Simon MS, John EM, Hennis A, Nemesure B, Wu SY, Leske MC, Ambbs S, Niu

Q, Zhang J, Cox NJ, Olopade OI, Huo D. 2012. Lack of association between common single nucleotide polymorphisms in the TERT-CLPTM1L locus and breast cancer in women of African ancestry. *Breast Cancer Res Treat* 132: 341-345.

Zhou L, Fu G, Wei J, Shi J, Pan W, Ren Y, Xiong X, Xia J, Shen Y, Li H, Yang M. 2015. The identification of two regulatory ESCC susceptibility genetic variants in the TERT-CLPTM1L loci. *Oncotarget*

Zhou P, Wei L, Xia X, Shao N, Qian X, Yang Y. 2014. Association between telomerase reverse transcriptase rs2736100 polymorphism and risk of glioma. *J Surg Res* 191: 156-160.

8. Biografija autora

Jelena Čarkić rođena je 04.08.1982. godine u Beogradu. Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2001/2002. godine, a diplomirala školske 2009/2010 godine sa prosečnom ocenom 9.45. U decembru 2010. godine završila je pripravnički staž na Stomatološkom fakultetu i položila stručni ispit. Doktorske akademske studije na Stomatološkom fakultetu upisala je školske 2010/2011. godine.

Od 2012. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik na naučnom projektu iz programa Osnovnih istraživanja finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod nazivom „Genetička kontrola i molekularni mehanizmi u malignim, inflamatornim i razvojnim patologijama orofacijalne regije“ (evidencioni broj 175075), pod rukovodstvom prof. dr Jelene Milašin. Zvanje istraživač saradnik stekla je u maju 2016 godine.

U periodu od 2012-2014 učestvovala je u vođenju praktične nastave na predmetu Humana genetika, a tokom školske 2014/2015 godine na predmetu Mikrobiologija sa imunologijom.

Dr Jelena Čarkić je do sada bila koautor 5 naučnih publikacija u časopisima međunarodnog značaja i 13 saopštenja na skupovima međunarodnog značaja iz uže naučne oblasti. Uža naučna oblast interesovanja su: molekularna genetika i epigenetika kancera i humana populaciona genetika.

9. Prilozi

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Јелена М. Чаркић _____

број индекса _____ 4001/2010 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Теломере као фактор геномске нестабилности код оралних планоцелуларних карцинома“

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

Потпис докторанда

У Београду, _____ године

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Јелена М. Чаркић _____

Број индекса _____ 4001/2010 _____

Студијски програм _____ Медицина _____

Наслов рада _____ „Теломере као фактор геномске нестабилности код оралних
планоцелуларних карцинома“ _____

Ментор _____ Проф. др Бранка Поповић _____

Потписани/а _____ Јелена М. Чаркић _____

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____ године

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Теломере као фактор геномске нестабилности код оралних планоцелуларних карцинома“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____ године

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.