

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Bojana B. Ilić

**EFEKAT MUTACIJE GENA *VHL* NA NIVO  
EKSPRESIJE PROTEINA mTOR  
SIGNALNOG PUTA U  
SVETLOĆELIJSKOM KARCINOMU  
BUBREGA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Bojana B. Ilić

**THE EFFECT OF *VHL* GENE MUTATION  
ON THE EXPRESSION LEVELS OF  
mTOR SIGNALING PATHWAY  
PROTEINS IN CLEAR CELL RENAL  
CELL CARCINOMA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

**Mentori:**

---

dr Svetozar Damjanović, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu  
Medicinski fakultet

---

dr Gordana Matić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu  
Biološki fakultet

**Članovi komisije:**

---

dr Goran Brajušković, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu  
Biološki fakultet

---

dr Ana Đorđević, viši naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu  
Institut za biološka istraživanja „ Siniša Stanković “

---

dr Jasmina Marković-Lipkovski, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu  
Medicinski fakultet

Datum odbrane: \_\_\_\_\_ 2018. godine

## Zahvalnica

*Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za genetička ispitivanja, Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Kliničkog centra Srbije u Beogradu, pod neposrednim rukovodstvom prof. dr Svetozara Damjanovića i rezultat je saradnje Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma i Klinike za urologiju, Kliničkog centra Srbije.*

*Prof. dr Svetozaru Damjanoviću dugujem najveću zahvalnost za pruženu priliku i ukazano poverenje da svoju doktorsku disertaciju radim u Laboratoriji za genetička ispitivanja, kao i za izbor teme, sugestije, višečasovne diskusije tokom izrade i pisanja disertacije.*

*Prof. dr Gordani Matić dugujem neizmernu zahvalnost na pruženoj podršci i velikoj pomoći tokom izrade i pisanja teze.*

*Prof. dr Goranu Brajuškoviću i dr Ani Đorđević dugujem posebnu zahvalnost na pruženoj podršci, nesebično izdvojenom vremenu i konstruktivnim sugestijama tokom pisanja doktorske disertacije.*

*Prof. dr Jasmini Marković-Lipkovski se zahvaljujem na saradnji i pomoći.*

*Prof. dr Canetu Tuliću i saradnicima sa Klinike za urologiju dugujem veliku zahvalnost na saradnji u kliničkom dijagnostikovanju bolesnika i prikupljanju uzoraka i kliničkih podataka.*

*Prof. dr Veri Todorović i doc. dr Neli Puškaš dugujem zahvalnost za imunohistohemijsku analizu uzoraka.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem kolegama iz Kabineta endokrinološke radiologije, Centra za radiologiju i magnetnu rezonancu, KCS, Ivoni Stanković, Goranu Jankoviću, Milanki Perović, Aleksandri Šeljo i Vesni Boškić na izdvojenom vremenu i pruženoj pomoći.*

*Posebno se zahvaljujem kolegama Laboratorije za genetička ispitivanja, dr Bojani Beleslin Čokić, dr Jadranki Antić, Jovani Banković, Ivani Milićević, Gordani Rodić i dr Dušanu Iliću na pruženoj podršci, svakoj vrsti pomoći i timskom duhu.*

*Beli i Milošu Sekereš dugujem posebnu zahvalnost na ukazanoj pomoći u vezi tehničke obrade teksta, kao i na prijateljstvu.*

*Porodici se zahvaljujem na bezuslovnoj podršci i ljubavi. Ovu tezu posvećujem svojim roditeljima, Branku i Jadranki i sestri Nataši.*

## **Efekat mutacije gena *VHL* na nivo ekspresije proteina mTOR signalnog puta u svetloćelijskom karcinomu bubrega**

### **REZIME**

Sporadični svetloćelijski karcinomi bubrega asocirani su sa mutacijama tumor supresorskog gena *VHL* kod 60-80 % pacijenata. U odsustvu funkcionalnog proteina *VHL* dolazi do akumulacije faktora indukovanih hipoksijom koji regulišu ekspresiju gena uključenih u procese angiogeneze, eritropoeze, ćelijskog metabolizma i preživljavanja. Pored specifičnog genetičkog profila i povišenog nivoa *HIF-2 $\alpha$*  svetloćelijske karcinome bubrega karakteriše glikolitički metabolički put i povišena aktivnost mTOR signalnog puta. Nepovoljan energetski status i hipoksija blokiraju aktivnost mTOR signalnog puta preko proteina AMPK i REDD1.

Ova studija imala je za cilj da utvrdi moguću asocijaciju mutacionog statusa gena *VHL* sa patohistološkim parametrima, nivoom *HIF-2 $\alpha$*  iRNK i nivoom proteina *HIF-2 $\alpha$* , mTOR, TSC1, TSC2, eIF4E-BP1, p70S6K1, AMPK, REDD1 i PDK3 u svetloćelijskom karcinomu bubrega.

Studija je obuhvatala 47 pacijenata kojima je urađena totalna nefrektomija zbog prisustva svetloćelijskog karcinoma bubrega. Genomska DNK izolovana iz uzoraka venske krvi i somatska DNK izolovana iz uzoraka tumorskog i neizmenjenog tkiva bubrega upotrebljene su za određivanje mutacionog statusa gena *VHL* i gubitka heterozigotnosti 3p lokusa sekvenciranjem, metodom amplifikacije višestruko ligiranih proba i fragmentnom analizom mikrosatelitnih markera. Metilacioni status promotora gena *VHL* ispitan je metil specifičnom PCR reakcijom nakon bisulfitne modifikacije DNK. Kvantitativni RT-PCR primenjen je za relativnu kvantifikaciju *HIF-2 $\alpha$*  iRNK u tumorskom i neizmenjenom tkivu bubrega. Kvantifikacija ekspresije proteina *HIF-2 $\alpha$* , mTOR, TSC1, eIF4E-BP1, p70S6K1, AMPK, REDD1 i PDK3 utvrđena je Western blot metodom. Semikvantitativna imunohistohemijska analiza korišćena je za utvrđivanje nivoa ekspresije proteina TSC2.

Alteracija u genu *VHL* i/ili 3p regionu detektovana je kod 37/47 (78.7 %) analiziranih uzoraka tumorskog tkiva. Monoalelna inaktivacija gena *VHL* (prisustvo intragenske mutacije ili gubitak heterozigotnosti 3p lokusa) detektovana je kod 10/47 (21.3 %) pacijenata. Bialelna inaktivacija gena *VHL* utvrđena je kod 27/47 (57.4 %) pacijenata, odnosno 27/31 (87.1 %) nosioca intragenske mutacije. Uzorci tumorskog tkiva sa *wtVHL* genom imali su značajno veći gradus u odnosu na tumore sa monoalelnom i bialelnom inaktivacijom gena *VHL*. U našoj studiji, pokazana je asocijacija nivoa ekspresije proteina TSC1, REDD1 i PDK3 sa mutacionim statusom gena *VHL*.

Ovo je prva studija rađena na uzorcima svetloćelijskog karcinoma bubrega u kojoj je ispitivana ekspresija i pokazana asocijacija nivoa proteina PDK3 sa mutacionim statusom gena *VHL*. Rezultati ove studije pokazali su naučnu opravdanost, jer pružaju informacije koje se odnose na nivo ekspresije komponenata mTOR signalnog puta u zavisnosti od mutacionog statusa gena *VHL*, što doprinosi potpunijem razumevanju molekularnih mehanizama koji su uključeni u proces onkogeneze bubrežnog tkiva.

**Ključne reči:** svetloćelijski karcinom bubrega, gen *VHL*, mTOR signalni put, ćelijski metabolizam.

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Biohemija i molekularna biologija

**UDK broj:** 616-006.6:[575.224.2:[577.112:612.46]](043.3)

## **The effect of *VHL* gene mutation on the expression levels of mTOR signaling pathway proteins in clear cell renal cell carcinoma**

### **Abstract**

Sporadic clear cell renal carcinoma is associated with mutations of the *VHL* gene in 60-80 % patients. The absence of a functional VHL protein leads to accumulation of hypoxia-inducible factors which regulate expression of genes involved in angiogenesis, erythropoiesis, cell metabolism and survival. Specific genetic background, overexpression of HIF-2 $\alpha$  transcription factor as well as glycolytic metabolism and upregulated activity of mTOR pathway are the main characteristics of clear cell renal carcinoma. The lack of energy and hypoxia inhibit mTOR signaling through activity of AMPK and REDD1 proteins.

The aim of present study was to determine association of *VHL* gene mutational status with pathohistological parameters, expression level of mRNA HIF-2 $\alpha$  and expression levels of mTOR, TSC1, TSC2, eIF4E-BP1, p70S6K1, AMPK, REDD1 and PDK3 proteins in clear cell renal carcinoma.

The study included 47 patients who underwent radical nephrectomy due to unilateral kidney tumor. DNA was extracted from peripheral venous blood, tumorous and corresponding healthy renal tissue. The *VHL* gene mutational status and loss of heterozygosity of 3p loci were detected using DNA sequencing, MLPA and analysis of microsatellite markers. The *VHL* gene promoter methylation analysis was examined by MS-PCR after bisulphite modification of DNA. Quantitative real time PCR was performed for relative quantification of HIF-2 $\alpha$  mRNA. Expression levels of HIF-2 $\alpha$ , mTOR, TSC1, eIF4E-BP1, p70S6K1, AMPK, REDD1 and PDK3 proteins was determined using Western blot method. Immunohistochemistry was performed for semi-quantitative analysis of TSC2 protein.

Alteration of *VHL* gene and/or changes of 3p loci were detected in 37/47 (78.7 %) analysed tumorous samples. Monoallelic inactivation of *VHL* gene (intragenic mutation or loss of heterozygosity of 3p loci) occurred in 10/47 (21.3 %) tumorous



samples. Biallelic inactivation of *VHL* gene were found in 27/47 (57.4 %) tumorous samples or 27/31 (87.1 %) samples with mutation in *VHL* gene. Tumors with wt *VHL* gene have shown significantly higher Furhman's nuclear grade in comparison to tumors with monoallelic and biallelic inactivation of *VHL* gene. This study has shown association of *VHL* gene mutational status with expression levels of TSC1, REDD1, and PDK3 proteins.

To our knowledge, this was the first study performed on clear cell renal cell carcinoma that has examined the expression level of PDK3 protein and its association with *VHL* gene mutational status. Scientific rationale for our study was results that provide information about the expression levels of mTOR signaling pathway components according to mutational status of *VHL* gene and contribute to better insights into molecular mechanisms involved in oncogenesis of renal tissue.

**Keywords:** clear cell renal cell carcinoma, *VHL* gene, mTOR signaling pathway, cellular metabolism.

**Scientific field:** Biology

**Special topic:** Molecular biology

**UDC number:** 616-006.6:[575.224.2:[577.112:612.46]](043.3)

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Epidemiologija, etiologija i klasifikacija karcinoma bubrega .....	1
1.2. Svetloćelijski karcinom bubrega .....	4
1.2.1. TNM sistem klasifikacije svetloćelijskog karcinoma bubrega.....	4
1.2.2. Furmanov nuklearni gradus kao sistem klasifikacije svetloćelijskog karcinoma bubrega .....	5
1.3. Strukturna organizacija gena <i>VHL</i> .....	6
1.4. Struktura i funkcija proteina VHL .....	7
1.5. Uloga proteina VHL u regulaciji faktora indukovanih hipoksijom .....	9
1.6. Uloga mTOR signalnog puta u patogenezi svetloćelijskog karcinoma bubrega.....	11
1.6.1. Strukturna organizacija i funkcija kompleksa mTORC1 i mTORC2 .	12
1.6.1.1. Strukturne komponente kompleksa mTORC1 .....	13
1.6.1.2. Strukturne komponente kompleksa mTORC2.....	14
1.6.2. Regulacija kompleksa mTORC1 .....	15
1.6.2.1. Regulacija kompleksa mTORC1 mitogenim faktorima.....	15
1.6.2.1.1. Struktura i funkcija kompleksa TSC1/TSC2 .....	17
1.6.2.2. Regulacija kompleksa mTORC1 u zavisnosti od energetskog statusa ćelije .....	18
1.6.2.3. Regulacija kompleksa mTORC1 u hipoksičnim uslovima .....	18
1.6.3. Efektorni molekuli kompleksa mTORC1 .....	19
1.6.4. Regulacija kompleksa mTORC2.....	20
1.6.5. Efektorni molekuli kompleksa mTORC2.....	21
1.7. Uloga kompleksa mTORC1 u regulaciji ćelijskog metabolizma.....	21
<b>2. CILJEVI RADA .....</b>	<b>25</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>26</b>
3.1. Materijal .....	26
3.2. Metode .....	26

3.2.1. Izolacija genomske DNK iz uzoraka pune periferne krvi i tkiva bubrega.....	26
3.2.2. Umnožavanje fragmenata DNK lančanom reakcijom polimeraze .....	28
3.2.3. Detekcija germinativnih i somatskih mutacija gena <i>VHL</i> metodom automatskog sekvenciranja .....	31
3.2.4. Detekcija germinativnih i somatskih mutacija gena <i>VHL</i> metodom amplifikacije višestruko ligiranih proba.....	34
3.2.5. Analiza metilacionog statusa promotorskog regiona gena <i>VHL</i> .....	36
3.2.6. Analiza gubitka heterozigotnosti 3p lokusa ( <i>eng. Loss of Heterozigosity, LOH</i> ).....	39
3.2.7. Analiza nivoa HIF-2 $\alpha$ iRNK metodom kvantitativnog RT-PCR u realnom vremenu.....	41
3.2.8. Analiza nivoa proteina HIF-2 $\alpha$ , mTOR, TSC1, eIF4E-BP1, p70S6K1, AMPK, REDD1 i PDK3 Western Blot metodom.....	47
3.2.9. Analiza nivoa proteina TSC2 metodom imunohistohemije .....	52
3.2.10. Statistička obrada rezultata.....	53
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>54</b>
4.1. Rezultati analize mutacionog statusa gena <i>VHL</i> .....	54
4.1.1. Rezultati analize mutacionog statusa gena <i>VHL</i> metodom automatskog sekvenciranja.....	54
4.1.2. Rezultati analize mutacionog statusa gena <i>VHL</i> metodom amplifikacije višestruko ligiranih proba.....	56
4.1.3. Rezultati analize metilacionog statusa promotorskog regiona gena <i>VHL</i> .....	59
4.1.4. Rezultati analize gubitka heterozigotnosti 3p lokusa .....	59
4.1.5. Klasifikacija uzoraka tumorskog tkiva u odnosu na mutacioni status gena <i>VHL</i> .....	61
4.2. Rezultati analiza asocijacije patohistoloških parametara sa mutacionim statusom gena <i>VHL</i> .....	63
4.3. Rezultati analiza asocijacije nivoa HIF-2 $\alpha$ iRNK sa mutacionim statusom gena <i>VHL</i> .....	63

4.4.	Rezultati analiza nivoa proteina HIF-2 $\alpha$ , mTOR, TSC1, eIF4E-BP1, p70S6K1, AMPK, REDD1 i PDK3 Western Blot metodom.....	64
4.4.1.	Rezultati analiza asocijacije nivoa proteina HIF-2 $\alpha$ sa mutacionim statusom gena <i>VHL</i> .....	64
4.4.2.	Rezultati analiza asocijacije nivoa proteina mTOR sa mutacionim statusom gena <i>VHL</i> .....	65
4.4.3.	Rezultati analiza asocijacije nivoa proteina TSC1 sa mutacionim statusom gena <i>VHL</i> .....	66
4.4.4.	Rezultati analiza asocijacije nivoa proteina eIF4E-BP1 sa mutacionim statusom gena <i>VHL</i> .....	67
4.4.5.	Rezultati analiza asocijacije nivoa proteina p70S6K1 sa mutacionim statusom gena <i>VHL</i> .....	68
4.4.6.	Rezultati analiza asocijacije nivoa proteina AMPK sa mutacionim statusom gena <i>VHL</i> .....	69
4.4.7.	Rezultati analiza asocijacije nivoa proteina REDD1 sa mutacionim statusom gena <i>VHL</i> .....	70
4.4.8.	Rezultati analiza asocijacije nivoa proteina PDK3 sa mutacionim statusom gena <i>VHL</i> .....	71
4.5.	Rezultati analize nivoa ekspresije proteina TSC2 metodom imunohistohemije i asocijacija sa mutacionim statusom gena <i>VHL</i> .....	72
4.6.	Rezultati multiple regresione analize .....	74
4.6.1.	Rezultati multiple regresione analize za uzorke tumorskih tkiva sa wt genom <i>VHL</i> .....	74
4.6.1.1.	Rezultati multiple regresione analize sa Furmanovim gradusom kao zavisnom promenljivom.....	74
4.6.1.2.	Rezultati multiple regresione analize sa proteinom HIF-2 $\alpha$ kao zavisnom promenljivom.....	74
4.6.1.3.	Rezultati multiple regresione analize sa proteinom TSC1 kao zavisnom promenljivom.....	75
4.6.1.4.	Rezultati multiple regresione analize sa proteinom p70S6K1 kao zavisnom promenljivom.....	76

4.6.1.5. Rezultati multiple regresione analize sa proteinom PDK3 kao zavisnom promenljivom.....	76
4.6.2. Rezultati multiple regresione analize za uzorke tumorskih tkiva sa monoalelnom inaktivacijom gena <i>VHL</i> .....	77
4.6.2.1. Rezultati multiple regresione analize sa proteinom HIF-2 $\alpha$ kao zavisnom promenljivom.....	77
4.6.2.2. Rezultati multiple regresione analize sa proteinom AMPK kao zavisnom promenljivom.....	78
4.6.2.3. Rezultati multiple regresione analize sa proteinom REDD1 kao zavisnom promenljivom.....	78
4.6.3. Rezultati multiple regresione analize za uzorke tumorskih tkiva sa bialelnom inaktivacijom gena <i>VHL</i> .....	79
4.6.3.1. Rezultati multiple regresione analize sa proteinom HIF-2 $\alpha$ kao zavisnom promenljivom.....	79
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>80</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>93</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>94</b>

Stručna biografija

Prilog 1. Izjava o autorstvu

Prilog 2. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Prilog 3. Izjava o korišćenju

# 1. UVOD

## 1.1. Epidemiologija, etiologija i klasifikacija karcinoma bubrega

Karcinom bubrega (eng. *Renal Cell Carcinoma*, RCC) predstavlja neoplaziju epitelijalnih ćelija proksimalnih tubula bubrega, čini preko 90% tumora bubrega i 2-3 % svih karcinoma sa najvećom incidencom u razvijenim zemljama. U protekle dve decenije godišnji porast incidence renalnih karcinoma u zemljama Evrope iznosio je 2 % (Ljunberg et al. 2014). Prema podacima Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ u našoj populaciji prisutan je trend porasta broja obolelih od karcinoma bubrega (Cancer Registry of Central Serbia, 2012). Karcinom bubrega se najčešće javlja kod osoba između 60 i 70 godina starosti, sa većom učestalošću kod muškaraca (1.5:1). Faktori rizika za pojavu karcinoma bubrega su pušenje, gojaznost, hipertenzija, kao i porodična anamneza. Za razliku od sporadičnih, familijarni karcinom bubrega sa sindromskom ili nesindromskom prezentacijom nastaje u ranoj životnoj dobi (Ljunberg et al. 2014). Identifikovani su geni koji su odgovorni za razvoj hereditarnih sindroma u kojim participira tumor bubrega: von Hippel Lindau sindrom (VHL), hereditarni papilarni renalni karcinom (HPRC), Birt-Hogg Dubé sindrom (BHD), hereditarni lejomiomatozni renalni karcinom, tuberozna skleroza i familijarni onkocitom (Tabela 1) (Beltran et al. 2006; Bodmer et al. 2002).

Tumori bubrega se prema klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization*, WHO) iz 2004. godine zasnovanoj na patohistološkim i genetičkim karakteristikama dele na: familijarne karcinome bubrega i sporadične tumore bubrega u koje spadaju maligni (eng. *Renal Cell Carcinoma*, RCC) i benigni tumori bubrega, metanefrički tumori, mešoviti mezenhimalni i epitelijalni tumori, nefroblastički tumori, neuroendokrini i drugi tumori (Tabela 2) (Beltran et al. 2006).

**Tabela 1.** Familijarni RCC sa sindromskom i nesindromskom prezentacijom (Beltran et al. 2006)

<b>Sindrom</b>	<b>Gen</b>	<b>Tip tumora</b>
Von Hippel-Lindau (VHL)	<i>VHL</i> (3p25)	svetloćelijski
Tuberozna skleroza	<i>TSC1, TSC2</i>	angiomiolipom, svetloćelijski, drugi
Konstitutivna translokacija hromozoma 3	nije identifikovan*	svetloćelijski
Familijarni karcinom bubrega	nije identifikovan	svetloćelijski
Hereditarni PRCC	<i>c-MET</i>	papilarni tip 1
Birt-Hogg-Dubbe (BHD)	<i>BHD</i>	hromofobni**
Familijarni onkocitom	parcijalni gubitak različitih hromozoma	onkocitom
Hereditarni lejomiom-RCC	<i>FH</i>	papilarni tip 2

\* Gen *VHL* mutiran je u pojedinim familijama

\*\* Renalni onkocitomi, hibridni onkocitomi i svetloćelijski karcinomi

**Tabela 2.** Klasifikacija tumora bubrega prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (Beltran et al. 2006)

<b>Familijarni karcinom bubrega</b>	
<b>Tumori bubrega</b>	
<b>Maligni tumori</b>	<b>Benigni tumori</b>
Svetloćelijski karcinom bubrega	Papilarni adenom
Multilokularni svetloćelijski karcinom bubrega	Onkocitom
Papilarni karcinom bubrega	
Hromofobni karcinom bubrega	
Karcinom sabirnih kanalića	
Medularni karcinom bubrega	
Karcinom bubrega asociran sa Xp11 translokacijom	
Karcinom asociran sa neuroblastomom	
Karcinom mucinoznih, tubularnih i vretenastih ćelija	
Neklasifikovani karcinom bubrega	
<b>Metanefrički tumori</b>	
Metanefrički adenom	
Metanefrički adenofibrom	
Metanefrički stromalni tumor	
<b>Mešoviti mezenhimalni i epitelijalni tumori</b>	
Cistični nefrom	
Mešoviti epitelijalni i stromalni tumor	
Sinovijalni sarkom	
<b>Nefroblastični tumori</b>	
Nefrogeni ostatak	
Nefroblastom	
Cistični parcijalno diferentovani nefroblastom	
<b>Neuroendokrini tumori</b>	
Karcinoid	
Neuroendokrini karcinom	
Primitivni neuroektodermalni tumor	
Neuroblastom	
Feohromocitom	
<b>Ostali tumori</b>	
Mezenhimalni tumor	
Hematopoetski i limfoidni tumori	
Tumori germinalnih ćelija	
Metastatski tumori	



## 1.2. Svetloćelijski karcinom bubrega

Svetloćelijski karcinom bubrega (eng. *clear cell Renal Cell Carcinoma*, ccRCC) je solitarni, nasumično distribuirani i dobro vaskularizovan tumor kore bubrega izgrađen od ćelija sa svetlom eozinofilnom citoplazmom. Makroskopski, ccRCC je zlatno žute boje koja potiče od bogatog sadržaja holesterola, neutralnih lipida i fosfolipida. U okviru tumora prisutne su ciste, nekrotične i hemoragične zone, kao i zone kalcifikacije. Svi karcinomi bubrega svetloćelijskog tipa smatraju se malignim, nezavisno od veličine, metastaziraju najčešće u pluća i limfne žlezde i indukuju slab inflamatorni odgovor (Algaba et al. 2011).

Svetloćelijski karcinom bubrega javlja se u okviru VHL sindroma i u sporadičnoj formi kao posledica germinativne, odnosno somatske mutacije jednog alela tumor supresorskog gena *VHL* i somatske inaktivacije drugog, *wt* (eng. *wild type*) alela (Kim i Kaelin 2004; Kaelin i Maher 1998; Nordstrong-O'Brien et al. 2010; Banks et al. 2006; Knudson 2001; Maher i Kaelin 1997; Maher et al. 2011). Somatska bialelna inaktivacija gena *VHL* podrazumeva prisustvo mutacije/gubitka heterozigotnosti na drugom alelu ili njegovo transkripciono utišavanje epigenetičkim mehanizmom - hipermetilacijom *CpG* ostrvaca u okviru promotora (Herman et al. 1994; Clifford et al. 1998). Nastanak svetloćelijskog karcinoma bubrega asociran je i sa delecijama hromozoma 3p, 6q, 8p, 9p, 14q i duplikacijama hromozoma 5q22 (Beltran et al. 2006; Linehan et al. 2010).

### 1.2.1. TNM sistem klasifikacije svetloćelijskog karcinoma bubrega

Stepen napredovanja bolesti određuje se korišćenjem TNM sistema klasifikacije (eng. *Tumour Node Metastasis*, TNM) kojim se opisuju veličina primarnog tumora (T), prisustvo metastaza u regionalnim limfnim žlezdama (N) i prisustvo udaljenih metastaza (M). Za određivanje stadijuma karcinoma bubrega preporučuje se UICC (eng. *The Union for International Cancer Control*) TNM sistem klasifikacije iz 2010. godine (Tabela 3) (Ljunberg et al. 2014).

**Tabela 3.** TNM klasifikacija svetloćelijskog karcinoma bubrega (Ljunberg et al. 2014)

<b>T Primarni tumor</b>
T0x - primarni tumor nije detektabilan
T1 - tumor veličine do 7 cm, ograničen na bubreg
T1a - tumor veličine do 4 cm, ograničen na bubreg
T1b - tumor > 4 cm, ali $\leq$ 7 cm
T2 - tumor > 7 cm, ograničen na bubreg
T2a - tumor > 4 cm, ali $\leq$ 10 cm
T2b - tumor > 10 cm, ograničen na bubreg
T3 - tumor zahvata glavne vene, perirenalno masno tkivo, ali ne i ipsilateralnu nadbubrežnu žlezdu
T3a - tumor zahvata renalnu venu ili njene grane, perirenalno tkivo i/ili renalni sinus, ali ne probija Gerota fasciju
T3b - tumor zahvata venu kavu ispod dijafragme
T3c - tumor zahvata venu kavu ili njen zid iznad dijafragme
T4 - tumor probija Gerota fasciju i ipsilateralnu nadbubrežnu žlezdu
<b>N Regionalne limfne žlezde</b>
Nx - metastaze u regionalnim limfnim žlezdama nisu detektabilne
N0 - metastaze u regionalnim limfnim žlezdama nisu prisutne
N1 - metastaze su prisutne u jednoj limfnoj žlezdi
N2 - metastaze su prisutne u više od jedne limfne žlezde
<b>M Udaljene metastaze</b>
M0 - metastaze u udaljenim organima nisu prisutne
M1 - metastaze su prisutne u udaljenim organima

### **1.2.2. Furmanov nuklearni gradus kao sistem klasifikacije svetloćelijskog karcinoma bubrega**

Furmanov nuklearni gradus predstavlja sistem klasifikacije svetloćelijskog karcinoma bubrega zasnovan na morfološkim karakteristikama nukleusa i nukleolusa (Tabela 4) i pored TNM klasifikacije najznačajniji je prognostički parametar. Furmanov

gradus određuje se mikroskopskom analizom svetloćelijskog karcinoma bubrega primenom malog uvećanja mikroskopa (10x) (Fuhrman et al. 1982).

**Tabela 4.** Furmanov nuklearni gradus (Modifikovano Fuhrman et al. 1982)

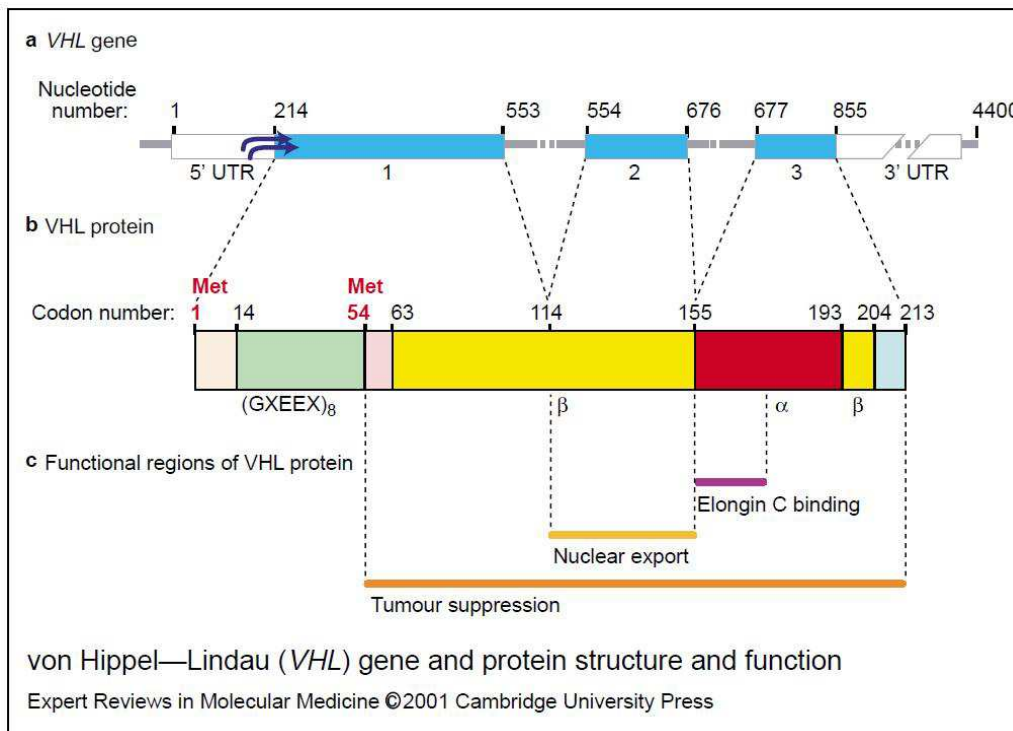
---

<b>Gradus 1</b>
okrugli hiperhromatski nukleusi (< 10 µm), nukleolusi nisu vidljivi;
<b>Gradus 2</b>
nukleusi (10-15 µm) sa fino granuliranim "otvorenim" hromatinom, nukleolusi su prisutni, slabo vidljivi;
<b>Gradus 3</b>
nukleusi ovalnog oblika (20 µm) sa grubo granuliranim hromatinom, izraženi nukleolusi;
<b>Gradus 4</b>
pleomorfni nukleusi sa "otvorenim" hromatinom, prisustvo jednog ili više makronukleolusa;

---

### 1.3. Strukturna organizacija gena *VHL*

Gen *VHL* mapiran je na kraćem kraku trećeg hromozoma (3p25-26), obuhvata region dužine od oko 10 kb i sastoji se od tri konzervirana egzona (Slika 1). Transkripcioni produkt gena *VHL* je 4.7 kb duga informaciona ribonukleinska kiselina (iRNK) koja je eksprimirana u fetalnim i adultnim tkivima. Pomenuta iRNK sadrži dva otvorena okvira čitanja (eng. *open reading frame*, ORF), AUG start mesta (kodon 1 i 54) i kodira dve proteinske izoforme, pVHL30 (213 amino kiselina, 24-30 kDa) koja je predominantno lokalizovana u citoplazmi i pVHL19 (160 amino kiselina, 19 kDa) sa nukleusnom i citoplazmatskom lokalizacijom, što sugeriše da u određenim uslovima ove izoforme mogu eksprimirati različite funkcije (Richards 2001; Robinson i Ohh 2014). Funkcionalnim analizama pokazano je da obe izoforme ispoljavaju tumor supresorski efekat u *in vivo* uslovima (Gossage 2014).



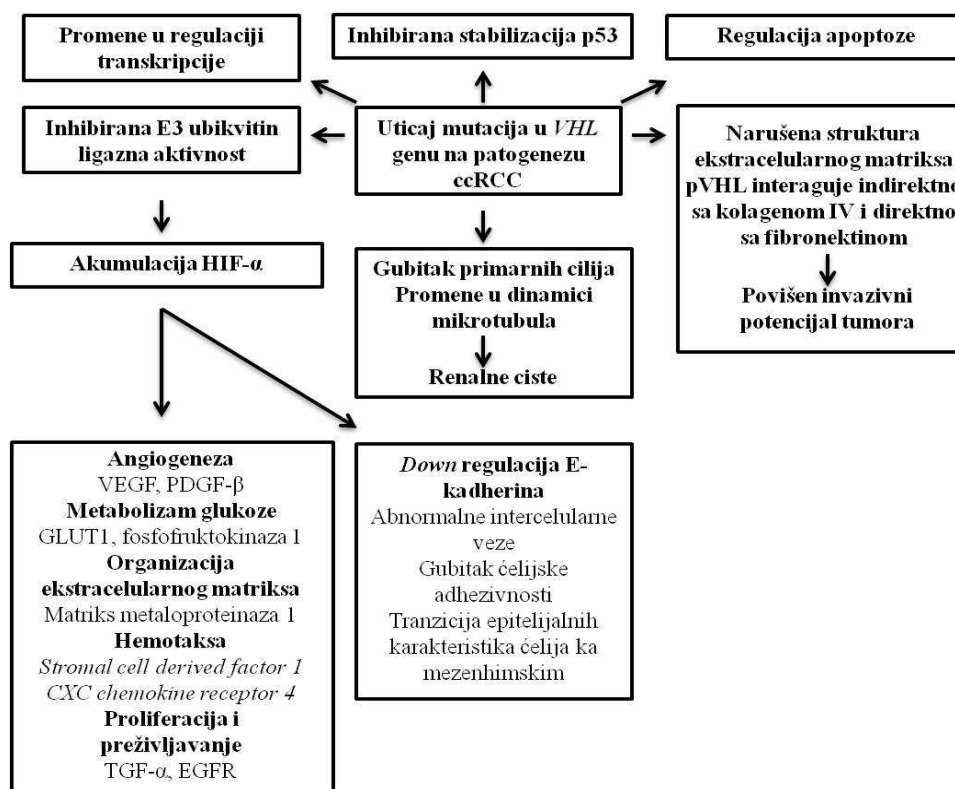
**Slika 1.** Struktura gena *VHL* i proteina VHL (Modifikovano Richards 2001)

#### 1.4. Struktura i funkcija proteina VHL

Protein VHL (pVHL) je multifunkcionalni adapterski molekul koji ostvaruje tumor supresorski efekat na više nivoa (Slika 2) (Decker et al. 1997). pVHL sadrži vezujuće mesto -  $\alpha$  domen i aminokiselinsku sekvencu za prepoznavanje supstrata -  $\beta$  domen (Slika 1).

Protein VHL formira multiproteinski kompleks sa elonginom B i C, kulinom 2 i Rbx-1 koji ispoljava E3 ubikvitin ligaznu aktivnost i učestvuje u promovisanju degradacije različitih proteina (Maher 2011; Lisztwan et al. 1999; Lee et al. 2005; Kuznetsova et al. 2003). Direktnim vezivanjem za glikoprotein fibronektin i kolagen IV  $\alpha 2$  (COL4 $\alpha 2$ ) podpomaže organizovanje ekstracelularnog matriksa, pa je u pVHL<sup>-/-</sup> negativnim tumorima uočena povišena sekrecija fibronektina, uz deficit kolagena, što narušava arhitekturu ekstracelularnog matriksa i olakšava infiltraciju nove mreže krvnih sudova (Ohh et al. 1998; Kurban et al. 2008). pVHL ima sposobnost vezivanja za

mikrotubule čime inhibira njihovu depolimerizaciju, posredno delujući na održavanje oblika i polariteta ćelije, formiranje cilija i mitotskog vretena. Pokazano je da pVHL kolokalizuje sa komponentama deobnog vretena i da njegov gubitak indukuje hromozomsku nestabilnost (Thoma et al. 2009). Gubitak cilija adultnih bubrežnih ćelija jedna je od prvih morfoloških promena koja prethodi formiranju renalnih cista, koje su indikacija prekanceroznog patološkog stanja.



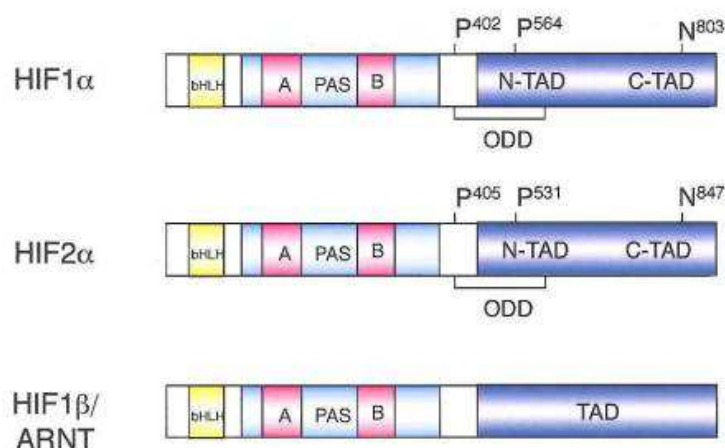
**Slika 2.** Uticaj mutacija u genu *VHL* na patogenezu svetloćelijskog karcinoma bubrega (Modifikovano Gossage et al., 2010)

Protein VHL uključen je u ćelijski odgovor na DNK oštećenja (eng. *DNA damage response*), modulaciju aktivnosti regulatora apoptoze, uvođenje ćelije u stanje “quiescent-a”, regulaciju plazminogen aktivirajućeg sistema urokinaznog tipa i inhibiciju invazije indukovanu hepatocitnim faktorom rasta u karcinomima bubrega (Roe et al. 2011; Metcalf et al. 2014; Roberts et al. 2009; Yang et al. 2007; preuzeto sa <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/VHLID132.html>).

## 1.5. Uloga proteina VHL u regulaciji faktora indukovanih hipoksijom

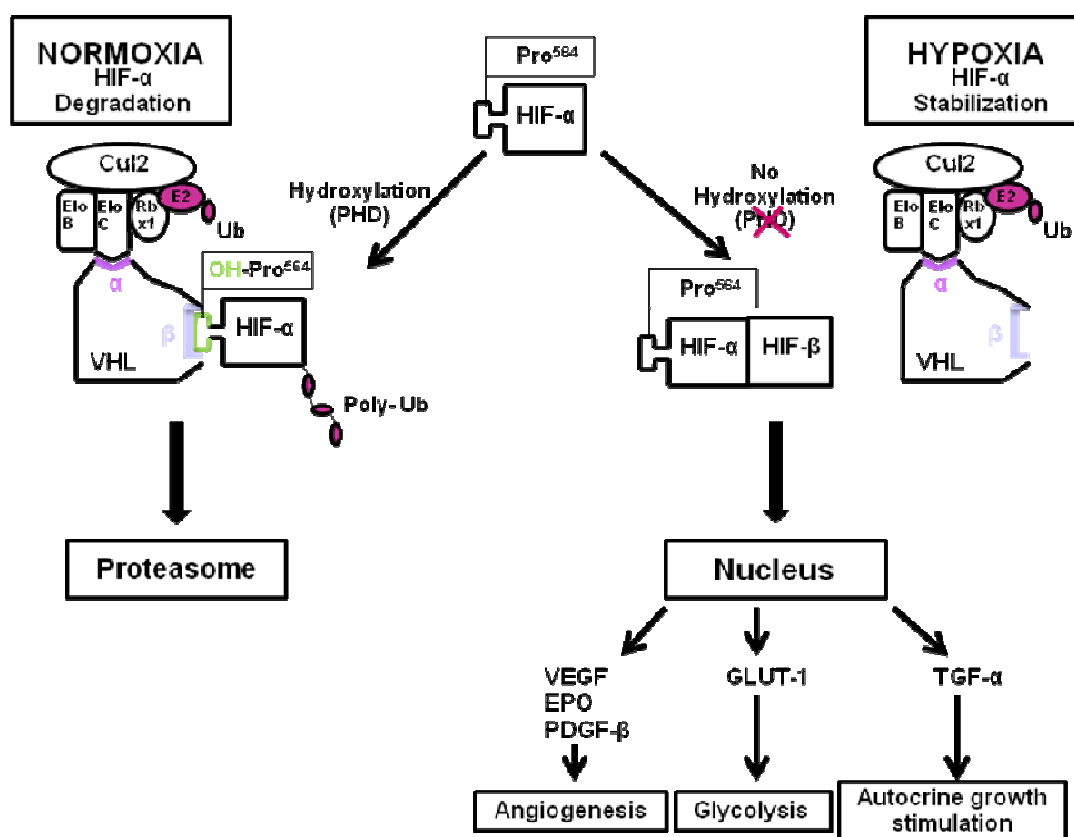
Familija faktora indukovanih hipoksijom (eng. *Hypoxia-inducible factors*, HIFs), ima izuzetno značajnu ulogu u procesu tumorigeneze bubrežnog tkiva (Kaelin 2008; Gunaratnam i Bonventre 2009).

Faktori indukovani hipoksijom pripadaju familiji transkripcionih regulatora sa bHLH (eng. *basic helix-loop-helix*, bHLH) i PAS (PER-ARNT-SIM) domenima koji vezivanjem za regulatorne sekvence HRE (eng. *Hypoxia Response Elements*, HRE) indukuju ekspresiju gena uključenih u regulaciju procesa angiogeneze, eritropoeze, proliferacije tumorskih ćelija, progresije metastaza, apoptoze i metabolizma glukoze u hipoksičnim i pseudohipoksičnim uslovima. Transkripciono funkcionalan HIF je heterodimerni molekul izgrađen od subjedinic  $\alpha$  (izoforme HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  ili HIF-3 $\alpha$ ) i  $\beta$  (HIF-1 $\beta$ /Arnt, eng. *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*, izoforme Arnt1, Arnt2 i Arnt3) (Slika 3) (Gunaratnam i Bonventre 2009). Subjedinice HIF- $\alpha$  i  $\beta$  pokazuju značajan stepen strukturne homologije. Subjedinica  $\beta$  je konstitutivno eksprimirana, dok je subjedinica  $\alpha$  okarakterisana izrazito kratkim vremenom poluživota, izuzev u uslovima hipoksije ili pseudohipoksije (Wang et al. 1995; Semenza et al. 1995; Semenza 2001; Dayan et al. 2006; Hu et al. 2007; Tanaka et al. 2009).



**Slika 3.** Strukturna organizacija faktora indukovanih hipoksijom HIF- $\alpha/\beta$  (Modifikovano Gunaratnam et al. 2009)

U normoksičnim uslovima, sposobnost transkripcionog regulatora HIF- $\alpha$  da indukuje transkripciju onemogućena je hidroksilacijom prolinskih ostataka u okviru degradacionog domena zavisnog od kiseonika (eng. *Oxygen Dependent Degradation domain*, ODD). Hidroksilacija ODD domena ostvaruje se aktivnošću enzima prolil hidroksilaza (eng. *Prolyl hydroxylases* 1-4, PHDs), koje pripadaju familiji 2-oksoglutarat- i Fe-zavisnih dioksigenaza (Kaelin 2005a; Bruick i McKnight 2001). Prolil hidroksilaze vrše hidroksilaciju prolinskih aminokiselinskih ostataka na pozicijama 402 i 564 subjedinice HIF-1 $\alpha$ , odnosno 405 i 531 subjedinice HIF-2 $\alpha$  (Smirnova et al. 2012; Appelhoff et al. 2004; Semenza 2004). pVHL, kao komponenta ECV kompleksa preko svog  $\beta$ -domena ostvaruje interakciju sa ODD domenom hidroksilirane HIF- $\alpha$  subjedinice, što rezultira njenom polikubikvitinacijom i brzom proteazomalnom degradacijom (Slika 4) (Maxwell et al. 1999; Salceda et al. 1997).



**Slika 4.** Uloga pVHL i HIF- $\alpha$  u normoksičnim i hipoksičnim uslovima (Modifikovano Linehan et al. 2010)

U hipoksičnim uslovima, kao i u slučaju odsustva ili haploinsuficijencije funkcionalnog pVHL, takođe dolazi do stabilizacije subjediniice HIF- $\alpha$  (Slika 4). VHL nezavisna stabilizacija HIF- $\alpha$  dešava se u pseudohipoksičnim uslovima kada akumulirani fumarat ili sukcinat inaktiviraju prolil hidroksilazu. Akumulacija intermedijera Krebsovog ciklusa posledica je enzimatske neaktivnosti fumarat hidrataze ili sukcinat dehidrogenaze indukovane mutacijama odgovarajućih gena (*FH* ili *SDHB*) (Bratslavsky et al. 2007; Bardella et al. 2011; López-Jiménez et al. 2010). Subjediniice HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  se iz citoplazme translociraju u nukleus gde dolazi do dimerizacije sa subjediniicom HIF-1 $\beta$ . Formirani heterodimerski kompleks regrutuje koaktivatore p300 i CREB-vezujući protein (CBP), vezuje se za konsenzus HRE elemente i indukuje transkripciju ciljnih gena. Dodatno, regulacija se ostvaruje i faktorom FIH1 (eng. *factor inhibiting HIF-1*, FIH-1) koji u uslovima umerene hipoksije dovodi do hidroksilacije konzerviranog asparaginskog ostatka u blizini C-TAD regiona čime je onemogućena interakcija sa koaktivatorom p300 i CBP proteinom (Morris et al. 2004; Mahon et al. 2001). U odsustvu kiseonika, katalitička aktivnost FIH-a je inhibirana, čime je omogućeno uspostavljanja stabilnije interakcije između faktora indukovanih hipoksijom i promotora ciljnih gena (Lando et al. 2002; Semenza 2003).

Pored regulacije ekspresije istih gena, izoforme HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  ispoljavaju i potpuno suprotne efekte u regulaciji onkoproteina i tumor supresora kao što su MYC, mTOR i p53 (Keith et al. 2011). Pokazano je da u svetloćelijskim karcinomima bubrega HIF-1 $\alpha$  inhibira rast tumora ispoljavajući tumor supresorsku aktivnost, dok HIF-2 $\alpha$  svojim snažnim onkogenim potencijalom stimuliše rast tumora (Raval et al. 2005).

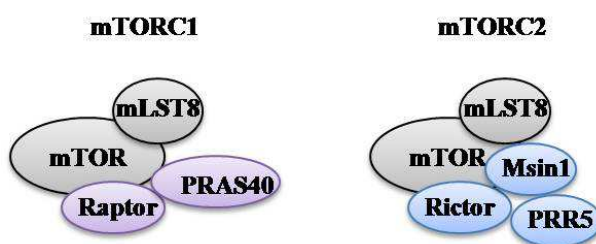
## **1.6. Uloga mTOR signalnog puta u patogenezi svetloćelijskog karcinoma bubrega**

Svetloćelijski karcinom bubrega karakteriše povišena aktivnost mTOR signalnog puta koji reguliše uspostavljanje balansa između kataboličkih i anaboličkih procesa, omogućavajući ćelijsko preživljavanje, rast i proliferaciju u uslovima promenljive raspoloživosti hranljivih materija i energije. Promene u regulaciji mTOR signalnog puta karakteristične su za različita patološka stanja, uključujući karcinom, dijabetes, gojaznost i neurodegenerativne promene (Laplane i Sabatini 2012).



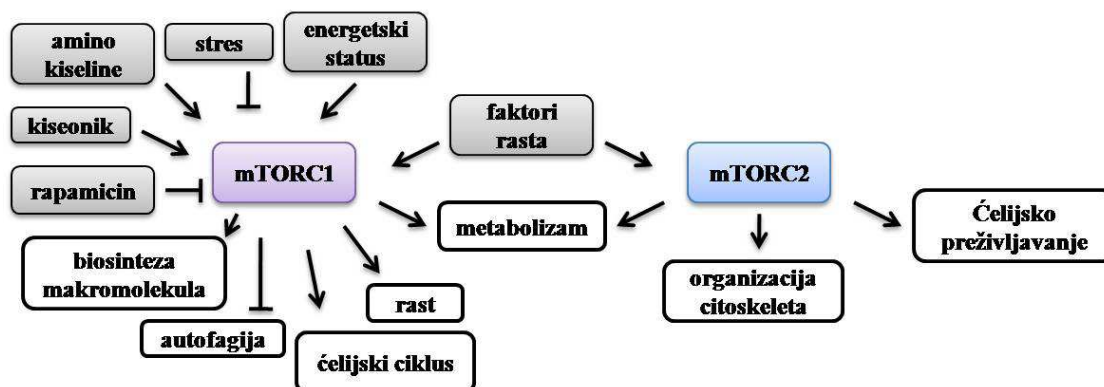
### 1.6.1. Strukturna organizacija i funkcija kompleksa mTORC1 i mTORC2

Protein mTOR (eng. *mammalian Target of Rapamycin*, mTOR) je serin/treonin kinaza koja svoju funkciju ostvaruje u okviru dva evolutivno konzervirana multiproteinska kompleksa mTORC1 i mTORC2 (Slika 5) (Laplante i Sabatini 2012).



Slika 5. Strukturna organizacija kompleksa mTORC1 i mTORC2 (Modifikovano Laplante i Sabatini 2012)

Identifikovani su u kvascu na osnovu različite senzitivnosti na dejstvo fungicida rapamicina koji inhibira aktivnost mTORC1 (Li et al. 2014). Produženo dejstvo rapamicina ispoljava inhibitorski efekat i na mTORC2 (Sarbasov et al. 2006). mTORC1 kao glavni senzor mitogenih signala, energetskog i nutritivnog statusa učestvuje u regulaciji ćelijskog rasta, proliferacije i preživljavanja optimizujući aktivnost različitih celularnih procesa koji uključuju sintezu proteina, biogenezu ribozoma, lipida i organela, autofagiju i metabolizam (Slika 6) (Laplante i Sabatini 2012; Guertin i Sabatini 2001; Wullschleger et al. 2006). mTORC2 uključen je u regulaciju organizacije aktinskog citoskeleta i ćelijskog preživljavanja (Zinzalla et al. 2011).



Slika 6. Funkcija kompleksa mTORC1 i mTORC2 (Modifikovano Laplante i Sabatini 2012)

### 1.6.1.1. Strukturne komponente kompleksa mTORC1

Funkcionalni kompleks mTORC1 prisutan je u formi homodimera koji je konstituisan od sledećih subjedinica: proteina mTOR, pozitivnih regulatora raptora (eng. *regulatory associated protein of mTOR*, raptor) i proteina mLST8 (eng. *mammalian lethal with Sec thirteen protein 8*, mLST8) i negativnih regulatora, PRAS40 (eng. *proline-rich Akt substrate 40 kDa*, PRAS40) i DEPTOR (eng. *DEP domain TOR-binding protein*, DEPTOR) (Slika 5) (Laplante i Sabatini 2012; Zhou i Huang 2010).

Multidomenski molekul mTOR poznat kao FRAP (eng. *FKBP12-rapamycin-associated protein*, FRAP), RAPT 1 (eng. *Rapamycin Target 1*, RAPT 1) ili SEP (eng. *Sirolimus Effector Protein*, SEP), predstavlja atipičnu serin/treonin kinazu molekulske mase od 289 kDa koja pripada superfamiliji PIKK kinaza (eng. *phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-kinase-related kinase*, PIKK) (Populo et al. 2012; Gingras et al. 2001; Bai i Jiang 2010).

Raptor je konstitutivna subjedinica koja reguliše aktivnost kompleksa mTORC1 u odgovoru na insulin, nutritivni i energetska status. Učestvuje u regrutovanju supstrata i njihovom pozicioniranju uz katalitički domen molekula mTOR, omogućavajući fosforilaciju nishodnih efektornih molekula, p70S6 kinaze 1 (eng. *ribosomal protein S6 kinase*, p70S6K1) i vezujućeg proteina eukariotskog inicijacionog faktora translacije (eng. *eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1*, eIF4E-BP1). Raptor eksprimira efekat pozitivnog ili negativnog regulatora kompleksa mTORC1, u zavisnosti od fosforilacionog statusa. U uslovima energetske stresa, AMPK (eng. *AMP-activated protein kinase*) posredovanom fosforilacijom serinskih ostataka S722/792 raptora dolazi do supresije mTORC1 aktivnosti i zaustavljanja ćelijskog ciklusa. Suprotan efekat na aktivnost mTORC1 ispoljava fosforilacija raptora na pozicijama S719/721/722 od strane p90 ribozomalnih S6 kinaza (RSK) tokom stimulacije mitogenim faktorima (Hara et al. 2002).

mLST8 subjedinica ostvaruje interakciju sa kinaznim domenom mTOR-a i stimuliše njegovu kinaznu aktivnost (Hara et al. 2002). Prema podacima određenih autora mLST8 je neophodan za interakciju raptora i mTOR-a (Kim et al. 2003), dok

drugi smatraju da je mLST8 primarno odgovoran za regulaciju aktivnosti kompleksa mTORC2 kao posrednik u ostvarivanju interakcije između riktora i mTOR-a (Tchevkina i Komelkov 2012).

Aktivnost PRAS40 subjedinice modulirana je fosforilacijom serina na različitim pozicijama od strane Akt/PKB kinaza (eng. *PKB, Protein kinase B*), 14-3-3 vezujućeg proteina i kompleksa mTORC1. U uslovima energetske deficita povećan je nivo ekspresije PRAS40 i njegove asocijacije sa mTORC1 kompleksom preko raptora (Oshiro et al. 2007; Wang et al. 2007), pri čemu je inhibirana aktivnost mTORC1. Utišavanje ekspresije PRAS40 redukuje fosforilaciju S6K stimulisanu insulinom, što ulogu PRAS40 u regulaciji aktivnosti mTORC1 čini kompleksnijom (Bai i Jiang 2010).

DEPTOR deluje inhibitory na aktivnost mTORC1 i mTORC2 signalnih puteva. Povećanje nivoa ekspresije DEPTOR-a indukuje aktivaciju PI3K puta i paradoksalno, mTORC2 zavisnih Akt kinaza (Peterson et al. 2009).

#### **1.6.1.2. Strukturne komponente kompleksa mTORC2**

Kompleks mTORC2 pored subjedinica mTOR, mLST8 i DEPTOR, sadrži rikator (eng. rapamycin-insensitive companion of mTOR, rictor), mSin1 (eng. mammalian stress-activated protein kinase (SAPK)-interacting protein 1, mSin1) i protor (eng. protein observed with rictor) (Slika 5) (Laplante i Sabatini 2012).

Rikator je mTOR asociirani protein koji učestvuje u modulaciji fosforilacije Akt-a, PKC $\alpha$ , fokalnih adhezionih proteina i malih GTP-aza, ukazujući na ulogu mTORC2 u ćelijskoj migraciji i preživljavanju (Sarbasov et al. 2005; Zhou i Huang 2011).

Subjedinica mSin1 odgovorna je za formiranje i održavanje integriteta kompleksa mTORC2. U odsustvu mSin1, narušena je interakcija između riktora i mTOR-a (Yang i Guan 2007; Frias et al. 2006).

Protor ostvaruje kontakt sa mTOR-om posredstvom riktora, ne utiče na integritet i katalitičku aktivnost mTORC2. Stabilnost protora zavisi od ekspresije ostalih

komponentata kompleksa mTORC1 (Tchevkina i Komelkov 2012). Funkcionalni značaj protora još uvek nije poznat (Woo et al. 2007; Gatherar et al. 2004).

### **1.6.2. Regulacija kompleksa mTORC1**

Aktivnost kompleksa mTORC1 kontrolisana je ushodnim signalima koji uključuju faktore rasta, ATP, nutrijente i različite tipove stresora (Laplanche i Sabatini 2012).

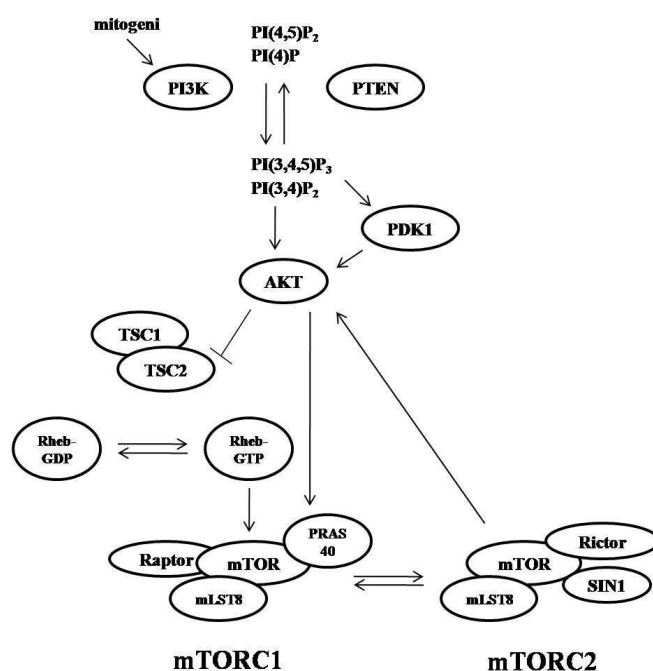
#### **1.6.2.1. Regulacija kompleksa mTORC1 mitogenim faktorima**

Regulacija kompleksa mTORC1 mitogenim faktorima ostvaruje se aktivacijom PI3K/Akt signalnog puta vezivanjem liganada za tirozin kinazne receptore, indukcijom aktivnosti G proteinskih receptora ili Ras onkogena (Slika 7) (Memmott i Dennis 2009).

Aktivirani receptori iniciraju intracelularnu signalnu kaskadu, koja počinje fosforilacijom supstrata insulinskog receptora (eng. *IRS1-4, insulin receptor substrates*), src- i SHC (eng. *Src homologous and collagen*) adaptorskih proteina koji potom aktiviraju fosfatidilinozitol-3 kinazni (PI3K) signalni put. Negativni regulator PI3K puta je tumor supresorski protein PTEN (eng. *phosphatase and tensin homolog on chromosome ten, PTEN*) koji uz koordinisanu aktivnost kinaza PDK1 i PDK2 (eng. *phosphoinositide-dependent kinase*) učestvuje u potpunoj aktivaciji Akt-a/PKB (eng. *protein kinase B*), fosforilacijom amino kiselina T308 i S473 (Song et al. 2005; Vara et al. 2004; Frenke 2008).

PDK1, ILK (eng. *integrin-linked kinase*), DNA-PK (eng. *DNA-dependent protein kinase*) i mTORC2 takođe imaju sposobnost fosforilacije S473 Akt-a. Akt u mTOR signalnom putu ima dvostruku ulogu, kao supstrat i kao efektor (Memmott i Dennis 2009). PI3K signalni put i Akt su pozitivni regulatori mTORC1, koji mogu indukovati aktivnost pomenutog signalnog puta na dva načina. Prvo, supresijom GAP (eng. *GTP-ase activating protein*) aktivnosti heterodimernog tuberozno skleroznog kompleksa TSC1/TSC2, fosforilacijom GAP domena TSC2 proteina na pozicijama S939 i T1462, čime je zaustavljena hidroliza GTP-a u GDP i konverzija Rheb-a (eng. *Ras homolog enriched in brain*) iz aktivne u neaktivnu formu. Rheb je pozitivni

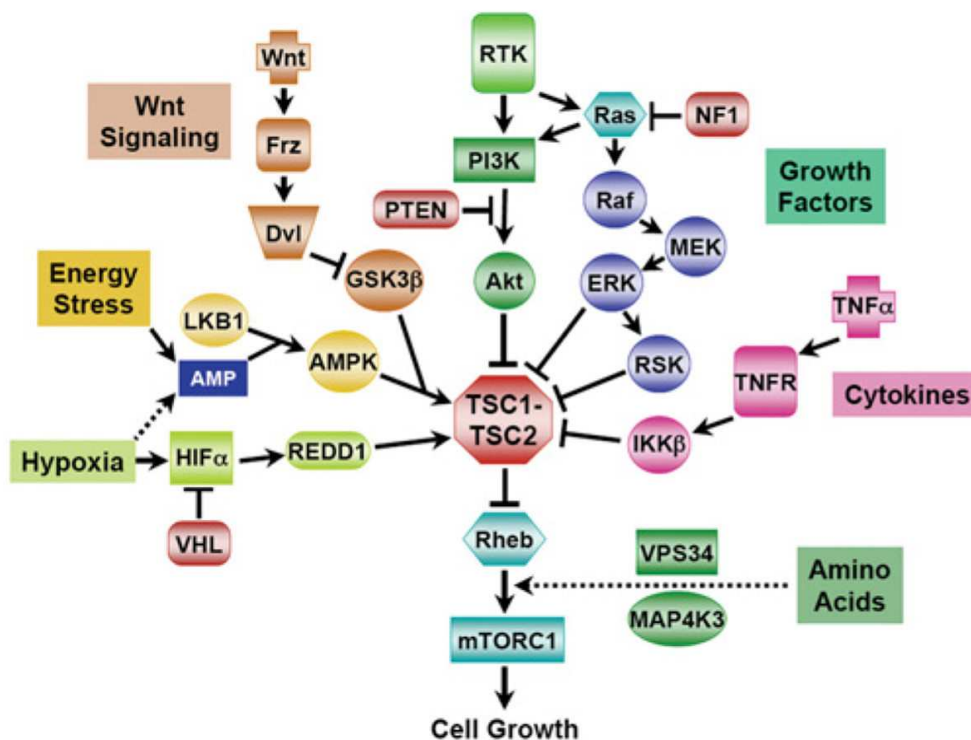
regulator aktivnosti mTORC1 kompleksa. TSC2 u kompleksu sa TSC1 indukuje hidrolizu GTP-a vezanog za Rheb i na taj način inhibira aktivnost mTORC1 signalnog puta (Inoki et al. 2002; Manning et al. 2002). Fosforilacija TSC2 proteina koja dovodi do disocijacije TSC1/TSC2 kompleksa i konsekventne aktivacije mTORC1 signalnog puta moguća je stimulacijom ERK1/2 kinaza (eng. *extracellular-signal-regulated kinase 1/2*, ERK1/2) i p90S6K1 kinaze (eng. *RSK1, ribosomal S6 kinase 1*) (Ma et al. 2005; Roux et al. 2004). Alternativni put u aktivaciji mTORC1, nezavisno od TSC2, ostvaruje se fosforilacijom PRAS40, od strane Akt-a ili samog mTOR-a, čime je suprimiran njegov inhibitoryni efekat na mTORC1 kompleks (Kovacina et al. 2003; Sancak et al. 2007; Vander Haar et al. 2007). Akt nezavisna aktivacija mTOR signalnog puta koja uključuje mitogene signale ostvaruje se posredstvom Ras/MEK/ERK puta, fosforilacijom i inaktivacijom TSC2 (Yang i Guan 2007).



**Slika 7.** Regulacija mTOR aktivnosti posredstvom PI3K/Akt signalnog puta (Modifikovano Memmott i Dennis 2009)

### 1.6.2.1.1. Struktura i funkcija kompleksa TSC1/TSC2

Tuberozno sklerozni kompleks (TSC1/TSC2) u odgovoru na različite ušodne signale deluje inhibitorno na aktivnost mTORC1 kompleksa (Slika 8).



Slika 8. Signalni putevi u kojima učestvuje kompleks TSC1/TSC2 (Modifikovano Huang i Manning 2008)

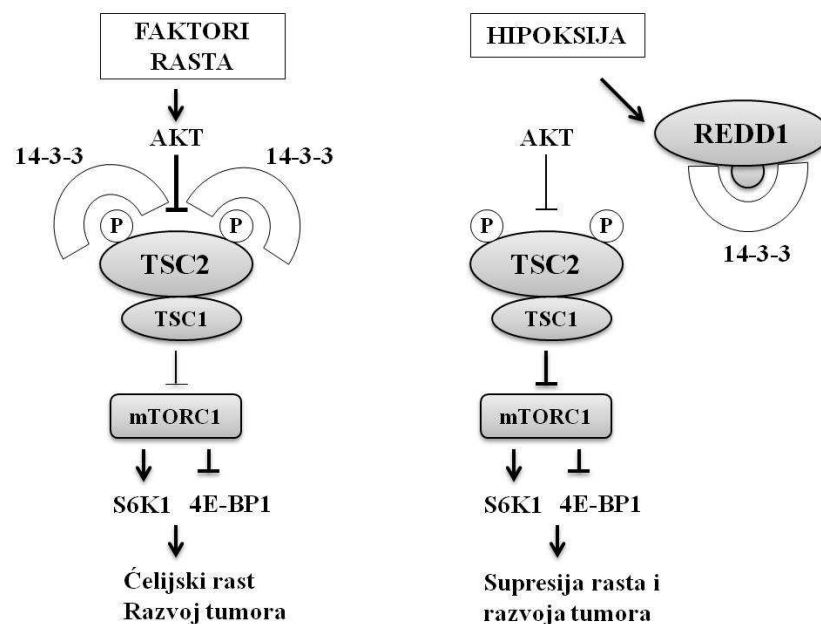
Geni *TSC1* i *TSC2* kodiraju za proteine hamartin (TSC1, 140 kDa) i tuberin (TSC2, 200 kDa) bez međusobno homologih regiona. U okviru kompleksa, TSC2 predstavlja funkcionalnu subjedinicu sa GAP (eng. *GTPase-activating protein*) aktivnošću, koja ubrzava hidrolizu GTP-a vezanog za mali G-protein Rheb (eng. *Ras homolog enriched in brain*), konvertujući ga iz aktivnog GTP-vezanog u neaktivno GDP-vezano stanje (Tchevkina i Komelkov 2012). TSC1 učestvuje u stabilizaciji kompleksa i supresiji ubikvitin zavisne degradacije TSC2 proteina (Hoogeveen-Westerveld et al. 2011; Benvenuto et al. 2000; Chong-Kopera et al. 2006).

### **1.6.2.2. Regulacija kompleksa mTORC1 u zavisnosti od energetskeg statusa ćelije**

Regulacija mTORC1 u zavisnosti od intracelularnog energetskeg statusa ostvaruje se posredstvom visoko konzerviranog heterotrimernog proteina AMPK, koji se sastoji od katalitičke  $\alpha$  i regulatornih  $\beta$  i  $\gamma$  subjedinica (Hardie et al. 2003). U uslovima energetskeg deficita (nizak odnos ATP/AMP), LKB1 kinaza (eng. *Liver Kinase B1*, LKB1) fosforilacijom amino kiseline T172 aktivira AMPK kinazu, koja potom fosforiliše TSC2 na pozicijama T1227 i S1345, indukujući konverziju Rheb-GTP u Rheb-GDP što rezultuje inaktivacijom mTORC1 (Inoki et al. 2003; Shackelford i Shaw 2009; Carling 2004). TSC2 nezavisni mehanizam inhibicije mTORC1 podrazumeva direktnu fosforilaciju raptora na visoko konzerviranim reziduama amino kiseline S722 i S792 što indukuje vezivanje 14-3-3 proteina i posledično supresiju mTORC1 kinazne aktivnosti (Gwinn et al. 2008). U uslovima visoke intracelularne koncentracije ATP-a, Akt stimuliše aktivnost mTOR-a inhibicijom AMPK kinaze i direktnom fosforilacijom TSC2 (Hahn-Windgassen et al. 2005; Inoki et al. 2002).

### **1.6.2.3. Regulacija kompleksa mTORC1 u hipoksičnim uslovima**

Supresija mTORC1 u hipoksičnim uslovima indukovana je HIF zavisnom ekspresijom gena *REDD1*, koji kodira citoplazmatski protein REDD1 molekulske mase  $\sim 34$  kDa (eng. *Regulated in Development and DNA damage responses*, REDD1) (Shoshani et al. 2002; Schneider et al. 2008). Faktori rasta i optimalni energetske status ćelije indukuju aktivnost mTORC1 fosforilacijom TSC2 Akt kinazom koja promovira formiranje kompleksa TSC2/14-3-3 i inhibiciju kompleksa TSC1/TSC2. U hipoksičnim uslovima, REDD1 ostvaruje interakciju sa 14-3-3 proteinom, što rezultuje disocijacijom TSC2/14-3-3, aktivacijom TSC1/TSC2 kompleksa i finalno inhibicijom mTORC1, čak i u prisustvu konstitutivno aktivne Akt kinaze (Slika 9) (DeYoung et al. 2008; Brugarolas et al. 2004). Predstavljeni mehanizam REDD1 zavisne supresije mTORC1 ostaje predmet spekulacija, nakon strukturnih analiza koje impliciraju da REDD1 i 14-3-3 ne mogu ostvariti direktan kontakt (Vega-Rubin-de-Celis et al. 2010).



**Slika 9.** Shematski prikaz REDD1 zavisne regulacije aktivnosti mTORC1 kompleksa (Modifikovano DeYoung et al. 2008)

Značaj molekula REDD1 kao supresora progresije tumora potvrđen je brojnim studijama, međutim ispitivanja mehanizama regulacije ekspresije REDD1 u uslovima prolongirane hipoksije pružaju oprečne rezultate (Sofer et al. 2005; Corradetti et al. 2005). Određeni autori sugeriraju da je supresorska funkcija REDD1 proteina zavisna od ekspresije AMPK, dok prema drugima REDD1 i AMPK deluju potpuno nezavisno u modulaciji mTORC1 aktivnosti (Schneider et al. 2008; Brugarolas et al. 2004). Dodatno, hipoksija suprimira mTORC1 signalni put posredstvom molekula koji ostvaruju interakciju sa mTOR-om i Rheb-om, kao što su PML (eng. *promyelocytic leukaemia tumour suppressor*) i BNIP3 (eng. *BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3*) (Bernardi et al. 2006; Li et al. 2007).

### 1.6.3. Efektorni molekuli kompleksa mTORC1

Jedna od osnovnih uloga mTOR signalnog puta je indukcija biosinteze proteina koja je precizno regulisana fosforilacijom efektornih molekula p70S6K1 i 4E-BP1.

Protein p70S6K1 je kinaza ribozomalnog proteina S6 i dominantno je lokalizovana u citoplazmi. Ima primarnu ulogu u regulaciji ćelijskog rasta i proliferaciji.



mTORC1 i p70S6K1 u zavisnosti od ekstra- i intracelularnih stimulusa kontrolišu aktivaciju i inhibiciju eukariotskog inicijacionog faktora eIF3 koji predstavlja komponentu translacionog inicijacionog kompleksa. U neaktivnoj formi S6K1 je vezan za eIF3 kompleks, dok u aktivnoj fosforilisanom formi disocira sa kompleksa i promovira inicijaciju translacije, fosforilacijom translacionih ciljnih molekula, uključujući 40S ribozomalni protein S6, faktor inicijacije translacije eIF4B, kinazu elongacionog faktora eEF2K i protein PDCD4. mTORC1 deluje inhibitory na eEF2 kinazu direktnom fosforilacijom ili fosforilacijom preko p70S6K. Aktivacijom eEF2, mTORC1 učestvuje u regulaciji elongacije translacije. Pored navedenog, mTORC1 doprinosi regulaciji produkcije tRNK, promociji sinteze rRNK i biogeneze ribozoma, aktivirajući TFIIC i promovira asocijaciju transkripcionog inicijacionog faktora 1A i polimeraze I (Martineau et al. 2013; Showkat et al. 2014; Laplante i Sabatini 2013).

4E-BP predstavlja familiju proteina represora translacije koja obuhvata 4E-BP1, 4E-BP2 i 4E-BP3 proteine. 4E-BP1 je represor translacionog inicijacionog faktora eIF4E. Hipofosforilisani 4E-BP1 ostvaruje čvrstu vezu sa eIF4E, sprečavajući njegovu interakciju sa eIF4G i inicijaciju 5'- *cap* zavisne translacije iRNK. U odgovoru na faktore rasta i dostupnost nutrijenata, može biti fosforilisano šest aminokiselinskih ostataka 4E-BP1, uključujući T37, T46, S65, T70, S83 i S112, nakon čega 4E-BP1 disocira iz kompleksa sa eIF4E, ostavljajući ga slobodnim za uspostavljanje interakcije sa eIF4G za koji se takođe vezuju i ostali inicijacioni faktori. Fosforilacija 4E-BP1 omogućava adekvatno pozicioniranje 40S subjediniice ribozoma i kompleksa inicijacionih faktora na 5' kraj iRNK, kako bi započeo proces sinteze proteina (Tchevkina i Komelkov 2012).

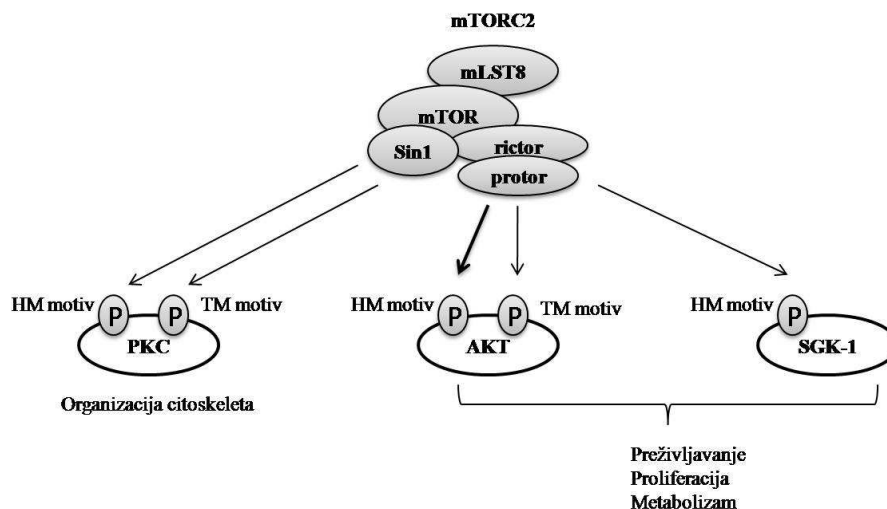
#### **1.6.4. Regulacija kompleksa mTORC2**

Kompleks mTORC2 regulisan je PI3K signalnim putem i za razliku od mTORC1 kompleksa, neosetljiv je na promene nutritivnog i energetskog statusa ćelije (Alessi et al. 2009). Pored uloge u organizaciji citoskeleta i celularnoj polarizaciji, potvrđeno je njegovo učešće u regulaciji ćelijskog preživljavanja, progresiji ćelijskog ciklusa i anaboličkih procesa fosforilacijom enzima koji pripadaju familiji AGC kinaza, kao što su Akt, SGK (eng. *serum and glucocorticoid-induced protein kinase*, SGK) i

PKC. Aktivnost mTORC2 je direktno ili indirektno regulisana faktorima rasta koji transmituju signale preko AGC kinaza i kompleksa mTORC1 (Zhou i Huang 2010; Zoncu et al. 2011; Laplante i Sabatini 2009).

### 1.6.5. Efektorni molekuli kompleksa mTORC2

Kompleks mTORC2 reguliše celularne procese modulacijom fosforilacionog nivoa, stabilnosti i aktivnosti određenih AGC kinaza kojima pripadaju Akt, PKC i SGK1 (Slika 10). Članovi familije AGC kinaza imaju sličnu strukturnu organizaciju, koja podrazumeva prisustvo fosforilacionog mesta u okviru hidrofobnog motiva i aktivacionu petlju u blizini ili u okviru katalitičkog domena. Pored modulacije hidrofobnog motiva protein kinaze C i Akt-a, mTORC2 reguliše i fosforilacioni nivo TM motiva (eng. *turn motifs*, TM) (Treins i Downward 2010).



Slika 10. Efektorni molekuli mTORC2 kompleksa (Modifikovano Treins i Downward 2010)

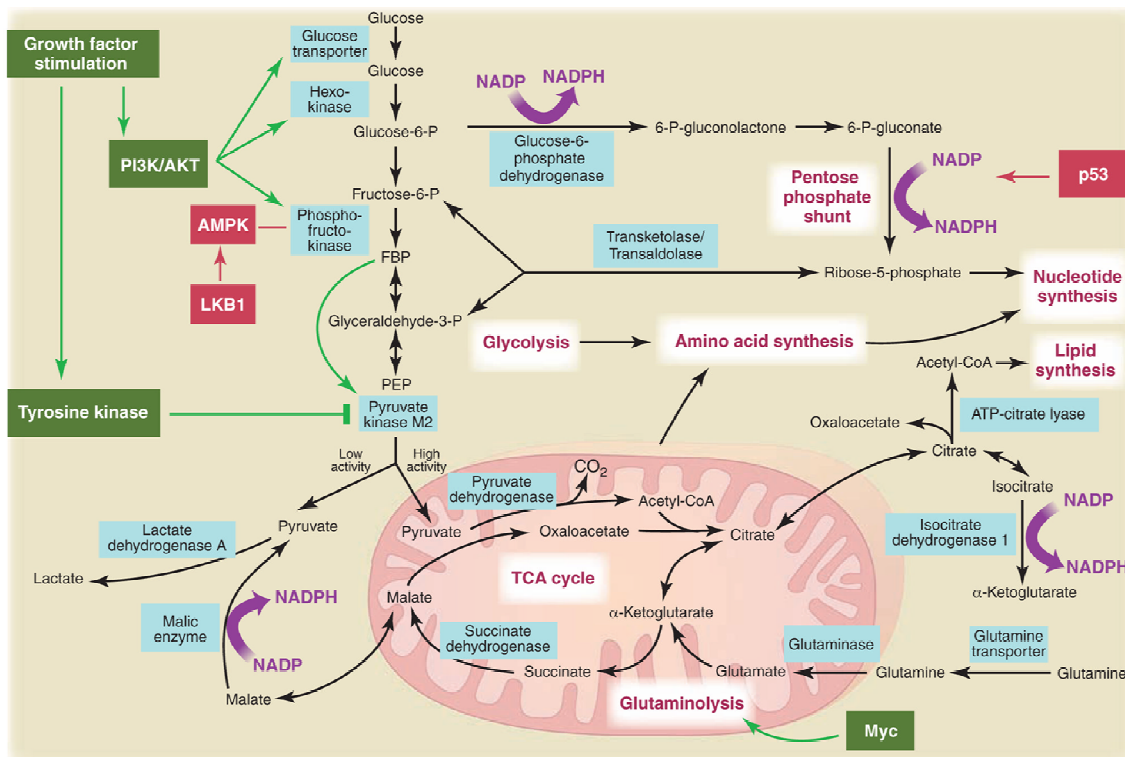
### 1.7. Uloga kompleksa mTORC1 u regulaciji ćelijskog metabolizma

Jedna od osnovnih razlika između tumorskih i zdravih ćelija je regulacija metabolizma glukoze (Vander Heiden et al. 2009). Produkcija energije zdravih diferenciranih ćelija je zasnovana na mitohondrijalnoj oksidativnoj fosforilaciji, dok je u slučaju tumorskih ćelija ovaj put značajno redukovano, a metabolizam glukoze usmeren ka aerobnoj glikolizi (Warburg-ov efekat). Aerobna glikoliza omogućava tumorskim

ćelijama prednost u uslovima intermitentne hipoksije, obezbeđujući energiju (ATP) i gradivne blokove za ubrzani rast i proliferaciju (Yecies i Manning 2011). Metabolički „switch” ka aerobnoj glikolizi omogućen je indukcijom ekspresije gena koji kodiraju glikolitičke enzime (Altenberg et al. 2004).

Fiziološka ili patološka aktivacija mTORC1 promoviše ekspresiju gena uključenih u regulaciju preuzimanje glukoze i proces glikolize posredstvom transkripcionih regulatornih proteina HIF-1 $\alpha$  i c-Myc (Semenza et al. 1994; Hudson et al. 2002; Duvel et al. 2010; West et al. 1998; Gordan et al. 2007). Glikolitički program tumorskih ćelija podrazumeva preusmeravanje krajnjeg produkta glikolize, piruvata ka konverziji u laktat uz katalitičku aktivnost enzima laktat dehidrogenaze indukovanu faktorom HIF-1 $\alpha$  (eng. *Lactate dehydrogenase 1*, LDH1) i kinaze piruvat dehidrogenaze (eng. *Pyruvate dehydrogenase kinase*, PDK). Enzim PDK inhibira konverziju piruvata u acetil-CoA, fosforilacijom i inhibicijom piruvat dehidrogenaze (eng. *Pyruvate dehydrogenase*, PDH). U tumorskim ćelijama inhibicija piruvat dehidrogenaze dovodi do preusmeravanja metaboličke aktivnosti sa mitohondrijalne respiracije ka citoplazmatskoj glikolizi (Slika 11).

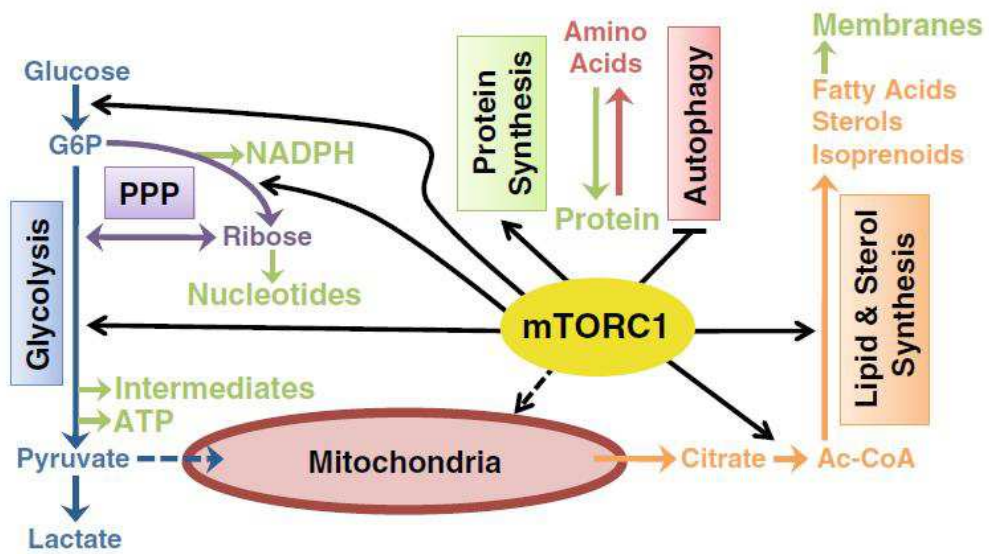
Određene studije sugerišu da je izoforma kinaze piruvat dehidrogenaze PDK3 uključena u metabolički „switch” indukovan hipoksijom (Chun-Wun et al. 2011). Izoforma PDK3 pokazuje veću katalitičku aktivnost u odnosu na preostale tri izoforme i ima visok vezujući afinitet za piruvat dehidrogenazu (Bowker-Kinley et al. 1998; Tuganova et al. 2002). Takođe, enzimska aktivnost izoforme PDK3 je neosetljiva na koncentraciju piruvata, za razliku od izoformi PDK1, 2 i 4 čija je aktivnost inhibirana sa porastom koncentracije piruvata (Baker et al. 2000).



Slika 11. Metabolički putevi proliferišućih ćelija (Modifikovano Heiden et al. 2009)

Pored promovisanja sinteze proteina i inhibicije autofagije, mTORC1 stimuliše intracelularno preuzimanje glukoze i konverziju u glukoze 6-fosfat (G6P), metabolički fluks ka glikolizi i pentozo fosfatnom putu. mTORC1 stimuliše sintezu sterola i lipida indukcijom produkcije citosolnog acetil-CoA (Slika 12) (Yecies i Manning 2011).

Aktivacija kompleksne mreže signalnih puteva u kojima participira mTOR uzrok je ograničene efikasnosti mTOR inhibitora (rapamicin i analozi, evrolimus i temsirolimus) koji se primenjuju u terapiji svetloćelijskog karcinoma bubrega. Studije su pokazale da analozi rapamicina samo parcijalno inhibiraju mTORC1 i da dovode do aktivacije PI3K-Akt signalnog puta blokiranjem mTORC1 zavisnih *feedback* mehanizama (Yecies i Manning 2011).



**Slika 12.** Kompleks mTORC1 u regulaciji celularnog metabolizma (Modifikovano Yecies i Manning 2011)

## 2. CILJEVI RADA

U cilju ispitivanja veze između mutacionog statusa gena *VHL* i aktivnosti mTOR signalnog puta u svetloćelijskom karcinomu bubrega, definisani su sledeći posebni ciljevi ovog istraživanja:

1. Ispitati mutacioni status gena *VHL*, metilacioni status promotorskog regiona gena *VHL* i gubitak heterozigotnosti 3p lokusa u tumorskom i neizmenjenom tkivu bubrega.
2. Utvrditi moguću asocijaciju mutacionog statusa gena *VHL* sa vrednostima patohistoloških parametara u tumorskom tkivu bubrega.
3. Ispitati nivo HIF-2 $\alpha$  iRNK i proteina u tumorskom i neizmenjenom tkivu bubrega i utvrditi moguću korelaciju sa mutacionim statusom gena *VHL*.
4. Ispitati nivo proteinskih komponenata mTOR signalnog puta: mTOR, TSC1, TSC2, eIF4E-BP1, p70S6K1, AMPK i REDD1 u tumorskom i neizmenjenom tkivu bubrega i utvrditi moguću korelaciju sa mutacionim statusom gena *VHL*.
5. Ispitati nivo proteina PDK3 u tumorskom i neizmenjenom tkivu bubrega i utvrditi moguću korelaciju sa mutacionim statusom gena *VHL*.

## 3. MATERIJAL I METODE

### 3.1. Materijal

Studijom je bilo obuhvaćeno 47 (33 muškaraca/14 žena) bolesnika koji su operisani zbog karcinoma bubrega u Klinici za urologiju, Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Ispitanici su potvrdili učešće u studiji potpisivanjem informisanog pristanka. Ispitivanja su odobrena od strane Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije.

Neposredno nakon totalne nefrektomije, uzeti su uzorci tumorskog i neizmenjenog tkiva bubrega ( $\sim 10 \text{ mm}^3$ ), od kojih je deo ( $\sim 5 \text{ mm}^3$ ) stavljan u tube sa 1 ml reagensa za prezervaciju RNK (*RNA Later RNA Stabilization Reagent, Qiagen, Gilden, Nemačka*). Uzorci renalnog tkiva su čuvani na temperaturi od  $-80^\circ\text{C}$ . Od pacijenata je uzorkovano i po 5 ml periferne krvi (*BD Vacutainer 9NC, 0.109M, Buff. Na<sub>3</sub> Citrate, BD, Plymouth, UK*) koja je čuvana na  $-20^\circ\text{C}$ . Kontrolnu grupu činilo je 20 uzoraka periferne krvi zdravih osoba kojima nisu dijagnostikovani karcinom bubrega i VHL sindrom.

### 3.2. Metode

#### 3.2.1. Izolacija genomske DNK iz uzoraka pune periferne krvi i tkiva bubrega

Genomska DNK izolovana je iz periferne krvi primenom *QIAampDNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Nemačka) prema uputstvima proizvođača, na sledeći način:

1. U tube od 1.5 ml dodavano je 200  $\mu\text{l}$  periferne krvi, 20  $\mu\text{l}$  Proteinaze K i 200  $\mu\text{l}$  AL pufera.
2. Smeša je vorteksovana 15 s (Reax control, Heidolph, Nemačka) i inkubirana 10 min na temperaturi od  $56^\circ\text{C}$  (Thermomixer comfort, Eppendorf, Nemačka).
3. Posle inkubacije uzorci su centrifugirani 15 s (*Centrifuge 5417C, Eppendorf, Nemačka*), a zatim je dodato 200  $\mu\text{l}$  96-100 % etanola.

4. Uzorci su vorteksovani 15 s i centrifugirani na 8000 rpm (eng. *rotation per minute*) 1 minut i potom prebačeni u kolonice.
5. Kolonice su centrifugirane na 8000 rpm 1 minut, a zatim smeštane u novu kolektorsku tubu.
6. U kolonice je dodavano je 500 µl AW1 pufera, a potom su centrifugirane na 8000 rpm 1 minut.
7. Kolonice su smeštane u nove kolektorske tube i postupak je ponovljen dodavanjem AW2 pufera uz centrifugiranje na 14 000 rpm tri minuta.
8. Kolonice su smeštane u nove kolektorske tube i centrifugirane bez dodavanja reagenasa na 14000 rpm 1 minut.
9. Kolonice su prebačene u tube od 1.5 ml i DNK je eluirana sa 50 µl AE elucionog pufera.
10. Nakon inkubacije od 5 minuta na sobnoj temperaturi, kolonice sa tubama su centrifugirane na 8 000 rpm 1 min.

Za izolaciju DNK iz uzoraka tumorskog neizmenjenog tkiva bubrega upotrebljen je standardni protokol za fenol-hloroform-izoamilalkoholnu izolaciju (Modifikovano Ausubel et al. 1995):

1. U tubu od 1.5 ml dodavano je 30 mg tkiva, 400 µl digestionog pufera (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, pH8), 30 µl SDS i 30 µl proteinaze K (*Proteinase K Solution*, 20 mg/ml; *Applied Biosystem, Foster City, SAD*).
2. Smeša je inkubirana preko noći na 37 °C.
3. Smeši je dodavano 30 µl proteinaze K, a zatim je inkubirana 60 minuta na 56 °C i potom preko noći na 37 °C.
4. U uzorke je dodavano 490 µl smeše fenol-hloroform-izoamilalkohol u razmeri 25:24:1.
5. Uzorci su vorteksovani 15 s i centrifugirani na 5000 rpm 5 min.
6. Gornja faza je prebačena u novu tubu od 1.5 ml i dodavano je 490 µl smeše hloroforma-izoamilalkohol u odnosu 24:1.
7. Uzorci su vorteksovani 15 s i centrifugirani na 5000 rpm 5 min.



8. Gornja faza je prebačena u novu tubu od 1.5 ml i dodavani su natrijumacetat u finalnoj koncentraciji od 0.3 M i 2.2 volumena 96 % etanola, zatim su ostavljani na -20<sup>0</sup>C preko noći.
9. Uzorci su centrifugirani na 10000 rpm 15 minuta, na 4<sup>0</sup>C.
10. Precipitat DNK je ispiran dodavanjem 500 µl 70 % etanola, a smeša je zatim centrifugirana na 10000 rpm 5min.
11. Etanol je odlivan i tube sa DNK su ostavljane na sobnoj temperaturi do potpunog isparavanja tečnosti.
12. DNK je resuspendovana u TE puferu (pH 7.5) (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8) ili u dejonizovanoj vodi i inkubirana na 37<sup>0</sup>C preko noći.

DNK je kvantifikovana korišćenjem spektrofotometra, merenjem apsorbance na talasnoj dužini od 260 nm (*GeneQuant*, *GE Helthcare*, Švedska) i čuvana na -20<sup>0</sup>C.

### **3.2.2. Umnožavanje fragmenata DNK lančanom reakcijom polimeraze**

Umnožavanje fragmenata molekula DNK od interesa vršeno je metodom lančane reakcije polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) (Romac et al. 1999; Innis i Gelfand 1990). PCR reakcija korišćena je za *in vitro* amplifikaciju kodirajućih regiona gena *VHL* (egzoni 1, 2 i 3). Izvođena je u mikrotubama od 0.5 ml u finalnom volumenu od 50 µl reakcione smeše u koju je dodavano po 250 ng DNK. Komponente reakcione smeše i njihove finalne koncentracije predstavljene su u tabeli 5, a temperaturni profili PCR reakcija u tabeli 6. Sekvence prajmera i dužine amplifikovanih fragmenata prikazane su u tabeli 7.

**Tabela 5.** Komponente reakcione smeše za amplifikaciju egzona gena *VHL*

Komponente reakcione smeše	Finalna koncentracija			Finalna zapremina (50 µl)			Proizvođač
	egzon	egzon	egzon				
	1	2	3				
10X <i>Taq</i> Buffer with (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1x			5			Fermentas (Thermo Scientific, Carlsbad, SAD)
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5	3.5	1.5	3	5	3	Fermentas (Thermo Scientific, Carlsbad, SAD)
10 mM dNTPs	0.2 mM			1			Fermentas (Thermo Scientific, Carlsbad, SAD)
25 µM Fw prajmer	0.4 µM			0.8			Thermo Scientific, Invitrogen, Carlsbad, SAD
25 µM Rv prajmer	0.4 µM			0.8			
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5U/µl)	1.5 U/µl			0.4			Fermentas (Thermo Scientific, Carlsbad, SAD)
5x Q-solution	1x	/	/	10	/	/	Qiagen (Hilden, Germany)
Nuclease-free water				do 25 µl			Fermentas (Thermo Scientific, Carlsbad, SAD)

**Tabela 6.** Temperaturni uslovi PCR reakcije

A) Egzon 1

<b>Broj ciklusa</b>		
<b>1</b>	<b>35</b>	<b>1</b>
	95 °C /30 s	
95 °C/5 min	62 °C /30 s	72 °C/10 min
	72 °C /80 s	

B) Egzon 2

<b>Broj ciklusa</b>		
<b>1</b>	<b>35</b>	<b>1</b>
	95 °C /30 s	
95 °C/5 min	58 °C /30 s	72 °C/10 min
	72 °C /45 s	

C) Egzon 3

<b>Broj ciklusa</b>		
<b>1</b>	<b>35</b>	<b>1</b>
	95 °C /30 s	
95 °C/5 min	60 °C /30 s	72 °C/10 min
	72 °C /60 s	

**Tabela 7.** Sekvence prajmera korišćenih za amplifikaciju egzona gena *VHL* (*Thermo Scientific, Invitrogen, Carlsbad, SAD*)

<b>Egzon</b>	<b>Sekvenca prajmera</b>	<b>Dužina fragmenta (bp)</b>
<b>1</b>	Fw 5'-GAGCGCGTTCCATCCTCTAC-3'	530
	Rv 5'-GGGCTTCAGACCGTGCTATC-3'	
<b>2</b>	Fw 5'-CGGTGTGGCTCTTTAACAACC-3'	224
	Rv 5'-CAAGTGGTCTATCCTGTACTT-3'	
<b>3</b>	Fw 5'-GCAAAGCCTCTTGTTTCG TTC-3'	431
	Rv 5'-GCCCTAAACATCACAATGC-3'	

Uspešnost reakcije je proveravana elektroferezom u 2 % agaroznom gelu sa etidijum-bromidom (EtBr) i vizuelnom inspekcijom amplifikata izlaganjem gela UV svetlu u transiluminatoru (Vilber Lourmat, France). Dužina amplifikovanih fragmenata je proveravana pomoću markera *O'Gene Ruler<sup>TM</sup> 50 bp DNA Ladder* (*Fermentas, Thermo Fisher Scientific, SAD*).

### **3.2.3. Detekcija germinativnih i somatskih mutacija gena *VHL* metodom automatskog sekvenciranja**

Metoda automatskog sekvenciranja ("metoda terminacije sinteze lanca", "dideoksi metoda") je korišćena za utvrđivanje redosleda nukleotida kodirajućih regiona gena *VHL*. U reakcionoj smeši za *in vitro* sintezu DNK se pored dezoksiribonukleozidtrifosfata (dNTPs) nalaze i 2', 3'-didezoksiribonukleozidtrifosfati (ddNTPs) obeleženi fluorescentnim bojama, koji zbog odsustva 3' hidroksilne grupe onemogućavaju formiranje fosfodiesterne veze sa sledećim nukleotidom. Ugradnjom ddNTP-a u rastući DNK lanac dolazi do terminacije sinteze DNK. Finalni produkti reakcije predstavljaju smešu fragmenata koji se međusobno razlikuju prema dužini, odnosno broju inkorporiranih nukleotida. Pomoću automatskog sekvenatora moguće je izvršiti elektroforetsku separaciju amplifikata čija se dužina razlikuje za po jedan nukleotid i očitavanje sekvence željenog fragmenta (Dostupno na URL:

[https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_041003.pdf](https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041003.pdf)).

Pre sekvenciranja umnoženih DNK fragmenata, produkti PCR reakcije se prečišćavaju, odnosno oslobađaju od viška prajmera i nukleotida koji su prisutni u smeši i mogu ometati reakciju sekvenciranja. Čistoća i koncentracija DNK matrice su osnovni uslovi za dobijanje kvalitetnih sekvenci u reakciji sekvenciranja (Dostupno na URL: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms\\_081527.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_081527.pdf)).

Za prečišćavanje PCR produkata upotrebljen je *QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden, Nemačka), prema protokolu proizvođača:

1. 45 µl PCR proizvoda pomešano je sa 225 µl PB pufera i prebačeno u kolonice sa kolektorskim tubama.
2. Kolonice su centrifugirane na 13000 rpm 1 minut, a zatim je iz kolektorskih tuba odlivan sadržaj.
3. U kolonice je dodavano 750 µl PE pufera i centrifugirano na 13000 rpm 1 min;
4. Nakon odlivanja sadržaja iz kolektorskih tuba, kolonice su centrifugirane još jednom na 13000 rpm, 1 minut.
5. Kolonice su prebačene u tube od 1.5 ml i prečišćeni amplifikati su eluirani sa 20 µl EB pufera. Kolonice su inkubirane 5 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirane na 13000 rpm 1 minut.

Koncentracija i kvalitet prečišćenih produkata PCR reakcije su proveravani pomoću spektrofotometra merenjem apsorbance na talosnoj dužini od 260 nm i utvrđivanjem odnosa apsorbanci  $A_{260}/A_{280}$ . Vrednosti  $A_{260}/A_{280}$  niže od 1.7-1.9 ukazuju na kontaminaciju amplifikata proteinima i organskim hemikalijama. Prečišćeni amplifikati su čuvani na - 20 °C.

Priprema prečišćenih PCR proizvoda za sekvenciranje obavljena je korišćenjem *BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, SAD) u PCR mašini (Thermocycler T3000, Biometra, Nemačka). Komponente reakcione smeše i temperaturni profil reakcije predstavljeni su u tabelama 8 i 9.

**Tabela 8.** Komponente reakcione smeše

Komponente reakcione smeše	Zapremina ( $\mu\text{l}$ )
Ready Reaction Premix	4
BigDye Sequencing Buffer	2
Prajmer (1.6 pmol)	1.6
PCR produkt (3-10 ng)	2
Dejonizovana voda	10.4

**Tabela 9.** Temperaturni uslovi PCR reakcije

Broj ciklusa		
1	30	1
	96 °C/10 s	
96 °C/1 min	50 °C/5 s	4 °C/ $\infty$
	60 °C/4 min	

Nakon pripreme, amplifikovani fragmenti DNK su prečišćeni od ostatka ddNTP-a precipitacijom pomoću EDTA, amonijum acetata i etanola, prema sledećem protokolu:

1. U smešu nakon reakcije dodavano je 2  $\mu\text{l}$  glikogena, 5  $\mu\text{l}$  7.5 M amonijum acetata i 5  $\mu\text{l}$  125 mM EDTA;
2. Smeša je vorteksovana i centrifugirana na 14000 rpm 15 s;
3. U smešu je dodavano 60  $\mu\text{l}$  96 % etanola, a zatim centrifugirano na 14000 rpm 15 s;
4. Smeša je hladena na - 20 °C 2 časa, a zatim centrifugirana na 14000 rpm 45 minuta;
5. Supernatant je odlivan i talogu je dodavano 70  $\mu\text{l}$  70% etanola;
6. Uzorci su centrifugirani na 14000 rpm 15 min.
7. Supernatant je odlivan, a talog je sušen na sobnoj temperaturi 10 minuta;
8. Talogu je dodavano 20  $\mu\text{l}$  Hi-Di<sup>TM</sup> formamida (*Applied Biosystems*, Foster City, SAD), nakon čega su uzorci vorteksovani;
9. Smeša je inkubirana 5 min na 95 °C, a zatim kratko hladena na - 20 °C;

Pripremljeni uzorci nalivani su u bunariće na ploči i sekvencirani u automatskom četvorokapilarnom sekvenatoru *ABI PRISM<sup>®</sup> 3130 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*, Foster City, SAD). Elektroforetska separacija fragmenata vršena je na polimeru 3130 POP7<sup>TM</sup> (*Applied Biosystems*, Foster City, SAD) u kapilarama dužine 50 cm (3130 & 3100-*Avant Capillary Array*, *Applied Biosystems*, Foster City, SAD). Digitalni zapisi dobijeni tokom elektroforeze obrađivani su pomoću softvera *Sequencing Analysis v5.2* (*Applied Biosystems*, Foster City, SAD). Dobijene sekvence su poređene sa referentnom sekvencom *VHL* gena koja je preuzeta sa URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\\_000003.12?report=genbank&from=10141635&to=10153670](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000003.12?report=genbank&from=10141635&to=10153670).

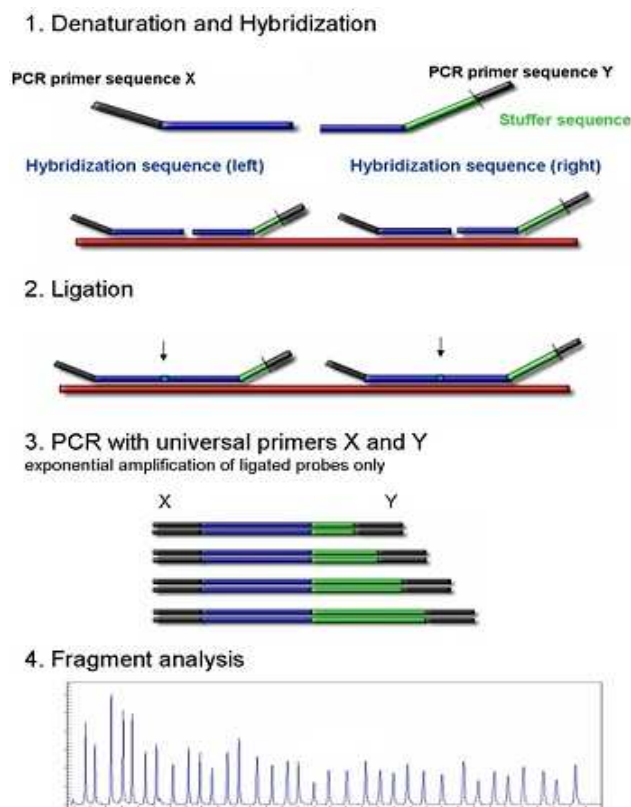
#### **3.2.4. Detekcija germinativnih i somatskih mutacija gena *VHL* metodom amplifikacije višestruko ligiranih proba**

Detekcija velikih delecija i duplikacija gena *VHL* i susednih lokusa u okviru regiona 3p25 urađena je metodom amplifikacije višestruko ligiranih proba (eng. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*, MLPA), korišćenjem *SALSA MLPA probemix P016-C2 VHL* kita (*MRC-Holland*, Amsterdam, Holandija). Miks proba sadrži 9 proba komplementarnih različitim regionima gena *VHL* (dve ili više proba za svaki egzon), 6 proba za gene koji su locirani u neposrednoj blizini *VHL* gena: *FANCD2*, *BRK1*, *C3orf10*, *HSPC300*, *IRAK2* i *GHRL*, 2 probe komplementarne telomernom i centromernom regionu hromozoma 3 i 12 referentnih proba koje odgovaraju regionima na ostalim hromozomima (Preuzeto sa URL:

<http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag=tz2fAPIAupKyMjaDF\E\t9bmuxqlhe/Lgqfk8Hkjuss|&ProductOID=P3G8NHKhaiY;>

<https://mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=zjCZBtdOUyAt3KF3EwRZhNWLtcfv9pVI/tHJIM\fa9FWO8KMqctOGIoqYwxaGF9Y>).

MLPA reakcija je izvođena prema uputstvima proizvođača i obuhvata denaturaciju molekula DNK , hibridizaciju MLPA proba, reakciju ligacije i PCR reakciju (Slika 13) (Preuzeto sa URL: <https://mlpa.com/>).



**Slika 13.** Postupak izvođjenja MLPA analize  
(preuzeto sa URL: <https://mlpa.com/>)

1. U tube je dodvano 100 ng DNK koja je rastvarana u 5  $\mu$ l TE pufera. Na svakih 5 ispitivanih DNK izolovanih iz tumorskog tkiva korišćena je DNK izolovana iz PBMC zdravih kontrola. Analizirana je i reakciona smeša bez DNK uzorka kako bi se utvrdilo eventualno prisustvo nespecifičnih fragmenata kao posledica kontaminacije. Uzorci su denaturisani na 98  $^{\circ}$ C 5 minuta, a zatim hlađeni do 25 $^{\circ}$ C (Thermocycler T3000, *Biometra*, Nemačka).
2. U uzorke je dodavano 1.5  $\mu$ l *MLPA buffer* i 1.5  $\mu$ l miksa proba. Uzorci su inkubirani na 95  $^{\circ}$ C 1 minuta, a zatim na 60  $^{\circ}$ C 16-20 časova.
3. Narednog dana, program je nastavljen inkubacijom uzoraka na 54 $^{\circ}$ C. Po dostizanju zadate temperature dodavano je 32  $\mu$ l prethodno napravljenog master miksa. Master



miks je za svaki uzorak sadržao 3  $\mu$ l *ligase buffer A*, 3  $\mu$ l *ligase buffer B*, 25  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O i 1  $\mu$ l *ligaze-65 enzyme*. Zatim je reakcija nastavljena inkubacijom u trajanju od 15 minuta na 54°C (*ligacija*), koja je bila praćena inkubacijom od 5 minuta na 98°C. Potom je temperatura spuštana na 15°C.

4. U novu tubu dodavano je 4 $\mu$ l *SALSA PCR buffer* i 26  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O po uzorku, a zatim 10  $\mu$ l *ligata*. Nakon toga je pripremljen novi master miks, koji je za svaku reakciju sadržao 2  $\mu$ l *SALSA PCR prajmera*, 7.5  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O i 0.5  $\mu$ l *SALSA Polymerase* i ostavljen na ledu. Tube su potom premeštene u PCR mašinu i program je nastavljen do 60 °C. Na ovoj temperaturi, dok su tube bile u termalnom bloku, dodavano je po 10  $\mu$ l prethodno napravljenog master miksa. Program je zatim nastavljen u 35 ciklusa: 30 sekundi na 95 °C, 30 sekundi na 60 °C i jedan minut na 72°C. Potom je usledila inkubacija na 72 °C u trajanju od 20 minuta, nakon čega je temperatura spuštana na 15 °C.

Nakon amplifikacije ligiranih proba, 0,3  $\mu$ l uzorka pripremano je za elektroforetsku separaciju na automatskom genetičkom analizatoru *ABI PRISM® 3130* denaturacijom u 9,6  $\mu$ l *Hi-Di™* formamida 5 min na 85 °C u koji je dodavano 0,2  $\mu$ l *GeneScan™- 500 LIZ™ Size* standarda. Veličina fragmenata je određivana poređenjem sa internalnim *GeneScan™- 500 LIZ™ Size* standardom (*Applied Biosistems, Foster City, SAD*).

Digitalni zapis obrađivan je pomoću softvera *GeneMapper® v3.7* (*Applied Biosistems, Foster City, SAD*). Rezultati su analizirani primenom softvera *Coffalyser.Net* (*MRC-Holland, Amsterdam, Holandija*). Intenzitet signala je proporcionalan koncentraciji amplifikovanih proba. Proračunavanjem odnosa intenziteta signala svake pojedinačne probe kontrolne i obolele osobe utvrđeno je prisustvo delecije/duplikacije, pri čemu su vrednosti manje od 0,7 bile indikovane za prisustvo delecije, a veće od 1.3 za prisustvo duplikacije.

### **3.2.5. Analiza metilacionog statusa promotorskog regiona gena *VHL***

Transkripciona inaktivacija gena *VHL* kao posledica hipermetilacije CpG ostrvaca u okviru promotorskog regiona (Bird 1986; Bird 1992) ispitivana je metil

specifičnim PCR-om nakon bisulfitne modifikacije DNK (Herman et al. 1996; Zeschnigk et al. 2003; Choi CC et al. 2007). Izlaganje DNK bisulfitnom tretmanu dovodi do konverzije citozina u uracil, dok je metilovani citozin (5-metilcitozin) rezistentan na ovu modifikaciju i ostaje u neizmenjenom obliku. Primenom odgovarajućih prajmer parova u reakciji metil specifičnog PCR-a može se uočiti distinkcija između metilovane i nemetilovane DNK (Herman et al. 1996).

Bisulfitna modifikacija DNK vršena je prema sledećem protokolu (Zeschnigk et al. 2003):

1. 5 µg DNK resuspendovano je u 45 µl dejonizovane vode, a zatim je dodavano 5 µl sveže pripremljenog 3M NaOH (finalno 0,3M NaOH).
2. Smeša je inkubirana 15 minuta na 37 °C, a zatim 1 minut na 95 °C i stavljana na led;
3. U smešu je dodavano 500 µl sveže pripremljenog bisulfitnog rastvora.
4. Smeša je inkubirana 16-18 časova na 55 °C.

DNK je nakon bisulfitnog tretmana prečišćavana pomoću *Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-Up sistema* (Promega, Wisconsin, SAD) prema uputstvu proizvođača:

1. U uzorak DNK dodavano je 1 ml *Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-Up Resin* reagensa.
2. Smeša je prebačena u cilindar šprica od 3 ml koji je prethodno pričvršćen za *Wizard<sup>®</sup>* minikolonu.
3. Sadržaj je propušten kroz minikolonu laganim pritiskom klipa šprica.
4. Minikolona je ispirana dodavanjem 2 ml 80 % izopropanola u cilindar šprica.
5. Minikolona je odvajana od cilindra šprica i stavljana u tubu od 1,5 ml, a zatim centrifugirana na 14000 rpm 2 minuta.
6. Minikolona je stavljana u novu tubu od 1,5 ml, dodavano je 50 µl dejonizovane vode zagrejane na 65-70 °C.
7. Nakon inkubacije od 1 min na sobnoj temperaturi, DNK je eluirana sa kolone centrifugiranjem na 14000 rpm, 1 minut.

U uzorak prečišćene modifikovane DNK dodavano je 11 µl 3M NaOH, a zatim je smeša inkubirana na 37 °C 15 minuta. Smeša je neutralisana dodavanjem 110 µl 6M NH<sub>4</sub>OAc. DNK je precipitirana standardnom etanolskom procedurom, nakon čega je resuspendovana u 40 µl dejonizovane vode. Koncentracija DNK merena je na spektrofotometru.

**Tabela 10.** Sekvenca prajmera (Thermo Scientific, Invitrogen, Carlsbad, SAD) korišćenih u metil specifičnoj PCR reakciji (Herman et al. 1996);

(Razlike u sekvenci između modifikovanih prajmera i nemodifikovane DNK predstavljene su slovima tamnije boje, a razlike između metilovanih/modifikovanih i nemetilovanih /modifikovanih predstavljene su podvučenim slovima)

Prajmeri	Sekvenca prajmera	Dužina amplifikata (bp)
<b>VHL-M</b>	Fw: 5'-TGGAGGATTTTTT <u>TGCGTACGC</u> -3' Rv: 5'- <u>GAACCGAACGCCGCGAA</u> -3'	158
<b>VHL-U</b>	Fw: 5'- GTTGGAGGATTTTTT <u>GTGTATGT</u> -3' Rv: 5'-CCC <u>AAACCAAA</u> CC <u>ACCA</u> AAA-3'	165

**Tabela 11.** Komponente reakcione smeše MS-PCR reakcije

Komponente reakcione smeše	Finalna koncentracija	Finalna zapremina (20 µl)
10X <i>Taq</i> Buffer with (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1X	2
25 mM MgCl <sub>2</sub>	5	4
100 mM dNTPs	5	1
25 µM Fw prajmer M/U	0,8	1
25 µM Rv prajmer M/U	0,8	1
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5U/µl)	1U	0,2
Nuclease-free voda		do 20

**Tabela 12.** Temperaturni uslovi MS-PCR reakcije

<b>Broj ciklusa</b>		
<b>1</b>	<b>35</b>	<b>1</b>
	96 °C/30 s	
95 °C/5 min	58 °C/30 s	72 °C/10 min
	72 °C/45 s	

### 3.2.6. Analiza gubitka heterozigotnosti 3p lokusa (*eng. Loss of Heterozygosity, LOH*)

Šest polimorfnih mikrosatelitnih markera (tabela 15) koji okružuju gen *VHL* (slika 14) istovremeno je amplifikovano primenom *QIAGEN*<sup>®</sup> *Multiplex PCR* kita (*Qiagen*, Nemačka). Komponente reakcione smeše, temperaturni profil reakcije i sekvenca prajmera predstavljeni su u tabelama 13, 14 i 15 (Banks et al. 2006):

**Tabela 13.** Komponente reakcione smeše multipleks PCR reakcije

<b>Reakciona smeša</b>	<b>Finalna koncentracija</b>	<b>Zapremina (µl)</b>
DNK	100 ng	
2x <i>QIAGEN Multiplex PCR Master Mix</i>	1x	12,5 µl
prajmer miks (2 µM svakog prajmera)	0,2 µM	
Rnase-free voda		do 25 µl

**Tabela 14.** Temperaturni uslovi multipleks PCR reakcije

<b>Broj ciklusa</b>		
<b>1</b>	<b>35</b>	<b>1</b>
	95 °C /30 s	
95 °C/5 min	55,8 °C /90 s	72 °C/10 min
	72 °C /60 s	

**Tabela 15.** Sekvenca prajmera korišćenih za amplifikaciju mikrosatelitnih markera

<b>Marker</b>	<b>Sekvenca prajmera</b>	<b>Dužina amplifikata (bp)</b>
<b><i>D3S1038</i></b>	Fw: 5'-TCCAGTAAGAGGCTTCCTAG-3'	115
Dinukleotidni ponovak	Rv: 5'-AAAGGGGTTTCAGGAAACCTG-3'	
<b><i>D3S1435</i></b>	Fw: 5'-TGGATACATTAGTATACTGAATT-3'	154
Dinukleotidni ponovak	Rv: 5'-TAAGACGGAAGCAAGGAAGG-3'	
<b><i>D3S1317</i></b>	Fw: 5'-TACAAGTTCAGTGGAGAACC-3'	159
Dinukleotidni ponovak	Rv: 5'-CCTCCAGGCCATACACAGTCA-3'	
<b><i>D3S1597</i></b>	Fw: 5'-AGTACAAATACACACAAATGTCTC-3'	171
Dinukleotidni ponovak	Rv: 5'-GCAAATCGTTCATTGCT-3'	
<b><i>D3S3691</i></b>	Fw: 5'-TCTCAGCAATAGCAAACATCAGG-3'	250
Dinukleotidni ponovak	Rv: 5'-TTGAAACCAGGGTGACAAATACATC-3'	
<b><i>D3S1537</i></b>	Fw: 5'-CTATAAAATGGCTATACCAG-3'	212
Tetranukleotidni ponovak	Rv: 5'-CTATTTTTGGACCCAGTAACC-3'	

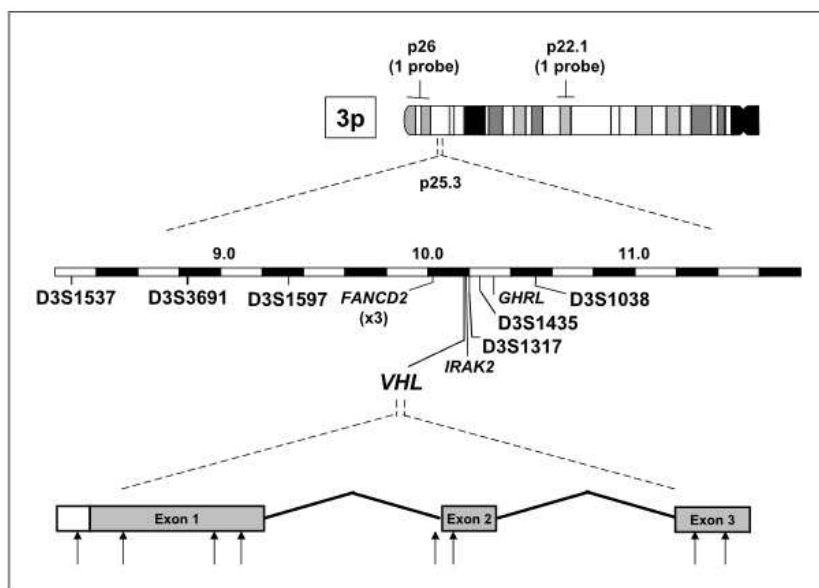
Amplifikovani fragmenti su elektroforetski razdvojeni na *ABI PRISM 3130* genetičkom analizatoru. Dužina fragmenata je određena poređenjem sa internalnim *GeneScan<sup>TM</sup>- 500 LIZ<sup>TM</sup> Size* standardom. Intenzitet signala (visina pikova) PCR produkata za svaki pojedinačni marker tumorskog tkiva je poređen sa intenzitetom signala svakog pojedinačnog markera zdravog tkiva, a gubitak heterozigotnosti je određivan izračunavanjem AIR (eng. *Allelic Imbalance Ratio*, AIR), prema sledećoj formuli:

$$\text{AIR} = (\text{T1}/\text{T2}) / (\text{N1}/\text{N2})$$

T1, T2- intenzitet signala alela (1 i 2) u tumorskom tkivu

N1, N2- intenzitet signala alela (1 i 2) u neizmenjenom tkivu

Kod uzoraka sa vrednostima  $\text{AIR} < 0.8$  za bar jedan od ispitivanih markera potvrđen je gubitak heterozigotnosti.



**Slika 14.** Shematski prikaz lokalizacije gena *VHL*, mikrosatelitnih markera korišćenih za LOH analizu i MLPA proba u okviru 3p25.3 hromozoma (dva mikrosatelitna markera su pozicionirana u centromernom 3p26 i telomernom regionu 3p22.1) (Modifikovano Banks et al. 2006)

### 3.2.7. Analiza nivoa HIF-2 $\alpha$ iRNK metodom kvantitativnog RT-PCR u realnom vremenu

Metoda kvantitativnog RT PCR u realnom vremenu (eng. *Quantitative Real Time – PCR*, qRT-PCR) korišćena je za relativnu kvantifikaciju ekspresije gena HIF-2 $\alpha$  u tumorskom i neizmenjenom tkivu bubrega pomoću *LightCycler*<sup>®</sup> 480 instrumenta. Metoda se zasniva na određivanju intenziteta signala koji potiče od FRET (eng. *fluorescence energy transfer*, FRET) hidrolizacionih proba posle svakog ciklusa PCR-a, a koji korelira sa koncentracijom/brojem kopija ispitivane DNK. Proba je na 5'- kraju obeležena donorskom fluoroforom (eng. *reporter*), a na 3'- kraju akceptorskom

fluoroforom (eng. *quencher*) koje se nalaze na bliskoj distanci što akceptoru omogućava supresiju fluorescentnog signala koji potiče od donora. Na 3'- kraju proba je foforilisana što onemogućava ekstenziju lanca. Tokom PCR reakcije, 5'-nukleaznom aktivnošću polimeraze dolazi do isecanja hidrolizacione probe, uklanjanja fragmenata sa targeta i međusobnog odvajanja akceptorske i donorske fluorofore. Donor više nije suprimiran akceptorom tako da nakon ekscitacije emituje fluorescentni signal čiji intenzitet se meri u detektorskom kanalu instrumenta. Povećanje intenziteta fluorescentnog signala korelira sa količinom oslobođene reporterske fluorofore, odnosno količinom PCR produkta (Preuzeto sa URL:

[http://plantbio.okstate.edu/resources/PCR\\_Core/Roche\\_RealTime%20PCR%20Application%20Manual.pdf](http://plantbio.okstate.edu/resources/PCR_Core/Roche_RealTime%20PCR%20Application%20Manual.pdf)).

Kvantifikovanje nivoa genske ekspresije obuhvatalo je sledeće stadijume:

1. Izolacija RNK iz tumorskog i neizmenjenog renalnog tkiva
2. Tretman DNKazom
3. Konverzija RNK u komplementarni molekul DNK (cDNK) reverznom transkripcijom
4. qRT-PCR

Izolacija RNK iz tkiva bubrega vršena je pomoću RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemačka) prema protokolu proizvođača:

U 600 µl RLT pufera dodavano je 10 µl β-merkaptetoetanol i smeša je hladena na ledu tokom merenja i sečenja tkiva.

1. Odmah nakon uzimanja tkiva iz tube sa *RNA Later*-om odmereno je 30 mg i usitnjeno skalpelom na ledu.
2. Tkivo je prebačeno u tube od 2 ml i dodato je 600 µl smeše RLT pufera i β-merkaptetoetanol, a zatim homogenizovano tučkom.
3. Smeša je ostavljena na -20 °C 20 minuta, a zatim prebačena u *QIAshredder* (Qiagen, Hilden, Nemačka) kolonice koje su stavljane u kolektorske tube od 2 ml i centrifugirana na 14000 rpm 2 minuta.

4. Lizat je centrifugiran na 14000 rpm 3 minuta.
5. Supernatant je prebačen pipetom u tubu od 1,5 ml i dodavano je 600  $\mu$ l 70 % etanola.
6. Smeša je prebačena u *RNeasy* kolonice i centrifugirana na 10000 rpm 15 sekundi.
7. Nakon odlivanja sadržaja iz kolektorskih tuba, u *RNeasy* kolonice je dodavano 700  $\mu$ l RW1 pufera.
8. *RNeasy* kolonice su centrifugirane na 10000 rpm 15 sekundi i sadržaj je odlivan iz kolektorskih tuba.
9. U *RNeasy* kolonice je dodavano 500  $\mu$ l RPE pufera i centrifugirano na 10000 rpm 15 sekundi, sadržaj iz kolektorskih tuba je uklanjan.
10. U *RNeasy* kolonice je dodavano 500  $\mu$ l RPE pufera centrifugirano na 10000 rpm 2 minuta.
11. *RNeasy* kolonica je stavljena u tubu od 2 ml i centrifugirana na 14000 rpm 1 minut.
12. *RNeasy* kolonica je stavljena u tubu od 1.5 ml i dodavano je 30  $\mu$ l *nuclease-free* vode (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD), a zatim je centrifugirana na 10000 rpm 1 min.

Koncentracija molekula RNK je merena na spektrofotometru na talasnoj dužini od 260 nm, a zatim je izračunavana ukupna masa RNK u zapremini od 29  $\mu$ l, prema formuli:

$$m_{\text{RNK}} (\text{ng}) = c_{\text{RNK}} (\text{ng}/\mu\text{l}) \times V (29 \mu\text{l});$$

Protokol za uklanjanje genomske DNK iz uzoraka RNK:

Genomska DNK je uklanjana iz uzoraka RNK upotrebom enzima *DNAse I*, *RNase-free* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD). Komponente reakcione smeše prikazane su u tabeli 16.

1. Smeša je inkubirana na 37  $^{\circ}$ C 30 minuta.
2. Dodavana je 1/10 volumena 25 mM EDTA i smeša je inkubirana na 65  $^{\circ}$ C 10 minuta.
3. Nakon inkubacije u uzorke je dodavano 300  $\mu$ l smeše fenol : hloroform : izoamilalkohol (25:24:1).



4. Uzorci su vorteksovani 10-15 sekundi i centrifugirani na 14000 rpm, 5 minuta na 4 °C.
5. Gornja faza je prebačena u tubu od 1,5 ml, a zatim je dodavano 300 µl smeše hloroform:izoamilalkohol (24:1), vorteksovano 10-15 sekundi I centrifugirano na 14000 rpm, 5 minuta na 4 °C.
6. Gornja faza je prebačena u tubu od 1,5 ml u koju je dodavano: 1/10 volumena 3M natrijum acetata i 2.2 volumena 96 % etanola.
7. Smeša je blago vorteksovana i ostavljena na - 20 °C preko noći.
8. Uzorci su centrifugirani na 14000 rpm, 45 minuta na 4 °C, a zatim je odlivan supernatant.
9. U uzorke je dodavano 200 µl 70 % etanola, a potom su centrifugirani 14000 rpm, 2 minuta na 4 °C. Supernatant je odlivan.
10. Uzorci RNK su nakon sušenja na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta, rastvarani u 20 µl *DEPC-treated* vode.
11. Uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi 10 minuta, blago vorteksovani, nakon čega je merena koncentracija RNK; Kvalitet RNK je smatran zadovoljavajućim za vrednosti  $A_{260/280} \sim 2$ .

**Tabela 16.** Komponente reakcione smeše

<b>Reakciona smeša</b>	<b>Zapremina (µl)</b>
RNK	1-2 µg
10x reaction buffer with MgCl <sub>2</sub>	1 µl
DEPC-treated Water	do 9 µl
Dnase I, Rnase-free (1 u/µl)	1-2 µl

*In vitro* sinteza komplementarne DNK vršena je korišćenjem *First Strand cDNA Synthesis Kit* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD*) prema uputstvu proizvođača:

1. 0.5 µg ukupne RNK je konvertovano u cDNK u tubi od 0.5 ml; Komponente reakcione smeše su dodavane prema redosledu prikazanom u tabeli 17.

2. Smeša je blago vorteksovana i centrifugirana na 5000 rpm, 10 sekundi.
3. Smeša je inkubirana na 37 °C, 60 minuta, a zatim na 70 °C, 5 minuta. Uzorci cDNK su čuvani na - 80 °C.

Za izvođenje qRT-PCR reakcije korišćen je *LightCycler*<sup>®</sup> 480 Probes Master kit (Roche, Mannheim, Nemačka). Sekvence prajmera i proba, komponente reakcione smeše i temperaturni profil reakcije su predstavljeni u tabelama 20, 21 i 22. Uz svaku seriju uzoraka predviđenih za analizu, istim reakcionim uslovima izlagano je pet razblaženja standarda poznatih koncentracija i negativna kontrola. Reakcije su izvođene u triplikatu za svaki uzorak. Sa svakim ciklusom PCR reakcije produkt je umnožen po formuli  $N=N_0 \times (E)^n$ , gde  $N_0$  predstavlja količinu amplifikata na početku reakcije, E je amplifikaciona efikasnost i iznosi 80-90 % , n je broj ciklusa i N je količina amplifikovanih molekula. Nakon određenog broja ciklusa PCR reakcije, umnožava se količina standarda i uzorka proporcionalno ekspresiji gena, što se uočava pojavom krive iz tzv. *background*-a. Momenat detekcije signala praćen pojavom krive naziva se "Crossing point,, (Cp vrednost). Nakon završene reakcije konstruiše se standardna kriva, pri čemu su na X osi predstavljene logaritmovane vrednosti koncentracije standarda (amol), a na Y osi srednja Cp vrednost triplikata pojedinačnog razblaženja standarda. Iz jednačine prave ( $y = ax + b$ ) se preračunava ekspresija ispitivanog gena, gde y predstavlja Cp vrednost ispitivanog uzorka, a X njegovu koncentraciju izraženu u logaritmovanoj vrednosti koncentracije (logamol). Antilogaritmovanjem X vrednosti dobija se koncentracija uzorka (amol), a zatim se preračunava po µg RNK koja je korišćena za sintezu cDNK. Kao endogena kontrola korišćen je β-aktin i njegova ekspresija je takođe ispitivana za svaki uzorak. Relativna kvantifikacija je vršena određivanjem odnosa ekspresije cDNK za HIF-2α i β-actin u ispitivanom uzorku tumorskog odnosno neizmenjenog tkiva bubrega ( $\text{amol}_{\text{HIF-2}\alpha}$  po µg RNK/  $\text{amol}_{\beta\text{-aktin}}$  po µg RNK).

**Tabela 17.** Komponente reakcione smeše za sintezu cDNK

<b>Reakciona smeša</b>	
RNK	0,5 µg
oligo (dT) <sub>18</sub> prajmer	1 µl
voda, nuclease-free	do 11 µl
<i>5x Reaction Buffer</i>	4 µl
<i>RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl)</i>	1 µl
10 mM dNTP Miks	2 µl
M-MuLV Reverse Transcriptase (20 U/µl)	2 µl
<b>Totalna zapremina</b>	<b>20 µl</b>

**Tabela 18.** Komponente reakcione smeše za qRT-PCR reakciju

<b>Reakciona smeša</b>	<b>Finalna koncentracija</b>	<b>Zapremina (µl)</b>
cDNK		1
<i>LightCycler® 480 Probes Master 2X conc.</i>	1x	12.5
prajmer Fw	0.25 mM	0.1
prajmer Rv	0.25 mM	0.1
proba	0.05 pM	0.2
<i>LightCycler Uracil-DNA Glycosylase</i>		0.2
voda, PCR-grade		do 20

**Tabela 19.** Temperaturni uslovi qRT-PCR reakcije za A) HIF-2 $\alpha$  i B)  $\beta$ -aktin

<b>A</b>		Broj ciklusa
Denaturacija	95 °C/5 min	1
Amplifikacija	95 °C /30 s	40
	58 °C /30 s	
	72 °C/60 s	
Hlađenje	40 °C/10 s	1

<b>B</b>		Broj ciklusa
Denaturacija	95 °C/5 min	1
Amplifikacija	95 °C /30 s	40
	60 °C /30 s	
	72 °C/60 s	
Hlađenje	40 °C/10 s	1

**Tabela 20.** Sekvenca prajmera i proba (*Tib MolBiol*, Berlin, Nemačka) korišćenih u qRT-PCR reakciji

Gen	Sekvenca prajmera (Fw)	Sekvenca prajmera (Rv)	Sekvenca probe
<i>HIF-2<math>\alpha</math></i>	5'- TGCTCCACGCCCAAT AGC -3'	5'- TCCAGCTCATTGAAATCC GTC -3'	5'- 6FAM - CATTGGTCCTTGGCCTCTGT GTCC - BBQ -3'
<i><math>\beta</math>-aktin</i>	5'- AGCCTCGCCTTTGCC GA -3'	5'- CTGGTGCCTGGGGCG - 3'	5'- FAM - CCGCCGCCCGTCCACACCCG CC - BBQ -3'

### 3.2.8. Analiza nivoa proteina HIF-2 $\alpha$ , mTOR, TSC1, eIF4E-BP1, p70S6K1, AMPK, REDD1 i PDK3 Western Blot metodom

Western blot metoda korišćena je za kvantitativnu analizu proteina izolovanih iz tumorskog i neizmenjenog tkiva bubrega.

Protokol za izolaciju proteina iz tkiva:

1. Odmereno je 30 mg tkiva i usitnjeno na ledu. Tkivo je prebačeno u tubu od 2 ml, a zatim je dodavano 1 ml radnog RIPA pufera (Tabela 21) sa koktelom proteaznih inhibitora *cOmplete EDTA-free (Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Mannheim, Nemačka)*.
2. Uzorci su ostavljeni na - 20 °C 30 minuta.
3. Uzorci su sonifikovani 3x10 sekundi sa pauzom od po 1 minut između svakog ciklusa sonifikacije, a zatim ostavljeni na - 20 °C 30 minuta.
4. Uzorci su centrifugirani na 11000 rpm, 20 minuta na 4 °C.
5. Supernatant koji sadrži ukupne proteine je pažljivo izvučen pipetom i čuvan na - 80 °C.

**Tabela 21.** Receptura za RIPA pufer

<b>RIPA pufer</b>
10 mM TRIS-HCl (pH 7,5-8)
1 mM EDTA
0.1 % SDS
0.1 % deoksiholat
1 % Triton X-100
1 mM PMSF

Koncentracija proteina je određivana Bradford-ovom metodom (Bradford 1976) korišćenjem *Bio-Rad Protein Assay* reagensa (*Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, SAD*). Nakon merenja apsorbanci različitih razblaženja BSA (eng. *Bovine serum albumine*, BSA) poznatih koncentracija na 595 nm konstruisana je standardna kriva. Spektrofotometrijski je merena apsorbance uzoraka proteina, a korišćenjem zakrivljenosti standardne krive određivana je koncentracija analiziranih proteina.

Priprema uzoraka za SDS-PAGE elektroforezu (eng. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE):

1. U tube je dodavano 100 µg proteina, 2.5 µl *NuPAGE<sup>®</sup> LDS Sample Buffer (4x)*, 1 µl *NuPAGE<sup>®</sup> Reducing Agent (10x)* i dH<sub>2</sub>O do finalne zapremine od 10 µl.

2. Smeša je inkubirana na 70 °C 10 minuta.

Uzorci i markeri MagicMark™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Litvanija) i PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Litvanija) nalivani su u bunariće NuPAGE® Bis-Tris Mini gela za razdvajanje proteina molekulske mase od 1-200 kDa i razdvajani korišćenjem XCell SureLock® Mini-Cell sistema za elektroforezu, pri konstantnoj voltaži od 200 V, 40 minuta. Unutrašnja komora elektroforetskog sistema ispunjavana je sa 200 ml 1X NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer u koji je dodato 500 µl NuPAGE® Antioxidant, a spoljašna komora je ispunjavana sa 600 ml istog pufera bez dodavanja antioksidansa (Preuzeto sa URL: [http://pro.unibz.it/staff2/sbenini/documents/laboratory\\_and\\_safety/nupage\\_tech\\_man.pdf](http://pro.unibz.it/staff2/sbenini/documents/laboratory_and_safety/nupage_tech_man.pdf)).

Proteini molekulske mase od 36-400 kDa i gore pomenuti markeri razdvajani su na NuPAGE® Novex Tris-Acetate gelu pri konstantnoj voltaži od 150 V, 1 čas. Komore elektroforetskog sistema ispunjavane su sa 1X NuPAGE® Tris Acetate Running Buffer, pri čemu je u unutrašnju komoru dodavano 500 µl antioksidansa.

Elektroforetski transfer proteina sa NuPAGE® Bis-Tris Mini gela na nitroceluloznu membranu (*Nitrocellulose Membrane, Filter Paper Sandwich, 0,45 µm size* (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Litvanija), odnosno sa NuPAGE® Novex Tris-Acetate gela na PVDF (eng. *polyvinylidene difluoride*) membranu (*PVDF Membrane, Filter Paper Sandwich, 0,45 µm size, Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Litvanija*), vršen je pomoću XCell II™ Blot Module sistema (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Litvanija) pri naponu od 25 V 90 minuta. Receptura za pripremu pufera koji je korišćen za transfer proteina, prikazana je u tabeli 22.

**Tabela 22.** Komponente pufera za transfer proteina

<b>Komponente transfer pufera</b>	<b>Zapremina (ml)</b>
<i>NuPAGE<sup>®</sup> Transfer Buffer (20X)</i>	50
<i>NuPAGE<sup>®</sup> Antioxidant</i>	1
Metanol	200
Dejonizovana voda	849

PVDF membrana je inkubirana u metanolu 30 sekundi, isprana dejonizovanom vodom, a zatim natopljena transfer puferom na nekoliko minuta. Sunderi i nitrocelulozna membrane su takođe ostavljani u posudi sa transfer puferom. Komponente korišćene prilikom transfera proteina sa gela na membranu smeštane su u *XCell II<sup>TM</sup> Blot Module* sistem.

Nakon transfera, membrane su blokirane u 5 % rastvoru obranog mleka (*LumiLight<sup>PLUS</sup> Western Blotting Kit*, Basel, Švajcarska) u PBS-u 60 minuta, a zatim su inkubirane u odgovarajućem razblaženju primarnog antitela preko noći na 4 °C (Tabela 23). Membrane su ispirane tri puta od po 10 minuta u PBS-u, a potom inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim HRP – konjugovanim antitelom (eng. *horseradish peroxidase*, HRP) 90 minuta na sobnoj temperaturi i ispirane ponovo u PBS-u.

Detekcija ispitivanih proteina vršena je korišćenem *Lumi-Light<sup>PLUS</sup> Western Blotting Kit (Mouse/Rabbit)*, prema uputstvu proizvođača. Membrane su inkubirane u smeši jednakih zapremina *Lumi-Light<sup>PLUS</sup> Enhancer* i *Lumi-Light<sup>PLUS</sup> Stable Peroxide Solution* (0,5 ml/cm<sup>2</sup> membrane) 5 minuta, a zatim su smeštane u kasetu (*Maco Cassete 13x18, Hans O. Mahn & CO. Hamburg, Nemačka*). Na membrane je u mračnoj komori stavljan fotografski film (*Ortho, CP-GU, Medical X-ray film 13x18, AGFA, Mortsel, Belgija*). Ekspozicija je prilagođavana u zavisnosti od jačine hemiluminescentnog signala i antitela kojim je vršena detekcija proteina. Film je razvijan u aparatu *AGFA Classic EOS* (AGFA, Mortsel, Belgija). Detektovani protein uočavan je kao diskretna traka na odgovarajućoj poziciji na filmu. Proteini su kvantifikovani korišćenjem softvera *ImageQuant*.  $\beta$ -aktin korišćen je kao interna (endogena) kontrola za

normalizaciju ekspresionog nivoa ispitivanih proteina. Membrane su oslobođane primarnog i sekundarnog antitela, „stripovane“ inkubacijom u 0,2M NaOH 15 minuta na sobnoj temperaturi uz blagu agitaciju, a zatim pripremane za detekciju drugim antitelom, prema prethodno objašnjenoj proceduri.

**Tabela 23.** Antitela korišćena za detekciju i kvantifikaciju proteina Western blot metodom

<b>Primarno antitelo</b>	<b>MW (kDa)</b>	<b>Kataloški broj</b>	<b>Proizvođač</b>	<b>Sekundarno antitelo</b>	<b>Razblaženje</b>
<b>EPAS-1 (H-310)</b>	115	sc-28706	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, SAD</i>	<i>anti-rabbit</i>	1:200
<b>mTOR</b>	289	ab2732	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>	<i>anti-rabbit</i>	1:1000
<b>Hamartin (TSC1)</b>	160	ab32936	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>	<i>anti-rabbit</i>	1:500
<b>eIF4E-BP1</b>	20-25	ab2606	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>	<i>anti-rabbit</i>	1:1000
<b>p70S6K1</b>	70	ab9366	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>	<i>anti-rabbit</i>	1:1000
<b>AMPK alpha 1 + AMPK alpha 2</b>	~ 60	ab80039	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>	<i>anti-mouse</i>	1:500
<b>REDD-1 (H-110)</b>	34	sc:-67051	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, SAD</i>	<i>anti-rabbit</i>	1:500
<b>PDK-3</b>	47	LS-C111083	<i>Life Span Biosciences, Inc. Seattle, SAD</i>	<i>anti-rabbit</i>	1:1000
<b>ACTN05 (C4)</b>	42	ab3280	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>	<i>anti-mouse</i>	1:1000



### 3.2.9. Analiza nivoa proteina TSC2 metodom imunohistohemije

Imunohistohemijska metoda korišćena je za semikvantitativno utvrđivanje nivoa ekspresije proteina TSC2 na uzorcima svetloćelijskog karcinoma i neizmenjenog tkiva bubrega.

Parafinski preseci debljine 5 $\mu$ m su deparafinisani i rehidratirani. Između inkubacija u specifičnim rastvorima tokom imunohistohemijske reakcije pločice su ispirane u rastvoru 0,1 M PBS. Demaskiranje antigena vršeno je u citratnom puferu (10 mmol/L, pH6, *Epitope Retrieval Solution*, Dako, Glostrup, Denmark), inkubacijom na 95 °C, u trajanju od 21 minuta. Nakon toga, preseci su postepeno hladjeni i ispirani u tekućoj, a potom i destilovanoj vodi. Aktivnost endogene peroksidaze inhibirana je inkubacijom uzoraka u 3 % rastvoru vodonik peroksida tokom 10 minuta. Nespecifična imunoreaktivnost je blokirana rastvorom *Peptide Blocking Solution* (Dako, Glostrup, Denmark) tokom 30 minuta. Preseci su potom inkubirani 60 minuta u rastvoru primarnog poliklonskog anti-TSC2 antitelu (5  $\mu$ g/ml, ab128021, *Abcam*, Cambridge, UK) na sobnoj temperaturi. Vizuelizacija kompleksa antigen-antitelo je vršena korišćenjem *DAKO Universal LSAB+ /HRP* kita (DAKO K0679) sa hromogenom 3,3'-diaminobenzedinom (DAB + Substrate Chromogen System, Dako, Glostrup, Denmark). Uzorci su kontrastirani *Mayerovim* hematoksilinom i pokriveni Aquatex-om (Merck, Darmstadt, Germany). Svaki uzorak tumorskog tkiva je rađen u duplikatu. Kod negativnih kontrola u proceduri je izostavljeno izlaganje rastvoru primarnog antitela. Kao pozitivna kontrola korišćeni su uzorci tkiva mozga (hipokampus) i srčanog mišića pacova.

Analiza preparata rađena je na mikroskopu Olympus BX-41 sa Olympus XC50 digitalnom kamerom i Cell softverom (Olympus, Tokyo, Japan). Procena ekspresije TSC2 proteina rađena je brojanjem imunoreaktivnih struktura ćelije (jedro, citoplazma ili membrana) u pet reprezentativnih zona svakog preseka tumorskog i neizmenjenog tkiva bubrega. Intenzitet reakcije je definisan kao negativan 0, slab 1+, umeren 2+ i jak 3+. Rezultat je izražavan u vidu nukleusnog, citoplazmatskog i membranskog skora imunoreaktivnosti (0, 1, 2 i 3) na 100 izbrojanih ćelija (Marković-Lipkovski et al. 1995; Brašanac et al. 1996).

### 3.2.10. Statistička obrada rezultata

Rezultati analiza predstavljeni su kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška (SE). U zavisnosti od distribucije dobijenih rezultata, primenjeni su jednosmerna analiza varijanse (ANOVA) sa *post hoc Bonferroni* korekcijom za testiranje statističke značajnosti razlika između ispitivanih grupa ili *Kruskal Wallis* neparametrijski test praćen *Mann Whitney* testom. Jačina i smer linearne povezanosti dve varijable ispitana je određivanjem *Pearsonovog koeficijenta korelacije* u slučaju normalne distribucije podataka ili *Spearmanovog koeficijenta korelacije* kada najmanje jedna varijabla nije imala normalnu distribuciju. Vrednosti  $P < 0.05$  su smatrane statistički značajnim. Za opisivanje odnosa varijabli korišćene su multipla i prosta regresiona analiza. Sva izračunavanja su obavljena korišćenjem statističkog programa SPSS Statistic 17.0 *Microsoft Windows (Spss. Inc., Chicago, IL, SAD)*.

## 4. REZULTATI

Studijom je bilo obuhvaćeno 47 pacijenata (14 žena / 33 muškarca) sa tumorom bubrega, kod kojih je patohistološkom analizom tumorskog tkiva potvrđena dijagnoza svetloćelijskog karcinoma. U analiziranoj grupi pacijenata određen je stadijum tumora prema važećem sistemu TNM klasifikacije i gradus tumora prema Furmanovom sistemu klasifikacije (Tabela 25).

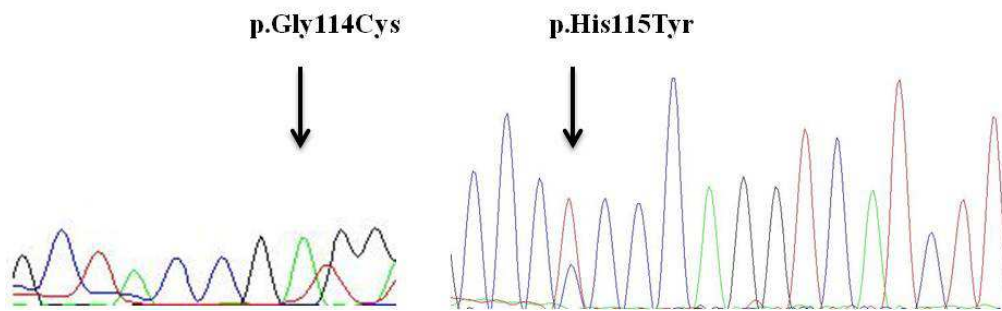
### 4.1. Rezultati analize mutacionog statusa gena *VHL*

Analizom DNK izolovane iz tumorskog tkiva bubrega detektovane su promene u okviru gena *VHL* i/ili 3p lokusa kod 37/47 (78.7 %) pacijenata.

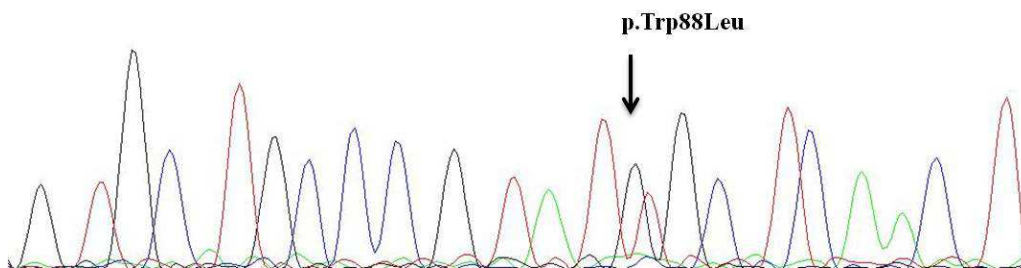
#### 4.1.1. Rezultati analize mutacionog statusa gena *VHL* metodom automatskog sekvenciranja

U analiziranoj grupi pacijenata sekvenciranjem gena *VHL* genomske DNK izolovane iz periferne krvi nisu detektovane germinativne mutacije. Analizom DNK izolovane iz tumorskog tkiva bubrega detektovane su somatske mutacije u genu *VHL* kod 31/47 (65.9 %) pacijenta sa svetloćelijskim karcinomom bubrega.

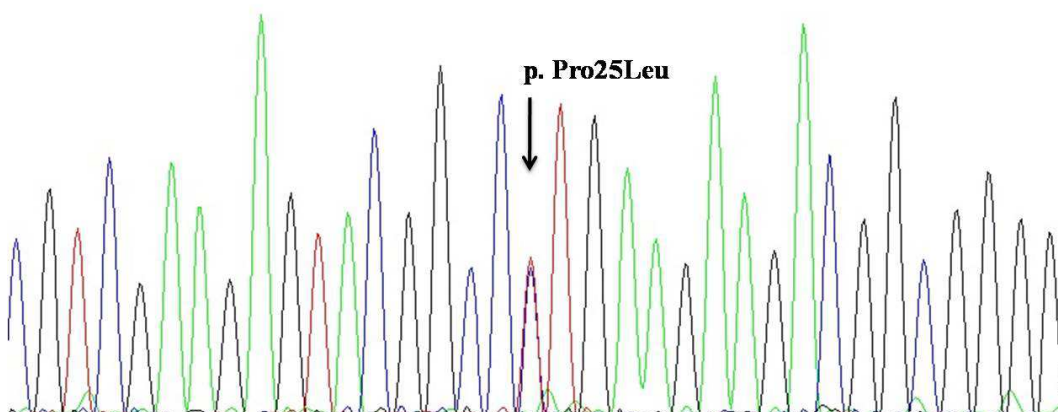
Sekvenciranjem gena *VHL* detektovano je 19 somatskih mutacija (19/31; 61.3 %) (tabela 25), od kojih 12 (12/19; 63.2 %) pripada tipu *frame shift* mutacija, 5 (5/19; 26.3 %) *missense* mutacijama (1 SNP, 2 *splice site* mutacije, Slike 15, 16 i 17) i 2 *in frame* delecijama (2/19; 10.5 %).



**Slika 15.** Elektroforegramski prikaz *splice site* mutacija p.Gly114Cys i p.His115Tyr

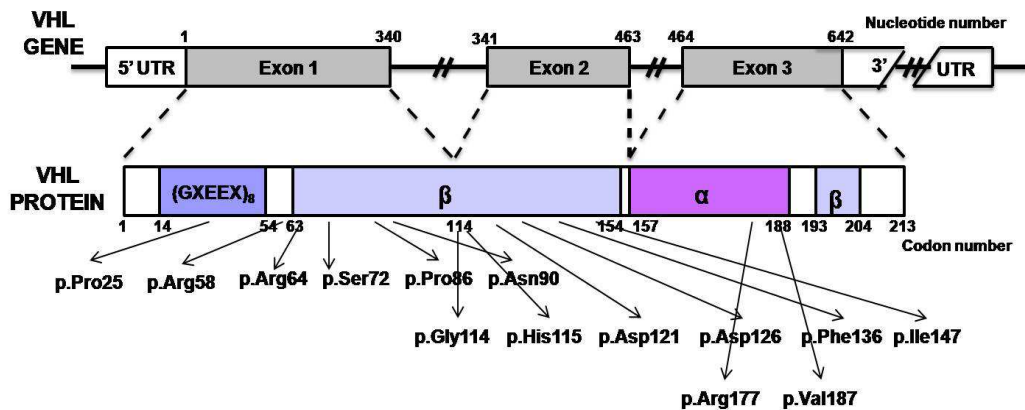


**Slika 16.** Elektroforegramski prikaz *missense* mutacije p.Trp88Leu



**Slika 17.** Elektroforegramski prikaz genetičke varijante rs35460768 (p.Pro25Leu)

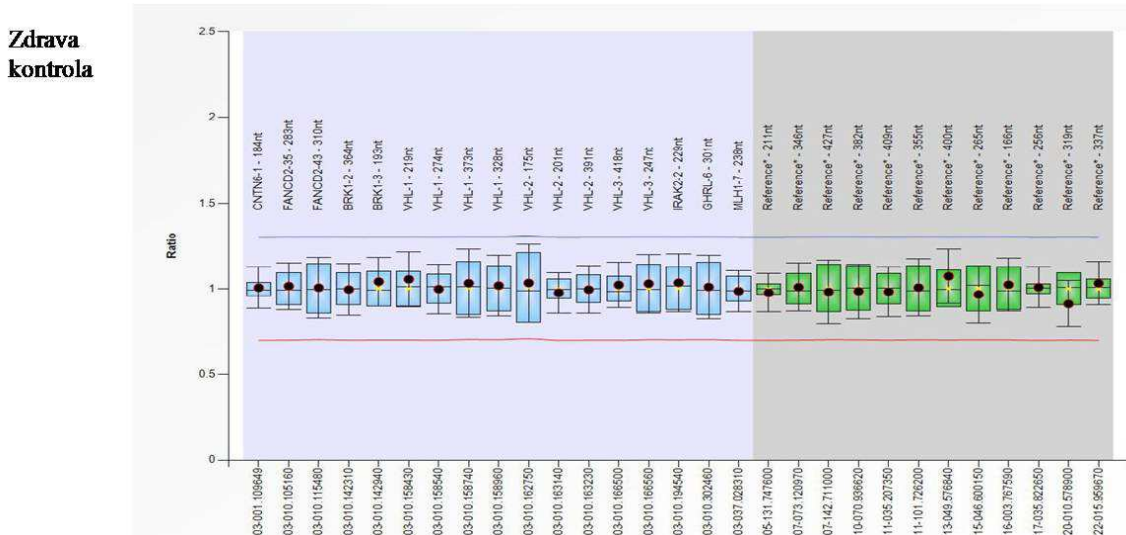
Na slici 18 predstavljene su pozicije somatskih mutacija detektovanih u uzorcima tumorskog tkiva. Analizom gena *VHL* neizmenjenog tkiva bubrega nisu detektovane mutacije ni u jednom ispitivanom uzorku.



Slika 18. Shematski prikaz gena *VHL*, proteina VHL i pozicije detektovanih mutacija

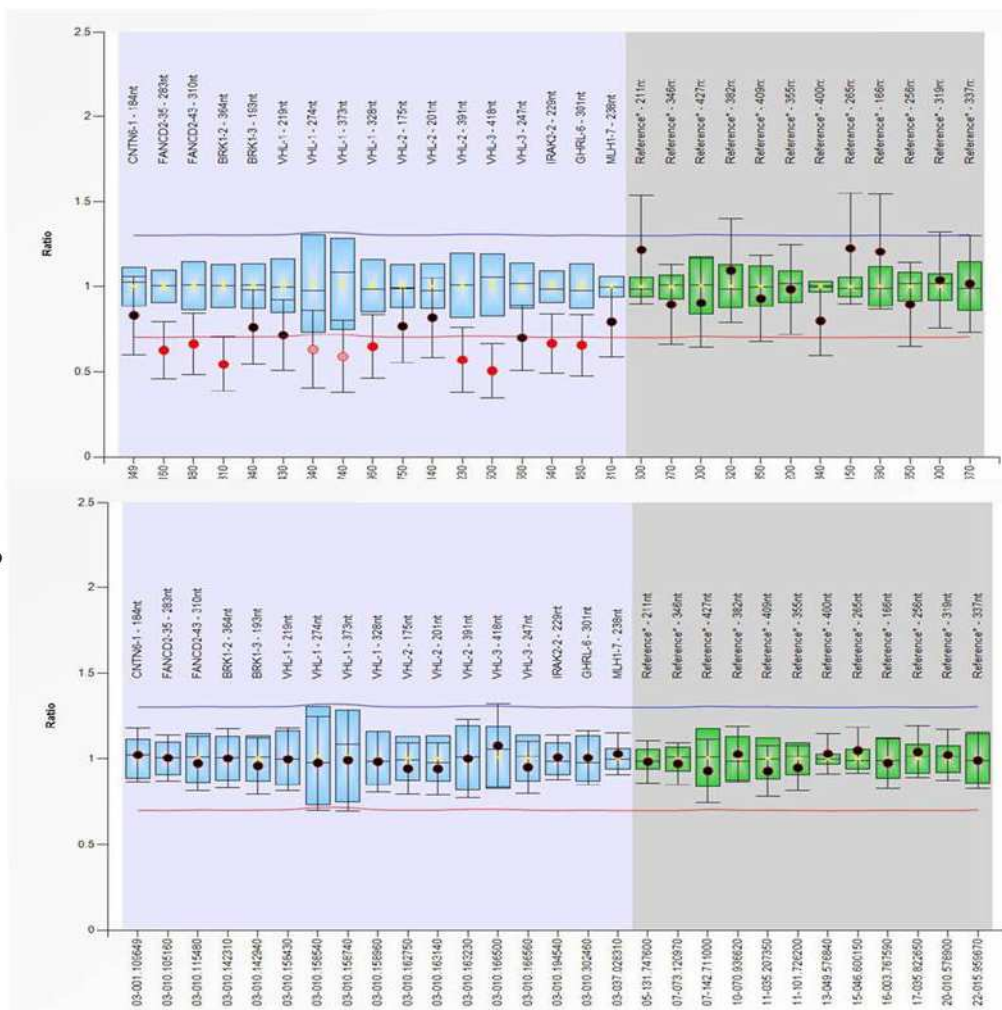
#### 4.1.2. Rezultati analize mutacionog statusa gena *VHL* metodom amplifikacije višestruko ligiranih proba

DNK izolovana iz tumorskog i neizmenjenog tkiva bubrega pacijenata kod kojih nisu detektovane mutacije sekvenciranjem gena *VHL* analizirana je MLPA metodom. Kod 12 (12/31; 38.7 %) pacijenata utvrđeno prisustvo velikih delecija (11) i duplikacija (1) u okviru gena *VHL* (Slike 20 i 21). Rezultat dobijen analizom DNK izolovane iz periferne krvi zdrave kontrolne osobe MLPA metodom prikazan je slikom 19.



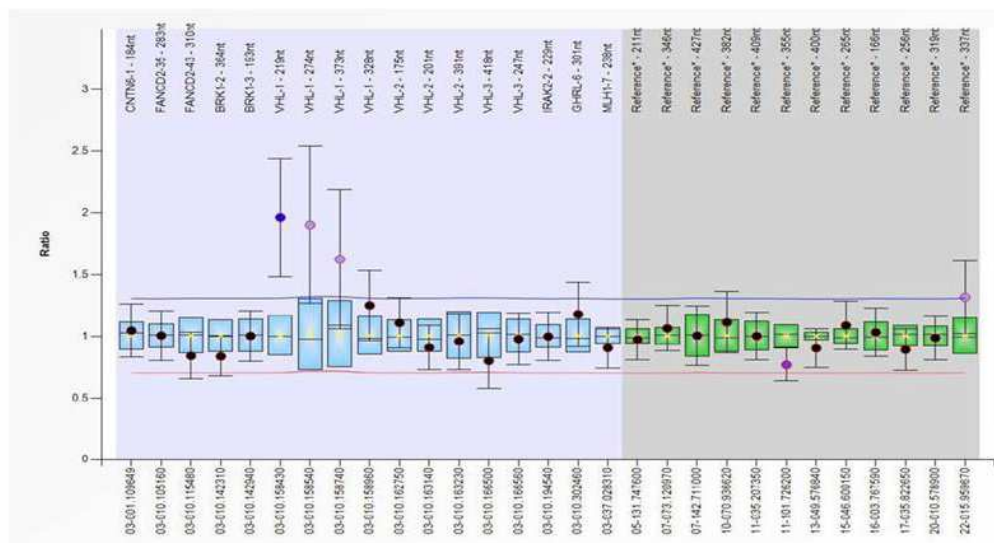
Slika 19. Prikaz rezultata dobijenih analizom DNK izolovane iz periferne krvi zdrave kontrolne osobe MLPA metodom. Crnim kružićima predstavljene su vrednosti AIR~1 koje ne ukazuju na prisustvo delecija/duplikacija ispitivanih regiona DNK.

**Tumorsko tkivo**

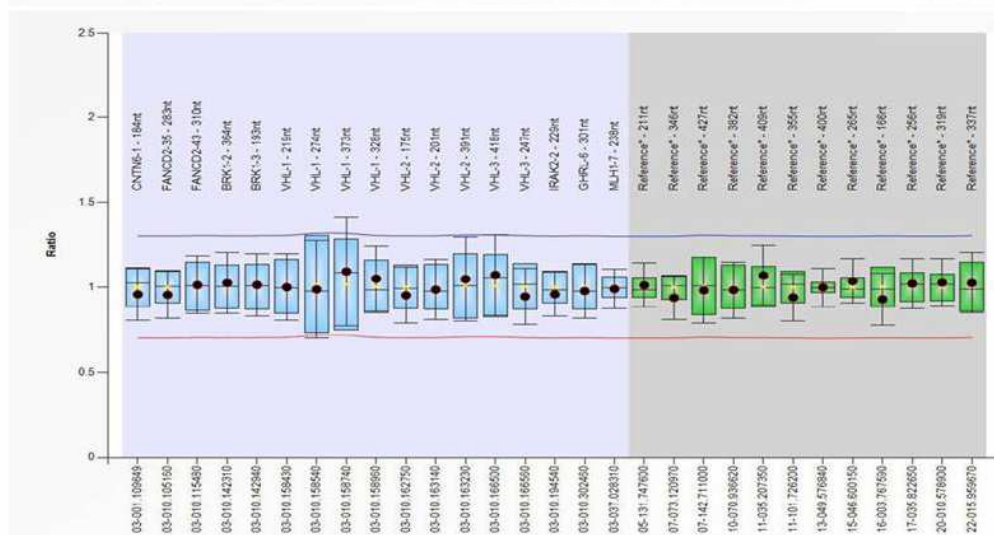


**Slika 20.** Prikaz delecije dela gena *VHL* i susednih regiona u okviru 3p25 lokusa detektovane MLPA metodom u uzorku tumorskog tkiva i neizmenjeno tkivo bubrega. Crvenim kružićima predstavljene su vrednosti  $AIR < 0.7$  regiona DNK koji su indikovani za prisustvo delecije. Crnim kružićima predstavljene su vrednosti  $0.7 < AIR < 1.3$  koje ne ukazuju na prisustvo delecije/duplikacije ispitivanih regiona DNK.

**Tumorsko tkivo**



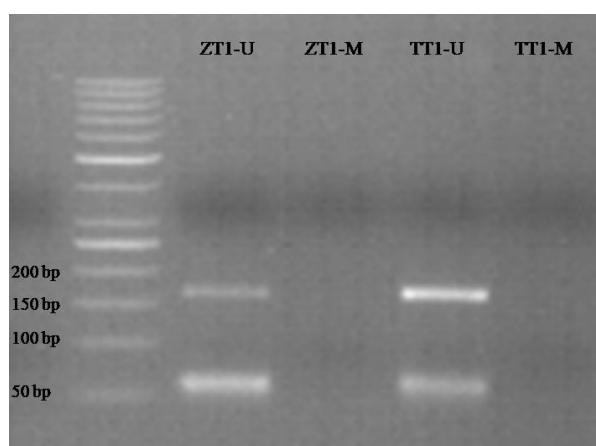
**Neizmenjeno tkivo**



**Slika 21.** Prikaz duplikacije dela prvog egzona gena *VHL* detektovane MLPA metodom u uzorku tumorskog tkiva i neizmenjeno tkivo bubrega. Plavim i ljubičastim kružićima predstavljene su vrednosti  $AIR > 1.3$  koje su indikovane za prisustvo duplikacije. Crnim kružićima predstavljene su vrednosti  $0.7 < AIR < 1.3$  koje ne ukazuju na prisustvo delecije/duplikacije ispitivanih regiona DNK.

#### 4.1.3. Rezultati analize metilacionog statusa promotorskog regiona gena *VHL*

Supresija transkripcije metilacijom promotora gena *VHL* nije detektovana ni u jednom uzorku tumorskog tkiva (Slika 22).

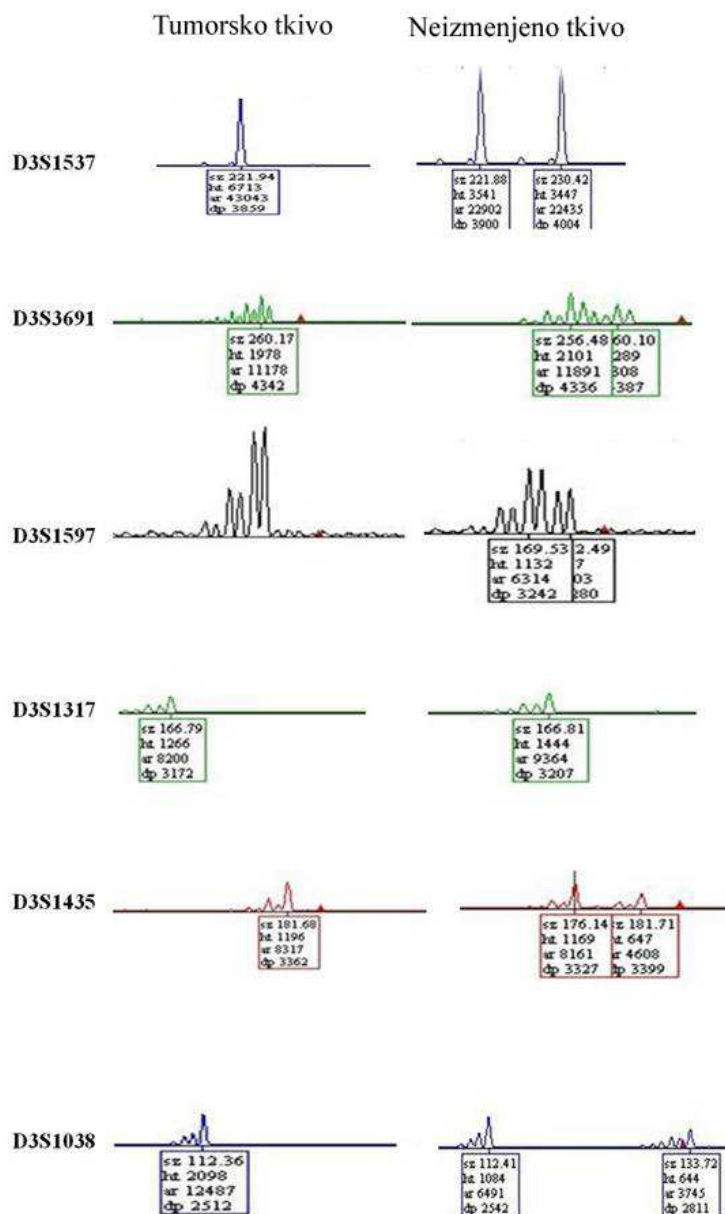


**Slika 22.** Prikaz produkata MS-PCR reakcije nakon elektroforetskog razdvajanja na 2,5 % agaroznom gelu; Levo- standardni marker koji je korišćen za proveru dužine amplifikovanih fragmenata (*O'GeneRuler™ DNA ladders*, Thermo Fisher Scientific, SAD); ZT- neizmenjeno tkivo, TT- tumorsko tkivo, U- nemetilovani prajmeri koji su korišćeni u PCR reakciji, M- metilovani prajmeri koji su korišćeni u PCR reakciji. MS-PCR produkti uočavaju se u vidu traka dužine 165 bp i dobijeni su samo primenom nemetilovanih prajmera; Nespecifične trake od ~ 50 bp predstavljaju dimere prajmera.

#### 4.1.4. Rezultati analize gubitka heterozigotnosti 3p lokusa

Analizom šest mikrosatelitnih markera koji okružuju gen *VHL* utvrđen je gubitak heterozigotnosti u uzorcima tumorskog tkiva 33 pacijenata (33/47; 70.2 %) (Slika 23).





**Slika 23.** Elektroforegramski prikaz LOH analize u tumorskom i neizmenjenom tkivu bubrega. Uzorak neizmenjenog tkiva je heterozigot za markere: D3S1537 (221/230 bp), D3S3691 (256/260 bp), D3S1597 (169/172 bp), D3S1435 (176/181 bp), D3S1038 (112/133 bp) i homozigot za D3S1317 (166 bp). U tumorskom tkivu prisutan je LOH što se uočava potpunim gubitkom jednog alela za markere D3S1537 (221 bp), D3S3691 (260 bp), D3S1435 (181 bp), D3S1038 (112 bp) ili vrednostima AIR<0,7 za marker D3S1597 (169/172 bp). Marker D3S1317 (166 bp) nije informativan.

#### 4.1.5. Klasifikacija uzoraka tumorskog tkiva u odnosu na mutacioni status gena *VHL*

Analizirani uzorci tumorskog tkiva grupisani su prema mutacionom statusu gena *VHL* na uzorke sa neizmenjenim genom *VHL* (*wt VHL*), sa monoalelnom inaktivacijom gena *VHL* i bialelnom inaktivacijom gena *VHL*.

Nemutirani gen *wtVHL* detektovan je kod 10 (10/47; 21.3 %) pacijenata sa svetloćelijskim karcinomom bubrega. Monoalelska inaktivacija gena *VHL* detektovana je kod 10 (10/47; 21.3 %) pacijenata (4/10 sa prisustvom intragenskih mutacija u *VHL* genu i 6/10 sa gubitkom heterozigotnosti). Bialelna inaktivacija gena *VHL* detektovana je kod 27 (27/47; 57.4 %) pacijenata, odnosno kod 87.1 % (27/31) pacijenata nosioca intragenske mutacije (Tabela 24).

**Tabela 24.** Patohistološke karakteristike tumora i mutacioni status gena *VHL* (Nomenklatura je urađena prema pozicijama HGVS- *Human Genome Variation Society*; Sekvenca gena *VHL* je preuzeta sa NCBI- The National Center for Biotechnology Information pod identifikacionim brojem NG\_0082123 za gen i L15409 za iRNK); ID-broj uzorka, FG-Furmanov gradus, TNM-stadijum tumora, cc-svetloćelijski karcinom, FS-*frame shift* mutacija, MS-*missense* mutacija, Spl-*splice site* mutacija, del-delecija, IFD-*in frame* delecija, ND-nije determinisano; (Modifikovano Damjanovic et al. 2016)

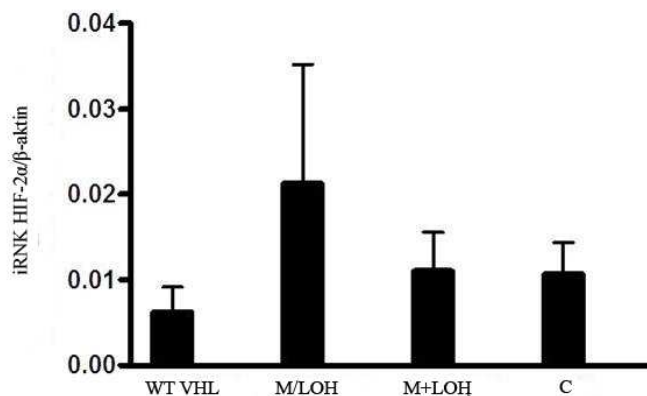
ID	FG	TNM	LOH	Metilacija	MLPA	MUTACIJA		Egzon	Tip mutacije
						Promena na nivou transkripta	Promena na nivou proteina		
1	1	pT1N0M0	ND	-	ND	-	-	-	-
2	3	pT3aNIM0	-	-	-	-	-	-	-
3	3	PT3aNxM0	-	-	-	-	-	-	-
4	1	pT1N0M0	+	ND	ND	c.263G>T	p.Trp88Leu	1	MS
5	1	pT1N0M0	+	ND	ND	c.364_366del	p.Alal22del	2	IFD
6	2	pT2N0M0	+	ND	ND	c.346del	p.Leull6Phefs*43	2	FS
7	2	pT3aN0M0	+	ND	ND	c.317del	p.Glyl06Alafs*53	1	FS
8	3	pT3aN0M0	-	ND	ND	c.439del	p.Ile147Phefs*12	2	FS
9	1	pT1N0M0	+	ND	ND	c.74C>T	p.Pro25Leu	1	MS
10	3	PT3aNIM0	+	ND	ND	c.267_292del	Asn90Profs*33	1	FS
11	3	pT3aN2M1	+	ND	ND	c.172del;175_177del	p.Arg58Gly; Pro59Glyfs*8	1	FS
12	3	PT3aNIM0	+	ND	ND	c.530_531del	p.Argl77Thrfs*78	3	FS
13	3	PT3aNIM0	-	-	-	-	-	-	-
14	3	PT3aNIM0	+	-	+	-	-	-	-
15	3	PT3aNIM0	+	-	-	-	-	-	-
16	2	PT3aNIM0	+	ND	ND	c.340G>T	p.Glyll4Cys	2	Spl/MS
17	3	pT1N1M0	-	-	-	-	-	-	-
18	1	pT1N0M0	+	-	+	-	-	-	-
19	3	pT3aN0M0	-	-	-	-	-	-	-
20	2	PT3aNIM0	+	-	-	-	-	-	-
21	2	pT3aN0M0	+	ND	ND	c.270_281del	p.Asn90_Glu94delinsLys	1	IFD
22	1	pT1N1M0	+	-	-	-	-	-	-
23	2	pT2N0M0	+	-	+	-	-	-	-
24	1	pT1NxM0	+	ND	ND	c.189del	p.Arg64Alafs*3	1	FS
25	1	pT1N0M0	+	-	-	-	-	-	-
26	2	PT3aNIM1	+	-	+	-	-	-	-
27	1	pT1N0M0	-	-	+	-	-	-	-
28	2	PT3aNIM0	+	-	-	-	-	-	-
29	2	pT1N0M0	+	-	-	-	-	-	-
30	3	PT3aNIM0	-	-	-	-	-	-	-
31	2	PT3aNIM0	+	ND	ND	c.258del	Val187Tyrfs*72	3	FS
32	1	pT1N0M0	+	ND	ND	c.358_359del	Asp121Cysfs*10	2	FS
33	2	PT3aNIM0	+	ND	ND	C.343C>T	p.His115Tyr	2	Spl/MS
34	2	pT3aN0M0	+	ND	ND	c.214T>C	p.Ser72Pro	1	MS
35	1	pT2NxM0	-	-	+	-	-	-	-
36	2	pT1NxM0	+	-	+	-	-	-	-
37	3	pT3aN2M1	+	-	+	-	-	-	-
38	2	PT3aNIM0	+	-	+	-	-	-	-
39	3	PT3aNIM0	+	-	+	-	-	-	-
40	3	pT3aNIM0	-	-	-	-	-	-	-
41	2	pT1N0M0	-	-	-	-	-	-	-
42	3	pT3aN0M0	-	-	+	-	-	-	-
43	3	PT3aNIM0	-	-	-	-	-	-	-
44	3	pT3aN0M0	+	ND	ND	c.257_258delinsT	p.Pro86Leufs*73	1	FS
45	3	PT3bNIM1	+	ND	ND	c.376del	p.Asp126Metfs*33	2	FS
46	2	pT3aNIM1	+	ND	ND	c.407_410del	p.Phe136Cysfs*22	2	FS
47	1	pT1bN0M0	+	-	+	-	-	-	-

## 4.2. Rezultati analiza asocijacije patohistoloških parametara sa mutacionim statusom gena *VHL*

U analiziranoj grupi pacijenata nije uočena korelacija između mutacionog statusa gena *VHL* i pola, starosti i stadijuma bolesti (TNM) ( $P > 0.05$ ). Uzorci tumorskog tkiva sa *wtVHL* genom imaju signifikantno veći Furmanov gradus ( $2.9 \pm 0.1$ ) u odnosu na tumore sa monoalelnom ( $1.7 \pm 0.2$ ;  $P = 0.014$ ) i bialelnom ( $2.0 \pm 0.1$ ;  $P = 0.009$ ) inaktivacijom gena *VHL*, dok razlike u gradusu *VHL* mutiranih (M/LOH vs. M+LOH) tumora nisu statistički značajne.

## 4.3. Rezultati analiza asocijacije nivoa HIF-2 $\alpha$ iRNK sa mutacionim statusom gena *VHL*

Ispitivanjem nivoa HIF-2 $\alpha$  iRNK metodom qRT-PCR nismo uočili statistički značajne razlike između analiziranih grupa tumorskih tkiva. Takođe, nisu detektovane razlike u nivou iRNK između tumora sa *wt VHL* genom, monoalelnom i bialelnom inaktivacijom gena *VHL* i neizmenjenog tkiva bubrega (Slika 24).

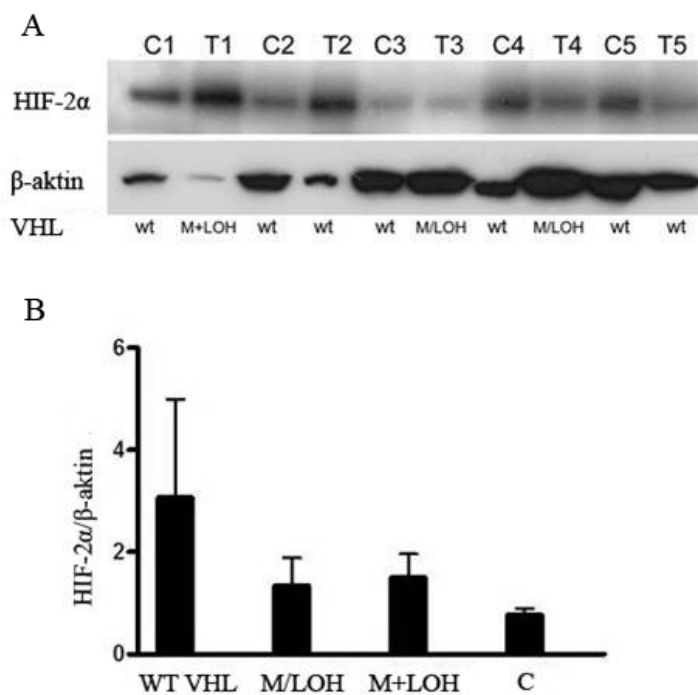


**Slika 24.** Histogramski prikaz nivoa HIF-2 $\alpha$  iRNK u uzorcima tumorskog tkiva sa različitim mutacionim statusom gena *VHL* i neizmenjenog tkiva bubrega. WT *VHL*, uzorci tumorskog tkiva kod kojih nije detektovana promena u genu *VHL*; M/LOH, uzorci tumorskog tkiva kod kojih je detektovana mutacija u genu *VHL* ili gubitak heterozigotnosti; M+LOH, uzorci tumorskog tkiva kod kojih je detektovana mutacija u genu *VHL* i gubitak heterozigotnosti; C, neizmenjeno tkivo bubrega; (Modifikovano Damjanovic et al. 2016)

#### 4.4. Rezultati analiza nivoa proteina HIF-2 $\alpha$ , mTOR, TSC1, eIF4E-BP1, p70S6K1, AMPK, REDD1 i PDK3 Western Blot metodom

##### 4.4.1. Rezultati analiza asocijacije nivoa proteina HIF-2 $\alpha$ sa mutacionim statusom gena *VHL*

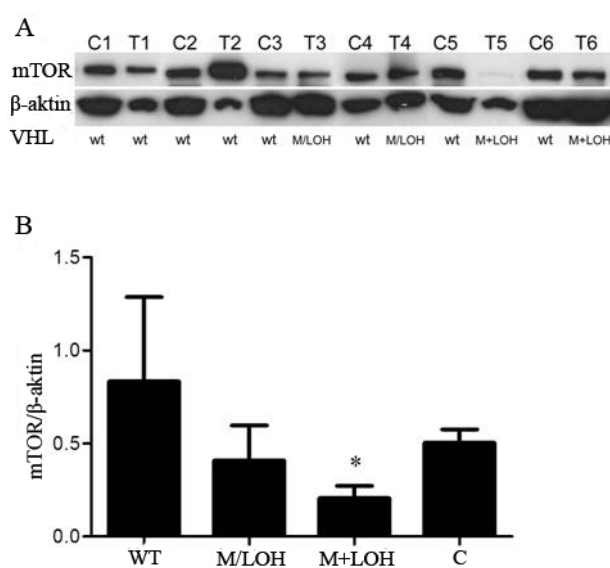
Analizom nivoa transkripcionog regulatora HIF-2 $\alpha$  nisu detektovane razlike između tumorskih tkiva sa različitim mutacionim statusom gena *VHL*, kao ni razlike u odnosu na neizmenjeno tkivo bubrega (Slika 25).



**Slika 25.** A- Prikaz nivoa proteina HIF-2 $\alpha$  detektovanog Western blot metodom; C1-C5, neizmenjeno tkivo; T1-T5, tumorsko tkivo; WT *VHL*, uzorci tumorskog tkiva kod kojih nije detektovana promena u genu *VHL*; M/LOH, uzorci tumorskog tkiva kod kojih je detektovana mutacija u genu *VHL* ili gubitak heterozigotnosti; M+LOH, uzorci tumorskog tkiva kod kojih je detektovana mutacija u genu *VHL* i gubitak heterozigotnosti; C, neizmenjeno tkivo bubrega; Normalizacija je urađena u odnosu na  $\beta$ -aktin; B - Histogramski prikaz nivoa proteina HIF-2 $\alpha$  u uzorcima tumorskog tkiva sa različitim mutacionim statusom gena *VHL* i uzorcima neizmenjenog tkiva (Modifikovano Damjanovic et al. 2016)

#### 4.4.2. Rezultati analiza asocijacije nivoa proteina mTOR sa mutacionim statusom gena *VHL*

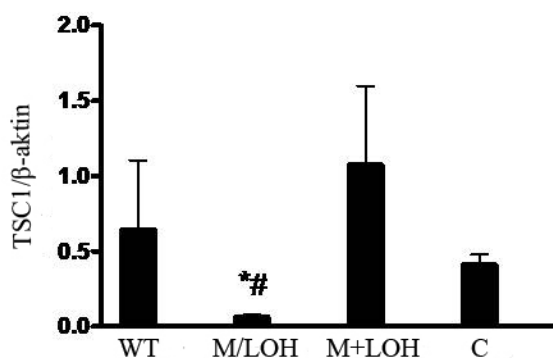
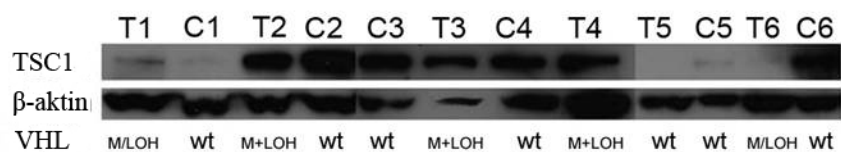
Analizom nivoa proteina mTOR nisu uočene razlike između tumora sa wt *VHL* genom, mono- i bialelnom inaktivacijom gena *VHL*. Takođe, nisu uočene statistički značajne promene u nivou ekspresije proteina mTOR u tumorima sa wt *VHL* genom i tumorima sa monoalelnom inaktivacijom gena *VHL* u odnosu na neizmenjeno tkivo. U tumorima sa bialelnom inaktivacijom gena *VHL* detektovan je značajno niži nivo proteina mTOR u odnosu na neizmenjeno tkivo ( $P = 0.002$ ) (Slika 26).



**Slika 26.** A- Prikaz nivoa proteina mTOR detektovanog Western blot metodom; C1-C3, neizmenjeno tkivo; T1-T3, tumorsko tkivo; WT *VHL*, uzorci tumorskog tkiva kod kojih nije detektovana promena u genu *VHL*; M/LOH, uzorci tumorskog tkiva kod kojih je detektovana mutacija u genu *VHL* ili gubitak heterozigotnosti; M+LOH, uzorci tumorskog tkiva kod kojih je detektovana mutacija u genu *VHL* i gubitak heterozigotnosti; C, neizmenjeno tkivo bubrega; Normalizacija je urađena u odnosu na  $\beta$ -aktin; B- Histogramski prikaz nivoa proteina mTOR u uzorcima tumorskog tkiva sa različitim mutacionim statusom gena *VHL* i uzorcima neizmenjenog tkiva (\* $M+LOH_{mTOR} < C_{mTOR}$ ) (Modifikovano Ilic et al. 2017)

#### 4.4.3. Rezultati analiza asocijacije nivoa proteina TSC1 sa mutacionim statusom gena *VHL*

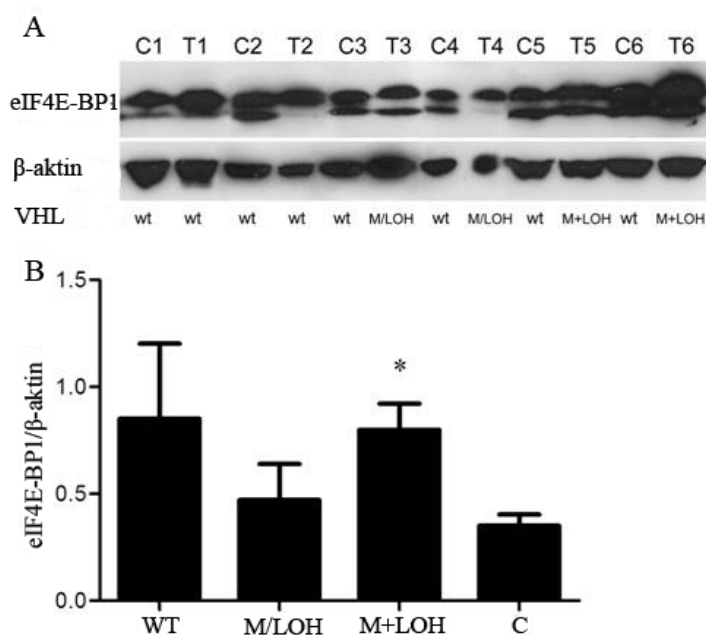
Kvantitativnom analizom utvrđeno je da tumori sa monoalelnom inaktivacijom gena *VHL* imaju značajno nižu ekspresiju proteina TSC1 u odnosu na tumore sa bialelnom inaktivacijom ( $P = 0.019$ ), kao i u odnosu na neizmenjeno tkivo bubrega ( $P = 0.001$ ) (Slika 27).



**Slika 27. A-** Prikaz nivoa proteina TSC1 detektovanog Western blot metodom; C1-C6, neizmenjeno tkivo; T1-T6, tumorsko tkivo; WT *VHL*, uzorci tumorskog tkiva kod kojih nije detektovana promena u genu *VHL*; M/LOH, uzorci tumorskog tkiva kod kojih je detektovana mutacija u genu *VHL* ili gubitak heterozigotnosti; M+LOH, uzorci tumorskog tkiva kod kojih je detektovana mutacija u genu *VHL* i gubitak heterozigotnosti; C, neizmenjeno tkivo bubrega; Normalizacija je urađena u odnosu na β-aktin; **B-** Histogramski prikaz nivoa proteina TSC1 u uzorcima tumorskog tkiva sa različitim mutacionim statusom gena *VHL* i uzorcima neizmenjenog tkiva bubrega ( $*M/LOH_{TSC1} < C_{TSC1}$ ;  $M/LOH_{TSC1} < M+LOH_{TSC1}$ ) (Modifikovano Damjanovic et al. 2016)

#### 4.4.4. Rezultati analiza asocijacije nivoa proteina eIF4E-BP1 sa mutacionim statusom gena *VHL*

Kvantitativnom analizom utvrđeno je da je nivo proteina eIF4E-BP1 u tumorskim tkivima sa bialelnom inaktivacijom gena *VHL* značajno veći u odnosu na neizmenjeno tkivo bubrega ( $P = 0.002$ ). Nisu detektovane značajne razlike u nivou proteina eIF4E-BP1 u ostalim grupama tumora (Slika 28).

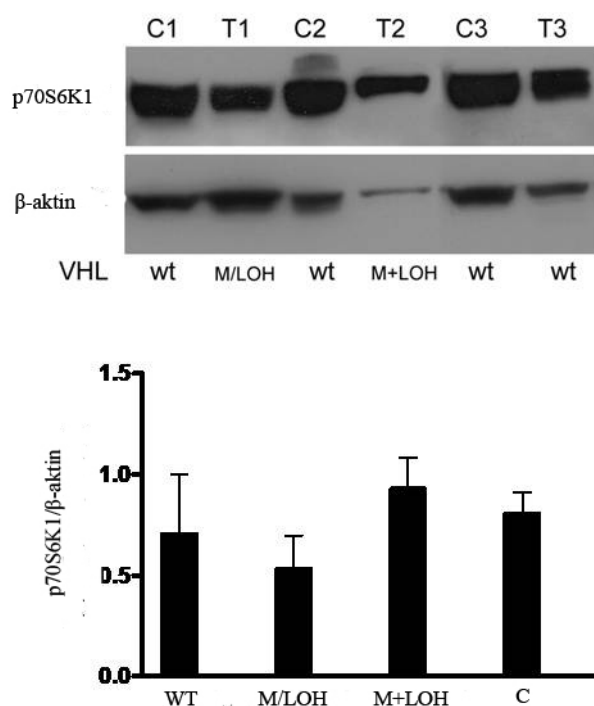


**Slika 28.** A- Prikaz nivoa proteina eIF4E-BP1 detektovanog Western blot metodom; C1-C3, neizmenjeno tkivo; T1-T3, tumorsko tkivo; WT *VHL*, uzorci tumorskog tkiva kod kojih nije detektovana promena u genu *VHL*; M/LOH, uzorci tumorskog tkiva kod kojih je detektovana mutacija u genu *VHL* ili gubitak heterozigotnosti; M+LOH, uzorci tumorskog tkiva kod kojih je detektovana mutacija u genu *VHL* i gubitak heterozigotnosti; C, neizmenjeno tkivo bubrega; Normalizacija je urađena u odnosu na  $\beta$ -aktin; **B-** Histogramski prikaz nivoa proteina eIF4E-BP1 u uzorcima tumorskog tkiva sa različitim mutacionim statusom gena *VHL* i uzorcima neizmenjenog tkiva bubrega (\* $M+LOH_{eIF4E-BP1} > C_{eIF4E-BP1}$ ) (Modifikovano Ilic et al. 2017)



#### 4.4.5. Rezultati analiza asocijacije nivoa proteina p70S6K1 sa mutacionim statusom gena *VHL*

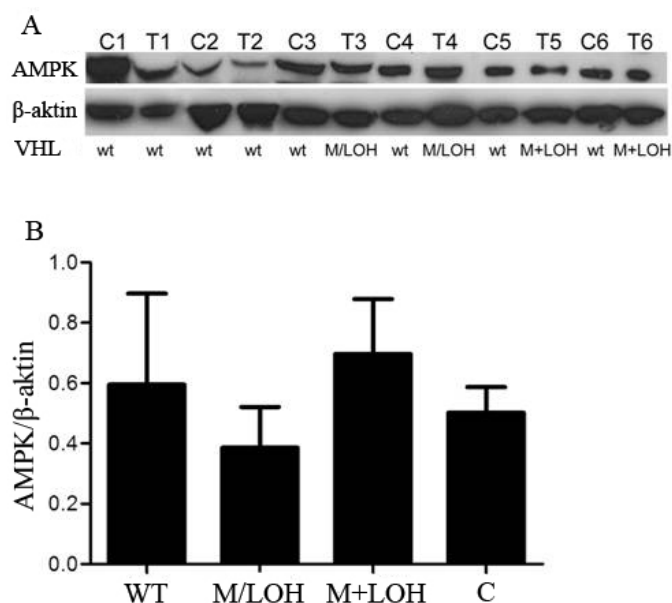
Kvantitativnom analizom nisu uočene razlike u ekspresiji proteina p70S6K1 u ispitivanim grupama tumorskih tkiva, kao ni razlike u odnosu na neizmenjeno tkivo bubrega (Slika 29).



**Slika 29. A-** Prikaz nivoa proteina p70S6K1 detektovanog Western blot metodom; C1-C3, neizmenjeno tkivo; T1-T3, tumorsko tkivo; WT *VHL*, uzorci tumorskog tkiva kod kojih nije detektovana promena u genu *VHL*; M/LOH, uzorci tumorskog tkiva kod kojih je detektovana mutacija u genu *VHL* ili gubitak heterozigotnosti; M+LOH, uzorci tumorskog tkiva kod kojih je detektovana mutacija u genu *VHL* i gubitak heterozigotnosti; C, neizmenjeno tkivo bubrega; Normalizacija je urađena u odnosu na  $\beta$ -aktin; **B-** Histogramski prikaz nivoa proteina p70S6K1 u uzorcima tumorskog tkiva sa različitim mutacionim statusom gena *VHL* i uzorcima neizmenjenog tkiva.

#### 4.4.6. Rezultati analiza asocijacije nivoa proteina AMPK sa mutacionim statusom gena *VHL*

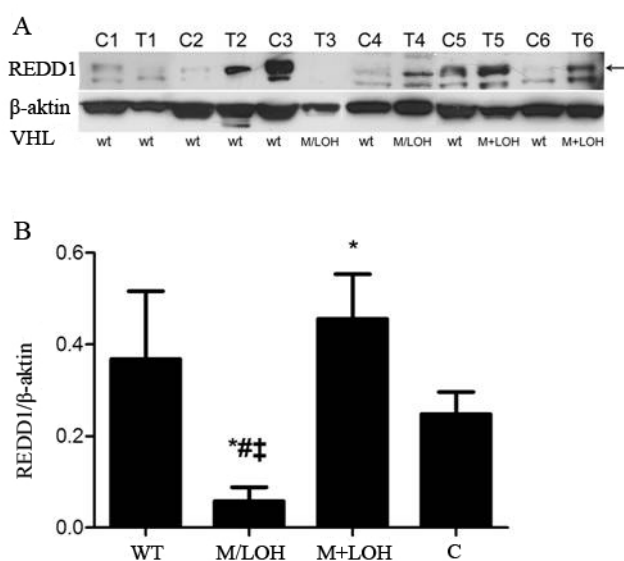
Kvantifikacijom ekspresije proteina AMPK nisu detektovane statistički značajne razlike između analiziranih grupa tumorskih tkiva. Takođe, nisu detektovane promene u nivou proteina AMPK između tumora sa *wt VHL* genom, monoalelnom inaktivacijom i bialelnom inaktivacijom gena *VHL* i neizmenjenog tkiva bubrega (Slika 30).



**Slika 30.** A- Prikaz nivoa proteina AMPK detektovanog Western blot metodom; C1-C3, neizmenjeno tkivo; T1-T3, tumorsko tkivo; WT *VHL*, uzorci tumorskog tkiva kod kojih nije detektovana promena u genu *VHL*; M/LOH, uzorci tumorskog tkiva kod kojih je detektovana mutacija u genu *VHL* ili gubitak heterozigotnosti; M+LOH, uzorci tumorskog tkiva kod kojih je detektovana mutacija u genu *VHL* i gubitak heterozigotnosti; C, neizmenjeno tkivo bubrega; Normalizacija je urađena u odnosu na  $\beta$ -aktin; B- Histogramski prikaz nivoa proteina AMPK u uzorcima tumorskog tkiva sa različitim statusom gena *VHL* i uzorcima neizmenjenih tkiva bubrega (Modifikovano Ilic et al. 2017)

#### 4.4.7. Rezultati analiza asocijacije nivoa proteina REDD1 sa mutacionim statusom gena *VHL*

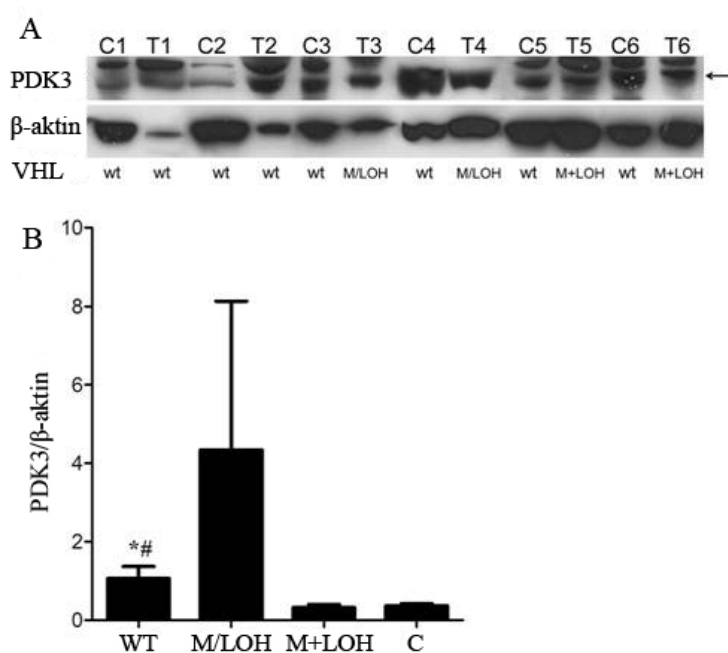
U uzorcima tumorskog tkiva sa monoalelnom inaktivacijom gena *VHL* detektovana je značajno niža ekspresija proteina REDD1 u odnosu na tumore sa neizmenjenim genom *VHL* ( $P = 0.042$ ), u odnosu na tumore sa bialelnom inaktivacijom gena *VHL* ( $P < 0.005$ ) i u odnosu na neizmenjeno tkivo ( $P = 0.004$ ). U tumorima sa bialelnom inaktivacijom gena *VHL* detektovan je viši nivo proteina REDD1 u odnosu na neizmenjeno tkivo ( $P = 0.008$ ) (Slika 31).



**Slika 31.** A- Prikaz nivoa proteina REDD1 detektovanog Western blot metodom; C1-C3, neizmenjeno tkivo; T1-T3, tumorsko tkivo; WT *VHL*, uzorci tumorskog tkiva kod kojih nije detektovana promena u genu *VHL*; M/LOH, uzorci tumorskog tkiva kod kojih je detektovana mutacija u genu *VHL* ili gubitak heterozigotnosti; M+LOH, uzorci tumorskog tkiva kod kojih je detektovana mutacija u genu *VHL* i gubitak heterozigotnosti; C, neizmenjeno tkivo bubrega; Normalizacija je urađena u odnosu na β-aktin; B- Histogramski prikaz nivoa proteina REDD1 u uzorcima tumorskog tkiva sa različitim mutacionim statusom gena *VHL* i uzorcima neizmenjenog tkiva (\* $\# \ddagger$   $M/LOH_{REDD1} < C_{REDD1}$ , WT  $VHL_{REDD1}$ ,  $M+LOH_{REDD1}$ ; \* $M+LOH_{REDD1} > C_{REDD1}$ ) (Modifikovano Ilic et al. 2017)

#### 4.4.8. Rezultati analiza asocijacije nivoa proteina PDK3 sa mutacionim statusom gena *VHL*

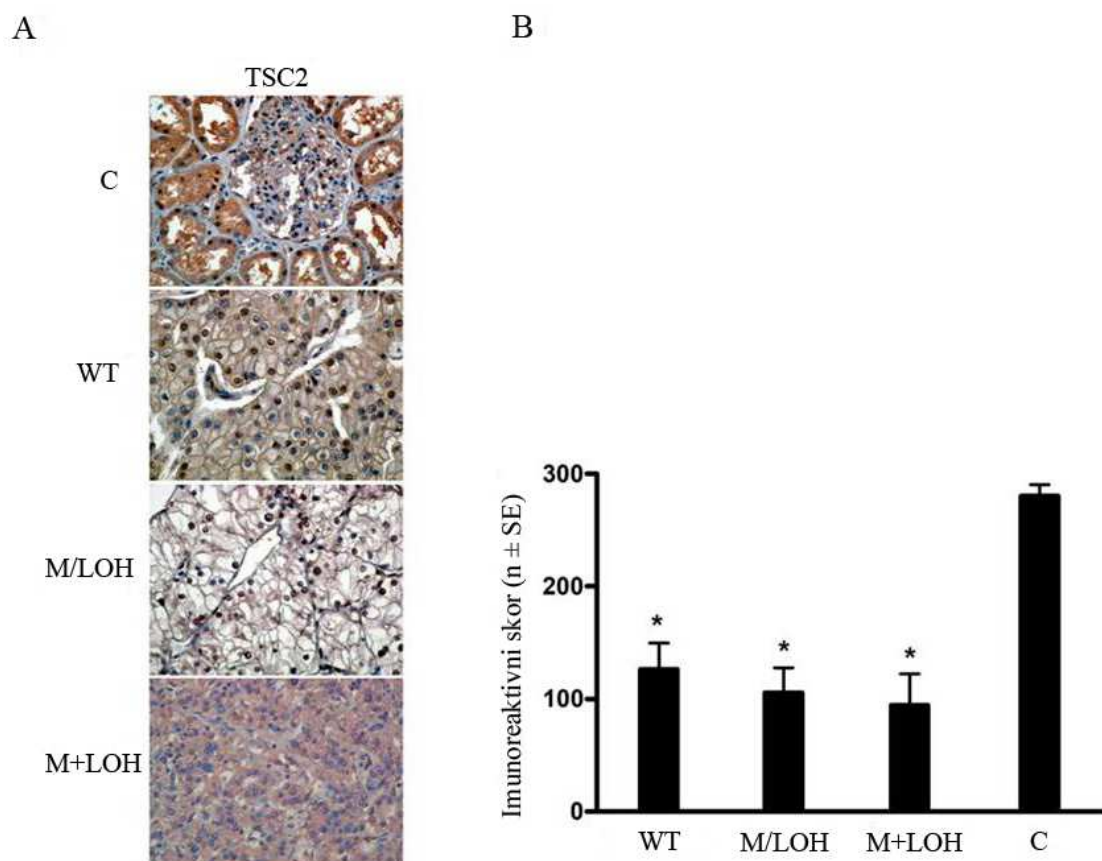
Western blot analizom uočen je statistički značajno viši nivo proteina PDK3 u tumorima sa wt *VHL* genom u odnosu na neizmenjeno tkivo ( $P = 0.016$ ), kao i u odnosu na tumorsko tkivo sa bialelnom inaktivacijom gena *VHL* ( $P = 0.012$ ). (Slika 32).



**Slika 32.** **A-** Prikaz nivoa proteina PDK3 detektovanog Western blot metodom; C1-C3, neizmenjeno tkivo; T1-T3, tumorsko tkivo; WT *VHL*, uzorci tumorskog tkiva kod kojih nije detektovana promena u genu *VHL*; M/LOH, uzorci tumorskog tkiva kod kojih je detektovana mutacija u genu *VHL* ili gubitak heterozigotnosti; M+LOH, uzorci tumorskog tkiva kod kojih je detektovana mutacija u genu *VHL* i gubitak heterozigotnosti; C, neizmenjeno tkivo bubrega; Normalizacija je urađena u odnosu na  $\beta$ -aktin; **B-** Histogramski prikaz nivoa proteina PDK3 u uzorcima tumorskog tkiva sa različitim mutacionim statusom gena *VHL* i uzorcima neizmenjenog tkiva bubrega (\*wt  $VHL_{PDK3} > C_{PDK3}$ ; #wt  $VHL_{PDK3} > M+LOH_{PDK3}$ ) (Modifikovano Ilic et al. 2017)

#### **4.5. Rezultati analize nivoa ekspresije proteina TSC2 metodom imunohistohemije i asocijacija sa mutacionim statusom gena *VHL***

Imunohistohemijskom analizom uzoraka pozitivna ekspresija proteina TSC2 detektovana je kod 89 % (31/35) svetloćelijskih karcinoma. Nukleusna imunoreaktivnost procenjena je imunoreaktivnim skorom 2+ i 3+ , dok je citoplazmatska ekspresija proteina TSC2 procenjena imunoreaktivnim skorom 1+. Semikvantitativnom procenom totalnog imunoreaktivnog skora uočen je statistički značajno niži nivo ekspresije proteina TSC2 u tumorskom tkivu u odnosu na neizmenjeno tkivo bubrega ( $P < 0.05$ ). Nisu uočene značajne razlike u nivou ekspresije proteina TSC2 u odnosu na mutacioni status gena *VHL* (Slika 33).



**Slika 33.** Rezultati dobijeni imunohistohemijomskom analizom: **A** - C, ekspresija proteina TSC2 u neizmenjenom tkivu bubrega nakon primene anti TSC2 antitela; wt, ekspresija proteina TSC2 u svetloćelijskom karcinomu bubrega sa neizmenjenim *VHL* genom; M/LOH, ekspresija proteina TSC2 u svetloćelijskom karcinomu bubrega sa monoalelnom inaktivacijom gena *VHL*; M+LOH, ekspresija TSC2 proteina u svetloćelijskom karcinomu bubrega sa bialelnom inaktivacijom gena *VHL*; **B** – Grafički prikaz nivoa ekspresije proteina TSC2 u uzorcima tumorskog tkiva sa različitim mutacionim statusom gena *VHL* i uzorcima neizmenjenog tkiva bubrega (\* $WT_{VHL_{TSC2}}$ ,  $M/LOH_{TSC2}$ ,  $M+LOH_{TSC2}$  <  $C_{TSC2}$ ) (Modifikovano Damjanovic et al. 2016)

## 4.6. Rezultati multiple regresione analize

Utvrđivanje odnosa ispitivanih parametara u uzorcima tumorskih tkiva sa različitim mutacionim statusom gena *VHL* urađeno je multiplom regresionom analizom.

### 4.6.1. Rezultati multiple regresione analize za uzorke tumorskih tkiva sa wt genom *VHL*

#### 4.6.1.1. Rezultati multiple regresione analize sa Furmanovim gradusom kao zavisnom promenljivom

Regresionim modelom dobijeno je da je varijabilitet gradusa tumora sa wt genom *VHL* određen nivoom proteina HIF-2 $\alpha$ . Procenat varijabiliteta gradusa tumora predstavljen je koeficijentom determinacije ( $R^2$ ) i iznosi 96.3 % (Tabela 25). Na osnovu koeficijenta nagiba (b) uočena je negativna korelacija između ekspresije proteina HIF-2 $\alpha$  i gradusa tumora ( $P = 0.002$ ).

**Tabela 25.** Regresioni model kojim se objašnjava varijabilitet zavisne promenljive (Furmanov gradus) u uzorcima tumorskih tkiva sa wt genom *VHL*

Model	Nezavisna promenljiva	Regresiona konstanta	Koeficijent nagiba (B)	SE	<i>P</i>	Koeficijent determinacije ( $R^2$ )
wt <i>VHL</i>	HIF-2 $\alpha$	3.09	- 0.084	0.011	0.002	0.936

#### 4.6.1.2. Rezultati multiple regresione analize sa proteinom HIF-2 $\alpha$ kao zavisnom promenljivom

Regresionim modelom dobijeno je da odnos nivoa iRNK za HIF-2 $\alpha$  u tumorskom i neizmenjenom tkivu (nivo iRNK<sub>HIF-2 $\alpha$</sub>  u tumorskom tkivu / nivo iRNK<sub>HIF-2 $\alpha$</sub>  u neizmenjenom tkivu) determiniše varijabilitet nivoa proteina HIF-2 $\alpha$  (96 %) u tumorskom tkivu sa wt genom *VHL*. Uočena je pozitivna korelacija između nivoa

proteina HIF-2 $\alpha$  u tumorskom tkivu i odnosa nivoa iRNK za HIF-2 $\alpha$  u tumorskom i neizmenjenom tkivu ( $P = 0.001$ ) (Tabela 26).

**Tabela 26.** Regresioni model kojim se objašnjava varijabilitet zavisne promenljive (protein HIF-2 $\alpha$ ) u uzorcima tumorskih tkiva sa wt genom *VHL*

Model	Nezavisna promenljiva	Regresiona konstanta	Koeficijent nagiba (B)	SE	<i>P</i>	Koeficijent determinacije (R <sup>2</sup> )
<b>wtVHL</b>	iRNK <sub>HIF-2<math>\alpha</math></sub> T/C	-2.14	3.007	0.296	0.001	0.963

#### 4.6.1.3. Rezultati multiple regresione analize sa proteinom TSC1 kao zavisnom promenljivom

Regresionom analizom utvrđeno je da se 88,7 % varijabiliteta nivoa proteina TSC1 u tumorima sa neizmenjenim genom *VHL* može objasniti nivoom proteina REDD1, pri čemu je uočeno da je povećanje nivoa ekspresije proteina TSC1 praćeno povećanjem nivoa proteina REDD1 ( $P = 0.005$ ) (Tabela 27).

**Tabela 27.** Regresioni model kojim se objašnjava procenat varijabiliteta zavisne promenljive (protein TSC1) u uzorcima tumorskih tkiva sa wt genom *VHL*

Model	Nezavisna promenljiva	Regresiona konstanta	Koeficijent nagiba (B)	SE (B)	<i>P</i>	Koeficijent determinacije (R <sup>2</sup> )
<b>wtVHL</b>	REDD1	- 0.433	2.930	0.522	0.005	0.887



#### 4.6.1.4. Rezultati multiple regresione analize sa proteinom p70S6K1 kao zavisnom promenljivom

Regresionom analizom utvrđeno je da se 87,2 % varijabiliteta nivoa ekspresije proteina p70S6K1 u tumorima sa neizmenjenim genom *VHL* može objasniti novoom ekspresije proteina TSC1, pri čemu je uočeno da je povećanje nivoa ekspresije proteina TSC1 praćeno povećanjem nivoa ekspresije proteina p70S6K1 ( $P = 0.002$ ) (Tabela 28).

**Tabela 28.** Regresioni modeli kojima se objašnjava procenat varijabiliteta zavisne promenljive (protein p70S6K1) u uzorcima tumorskih tkiva sa wt genom *VHL*

Model	Nezavisna promenljiva	Regresiona konstanta	Koeficijent nagiba (B)	SE (B)	<i>P</i>	Koeficijent determinacije (R <sup>2</sup> )
wt <i>VHL</i>	TSC1	0.314	0.515	0.113	0.002	0.872

#### 4.6.1.5. Rezultati multiple regresione analize sa proteinom PDK3 kao zavisnom promenljivom

Regresionom analizom utvrđeno je da se 77.8 % varijabiliteta nivoa proteina PDK3 u uzorcima tumorskih tkiva sa neizmenjenim genom *VHL* može objasniti nivoom ekspresije proteina AMPK, pri čemu je uočeno da je povećanje nivoa AMPK praćeno povećanjem nivoa proteina PDK3 u tumorima sa genom wt*VHL* ( $P = 0.013$ ) (Tabela 29).

**Tabela 29.** Regresion model kojim se objašnjava procenat varijabiliteta zavisne promenljive (protein PDK3) u uzorcima tumorskih tkiva sa wt genom *VHL*

Model	Nezavisna promenljiva	Regresiona konstanta	Koeficijent nagiba (B)	SE (B)	<i>P</i>	Keoficijent determinacije (R <sup>2</sup> )
wt <i>VHL</i>	AMPK	0.285	0.778	0.09	0.013	0.974

#### 4.6.2. Rezultati multiple regresione analize za uzorke tumorskih tkiva sa monoalelnom inaktivacijom gena *VHL*

##### 4.6.2.1. Rezultati multiple regresione analize sa proteinom HIF-2 $\alpha$ kao zavisnom promenljivom

Regresionom analizom utvrđeno je da se 94.3 % varijabiliteta nivoa ekspresije proteina HIF-2 $\alpha$  u tumorima sa monoalelnom inaktivacijom gena *VHL* može objasniti nivoom ekspresije proteina PDK3, pri čemu je uočena pozitivna korelacija između nivoa proteina HIF-2 $\alpha$  i PDK3 ( $P = 0.001$ ) (Tabela 30).

**Tabela 30.** Regresioni model kojim se objašnjava varijabilitet zavisne promenljive (protein HIF-2 $\alpha$ ) u uzorcima tumorskih tkiva sa monoalelnom inaktivacijom gena *VHL*

Model	Nezavisna promenljiva	Regresiona konstanta	Koeficijent nagiba (B)	SE (B)	<i>P</i>	Keoficijent determinacije (R <sup>2</sup> )
M/LOH	PDK3	0.36	0.193	0.021	0.001	0.943

#### 4.6.2.2. Rezultati multiple regresione analize sa proteinom AMPK kao zavisnom promenljivom

Regresionom analizom utvrđeno je da se 74,6 % varijabiliteta nivoa ekspresije proteina AMPK u tumorima sa monoalelnom inaktivacijom gena *VHL* može objasniti nivoom ekspresije proteina TSC1. Uočena je pozitivna korelacija između proteina AMPK i TSC1 ( $P = 0.006$ ) (Tabela 31).

**Tabela 31.** Regresion model kojima se objašnjava procenat varijabiliteta zavisne promenljive (protein AMPK) u uzorcima tumorskih tkiva sa monoalelnom inaktivacijom gena *VHL*

Model	Nezavisna promenljiva	Regresiona konstanta	Koeficijent nagiba (B)	SE (B)	<i>P</i>	Koeficijent determinacije (R <sup>2</sup> )
M/LOH	TSC1	- 0.390	7.448	1.775	0.006	0.746

#### 4.6.2.3. Rezultati multiple regresione analize sa proteinom REDD1 kao zavisnom promenljivom

Regresionom analizom utvrđeno je da se 55,8 % varijabiliteta nivoa ekspresije proteina REDD1 u tumorima sa monoalelnom inaktivacijom gena *VHL* može objasniti nivoom ekspresije proteina p70S6K1. Između proteina REDD1 i p70S6K1 uočena je pozitivna korelacija ( $P = 0.013$ ) (Tabela 32).

**Tabela 32.** Regresioni model kojim se objašnjava procenat varijabiliteta zavisne promenljive (protein REDD1) u uzorcima tumorskih tkiva sa monoalelnom inaktivacijom gena *VHL*

Model	Nezavisna promenljiva	Regresiona konstanta	Koeficijent nagiba (B)	SE (B)	<i>P</i>	Koeficijent determinacije (R <sup>2</sup> )
M/LOH	p70S6K1	- 0.015	0.137	0.043	0.013	0.558

#### 4.6.3. Rezultati multiple regresione analize za uzorke tumorskih tkiva sa bialelnom inaktivacijom gena *VHL*

##### 4.6.3.1. Rezultati multiple regresione analize sa proteinom HIF-2 $\alpha$ kao zavisnom promenljivom

Regresionom analizom utvrđeno je da se 71.9 % varijabiliteta nivoa ekspresije proteina HIF-2 $\alpha$  u tumorima sa bialelnom inaktivacijom gena *VHL* može objasniti odnosom nivoa proteina eIF4E-BP1 u tumorskom i neizmenjenom tkivu (nivo proteina eIF4E-BP1 u tumorskom tkivu / nivo proteina eIF4E-BP1 u neizmenjenom tkivu). Povećanje nivoa proteina eIF4E-BP1 u tumorskom u odnosu na neizmenjeno tkivo praćeno je povećanjem nivoa ekspresije proteina HIF-2 $\alpha$  u uzorcima tumora ( $P = 0.001$ ) (Tabela 33).

**Tabela 33.** Regresioni model kojim se objašnjava procenat varijabiliteta zavisne promenljive (protein HIF-2 $\alpha$ ) u uzorcima tumorskih tkiva sa bialelnom inaktivacijom gena *VHL*

Model	Nezavisna promenljiva	Regresiona konstanta	Koeficijent nagiba (B)	SE (B)	<i>P</i>	Koeficijent determinacije (R <sup>2</sup> )
M+LOH	eIF4EBP1 T/C	1.019	0.026	0.004	0.001	0.719

## 5. DISKUSIJA

U odnosu na status gena *VHL*, možemo razlikovati tri grupe svetloćelijskih karcinoma bubrega: tumore sa neizmenjenim genom *wtVHL* i funkcionalnim proteinom VHL, tumore sa monoalelskom inaktivacijom gena *VHL* i redukovanom dozom funkcionalnog proteina VHL i tumore sa bialelskom inaktivacijom gena *VHL* i potpunim odsustvom funkcionalnog proteina VHL. Klasifikacija svetloćelijskih tumora bubrega prema mutacionom statusu gena *VHL* u potpunosti je opravdana činjenicom da u određenim studijama bialelska inaktivacija pomenutog gena nije detektovana kod ~ 20 % svetloćelijskih renalnih karcinoma, kao i činjenicom da tumori u zavisnosti od mutacionog statusa gena *VHL* pokazuju jasne razlike u ekspresionom profilu komponenata signalnih puteva (Beroukhim et al. 2009).

Procentualna zastupljenost somatskih mutacija, kao i bialelna inaktivacija gena *VHL* u analiziranim uzorcima svetloćelijskog karcinoma bubrega je u saglasnosti sa podacima iz literature (Banks et al. 2006; Gnarra et al. 1994; Shuin et al. 1994; Whaley et al. 1994; Kondo et al. 2002). Uzevši u obzir odsustvo germinativnih mutacija gena *VHL* kod svih pacijenata, ispitivani uzorci svetloćelijskog karcinoma su sporadičnog tipa, a ne jedna od manifestacija naslednog von Hippel Lindau sindroma.

Monoalelska inaktivacija uočena je kod 23,4 % ispitivanih uzoraka i posledica je mutacije/gubitka heterozigotnosti u okviru jednog alela, dok je drugi alel neizmenjen (eng. *wild type*). Haploinsuficijentnim genom smatra se gen koji u jednoj kopiji ne može obavljati svoju funkciju na odgovarajući način. Sve je više publikacija koje ukazuju na značaj haploinsuficijencije tumor supresora u procesu onkogeneze (Macleod 2000; Berger AH i Pandolfi 2011). Gen *VHL* se smatra *gatekeeper* tumor supresorom kod kojeg je gubitak funkcije posledica bialelske inaktivacije, međutim postojanje tumorskih tkiva sa mutiranim samo jednim alelom implicira potencijalni uticaj dozne zavisnosti gena *VHL* na proces onkogeneze. Redukovana koncentracija proteina VHL bi mogla da indukuje tumorigenezu, ne samo preko stabilizacije HIF- $\alpha$ , već i gubitkom ostalih funkcija VHL-a, kao što su regulacija ćelijskog ciklusa i transkripcije (Uvod, Slika 4)

(Gossage i Eisen 2010; Roe et al. 2011; Metcalf et al. 2014; Roberts et al. 2009; Yang et al. 2007; Kaelin 2008; Hoebeek 2006). Takođe, jedno od mogućih objašnjenja nastanka renalnog karcinoma u slučaju monoalelske inaktivacije gena *VHL*, mogao bi biti fenomen udružene haploinsuficijencije (eng. *compound haploinsufficiency*), odnosno haploinsuficijencije većeg broja tumor supresora lociranih u bliskom okruženju (Brugarolas 2013; The Cancer Genome Atlas Research Network 2013). Razmatrajući ulogu gena *VHL* u patogenezi svetloćelijskog karcinoma, trebalo bi uzeti u obzir i epigenetičku regulaciju ekspresije, koja uključuje metilaciju *CpG* ostrvaca promotorskog regiona i gensko utišavanje molekulima miRNK. Prema literaturnim podacima u 5-10 % svetloćelijskog karcinoma disregulacija funkcije proteina VHL asocirana je sa redukcijom nivoa ekspresije metilacijom promotora *VHL* gena (Herman et al. 1994; Clifford et al. 1998; Nickerson et al. 2008). Analizom promotorskog regiona gena *VHL* nismo potvrdili supresiju ekspresije navedenim mehanizmom, što se delimično može objasniti činjenicom da smo u analizu metilacionog statusa uključili samo one uzorke u kojima je gen *VHL* neizmenjen. Hipermetilacija promotorskog regiona koja nije udružena sa mutacijom gena *VHL* redak je događaj i detektovana je u malom broju slučajeva i u studijama sa frekventnijim prisustvom hipermetilovanog promotora gena *VHL* (Banks et al. 2006; Young et al. 2009). Novijim istraživanjima potvrđen je direktan kontakt miRNK-155 i miRNK-331 sa 3'-UTR regionom iRNK za *VHL*, kao i regulatorna funkcija miRNK-92 u ekspresiji gena *VHL* (Kong et al. 2014; Cao et al. 2015; Valera et al. 2011).

Ni u jednom uzorku sa bialelnom inaktivacijom kao sekundarni mutacioni događaj nije detektovana intragenska tačkasta mutacija ili delecija/duplikacija, već gubitak heterozigotnosti lokusa koji se nalaze ushodno i nishodno od gena *VHL*, tako da bi se mehanizam inaktivacije alela koji je zahvaćen gubitkom heterozigotnosti mogao objasniti potpunim/delimičnim gubitkom kraćeg kraka trećeg hromozoma, kao i promenama na nivou *silencer*-a i *enhancer*-a koji regulišu transkripcionu aktivnost gena *VHL*.

Osam delecionih *in frame* mutacija rezultuju prevremenom terminacijom translacije i sintezom nefunkcionalnog skraćenog proteina sa izmenjenom aminokiselinskom sekvencom počevši od pozicije mutacije. Sve navedene mutacije su

pozicionirane u regionu drugog egzona koji kodira deo proteina odgovoran za uspostavljanje interakcije sa proteinima elonginom B, C, kulinom i Rbx1, što ukazuje na smanjeni ubikvitinacioni potencijal, kao i sniženu/inhibiranu degradaciju i akumulaciju HIF-1/2 $\alpha$  (Hansen et al. 2002). Sedam od osam navedenih mutacija su udružene sa gubitkom heterozigotnosti za minimum jedan mikrosatelitni marker u okviru 3p regiona.

Nismo detektovali tačkaste mutacije u regionu koji kodira prvih 54 amino kiselina, a koji je odgovoran za ostvarivanje kontakta sa fibronektinom. Tačkaste mutacije u okviru navedenog regiona u slučaju svetloćelijskog karcinoma bubrega nisu do sada prijavljene u literaturi (Banks et al. 2006).

Genetička varijanta Pro25Leu (rs35460768) predstavlja nesinonimnu zamenu tipa tranzicije (c.74 C > T) koja je prema podacima iz literature u populaciji zastupljena sa frekvencijom većom od 1 % (eng. *Single Nucleotide Polimorphism*, SNP). Navedenu genetičku varijantu smo detektovali u konstitutivnoj, kao i u tumorskoj DNK. U dosadašnjim publikacijama nismo pronašli informaciju o asociranosti navedene genetičke varijante i nastanka ccRCC, tako da se rs35460768 može smatrati neutralnom varijantom (Leonardi et al. 2011). U istom uzorku je detektovan gubitak heterozigotnosti 3p regiona. Takođe, nema podataka u vezi uticaja ove genetičke varijante na povećanje fragilnosti 3p lokusa i gubitka heterozigotnosti, kao i njihovom udruženom uticaju na proces onkogeneze bubrežnog tkiva.

*Missense* mutacije p.Gly114Cys (c.340 G>T; nesinonimna supstitucija tipa transverzije) i p.His115Tyr (c.343 C>T; nesinonimna supstitucija tipa tranzicije) nalaze se na početku drugog egzona gena *VHL* u neposrednoj blizini akceptorskog iskrajajućeg mesta i pripadaju tipu *splice site* mutacija. Navedene promene menjaju mesto iskrajanja primarnog transkripta, što rezultuje formiranjem izmenjene iRNK i proteina sa izmenjenom aminokiselinskom sekvencom i funkcijom.

*Missense* mutacija p.Trp88Leu (c.263 G>T; nesinonimna supstitucija tipa transverzije) se nalazi u okviru prvog egzona. Tri prethodno navedene mutacije nalaze se u okviru  $\beta$ -domena proteina *VHL*, preko kojeg se ostvaruje interakcija sa članovima

familije protein kinaze C (PKC $\zeta$ , PKC $\lambda$  i PKC $\delta$ ) čija je funkcija u regulaciji fundamentalnih ćelijskih procesa (Okuda et al. 1999). Pored uticaja na obradu iRNK, amino kiselina His<sup>115</sup> sa Trp<sup>88</sup> učestvuje u ostvarivanju interakcije između hidroksiliranog HIF-1 $\alpha$  i pVHL-a. Strukturnim analizama pokazano je da je specifičnost i stabilnost pVHL-HIF- $\alpha$ Hyp<sup>564</sup> interakcije omogućena smeštanjem hidroksiprolinskog bočnog lanca u duboki džep koji formiraju konzervirane amino kiseline Trp<sup>88</sup>, Tyr<sup>98</sup>, Ser<sup>111</sup>, His<sup>115</sup> i Trp<sup>117</sup> pVHL-a. U okviru džepa se formiraju vodonične veze između HIF- $\alpha$ Hyp<sup>564</sup>, hidroksi grupe Ser<sup>111</sup> i amino grupe imidazolnog prstena His<sup>115</sup>. Supstitucijom navedenih amino kiselina onemogućeno je uspostavljanje interakcije između HIF- $\alpha$  i pVHL-a (Miller et al. 2005; Min et al. 2002). Pomenute mutacije prijavljene su u bazi mutacija *The Human Gene Mutation Database* (Available from: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). Kod oba uzorka detektovan je gubitak heterozigotnosti 3p lokusa.

Proces onkogeneze u uzorcima tkiva kod kojih nisu detektovane promene u okviru gena *VHL*, kao i gubitak heterozigotnosti za šest ispitivanih mikrosatelitnih markera 3p lokusa verovatno je asociran sa alteracijama u drugim genima. Primenom nove generacije sekvenciranja kompletnog genoma/egzoma identifikovani su tumor supresorski geni koji su takođe asocirani sa nastanakom sporadičnih svetloćelijskih karcinoma bubrega, *PBRM1* (*Polybromo 1*, mutiran u ~ 50 % ccRCC), *BAP1* (*BRCA 1-associated protein 1*, mutiran u ~ 15 % ccRCC) i *SETD2* (*SET domain-containing protein 2*, ~ 15 % ccRCC) (Brugarolas et al. 2013). Gen *PBRM1* kodira protein koji je integralna komponenta ATP zavisnog kompleksa čija je funkcija remodeliranje hromatina, prilikom aktivacije ili represije transkripcije određenih gena, indukovane nuklearnim hormonskim receptorima. Gen *BAP1* kodira za protein koji pripada subfamiliji ubikvitin C-terminusnih hidrolaza i učestvuje u deubikvitinaciji histona H2A i HCFC1. *SETD2* kodira protein koji učestvuje u transkripcionoj aktivaciji hromatina metilovanjem Lys<sup>36</sup> ostatka histona H3 (H3K36). Navedeni geni lokalizovani su u okviru kraćeg kraka trećeg hromozoma (lokus 3p21), u blizini centromernog regiona, 50 mb od gena *VHL* (Brugarolas et al. 2013). Mikrosatelitni markeri koje smo ispitivali lokalizovani su u regionu koji obuhvata 20 mb od *VHL* gena, tako da nemamo informaciju u vezi očuvanosti ostatka hromozoma. Sato i saradnici su kod 42 % *wtVHL*



svetloćelijskog karcinoma detektovali bialelnu inaktivaciju *TCEB1* gena, koji kodira elongin C. Posledica mutacija u elonginu C je nemogućnost formiranja E3 ligaznog kompleksa i akumulacija faktora indukovanih hipoksijom. Utvrđeno je da prisustvo mutacija u genu *TCEB1* isključuje prisustvo mutacija u genu *VHL*, što ukazuje na snažan selektivni pritisak ka disregulaciji faktora indukovanih hipoksijom u više od 95 % svetloćelijskog karcinoma (Sato et al. 2013).

Uprkos ključnoj ulozi inaktivacije gena *VHL* u razvoju hereditarnih i sporadičnih svetloćelijskih karcinoma bubrega, ne može se sa sigurnošću tvrditi da je to *per se* uzrok nastanka ovog tipa karcinoma. Slična frekvencija *wt VHL* tumora i tumora u kojima je prisutan mutirani *VHL* gen u odnosu na stadijum, ukazuje na to da su mutacije gena *VHL* verovatno rani događaj u onkogenezi bubrežnog tkiva, što je potvrđeno i drugim studijama (Lubensky et al. 1996). Utvrđeno je da bubrezi pacijenata sa *VHL* sindromom sadrže brojne preneoplastične lezije sa bialelskom inaktivacijom gena *VHL*, od kojih će se samo veoma mali broj razviti u maligne karcinome, što sugeriše da su za malignu transformaciju bubrežnog tkiva pored rane inaktivacije ili haploinsuficijencije gena *VHL*, neophodni i dodatni mutacioni događaji. U skladu sa tim, u svetloćelijskom karcinomu su detektovane promene koje uključuju gubitak hromozoma 14q, duplikacije hromozoma 5q, potencijalno patogene mutacije u tumor supresorskim genima *CDKN2A*, *TP53*, *NF2* i *PTEN*, kao i mutacije u već pomenutim genima koji učestvuju u remodeliranju hromatina (Kaelin 2012).

*VHL* zavisni i *VHL* nezavisni mehanizam u nastanku i progresiji svetloćelijskog karcinoma (Bodmer et al. 2002) podržan je rezultatima ove studije, koji ukazuju na postojanje razlika u aktivaciji signalnih puteva koji determinišu specifičan metabolički profil, kao odgovor i adaptaciju na prisustvo različitih genetičkih alteracija u tkivu bubrega.

Analizom nivoa iRNK i proteina HIF-2 $\alpha$ , nismo detektovali značajne razlike između ispitivanih grupa tumorskog tkiva, kao ni značajne promene u odnosu na odgovarajuće neizmenjeno tkivo bubrega. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima određenih autora (Nyhan et al. 2011), a razlikuju se od rezultata Gordanove istraživačke grupe u čijim studijama prisustvo HIF-2 $\alpha$  nije potvrđeno kod *wtVHL* tumora (Gordan

et al 2005). Odsustvo razlika u nivou ekspresije HIF-2 $\alpha$  kod tumora sa *wtVHL* genom i tumora sa monoalelnom i bialelnom inaktivacijom, implicira postojanje VHL nezavisnog mehanizma regulacije faktora indukovanih hipoksijom i može se objasniti svojstvima solidnih tumora. Mikrosredina solidnih tumora karakteriše se prisustvom subregiona sa visokim pritiskom intersticijalne tečnosti, niskom ekstracelularnom pH vrednošću, slabom snabdevenošću nutrijentima i hipoksijom (Luoto et al. 2013). U tumorskom tkivu, hipoksija nastaje usled disbalansa između zahteva ćelije za potrošnjom kiseonika i njegove dostupnosti. Heterogenost tumorskog tkiva potiče od prisustva regiona koji se nalaze u uslovima akutne i/ili hronične hipoksije. Tumorske ćelije koje se nalaze na distanci > 70  $\mu$ m od krvnih sudova izložene su hroničnoj hipoksiji, koja indukuje proces nekroze ukoliko u periodu od nekoliko dana ne dođe do reoksigenacije (Vaupel i Harrison 2004). Brojnim studijama u kojima je detektovan nivo oksigenacije tumorskih tkiva primenom različitih metoda, uključujući pO<sub>2</sub> elektrode, pozitronsku emisionu tomografiju i imunohistohemiju, potvrđeno je da hipoksija jeste svojstvo solidnih tumora, odnosno da solidni tumori predstavljaju dinamičke strukture u kojima koegzistiraju regioni izloženi akutnoj ili hroničnoj hipoksiji (Kaelin 2005b). Našom studijom obuhvaćeni su uzorci tumora u uznapredovalom stadijumu, tako da možemo smatrati da se sastoje od subregiona u akutnoj i/ili hroničnoj hipoksiji. U uslovima smanjene koncentracije kiseonika inhibirana je aktivnost prolil hidroksilaza i zaustavljen je proces hidroksilacije (Kaelin 2005a, Kaelin 2005b), čime prisustvo funkcionalnog proteina VHL postaje irelevantno u procesu degradacije faktora indukovanih hipoksijom. Odsustvo direktne asociranosti između inaktivacije *VHL-a* i ekspresije faktora indukovanih hipoksijom potvrđeno je *in vitro* studijama, praćenjem ekspresije HIF inducibilnih gena u ćelijskim linijama renalnog karcinoma, 786-0 *VHL*<sup>+/+</sup> i 786-0 *VHL*<sup>-/-</sup>, pri čemu je utvrđeno da je određen broj istih gena eksprimiran u oba ćelijska tipa. Pomenuti eksperimenti predstavljaju još jednu potvrdu o postojanju VHL zavisnog i VHL nezavisnog odgovora ćelija ccRCC na hipoksični stres (Lin et al. 2011; Kong et al. 2007; Baldewijns et al. 2009). Međutim, nije poznato da li je aktivacija istih gena u hroničnoj hipoksiji praćena i smanjenom ekspresijom proteina VHL u tumorskom tkivu sa neizmenjenim genom *VHL*. Postranslaciona inaktivacija proteina VHL koja podrazumeva ubikvitin zavisnu degradaciju praćenu padom koncentracije VHL proteina, predstavlja jednu od

komponentata celularnih adaptacija na hipoksične uslove (Liu et al. 2011) i zapažena je u specifičnim ćelijskim *in vitro* modelima. Retki su radovi, uključujući i naš, koji sugerišu da se mutacioni status gena *VHL* ne može smatrati prediktorom nivoa ekspresije proteina HIF- $\alpha$  (Nyhan et al. 2011; Kong et al. 2007; Damjanović et al. 2016).

Odsustvo razlika u nivou iRNK HIF-2 $\alpha$  u tumorskom tkivu bubrega u odnosu na korespondirajuće neizmenjeno tkivo, sugeriše *VHL* nezavisnu regulaciju gena *HIF2A*, kao i postojanje ekvilibrijuma u procesu transkripcije, translacije i degradacije transkripcionog regulatora HIF-2 $\alpha$  što su pokazali i X. Kong i saradnici (Kong et al. 2007). Navedena grupa autora ističe da hronična hipoksija nema signifikantnog efekta na stabilnost i akumulaciju proteina HIF-2 $\alpha$  (Kong et al. 2007).

Iako nema razlike u nivou proteina HIF-2 $\alpha$  između *wtVHL* tumorskog i korespondirajućeg neizmenjenog tkiva, povećanje odnosa nivoa HIF-2 $\alpha$  iRNK između tumorskog i neizmenjenog tkiva korelira sa povećanjem proteina HIF-2 $\alpha$  u tumorskom tkivu. Dobijeni rezultat verovatno ukazuje na postojanje transkripcionih mehanizama regulacije ekspresije proteina HIF-2 $\alpha$  u pomenutoj grupi tumora (Krieg et al. 2000). Ovo se može objasniti činjenicom da protein HIF-2 $\alpha$  autoregulatornim mehanizmom pozitivne povratne sprege, indukuje transkripciju gena *HIF2A* (Sato et al. 2002).

Kvantitativnom analizom ekspresije ukupnog proteina mTOR nismo uočili značajnu razliku između *wtVHL* tumorskog tkiva i korespondirajućeg neizmenjenog tkiva. Takođe smo utvrdili da tumori sa očuvanom funkcijom proteina VHL imaju značajno veći Fuhrman-ov gradus u odnosu na tumore sa mono- i bialelnom inaktivacijom gena *VHL*. Uzevši u obzir da Fuhrman-ov gradus na osnovu karakteristika nukleolusa reflektuje metaboličke promene i biosintetsku aktivnost ćelije (Qayyum et al. 2013; Kucejova et al. 2011), možemo zaključiti da ova grupa tumora ima visoku aktivnost kompleksa mTORC1. Povišena metabolička aktivnost karakteristična je za kasnu G1 fazu ćelijskog ciklusa u kojoj dolazi do povećanja ukupne biomase i rasta kako bi se ćelija podelila na dve identične potomačke ćelije (Derenzini et al. 2009). Dostupnost glukoze i amino kiselina omogućava aktivaciju mTORC1 kompleksa, sintezu proteina i tranziciju ćelijskog ciklusa iz G1 u S fazu (Moniz et al. 2014).

Povišen nivo kinaze piruvat dehidrogenaze 3 (PDK3) u tumorima sa očuvanom funkcijom VHL proteina u odnosu na neizmenjeno tkivo sugeriše smanjenu aktivnost piruvat dehidrogenaze i glikolizu kao dominantan put za produkciju energije u kasnoj G1 fazi. Odsustvo razlika u ekspresiji AMPK između wtVHL tumora i odgovarajućeg neizmenjenog tkiva, moglo bi se objasniti sličnim energetske statusom koji maligna ćelija postiže ubrzanom glikolizom i reduktivnom karboksilacijom uvođenjem glutamata u Krebsov ciklus (Gwinn et al. 2008; Gameiro et al. 2013). Tokom progresije ćelijskog ciklusa dolazi do naizmeničnog smenjivanja glikolize i oksidativne fosforilacije, koje je uslovljeno ekspresijom faktora indukovanih hipoksijom (Moniz et al. 2014). U prilog tumačenju da je glikoliza kod ovih tumora dominantan energetski put ukazuje rezultat regresione analize kojom smo utvrdili da je najveći deo varijabilnosti tumorskog gradusa određen nivoom HIF-2 $\alpha$ , između kojih postoji negativna korelacija. Sličan rezultat dobijen je eksperimentima na ksenograftima ccRCC 786-O, pri čemu je potvrđeno da HIF-2 $\alpha$  stimuliše proces oksidativne fosforilacije (Biswas et al. 2010). Takođe smo utvrdili da se veliki deo promena u nivou PDK3 (97.4 %) može objasniti promenama nivoa proteina AMPK. Pozitivna korelacija između nivoa AMPK i PDK3 reflektuje dualističku prirodu AMPK koja metaboličkim reprogramiranjem ispoljava efekat tumor supresora ili onkogeno prateći faze ćelijskog ciklusa. Smanjenje intenziteta oksidativne fosforilacije praćeno je aktivacijom AMPK koja će indukovati preuzimanje i regulisati fluks glukoze (Hao et al. 2010; Wu et al. 2013).

Pokazano je da povećanje intenziteta glikolize rezultuje padom pH vrednosti mikrosredine usled oslobađanja veće koncentracije laktata u ekstracelularni prostor, što indukuje translokaciju proteina VHL u nukleolus čime je onemogućena interakcija sa HIF-om u hipoksičnim i normoksičnim uslovima (Mekhail et al. 2004). Dinamika lokalizacije i funkcije proteina VHL može biti od izuzetnog značaja u patogenezi svetloćelijskih karcinoma sa wtVHL genom. Činjenica da VHL može da bude lociran u citoplazmi i jedru ide u prilog postojanja VHL nezavisnih mehanizama u regulaciji faktora indukovanih hipoksijom o kojem je već bilo reči (Mekhail et al. 2004). Nukleolusna sekvestracija proteina VHL i inhibicija njegove aktivnosti tokom različitih

faza ćelijskog ciklusa moglo bi da objasni specifične patohistološke karakteristike svetloćelijskog karcinoma, nezavisno od genetičkog *background*-a.

Nismo uočili statistički značajne razlike u nivou proteina p70S6K1 između tumorskog i neizmenjenog tkiva bubrega. Značajan procenat varijabiliteta ekspresije p70S6K1 (92.6 %) određen je promenama nivoa TSC1 u tumorima sa *wtVHL* genom, a uočena je pozitivna korelacija između pomenutih proteina u tumorskom tkivu. Dobijeni rezultat sugeriše fiziološku aktivaciju negativne povratne sprege i pokušaj supresije aktivnosti kompleksa mTORC1. Određeni autori sugerišu postojanje pozitivne povratne sprege između aktivnosti mTORC1 i p70S6K1. Naime, uz mTORC1 kompleks u aktivaciji p70S6K1 učestvuje i protein kinaza C (PKC), a aktivirani p70S6K1 fosforiliše Thr<sup>2446</sup>/Ser<sup>2448</sup> u okviru represornog domena mTOR proteina koji indukuje aktivnost mTORC1 kompleksa (Holz i Blenis 2005; Chiang i Abraham 2005). Dodatno, niži nivo proteina TSC2 kod ovih tumora, verovatno ukazuje na smanjenu biološku funkciju kompleksa TSC1/TSC2. Gubitak represije preko TSC1/TSC2 kompleksa bio bi jedan od mehanizama koji dovodi do autonomne aktivnosti mTORC1 i p70S6K1. Regulacija proteina p70S6K1, nezavisna od mTORC1 kompleksa može predstavljati još jedan od razloga ograničene efikasnosti inhibitora mTOR-a u terapiji svetloćelijskog karcinoma bubrega.

Povećanju aktivnosti mTORC1 kompleksa u *wtVHL* tumorima doprinosi i izostanak supresornog efekta proteina REDD1, što proizilazi iz činjenice da nismo zapazili značajne promene nivoa proteina REDD1 u odnosu na neizmenjeno tkivo. Dobijeni rezultat u skladu je sa podatkom da je gubitak funkcionalnog VHL proteina neophodan za porast nivoa REDD1 u svetloćelijskim karcinomima bubrega (Kucejova et al. 2011). Takođe smo utvrdili da postoji pozitivna korelacija između nivoa proteina REDD1 i TSC1, kao i da je veliki procenat varijabiliteta ekspresije proteina REDD1 (88.2 %) određen ekspresijom TSC1. Rezultati naše *in vivo* studije su konzistentni sa rezultatima *in vitro* eksperimenata, kojima je utvrđeno da je za efikasnu inhibiciju mTORC1 kompleksa REDD1 proteinom neophodan funkcionalno očuvan TSC1/TSC2 kompleks (Brugarolas et al 2004; Sofer et al. 2005). Odsustvo razlike u ekspresiji TSC1 proteina, kao i niža ekspresija TSC2 proteina u odnosu na neizmenjeno tkivo bubrega, sugeriše slabiji supresorski efekat pomenutog kompleksa na mTORC1, što potvrđuju i

rezultati istraživanja prema kojima je i umereno smanjenje ekspresije TSC2 dovoljno da blokira inhibiciju mTORC1 kompleksa indukovanu proteinom REDD1 (Brugarolas et al 2004; Tan et al. 2013).

Tumori sa monoalelnom inaktivacijom obuhvataju tumore sa mutacijom u genu *VHL* i tumore sa gubitkom heterozigotnosti koji potencijalno može da dovede do inaktivacije susednih tumor supresorskih gena u 3p regionu. Heterogenost genskih promena u ovoj grupi uzoraka moglo bi da bude objašnjenje varijabilne ekspresije PDK3 i nemogućnosti tumačenja dozne zavisnosti proteina VHL u tumorskom tkivu, što predstavlja značajnu razliku između *in vivo* i *in vitro* studija sa indukovanom mutagenezom. Značajan procenat varijabiliteta nivoa HIF-2 $\alpha$  (94.1 %) determinisan je nivoom PDK3, iako nismo našli razliku u ekspresiji PDK3 između neizmenjenog i tumorskog tkiva. Pozitivna korelacija između HIF-2 $\alpha$  i PDK3, koja nije zapažena u neizmenjenom tkivu ukazuje na postojanje specifičnog mehanizma metaboličke regulacije u tumorima sa haploinsuficijentnim genom *VHL*. Pored aktivacije glikolitičkog puta kao dominantnog u produkciji ATP-a (Heiden et al. 2009), tumorske ćelije modifikuju i glutaminski metabolizam kako bi obezbedile efikasniju iskoristljivost ugljenika u anaboličkim procesima (DeBerardinis et al. 2010). Povećanje aktivnosti PDK3 enzima rezultuje padom koncentracije citrata i posledičnom indukcijom reduktivne karboksilacije koja je će obezbediti raspoloživost metaboličkih prekursora za lipidnu sintezu. *In vitro* i *in vivo* eksperimentima na *VHL* deficijentnim RCC ćelijskim linijama i *VHL* deficijentnim humanim tumorskim ksenograftima, potvrđeno je da reduktivnu karboksilaciju promovišu hipoksija i gubitak *VHL*-a. Rekonstitucijom *VHL*-a u *VHL* deficijentnim RCC ćelijama inhibirana je reduktivna karboksilacija i reaktivirana oksidacija glukoze. U *VHL* deficijentnim RCC ćelijama, koje ekspimiraju isključivo HIF-2 $\alpha$  rezistentan na VHL zavisnu degradaciju (HIF-2 $\alpha$  paralog) indukovana je reduktivna karboksilacija, dok u NEK ćelijama miša tu ulogu preuzima HIF-1 $\alpha$ . Ovo implicira *species* i ćelijski specifičnu regulaciju reduktivne karboksilacije (Gameiro et al. 2013). Uzevši u obzir suprotan efekat HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  na promociju svetloćelijskih karcinoma (Raval et al. 2005), verovatno, HIF-2 $\alpha$  ima dominantnu ulogu u opisanoj komponenti metaboličke adaptacije, što podržavaju i

rezultati naše studije koji se odnose na tumore sa monoalelnom inaktivacijom *VHL* gena.

U tumorima sa monoalelnom inaktivacijom gena *VHL* uočili smo značajno smanjenje nivoa REDD1 proteina u odnosu na wt *VHL* tumore, tumore sa bialelnom inaktivacijom gena *VHL* i korespondirajuće neizmenjeno tkivo, što odgovara rezultatima dobijenim na Caki-2 ćelijskim linijama (ćelije svetloćelijskog karcinoma bubrega) kod kojih je funkcija proteina VHL delimično očuvana (Kucejova et al. 2011). Značajno niža ekspresija REDD1 proteina praćena je paradoksnim smanjenjem nivoa TSC1. Objašnjenje za niži nivo navedenih proteina moglo bi da bude prisustvo mutacija u okviru gena koji kodiraju REDD1 i TSC1. Našom studijom nije bilo obuhvaćeno određivanje mutacionog statusa pomenutih gena, ali prema literaturnim podacima, somatske mutacije ovih gena predstavljaju redak događaj u svetloćelijskom karcinomu bubrega (Kucejova et al. 2011). Trebalo bi uzeti u obzir i regulaciju gena posredstvom miRNK, kojom bi mogla da se objasni redukovana ekspresija proteina (Manikandan et al. 2012). Rezultati studija pokazali su povišen nivo miR-221 koja se vezuje za 3'-UTR region *Redd1* transkripta kod pacijenata sa svetloćelijskim karcinomom bubrega (Pineau et al. 2010; Teixeira et al. 2014; Xing i He 2016; Li et al. 2015). Dodatno, određeni autori sugerišu da REDD1 u uslovima hronične hipoksije više ne ispoljava mTORC1 regulatornu funkciju (Brugarolas et al. 2004). Kinaza GSK3 $\beta$  (eng. *Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$* , GSK3 $\beta$ ) uključena je u ubikvitin zavisnu degradaciju proteina REDD1, TSC1 i TSC2 što bi moglo da objasni sličan obrazac ekspresionog nivoa pomenutih proteina u ovoj grupi tumora (Katiyar et al. 2009; Hu et al. 2008). Takođe, GSK3 $\beta$  fosforilisanjem proteina VHL deluje na njegove HIF-nezavisne funkcije, tako da bi trebalo ispitati mogući značaj ove kinaze u patogenezi svetloćelijskog karcinoma bubrega (Hergovich et al. 2006). Našom studijom pokazali smo da postoji pozitivna korelacija između ekspresije REDD1 i p70S6K proteina, kao i to da je značajan procenat varijabiliteta ekspresije REDD1 (55.8 %) određen promenama nivoa p70S6K1. Navedeni rezultat uz smanjenje nivoa REDD1 sugeriše da se regulatorni efekat REDD1 gubi verovatno na dva načina: smanjenjem ekspresije i pojavom rezistencije ciljnih molekula na njegovo delovanje. Slično je i sa funkcionalnim odnosom između TSC1 i AMPK proteina. Promene u ekspresiji AMPK objašnjavaju se velikim delom

promenama u TSC1 (74.6 %) u tumorima sa monoalelnom inaktivacijom *VHL* gena. Regulacija ekspresije TSC1 i AMPK pozitivnom povratnom spregom sugeriraju prisutan, ali neefikasan tumor supresorski put.

Patohistološkom analizom utvrđeno je da *VHL*<sup>-/-</sup> tumori imaju značajno niži Fuhrman-ov gradus od *VHL* pozitivnih tumora. Glavni regulator biogeneze ribozoma i veličine nukleolusa (Fuhrman-ov gradus) je mTORC1. Stoga se Fuhrman-ov gradus koristi kao marker aktivnosti mTORC1 (Kucejova et al. 2011; Tsang et al. 2003). Prema Fuhrman-ovom gradusu u analiziranim *VHL*<sup>-/-</sup> tumorima postoji niža aktivnost mTORC1 u odnosu na wt*VHL* tumore. Ovo je praćeno smanjenjem nivoa ukupnog mTOR proteina kod *VHL*<sup>-/-</sup> tumora u odnosu na neizmenjeno tkivo.

Takođe smo pokazali da u ovim tumorima postoji pozitivna korelacija između povećanja ekspresije eIF4E-BP1 i HIF-2 $\alpha$ . Poznato je da inhibicija samo mTORC1 kompleksa nema efekta na ekspresiju HIF-2 $\alpha$ , za razliku od mTORC2 kompleksa koji reguliše njegovu ekspresiju na posttranskripcionom nivou (Nayak et al. 2013). Hipoksija potencira vezivanje HIF-1 $\alpha$  za HRE sekvencu *4E-BP1* gena i indukuje povećanje ekspresije 4E-BP1, koje dovodi do supresije aktivnosti mTORC1 kompleksa (Azar et al. 2013). Ovo je obično praćeno i povećanjem fosforilacije eIF4E-BP1 u različitim tipovima karcinoma (Cha et al. 2015; Karlsson et al. 2013). Obzirom da je za efikasnu translaciju HIF-2 $\alpha$  neophodna slobodna forma eIF4E koja postoji samo kada je fosforilisan 4E-BP1, moguće je da je u *VHL*<sup>-/-</sup> tumorima porast ekspresije eIF4E-BP1 praćen i povećanom fosforilacijom samog proteina. Prisustvo HIF-2 $\alpha$  u tumorskom tkivu ukazuje na efikasnu fosforilaciju eIF4E-BP1 i prisutnu aktivnost mTORC2 kompleksa. Fosforilaciju 4E-BP1 najčešće obavlja mTORC1 čija je aktivnost u ovim tumorima smanjena. Objasnjenje za ekspresiju HIF-2 $\alpha$  u *VHL*<sup>-/-</sup> tumorima mogla bi da bude povećana aktivnost MAP kinaza koje takođe regulišu fosforilaciju 4E-BP1 (Martineau et al. 2013). Dobijeni rezultat ide u prilog pojačane aktivnosti mTORC2 puta što su i drugi autori pokazali (Block et al. 2010).

U tumorskim tkivima sa bialelnom inaktivacijom gena *VHL* prisutno je značajno povećanje nivoa REDD1 u odnosu na odgovarajuće neizmenjeno tkivo bubrega, što je dobijeno i studijama drugih (Kucejova et al. 2011). Povišen nivo proteina REDD1



praćen nižim nivoom proteina mTOR i TSC2, kao i nepromenjenim ekspresijom TSC1 u odnosu na neizmenjeno tkivo, sugeriše moguću preraspodelu proteina mTOR ka kompleksu mTORC2.

Ovo je prva studija rađena na uzorcima svetloćelijskog karcinoma bubrega u kojoj je ispitivana ekspresija i pokazana asocijacija nivoa proteina PDK3 sa mutacionim statusom gena *VHL*. Potvrđena je i asocijacija nivoa proteina REDD1 i TSC1 sa mutacionim statusom gena *VHL*. Rezultati ove studije pokazali su naučnu opravdanost, jer pružaju informacije koje se odnose na nivo ekspresije komponenata mTOR signalnog puta u zavisnosti od mutacionog statusa gena *VHL*, što doprinosi potpunijem razumevanju molekularnih mehanizama koji su uključeni u proces onkogeneze bubrežnog tkiva. Dalja istraživanja mogla bi da doprinesu razvoju novih pristupa u terapiji svetloćelijskog karcinoma bubrega.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih analizom mutacionog statusa gena *VHL* i nivoa proteina mTOR signalnog puta u svetloćelijskom karcinomu bubrega, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Mutacija gena *VHL* praćena je gubitkom heterozigotnosti 3p lokusa u 87.1 % sporadičnih svetloćelijskih karcinoma bubrega.
2. Tumorska tkiva sa neizmenjenim genom *VHL* imaju statistički značajno veći Furmanov gradus u odnosu na tumorska tkiva sa monoalelnom i bialelnom inaktivacijom gena *VHL*.
3. Nivo ekspresije iRNK za HIF-2 $\alpha$  nezavisan je od mutacionog statusa gena *VHL*.
4. Nivo ekspresije proteina HIF-2 $\alpha$ , mTOR, eIF4E-BP1, p70S6K i AMPK ne korelira sa mutacionim statusom gena *VHL*.
5. Nivo ekspresije proteina TSC1, REDD1 i PDK3 korelira sa mutacionim statusom gena *VHL*.

## 7. LITERATURA

- Alessi DR, Pearce LR, Garcìa-Martìnez JM. New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond. *Science Signaling*. 2009; 2(67), pe27.
- Algaba F , Akaza H, Beltrán AL, Martignoni G, Moch H, Montironi R and Reuter V. Current pathology keys of renal cell carcinoma. *European Urology*. 2011; 60(4): 634-43.
- Altenberg B, Greulich KO. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics*. 2004; 84: 1014-20.
- Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, and Gleadle JM. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia inducible factor. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279(37): 38458-65.
- Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology/VHL. [Internet]. 2015 [cited 2015 March 05]. Available from: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/VHLID132.html>
- Ausubel F, Brent R, Kingston RE, DD Moore, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, eds. Short protocols in molecular biology. Third edition. New York: John Willey & Sons; 1995.
- Azar R, Lasfargues C, Bousquet C, and Pyronnet S. Contribution of HIF-1 $\alpha$  in 4E-BP1 Gene Expression. *Molecular Cancer Res*. 2013; 11(1): 54-61.
- Bai X and Jiang Y. Key factors in mTOR regulation. *Cell Mol Life Sci*. 2010; 67: 239-53.
- Baker JC, Yan X, Peng T, Kasten S, Roche TE: Marked differences between two isoforms of human pyruvate dehydrogenase kinase. *J Biol Chem*. 2000; 275: 15773-81.

- Baldewijns MM, van Vlodrop IJH, Smits KM, Vermeulen PB, Van den Eynden GG, Schot F, Roskams T, von Poppel H, van Engeland M, and de Bruine AP. Different angiogenic potential in low and high grade sporadic clear cell renal cell carcinoma is not related to alterations in the von Hippel-Lindau gene. *Cellular Oncology*. 2009; 31: 371-82.
- Banks RE, Tirukonda P, Taylor C, Hornigold N, Astuti D, Cohen D, Maher ER, Stanley AJ, Harnden P, Joyce A, Knowles M and Selby PJ. Genetic and epigenetic analysis of von Hippel – Lindau (VHL) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer. *Cancer Research*. 2006; 66(4): 2000-11.
- Bardella C, Pollard PJ, Tomlinson I. SDH mutations in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*. 2011; 1807(11): 1432-43.
- Beltran AL, Scarpelli M, Montironi R, Kirkali Z. 2004 WHO Classification of the Renal Tumors of the Adults. *European Urology*. 2006; 49: 798 -805.
- Benvenuto G, Li S, Brown SJ, Braverman R, Vass WC, Cheadle JP, Halley DJ, Sampson JR, Wienecke R, DeClue JE. The tuberous sclerosis-1 (TSC1) gene product hamartin suppresses cell growth and augments the expression of the TSC2 product tuberin by inhibiting its ubiquitination. *Oncogene*. 2000; 19: 6306-16.
- Berger AH and Pandolfi PP. Haplo-insufficiency: a driving force in cancer. *Journal of Pathology*. 2011; 223: 137-46.
- Bernardi R, Guernah I, Jin D, Grisendi S, Alimonti A, Teruya-Feldstein J, Cordon-Cardo C, Simon MC, Rafii S and Pandolfi PP. PML inhibits HIF-1 $\alpha$  translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature*. 2006; 442: 779-85.
- Beroukhim R, Brunet JP, Di Napoli A, Mertz KD, Seeley A, Pires MM, Linhart D, Worrell RA, Moch H, Rubin MA, Sellers WR, Meyerson M, Linehan WM, Kaelin WG Jr, and Signoretti S. Patterns of gene expression and copy-number alterations in von-Hippel Lindau disease-associated and sporadic clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res*. 2009; 69(11): 4674-81.
- Bird A. The Essentials of DNA Methylation. *Cell*. 1992; 70: 5-8.

- Bird AP. CpG-Rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*. 1986; 321: 209-13.
- Biswas S, Troy H, Leek R, Chung YL, Li J, Raval RR, Turley H, Gatter K, Pezzella F, Griffiths JR, Stubbs M, and Harris AL. Effects of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  on growth and metabolism of clear-cell renal cell carcinoma 786-0 xenografts. *Journal of Oncology*. 2010; 2010: ID 757908.
- Block K, Gorin Y, New DD, Eid A, Chelmicki T, Reed A, et al. The NADPH oxidase subunit p22phox inhibits the function of the tumor suppressor protein tuberlin. *Am J Pathol*. 2010; 176(5): 2447-55.
- Bodmer D, van den Hurk W, van Groningen JJM, Eleveld MJ, Martens GJM, Weterman MAJ, and van Kessel A. Understanding familial and non-familial renal cell cancer. *Human Molecular Genetics*. 2002; 11(20): 2489-98.
- Bowker-Kinley MM, Davis WI, Wu P, Harris RA, Popov KM: Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem J*. 1998; 329(1): 191-6.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72: 248-54.
- Brašanac D, Todorović V, Knežević-Ušaj S, Marković-Lipkovski J. Histogenesis of renal cell carcinoma. *Med Pregl* 1996; 49(1-2): 23-25.
- Bratslavsky G, Sudarshan S, Neckers L, and Linehan WM. Pseudohypoxic pathways in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(16): 4667-71.
- Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, Witters LA, Ellisen LW, Kaelin WG Jr. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes & Development*. 2004; 18(23): 2893-904.
- Brugarolas J. PBRM1 and BAP1 as novel targets for renal cell carcinoma. *Cancer J*. 2013; 19(4): 324-32.

- Bruick RK and McKnight SL. A Conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. 2001; 294: 1337-40.
- Cancer Registry of Central Serbia. Institute of Public Health of the Republic of Serbia 2012; Available from: <http://www.batut.org.rs/>
- Cao Y, Zhang J, Xiong D, Wang D, Wu T, Huang A and Tang H. Hsa-miR-331-3p inhibits VHL expression by directly targeting its mRNA 3'-UTR in HCC cell lines. *Acta Biochim Pol*. 2015; 62(1): 77-82.
- Carling D. The AMP-activated protein kinase cascade – a unifying system for energy control. *Trends in Biochemical Sciences*. 2004; 29(1): 18-24.
- Cha YL, Li PD, Yuan LJ, Zhang MY, Zhang YJ, Rao HL, Zhang HZ, Zheng XFZ, Wang HY. EIF4EBP1 is associated with poor survival and disease progression in patients with hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE*. 2015; 10(2): e0117493.
- Chiang GG and Abraham RT. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Serin-2448 is mediated by p70S6 kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280: 25485-90.
- Choi CC, Lee KM, Choi JM, Kim TJ, Kim WZ, Lee JW, Lee SJ, Lee JH, Bae DS, Kim BG. Hypermethylation and loss of heterozygosity of tumor suppressor genes on chromosome 3p in cervical cancer. *Cancer Letters*. 2007; 255: 26-33.
- Chong-Kopera H, Inoki K, Li Y, Zhu T, Garcia-Gonzalo FR, Rosa JL, Guan KL. TSC1 stabilizes TSC2 by inhibiting the interaction between TSC2 and HERC1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*. 2006; 281: 8313-16.
- Chun-Wun L, Shau-Chieh L, Chun-Wei C, Shih-Chieh L, Chung-Ta L, Bo-Wen L, Jenq-Chang L, and Shaw-Jenq. Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase 3 increases drug resistance and early recurrence in colon cancer. *American Journal of Pathology*. 2011; 179(3): 1405-14.
- Clifford SC, Prowse AH, Affara NA, Buys CH, Maher ER. Inactivation of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene and allelic losses at chromosome arm 3p in primary renal carcinoma: evidence for VHL-independent pathway in clear cell renal tumourgenesis. *Genes, Chromosomes, Cancer*. 1998; 22(3):200-9.

- Corradetti MN, Inoki K, Guan KL. The stress-induced proteins RTP801 and RTP801L are negative regulators of the mammalian target of rapamycin pathway. *J Biol Chem.* 2005; 280: 9769-72.
- Damjanovic SS, Ilic BB, Beleslin Cokic BB, Antic AJ, Bankovic ZJ, Milicevic TI, Rodic SG, Ilic SD, Todorovic NV, Puskas N, Tulic DC. Tuberos sclerosis complex protein 1 expression is affected by VHL gene alterations and HIF-1 $\alpha$  production in sporadic clear-cell renal cell carcinoma. *Exp Mol Pathol.* 2016; 101(3): 323-31.
- Dayan F, Roux D, Horn MCB, Pouyssegur J, and Mazure NM. The Oxygen Sensor Factor- Inhibiting Hypoxia Inducible-Factor-1 Controls expression of Distinct Genes through the Bifunctional Transcriptional Character of Hypoxia Inducible-Factor-1 $\alpha$ . *Cancer Res.* 2006; 66(7): 3688-98.
- DeBerardinis RJ, and Cheng T. Q's next: the diverse function of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene.* 2010; 29(3): 313-24.
- Decker HJH, Weidt EJ, and Brieger J. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene: A rare and intriguing disease opening new insight into basic mechanisms of carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet.* 1997; 93: 74-83.
- Derenzini M, Montanaro L and Trere D. What the nucleolus says to a tumour pathologist. *Histopathology.* 2009; 54: 753-62.
- DeYoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D, and Ellisen LW. Hypoxia regulates TSC1/TSC2-mTOR signaling and tumour suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev.* 2008; 22(2): 239-51.
- Duvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, Trintafellow E, Ma Q, Gorski R, Cleaver S, Vander Heiden MG, MacKeigan JP, Finan PM, Clish CB, Murphy LO, Manning BD. Activation of metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell.* 2010; 39: 171-83.
- Franke TF. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene.* 2008; 27: 6473-6488.
- Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, Schroder W, Sculley T, Carr SA, Sabatini DM. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol.* 2006; 16: 1865-70.

- Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1982; 6(7): 655-63.
- Gameiro P A, Yang J, Metelo AM, Perez-Carro R, Baker R, Wang Z, Arreola A, Rathmell WK, Olumi A, Lopez-Larrubia P, Stephanopoulos G, and Iliopoulos O. In vivo hif-mediated reductive carboxylation is regulated by citrate levels and sensitizes vhl-deficient cells to glutamine deprivation. *Cell. Metabol.* 2013; 17: 372-85.
- Gatherar IM, Pollerman S, Dunn-Coleman N, And Turner G. Identification of a novel gene hbrB required for polarized growth in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* 2004; 41: 463-71.
- Gingras AC, Raught B, and Sonenberg N. Regulation of translational initiation by FRAP/mTOR. *Genes & Development.* 2001; 15(7): 807-26.
- Gnarra JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MW, Li H, Latif F, Liu S, Chen F, Duh FM, Lubensky I, Duan DR, Florence C, Pozzati R, Walther MM, Bander NH, Grossman HB, Brauch H, Pomer S, Brooks JD, Isaacs WB, Lerman MI, Zbar B, and Linehan WM. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet.* 1994; 7: 85-90.
- Gordan JD, Lal P, Dondeti VR, Letrero R, Parekh KN, Oquendo CE, Greenberg RA, Flaherty KT, Rathmell WK, Keith B, Simon MC, and Nathanson KL. HIF- $\alpha$  effects on c-myc distinguish two subtypes of sporadic VHL-deficient clear cell renal carcinoma. 2008; *Cancer Cell.* 14(6): 435-46.
- Gordan JD, Thompson CB, Simon MC. HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell.* 2007; 12: 108-13.
- Gossage L and Eisen T. Alterations in VHL as potential biomarkers in renal-cell carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010; 7(5): 277-88.
- Gossage L, Eisen T, Maher ER. VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nature reviews. Cancer.* 2014; 15(1): 55-64.
- Guertin DA, and Sabatini D. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell.* 2007; 12: 9-12.



- Gunaratnam L and Bonventre JV. HIF in kidney disease and development. *Journal of the American Society of the Nephrology*. 2009; 20: 1877-87.
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, and Shaw RJ. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell*. 2008; 30(2): 214-26.
- Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen CC, Skeen JE, Sonenberg N, and Hay N. Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK Activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(37): 32081-89.
- Hansen W, Ohh M, Moslehi J, Kondo K, Kaelin W, Welch W. Diverse effects of mutations in exon II of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene on the interaction of pVHL with the cytosolic chaperonin and the pVHL-dependent ubiquitin ligase activity. *Molecular and Cellular Biology*. 2002; 19:47-60.
- Hao W, Chang CPB, Tsao CC, and Xu J. Oligomycin-induced bioenergetic adaptation in cancer cells with heterogeneous bioenergetic organization. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285(17): 12647-54.
- Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*. 2002; 110:177-89.
- Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Letters*. 2003; 546(1): 113-20.
- Heiden MG, Cantley LC, and Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic, requirements of cell proliferation. *Science*. 2009; 324(5930): 1029-33.
- Hergovich A, Lisztwan J, Thoma CR, Wirbelauer C, Barry RE, Krek W. Priming-dependent phosphorylation and regulation of tumor suppressor pVHL by glycogen synthase kinase 3. *Mol Cell Biol* 2006; 26(15): 5784-96.
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, and Baylin SB. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1996; 93: 9821-26.

- Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, Samid D, Duan DSR, Gnarr JR, Linehan WM and Baylin SB. Silencing of the VHL tumor suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *PNAS*. 1994; 91:9700-704.
- Hoebeeck J, Vandesompele J, Nilsson H, De Preter K, Van Roy N, de Smet E, Yigit N, De Paepe A, Layreys G, Pahlman S, and Speleman F. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene expression level has prognostic value in neuroblastoma. *International Journal of Cancer*. 2006; 119: 624-9.
- Holz MK and Blenis J. Identification of S6 kinase 1 as a novel target of mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280: 26089-93.
- Hoogeveen-Westerveld M, Wentink M, van den Heuvel D, Mozaffari M, Ekong R, Povey S, Dunnen JT, Metcalfe K, Vallee S, Krueger S, Bergoffen J, Shashi V, Elmslie F, Kwiatkowski D, Sampson J, Vidales C, Dzarir J, Garcia-Planells J, Dies K, Maat-Kievit A, Ouweland A, Halley D, and Nellist M. Functional assessment of variants in the TSC1 and TSC2 genes identified in individuals with tuberous sclerosis complex. *Human Mutation*. 2011; 32(4): 424-35.
- Hu CJ, Sataur A, Wang L, Chen H, and Simon MC. The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of Hypoxia Inducible-Factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$ . *Mol Biol Cell*. 2007; 18(11): 4528-42.
- Hu J, Zacharek S, He YJ, Lee H, Shumway S, DuronioRJ, et al. WD40 protein FBW5 promotes ubiquitination of tumor suppressor TSC2 by DDB1-CUL4-ROC1 ligase. *Genes Dev* 2008; 22(7): 866-71.
- Huang J and Manning BD. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J*. 2008; 412(2): 179-90.
- Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, Abraham RT. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol*. 2002; 22: 7004-14.

- Ilic BB, Antic Aj, Bankovic ZJ, Milicevic TI, Rodic SG, Ilic SD, Tulic DC, Todorovic NV, Damjanovic SS. VHL dependent expression of REDD1 and PDK3 proteins in clear-cell renal cell carcinoma. *J Med Biochem.* 2018; 37: 31-7.
- Innis AM and Gelfand DH. Optimization of PCR. In: Innis AM, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols, a guide to methods and applications.* San Diego: Academic Press; 1990.
- Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, and Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signaling. *Nat. Cell. Biol.* 2002; 4: 648-57.
- Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signaling. *Nat Cell Biol.* 2002; 4(9): 648-57.
- Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell.* 2003; 115(5): 577-90.
- Kaelin WG Jr, Maher ER. The VHL tumour-suppressor gene paradigm. *Trends in genetics* 1998; 14(10): 423-6.
- Kaelin WG Jr. Molecular biology of clear cell renal carcinoma. In: Figlin RA, Rathmell WK, Rini BI, eds. *Renal cell carcinoma, Translational biology, personalized medicine, and novel therapeutic target.* New York: Springer Verlag; 2012. pp. 27-47.
- Kaelin WG Jr. Prolyne hydroxylation and gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* 2005; 74: 115-28.
- Kaelin WG Jr. The von Hippel–Lindau protein, HIF hydroxylation, and oxygen sensing. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2005; 338: 627-38.
- Kaelin WG Jr. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O<sub>2</sub> sensing and cancer. *Nature Reviews/Cancer.* 2008; 8(11): 865-73.
- Karlsson E, Pérez-Tenorio G, Amin R, Bostner J, Skoog L, Fornander T, Sgroi DC, Nordenskjöld B, Hallbeck AL, Stål O. The mTOR effectors 4EBP1 and S6K2 are frequently coexpressed, and associated with a poor prognosis and endocrine resistance in breast cancer: a retrospective study including patients from the randomised Stockholm tamoxifen trials. *Breast Cancer Res.* 2013; 15(5): R96.

- Katiyar S, Liu E, Knutzen CA, Lang ES, Lombardo CR, Sankar S, et al. REDD1, an inhibitor of mTOR signaling is regulated by the CUL4A-DDB1 ubiquitin ligase. *EMBO Rep* 2009; 10(8): 866-72.
- Keith B, Johnson RS, and Simon MC. HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumor growth and progression. *Nat Rev Cancer*. 2011; 12(1): 9-22.
- Kim DH, Sarbassov DD, Ali DM, Latek RR, Guntur KVP, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. G $\beta$ L, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Molecular cell*. 2003; 11(4): 895-904.
- Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2004; 22: 4991-5004.
- Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2001; 1(2):157-62.
- Kondo K, Yao M, Yoshida M, et al. Comprehensive mutational analysis of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: relationship to clinicopathological parameters. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002; 34: 58-68.
- Kong WL, He, Richards EJ, Challa S, Xu C-X, Permuth-Wey J, Lancaster JM, Coppola D, Sellers TA, Djeu JY and Cheng JQ. Upregulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triplenegative breast cancer. *Oncogene*. 2014; 33(6): 679-89.
- Kong X, Alvarez-Castelao B, Lin Z, Castano JG, and Caro J. Constitutive/hypoxic degradation of HIF- $\alpha$  proteins by the proteasome is independent of von Hippel Lindau protein ubiquitylation and the transactivation activity of the protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282(21): 15498-505.
- Kovacina KS, Park GY, Bae SS, Guzzetta AW, Schaefer E, Birnbaum MJ, Roth RA. Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *J Biol Chem*. 2003; 278(12): 10189-94.

- Krieg M, Haas R, Brauch H, Acker T, Flamme I and Plate KH. Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Oncogene*. 2000; 19: 5435-43.
- Kucejova B, Peña-Llopis S, Yamasaki T, Sivanand S, Tran TA, Alexander S, Wolff NC, Lotan Y, Xie XJ, Kabbani W, Kapur P, Brugarolas J. Interplay between pVHL and mTORC1 pathways in clear-cell renal cell carcinoma. *Mol. Cancer Res*. 2011; 9: 1255-65.
- Kurban G, Duplan E, Ramlal N, Hudon V, Sado Y, Ninomiya Y, Pause A. Collagen matrix assembly is driven by interaction of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein with hydroxylated collagen IV alpha 2. *Oncogene*. 2008; 27(7): 1004-12.
- Kuznetsova A, Meller J, Schnell PO, Nash J, Ignacak M, Sanchez Y, Conaway J, Conaway R, Czyzyk-Krzeska M. Von Hippel-Lindau protein binds hyperphosphorylated large subunit of RNA polymerase II through a prolyne hydroxylation motif and targets it for ubiquitination. *PNAS*. 2003; 100(5):2706-11.
- Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, and Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes & Development*. 2002; 16: 1466-71.
- Laplante M and Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science*. 2009;122: 3589-94.
- Laplante M and Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012; 149: 274-93.
- Laplante M, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *Journal of Cell Science*. 2013; 126(8): 1713-19.
- Lee S, Nakamura E, Yang H, Wei W, Linggi MS, Sajan MP, Farese RV, Freeman RS, Carter BD, Kaelin WG Jr, Schlisio S. Neuronal apoptosis linked to EgLN3 prolyl hydroxylase and familial pheochromocytoma genes: developmental culling and cancer. *Cancer Cell*. 2005; 8(2): 155-67.

- Leonardi E, Martella M, Tossato SCE and Murgia A. Identification and in silico analysis of novel von Hippel-Lindau (VHL) gene variants from a large Population. *Annals of Human Genetics*. 2011; 75: 483-96.
- Li J, Sang Gyun Kim, and Blenis J. Rapamycin: One drug, many effects. *Cell Metabolism*. 2014; 19: 373-9.
- Li M, Wang Y, Song Y, Bu R, Yin B, Fei X, Guo Q, Wu B. Micro-RNAs in renal cell carcinoma: a systematic review of clinical implications (Review). *Oncol Rep*. 2015; 33(4): 1571-8.
- Li Y, Wang Y, Kim E, Beemiller P, Wang CY, Swanson J, You M, Guan KL. Bnip3 mediates the hypoxia-induced inhibition of mammalian target of rapamycin by interacting with Rheb. *J. Biol. Chem*. 2007; 282: 35803-13.
- LightCycler Real-Time PCR Systems. Application Manual [Internet]. Available from: [http://plantbio.okstate.edu/resources/PCR\\_Core/Roche\\_RealTime%20PCR%20Application%20Manual.pdf](http://plantbio.okstate.edu/resources/PCR_Core/Roche_RealTime%20PCR%20Application%20Manual.pdf)
- Lin Q, Cong X, and Yun Z. Differential hypoxic regulation of hypoxia-inducible factors 1 $\alpha$  and 2 $\alpha$ . *Mol Cancer Res*. 2011; 9(6): 757-65.
- Linehan WM, Srinivasan R and Schmidt LS. The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. *Nature Reviews/Urology*. 2010; 7: 277-85.
- Lisztwan J, Imbert G, Wirbelauer C, Gstaiger M, and Krek W. The von Hippel- Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Genes and Development*. 1999; 13:1822-33.
- Liu W, Xin X, Eckert DT, Brown JA, and Gnarra JR. Hypoxia and cell cycle regulation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Oncogene*. 2011; 30(1): 21-31.
- López-Jiménez E, Gómez-López G, Leandro-García LJ, Muñoz I, Schiavi F, Montero-Conde C, de Cubas AA, Ramires R, Landa I, Leskelä S, Maliszewska A, Inglada-Pérez L, de la Vega L, Rodríguez-Antona C, Letón R, Bernal C, de Campos JM, Díez-Tascón C, Fraga MF, Boullosa C, Pisano DG, Opocher G, Robledo M, Cascón A. Research resource: Transcriptional profiling reveals different pseudohypoxic signatures in SDHB and VHL-related pheochromocytomas. *Mol Endocrinol*. 2010; 24(12): 2382-91.

- Lubensky IA, Gnarr JR, Bertheau P, Walther MM, Linehan WM, and Zhuang Z. Allelic deletions of the VHL gene detected in multiple microscopic clear cell renal lesions in von Hippel-Lindau disease patients. *Am. J. Pathol.* 1996; 149:2089-94.
- Luoto KR, Kumareswaran R and Bristow RG. Tumor hypoxia as a driving force in genetic instability. *Genome Integrity.* 2013; 4:5.
- Ljungberg B, Bensalah K, Bex A, Canfield S, Dabestani S, Hofmann F, Hora M, Kuczyk MA, Lam T, Marconi L, Merseburger AS, Mulders PFA, Powles T, Staehler M, Volpe A. Guidelines on renal cell carcinoma. European Association of Urology. 2014; Available from: <http://www.uroweb.org/>
- Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P and Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell.* 2005; 121: 179-93.
- Macleod K. Tumor suppressor genes. *Current Opinion in Genetics & Development.* 2000; 10: 81-93.
- Maher ER, Kaelin WG, Jr. Von Hippel-Lindau disease. *Medicine.* 1997; 76:381-91.
- Maher ER, Neumann HPH, and Richard S. Von Hippel- Lindau disease: a clinical and scientific review. *European Journal of Human genetics.* 2011; 19(6): 617-23.
- Mahon PC, Hirota K, and Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interact with HIF-1 $\alpha$  to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes & Development.* 2001;15: 2675-86.
- Manikandan M, Raksha G and Munirajan AK. Haploinsufficiency of tumor suppressor genes is driven by the cumulative effect of microRNAs, microRNA binding site polymorphisms and microRNA polymorphisms: an in silico approach. *Cancer Inform.* 2012; 11: 157-71.
- Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. Identification of the tuberous sclerosis tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase /akt pathway. *Mol Cell.* 2002; 10(1):151-62.

- Marković-Lipkovski J, Brašanac D, Todorović V, Muller GA. Immuno-morphological characteristics of renal cell carcinoma (RCC). *Histol Histopathol* 1995; 10(3): 651-9.
- Martineau Y, Azar R, Bousquet C and Pyronnet S. Anti-oncogenic potential of the eIF4E-binding proteins. *Oncogene*. 2013; 32, 671-7.
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, and Ratcliffe PJ. The tumour suppressor protein VHL targets the hypoxia inducible factor for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999; 399: 271-5.
- Mekhail K, Gunaratnam L, Bonicalzi ME, Lee S. HIF activation by pH-dependent nucleolar sequestration of VHL. *Nat Cell Biol*. 2004; 6(7):642-7.
- Memmott RM and Dennis PA. Akt-dependent and independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cell Signal*. 2009; 21(5): 656-64.
- Metcalf JL, Bradshaw PS, Komosa M, Greer SN, Stephen Meyn M, Ohh M. K-63 ubiquitylation of VHL by SOCS1 mediates DNA double-strand break repair. *Oncogene*. 2014; 33(8):1055-65.
- Miller F, Kentsis A, Osman R and Pan ZQ. Protein synthesis, post-translation modification, and degradation: Inactivation of VHL by tumorigenic mutations that disrupt dynamic coupling of the pVHL hypoxia-inducible transcription factor - 1 $\alpha$  complex. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280: 7985-7996.
- Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG Jr, and Pavletich NP. Structure of an HIF-1 $\alpha$ -pVHL complex: Hydroxyproline recognition in signaling. 2002; *Science*. 296: 1886-1889.
- MLPA. [Internet] Available from:  
<http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag=tz2fAPIAupKyMjaDF\E\t9bmuxqlhe/Lgqfk8Hkjuss|&ProductOID=P3G8NHKhaiY>
- Moniz S, Biddlestone J and Rocha S. Grow2: The HIF system, energy homeostasis and the cell cycle. *Histol Histopathol*. 2014; 29(5):589-600.



Morris MR, Maina EN, Morgan NV, Gentle D, Astuti D, Moch H, Kishida T, Yao M, Schraml P, Richards FM, Latif F, Maher ER. Molecular genetic analysis of FH-1, FH and SDHB candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Pathology*. 2004; 57(7): 706-11.

MRC-Holland. MLPA - an introduction [Internet]. Available from:

<https://mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=zjCZBtdOUyAt3KF3EwRZhNWLtcfv9pVl/tHJIM\fa9FWO8KMqctOGIoqYwxaGF9Y>

MRC-Holland. One-Tube MLPA Protocol for DNA Detection and Quantification.

[Internet] Available from:

[http://www.mrcholland.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=\\_wl2zCjiCGANQgZPuTixtCplCA1mmwJoFo\\_xHPnTgc](http://www.mrcholland.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_wl2zCjiCGANQgZPuTixtCplCA1mmwJoFo_xHPnTgc).

Nayak B, Feliers D, Sudarshan S, Friedrichs WE, Day RT, New DD, Fitzgerald JP, Eid A, DeNapoli T, Parekh DJ, Gorin Y, and Block K. Stabilization of HIF-2 alpha through redox regulation of mTORC2 activation and initiation of mRNA translation. *Oncogene*. 2013; 32(26): 3147-55.

Nickerson ML, Jaeger E, Shi Y, Durocher JA, Mahurkar S, Zaridze D, Matveev V, Janout V, Kollarova H, Bencko V, Navratilova M, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Mukeria A, Holcatova I, Schmidt LS, Toro JR, Karami S, Hung R, Gerard GF, Linehan WM, Merino M, Zbar B, Boffetta P, Brennan P, Rothman N, Chow WH, Waldman FM, Moore LE. Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(15):4726-34.

Nordstrong-O'Brien M., van der Luijt RB, van Rooijen E, van den Ouweland AM, Majoor-Krakauer DF, Lolkema MP, van Brussel A, Voest EE, Giles RH. Genetic analysis of von Hippel-Lindau disease. *Hum Mutat*. 2010; 31(50):521-37.

NuPAGE Technical Guide. [Internet] Available from:

[http://pro.unibz.it/staff2/sbenini/documents/laboratory\\_and\\_safety/nupage\\_tech\\_man.pdf](http://pro.unibz.it/staff2/sbenini/documents/laboratory_and_safety/nupage_tech_man.pdf)

- Nyhan MJ, El Mashad SM, O'Donovan TR, Ahmad S, Collins C, Sweeney P, Rogers E, O'Sullivan GC, McKenna SL. VHL genetic alteration in ccRCC does not determine deregulation of HIF, CAIX, hnRNP A2/B1 and osteopontin. 2011; *Cell Oncol.* 34: 225-34.
- Ohh M, Yauch RL, Lonergan KM, Whaley JM, Stemmer-Rachamimov AO, Louis DN, Gavin BJ, Kley N, Kaelin WG Jr, Iliopoulos O. The von Hippel Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol. Cell.* 1998; 1(7): 959-68.
- Okuda H, Hirai SI, Takaki Y, Kamada M, Baba M, Sakai N, Kishida T, Kaneko S, Yao M, Ohno S, and Shuin T. Direct interaction of  $\beta$ -domain of VHL tumor suppressor protein with the regulatory domain of a atypical PKC isotypes. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1999; 263: 491-7.
- Oshiro N, Takahashi R, Yoshino K, Tanimura K, Nakashima A, Eguchi S, Mayamoto T, Hara K, Tekehana K, Avruch J, Kikkawa U, Yonezawa K. The proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mammalian target of rapamycin complex 1. *J Biol Chem.* 2007; 282: 20329-39.
- Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, Gray NS, Sabatini DM. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell.* 2009; 137: 873-86.
- Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battison C, Terris B, Mazzaferro V, Lowe SW, Croce CM, Dejean A. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107(1): 264-9.
- Populo H, Lopes JM and Soares P. The mTOR signaling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci.* 2012; 13: 1886-918.
- Qayyum T, McArdle P, Orange C, Seywright M, Horgan P, Oades G, Aitchison M, and Edwards J. Reclassification of the Fuhrman grading system in renal cell carcinoma-does it make a difference? *Springerplus.* 2013; 2: 378.

- Raval RR, Lau KW, Tran MG, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL, Pugh CW, Maxwell PH, Harris AL, Ratcliffe PJ. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(13): 5675-86.
- Richards MF. Molecular Pathology of von Hippel-Lindau disease and the VHL tumour suppressor gene. *Expert Rev Mol. Med.* 2001; 2001: 1-27.
- Roberts AM, Watson IR, Evans AJ, Foster DA, Irwin MS, Ohh M. Suppression of hypoxia-inducible factor 2 alpha restores p53 activity via Hdm2 and reverses chemoresistance of renal carcinoma cell. *Cancer Research.* 2009; 69(23): 9056-64.
- Robinson CM, Ohh M. The multifaceted von Hippel-Lindau tumour suppressor protein. *FEBS Letters.* 2014; 588:2704-2711.
- Roe JS, Kim HR, Hwang IY, Cho EJ, Youn HD. Von Hippel-Lindau protein promotes Skp2 destabilization on DNA damage. *Oncogene.* 2011; 30(28):3127-38.
- Romac S, Vukosavić S, Stojković O, Čuljković B, eds. PCR u kliničkoj dijagnostici. Beograd: Biološki fakultet u Beogradu; 1999.
- Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP and Blenis J. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101: 13489-94.
- Salceda S and Caro J. Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic system. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *The Journal of Biological Chemistry.* 1997; 272: 22642-47.
- Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA, Sabatini DM. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell.* 2007; 25(6):903-15.
- Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular Cell.* 2006; 22(2): 159-68.

- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR complex. *Science*. 2005; 307: 1098-101.
- Sato M, Tanaka T, Maeno T, Sando Y, Suga T, Maeno Y, Sato H, Nagai R, and Kurabayashi M. Inducible expression of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia in human lung adenocarcinoma A549 cells role of Src family kinases-dependent pathway. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2002; 26:127-34.
- Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, Maekawa S, Okuno Y, Kamura T, Shimamura T, Sato-Otsubo A, Nagae G, Suzuki H, Nagata Y, Yoshida K, Kon A, Suzuki Y, Chiba K, Tanaka H, Niida A, Fujimoto A, Tsunoda T, Morikawa T, Maeda D, Kume H, Sugano S, Fukayama M, Aburatani H, Sanada M, Miyano S, Homma Y, Ogawa S. Integrated molecular analysis of clear-cell renal carcinoma. *Nat. Genet.* 2013; 7(1):85-90.
- Schneider A, Younis RH, and Gutkind JS. Hypoxia-induced energy stress inhibits the mTOR pathway by activating an AMPK/REDD1 signaling axis in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia*. 2008; 10(11): 1295-302.
- Semenza GL, Agani F, Booth G, Forsythe J, Iyer N, Jiang BH, Leung S, Roe R, Wiener C, Yu A. Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney Int.* 1997; 51(2): 553-5.
- Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1994; 269: 23757-63.
- Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Current Opinion in Cell Biology.* 2001; 13(2): 167-71.
- Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: Oxygen sensing at the molecular level. *Physiology.* 2004; 19(4): 176-82.
- Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews.* 2003; 3: 721-32.
- Shackelford DB and Shaw RJ. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nature Reviews/Cancer.* 2009; 9: 563-75.

- Shoshani T, Faerman A, Mett I, Zelin E, Tenne T, Gorodin S, Moshel Y, Elbaz S, Budanov A, Chajut A, Kamer I, Rozen I, Mor O, Keshet E, Leshkowitz D, Einat P, Skaliter R, and Feinstein E. Identification of a novel hypoxia-inducible factor-1 responsive gene, RTP801 Involved in apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*. 2002; 22(7): 2283-93.
- Showkat M, Beigh MA, and Andrabi KI. mTOR signaling in protein translation regulation: implications in cancer genesis and therapeutic interventions. *Molecular Biology International*. 2014; <http://dx.doi.org/10.1155/2014/686984>
- Shuin T, Kondo K, Torigoe S, Kishida T, Kubota Y, Hosaka M, Nagashima Y, Kitamura H, Latif F, Zbar B, Lerman MI, and Yao M. Frequent somatic mutations and loss of heterozygosity of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in primary human renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 1994; 54: 2852-55.
- Smirnova NA, Hushpalian DM, Speer RE, Gaisina IN, Ratan RR, and Gazaryan IG. Catalytic mechanism and substrate specificity of HIF prolyl hydroxylases. *Biochemistry*. 2012; 77(10): 1108-19.
- Sofer A, Lei K, Johannessen CM, Ellisen LW. Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Mol Cell Biol*. 2005; 25:5834–5845.
- Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell Mol. Med*. 2005; 9(1): 59-71.
- Tan CY, Hagen T. mTORC1 dependent regulation of REDD1 protein stability. *PLoS One* 2013; 8(5): e63970.
- Tanaka T, Wiesener M, Bernhardt W, Eckardt KU and Warnecke C. The human HIF (Hypoxia Inducible Factor)-3 $\alpha$  gene is a HIF-1 target gene and may modulate hypoxic gene induction. *Biochem J*. 2009; 424: 143-51.
- Tchevkina E and Komelkov A. 2012; Protein Phosphorylation as a Key Mechanism of mTORC1/2 Signaling Pathways, *Protein Phosphorylation in Human Health*, Dr. Cai Huang (Ed.), ISBN: 978-953-51-0737-8, InTech, DOI: 10.5772/48274. Available from: <http://www.intechopen.com/books/protein-phosphorylation-in-human-health/protein-phosphorylation-as-a-key-mechanism-of-mtorc1-2-signaling-pathways>

- Teixeira A, Ferreira M, Silva J, Gomes M, Dias F, Santos JI, Maurício J, Lobo F, Medeiros R. Higher circulating expression levels of miR-221 associated with poor overall survival in renal cell carcinoma patients. *Tumor Biol.* 2014; 35(5): 4057-66.
- The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal carcinoma. *Nature.* 2013; 499: 43-49.
- The Human Gene Mutation Database [Internet]. Available from: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>
- Thoma CR, Toso A, Gutbrodt KL, Reggi SP, Frew IJ, Schraml P, Hergovich A, Moch H, Meraldi P, Krek W. VHL loss causes spindle misorientation and chromosome instability. *Nat. Cell Biol.* 2009; 11(8): 994-1001.
- Treins C, Downward J. mTORC2: The other facet of mTOR. *The Enzymes* 2010; (28): 99-124.
- Tsang CK, Bertram PG, Ai W, Drenan R, Zheng XF. Chromatin mediated regulation of nucleolar structure and RNA Pol I localization by TOR. *EMBO J.* 2003; 22: 6045-56.
- Tuganova A, Boulatnikov I, Popov KM. Interaction between the individual isoenzymes of pyruvate dehydrogenase kinase and the inner lipoil-bearing domain of transacetylase component of pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem J.* 2002; 366(1): 129-36.
- Valera VA, Walter BA, Linehan WM, Merino MJ. Regulatory effects of microRNA-92 (miR-92) on VHL gene expression and the hypoxic activation of miR-210 in clear cell renal cell carcinoma. *J Cancer.* 2011; 2: 515-26.
- Vander Haar E1, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol.* 2007; 9(3):316-23.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, and Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009; 324(5930): 1029-33.

- Vara JAF, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzales-Baron M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2004; 30(2): 193-204.
- Vaupel P and Harrison L. Tumor hypoxia: Causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *The Oncologist*. 2004; 9(5):4-9.
- Vega-Rubin-de-Celis S, Abdallah Z, Kinch L, Grishin NV, Brugarolas J and Zhang X. Structural analysis and functional implications of the negative mTORC1 regulator REDD1. *Biochemistry*. 2010; 49: 2491-501.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA and Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *PNAS*. 1995; 92: 5510-14.
- Wang L, Harrid TE, Roth RA, Lawrence JC Jr. PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J Biol Chem*. 2007; 282: 20036-44.
- West MJ, Stoneley M, Willis AE. Translational induction of the c-myc oncogene via activation of the FRAP/TOR signalling pathway. *Oncogene*. 1998;17: 769-80.
- Whaley JM, Naglich J, Gelbert L, Hsia YE, Lamiell JM, Green JS, Collins D, Neumann HPH, Laidlaw J, Li FP, Klein-Szanto AJP, Seizinger B, and Kley N. Germline mutations in the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene are similar to somatic von Hippel-Hippel aberrations in sporadic renal cell carcinoma. *Am J Hum Genet*. 1994; 55: 1092-102.
- Woo SY, Kim DH, Jun CB, Kim YM, Haar EV, Lee SI, Hegg JW, Bandhakavi S, Griffin TJ, and Kim DH. PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling. *J Biol Chem*. 2007; 282: 25604-12.
- Wu CA, Chao Y, Shiah SG, Lin WW. Nutrient deprivation induces the Warburg effect through ROS/AMPK-dependent activation of pyruvate dehydrogenase kinase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*. 2013; 1833: 1147-56.

- Wullschleger S, Loewith R, and Hall MN. TOR Signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2006; 124: 471-84.
- Xing T, He H. Epigenomics of clear cell renal cell carcinoma: mechanism and potential use in molecular pathology. *Chin J Cancer Res*. 2016; 28(1): 80-91.
- Yang H, Minamishima YA, Yan Q, Schlisio S, Ebert BL, Zhang X, Zhang L, Kim WY, Olumi AF, Kaelin WG Jr. pVHL acts as an adaptor to promote the inhibitory phosphorylation of the NF-kappaB agonist Card9 by CK2. *Mol. Cell*. 2007; 28(1):15-27.
- Yang Q, Guan KL. Expanding mTOR signaling. *Cell Research*. 2007; 17: 666-81.
- Yecies JL, Manning BD. mTOR links oncogenic signaling to tumor cell metabolism. *J Mol Med*. 2011; 89: 221-8.
- Young AC, Craven RA, Cohen D, Taylor C, Booth C, Harnden P, Cairns DA, Astuti D, Gregory W, Maher ER, Knowles MA, Joyce A, Selby PJ, Banks RE. Analysis of VHL gene alterations and their relationship to clinical parameters in sporadic conventional renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009; 15: 7582-92.
- Zeschnigk M, Tschentscher F, Lich C, Brandt B, Horsthemke B and Lohmann DR. Methylation analysis of several tumour suppressor genes shows a low frequency of methylation of CDKN2A and RARB in uveal melanomas. *Comp Funct Genom*. 2003; 4: 329-36.
- Zhou H and Huang S. Role of mTOR signalling in tumor cell motility, invasion and metastasis. *Curr Protein Pept Sci*. 2011; 12(1): 30-42.
- Zhou H and Huang S. The complexes of mammalian target of rapamycin. *Curr Protein Pept Sci*. 2010; 11(6): 409-24.
- Zinzalla V, Stracka D, Oppliger W, Hall MN. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell*. 2011; 144(5): 757-68.
- Zoncu R, Sabatini DM, and Efeyan A. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011; 12(1): 21-35.



## STRUČNA BIOGRAFIJA

Bojana Ilić rođena je 05. decembra 1977. godine u Zagrebu. Diplomirala je 2007. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu (studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija) sa prosečnom ocenom 8.60. Diplomski rad pod naslovom “Ispitivanje indirektnog (bystander) efekta jonizujućeg zračenja i antioksidativne zaštite malina na preživljavanje zdravih humanih imunokompetentnih ćelija i malignih ćelija” odbranila je sa ocenom 10. Doktorske studije Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, modul Molekularna biologija, smer Molekularna biologija eukariota upisala je 2007. i 2016. godine.

Nakon završetka fakulteta, volontirala je u Laboratoriji za modifikatore biološkog odgovora, Odeljenja eksperimentalne onkologije, Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije. Od 2008. godine zaposlena je u Laboratoriji za genetička ispitivanja pri Odeljenju za neuroendokrine tumore i nasledne kancerske sindrome, Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, KCS.

Do sada je publikovala jedan rad u međunarodnom časopisu kategorije M23, a koautor je četiri rada u međunarodim časopisima kategorije M21, jednog u međunarodnom časopisu kategorije M22 i jednog rada u međunarodnom časopisu kategorije M23. Autor je ili koautor šest saopštenja na kongresima međunarodnog značaja i tri saopštenja na kongresima nacionalnog značaja.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Бојана Б. Илић

Број индекса М3011/2016

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Ефекат мутације гена *VHL* на ниво експресије протеина mTOR сигналног пута

у светлоћелијском карциному бубрега

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

Потпис аутора

У Београду, 29.01.2018.

Бојана Илић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Бојана Б. Илић

Број индекса М3011/2016

Студијски програм Молекуларна биологија, модул молекуларна биологија  
еукариота

Наслов рада Ефекат мутације гена *VHL* на ниво експресије протеина mTOR  
сигналног пута у светлоћелијском карциному бубрега

Ментор проф. др Светозар Дамјановић, проф. др Гордана Матић

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 29.01.2018.

Бојана Илић

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Ефекат мутације гена *VHL* на ниво експресије протеина mTOR сигналног пута

---

у светлоћелијском карциному бубрега

---

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

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

Потпис аутора

У Београду, 29.01.2018.

Војана Ђић