

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Ana M. Božović

**Metilovanje promotora i ekspresija  
estrogenskog receptora beta (ER $\beta$ ) u  
invazivnim karcinomima dojke**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Ana M. Božović

**Estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) promoter  
methylation and expression in invasive breast  
cancers**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

**Mentori:**

dr Vesna Mandušić, naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke “Vinča“ Univerziteta u Beogradu

dr Marina Stamenković-Radak, vanredni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

**Članovi komisije:**

dr Kovička Krtolica-Žikić, naučni savetnik Instituta za nuklearne nauke “Vinča“ Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

## **Zahvalnica**

Ova doktorska disertacija je osmišljena i urađena u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke “Vinča“, Univerziteta u Beogradu i Laboratoriji za biohemiju Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu.

Najveću zahvalnost dugujem dr Vesni Mandušić (naučni saradnik INN Vinča, Univerziteta u Beogradu), mom mentoru, na ukazanom poverenju, razumevanju, strpljenju, kao i na nesebičnoj pomoći i podršci u svakom segmentu izrade ove teze.

Veliku zahvalnost dugujem dr Marini Stamenković-Radak (vanredni profesor Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu) na korisnim savetima, podršci i razumevanju tokom izrade disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Koviljki Krtolici (naučni savetnik INN Vinča, Univerziteta u Beogradu) na nesebičnoj pomoći u idejnom rešavanju problema, kao i stručnim savetima prilikom izrade ovog rada.

Želim da se zahvalim i dr Bogomiru Dimitrijeviću (naučni savetnik INN “Vinča“, Univerziteta u Beogradu), rukovodiocu projekta, na korisnim savetima i podršci.

Mojim koleginicama mr Mileni Krajnović, dr Snežani Jovanović-Ćupić, Branislavi Dobutović i dr Emini Sudar, zahvaljujem se na savetima i pomoći u svakom trenutku.

Veliku zahvalnost dugujem i kolegama Odeljenja za biohemiju, Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu.

Zahvaljujem se kolegama iz Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije bez kojih ovaj rad ne bi bio moguć.

Zahvaljujem se mojoj porodici na razumevanju i podršci.

# **METILOVANJE PROMOTORA I EKSPRESIJA ESTROGENSKOG RECEPTORA BETA (ER $\beta$ ) U INVAZIVNIM KARCINOMIMA DOJKE**

## **SAŽETAK**

Invazivni karcinom dojke je najčešći kancer kod žena. Pored genetičkih i epigenetički faktori imaju važnu ulogu u njegovoj inicijaciji i progresiji. Cilj ove studije bio je ispitati da li metilacija promotora ON, gena za ER $\beta$  protein (ESR2) utiče na njegovu ekspresiju (na nivou iRNK i proteina) i utvrditi povezanost metilacionog indeksa promotora ON sa nivoima ER $\beta$ 1-iRNK i ER $\beta$ 1 proteina, kao i sa kliničkim i patohistološkim parametrima. U ovoj studiji analiziran je 131 arhivski uzorak kancera dojke. Pomoću posebno dizajniranog PCR testa iz dva koraka, amplifikovan je i kvantifikovan specifični region promotora ON ESR2 gena. Za kvantifikaciju ER $\beta$ 1-iRNK korišćena je metoda kvantitativnog RT-PCR u realnom vremenu. Metoda „Western Blot“ je korišćena za relativnu kvantifikaciju ER $\beta$ 1 proteinske izoforme. Dobijeni podaci, metilacioni indeks promotora ON, nivoi iRNK i ER $\beta$ 1 proteina, analizirani su i korelisani sa kliničkopatološkim parametrima neparametrijskim statističkim testovima. Nađeno je da je metilacioni indeks promotora ON ER $\beta$  gena značajno veći u grupi pacijentkinja sa pozitivnim, u odnosu na grupu sa negativnim statusom aksilarnih limfnih čvorova. Takođe, pronađena je značajna pozitivna korelacija metilacionog indeksa promotora ON ER $\beta$  gena sa nivoom estrogenog receptora  $\alpha$ . Na osnovu dobijenih rezultata pokazano je da metilacioni indeks promotora ON, ER $\beta$  gena može biti pouzdaniji marker prognoze kancera dojke nego ekspresija ER $\beta$ 1-iRNK ili proteina ER $\beta$ 1.

## **KLJUČNE REČI**

Kancer dojke, estrogeni receptor alfa, estrogeni receptor beta, progesteronski receptor, metilacija, kvantitativni PCR .

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Molekularna genetika kancera

**UDK broj:** 577.21 : 577.171.6] : 618.19-006 (043.3)

# **ESTROGEN RECEPTOR BETA (ER $\beta$ ) PROMOTER METHYLATION AND EXPRESSION IN INVASIVE BREAST CANCERS**

## **ABSTRACT**

Breast cancer is the most common invasive cancer in women. Beside genetic, epigenetic factors influence its initiation and progression. The purpose of this study was to test whether methylation of the promoter ON of the gene for ER $\beta$  protein (ESR2) influences its expression (on mRNA and protein level) and to correlate the methylation index of the ON promoter, ER $\beta$ 1-mRNA and ER $\beta$ 1 protein levels with clinicopathological parameters. In this study, 131 archival samples of breast cancer tissue were used. Custom designed two step PCR method, was done for amplification and relative quantification of the specific region of the ON promoter of the ESR2 gene. Measuring of ER $\beta$ 1-mRNA was done by quantitative real time RT-PCR, and relative quantification of ER $\beta$ 1 protein isoform was done by Western blot. Statistical analysis was performed and results for methylation index of ON promoter, mRNA and ER $\beta$ 1 protein levels were correlated with clinicopathological parameters. The methylation index of ER $\beta$ -ON promoter was significantly higher in a group of patients with positive axillary lymph node status, than in a group with negative one. A significant positive correlation between methylation index of ON promoter and ER $\alpha$  protein levels was obtained. It can be concluded that methylation index of the ER $\beta$ -ON promoter could be more confident parameter for prediction and/or prognosis of breast cancer, than measuring of ER $\beta$ 1-mRNA or ER $\beta$ 1 protein levels.

## **KEY WORDS**

Breast cancer, estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta, progesterone receptor, methylation, quantitative PCR.

**Scientific field:** Biology

**Special topic:** Molecular genetics of cancer

**UDC number:** 577.21 : 577.171.6] : 618.19-006 (043.3)

## SKRAĆENICE

qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (engl. „quantitative reverse transcriptase – polymerase chain reaction”)

RT-PCR - reverzna transkripcija sa PCR-om (engl. “Reverse Transcription with PCR”)

ERE - elementi koji odgovaraju na estrogen (engl. “Estrogen Response Elements”)

AP-1 - protein aktivator 1 (engl. “Activator Protein 1”)

Sp1 - protein specifičnosti 1 (engl. “Specificity Protein 1”)

HER2 - humani epidermalni receptor faktora rasta 2 (engl. “Human Epidermal Growth Factor Receptor 2”)

Ct - prag osetljivosti (engl. “Cycle Threshold”)

LBA - test vezivanja liganda (engl. “Ligand Binding Assay”)

MSP - PCR specifičan za metilaciju (engl. “Methylation-specific PCR”)

IHC - imunohistohemija (engl. “Immunohistochemistry”)

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Kancer dojke.....	1
1.1.1. Histološka podela kancera dojke .....	2
1.1.2. Gradus i TNM klasifikacija tumora dojke.....	3
1.1.3. Podela tumora dojke na osnovu statusa receptora.....	5
1.1.4. Faktori rizika za nastanak kancera dojke.....	6
1.2. Estrogen i estrogenski receptori u kanceru dojke.....	8
1.2.1. Organizacija gena i transkripciona aktivnost estrogenskog receptora $\alpha$ i estrogenskog receptora $\beta$ .....	9
1.2.2. Estrogenski receptor beta .....	13
1.2.3. Značaj ER $\alpha$ i ER $\beta$ u progresiji tumora dojke i odgovoru na terapiju.....	13
1.3. Epigenetički procesi u nastanku kancera dojke.....	15
1.4. Merenje stepena metilovanja metodom kvantitativnog PCR u realnom vremenu ....	20
<b>2. CILJEVI RADA .....</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>23</b>
3.1. Pacijenti i uzorci tkiva.....	23
3.2. Izolacija DNK i analiza metilacionog indeksa promotora ON gena za ER $\beta$ 1 .....	25
3.2.1. Izolacija DNK iz tkivnog homogenata.....	25
3.2.2. Izolacija DNK iz limfocita periferne krvi .....	26
3.2.3. Izolacija DNK iz ćelijske linije MDA-231.....	26
3.2.4. Merenje koncentracije izolovane DNK.....	26
3.2.5. Metilovanje DNK izolovane iz ćelijske linije MDA-231.....	26
3.2.6. Bisulfitna modifikacija DNK .....	27
3.2.7. Metilaciona analiza metodom kvantitativne MS-PCR reakcije .....	28
3.3. Izolacija ukupne RNK i merenje ER $\beta$ 1-iRNK metodom kvantitativnog RT-PCR...	31
3.3.1. Izolacija ukupne RNK .....	31



3.3.2. Mjerenje ER $\beta$ 1-iRNK metodom kvantitativnog RT-PCR.....	31
3.4. Izolacija proteina i semikvantitativna analiza ER $\beta$ 1 proteina metodom „Western blot“ .....	33
3.4.1. Izolacija proteina iz tkiva tumora .....	33
3.4.2. Analiza ER $\beta$ 1 proteina metodom „Western blot“ .....	34
3.5. Statistička obrada rezultata .....	37
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>38</b>
4.1. Analiza metilacionog indeksa promotorskog regiona ON ER $\beta$ gena.....	38
4.1.1. Korelacija metilacionog indeksa promotorskog regiona ON ER $\beta$ gena sa kliničkim i patohistološkim parametrima .....	40
4.1.2. Korelacija metilacionog indeksa promotorskog regiona ON ER $\beta$ gena sa ekspresijom ER $\alpha$ i PR.....	42
4.2. Analiza ekspresije ER $\beta$ 1-iRNK i korelacije sa kliničkim i patohistološkim parametrima .....	44
4.3. Analiza ekspresije ER $\beta$ 1 proteina .....	47
4.3.1 Analiza korelacije kliničkih i patohistoloških parametara i ekspresije ER $\beta$ 1 proteina .....	48
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>51</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>59</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>61</b>

# 1. UVOD

Kancer dojke je najčešća maligna bolest kod žena i glavni uzrok smrtnosti kod žena nepušača. Na svetskom nivou, zastupljen je sa oko 18% svih kancera (Vo sa sar., 2012). To je heterogena bolest sa veoma varijabilnim kliničkim ishodima. Smrtnost kao posledica kancera dojke je bila u porastu do 1990. godine, a nakon toga u Evropi pada (Veronesi sa sar., 2005). Smanjenje smrtnosti u razvijenim zemljama pripisuje se unapređenju rane i precizne dijagnostike i poboljšanoj terapiji, a naročito sve široj primeni antagonista estrogena, pre svega tamoksifena. Uprkos unapređenoj ranoj detekciji i dijagnostici, kao i novim terapijama, petogodišnja stopa preživljavanja pacijenata sa metastatskim kancerom dojke je samo 25% (Han, 2011). Stoga je od velikog značaja definisati nove biološke markere prognoze koji bi omogućili subgrupisanje pacijentkinja koje nose veći rizik za recidiv bolesti.

## 1.1. Kancer dojke

Epitel mlečnih žlezda je tkivo iz kojeg nastaje većina tumora dojke. Mlečne žlezde nisu u potpunosti formirane u trenutku rođenja već počinju da se razvijaju u ranom pubertetu. Sa početkom menstrualnog ciklusa dolazi do razgranjavanja duktalnog sistema i formiranja lobularnih struktura – terminalna duktalno lobularna jedinica (TDLU – engl. "terminal ductal lobular units"). Ovaj proces se nastavlja tokom rane trudnoće kada se povećava broj duktusa u okviru TDLU, da bi se u kasnoj trudnoći duktusi diferencirali i otpočeli sekreciju mleka. Ovaj proces je stimulisan estrogenom (Laron, 1989), a verovatno i progesteronom. Ceo duktalni sistem mlečnih žlezda je obložen luminalnim epitelijalnim ćelijama, okruženim slojem mioepitelijalnih ćelija, koje su pak u direktnom kontaktu sa bazalnom membranom. Duktalno lobularna jedinica je omeđena fibroblastima i specijalizovanom intralobularnom stromom. Histološke studije su pokazale da većina tumora dojke postaje u TDLU i da ima morfološke i biohemijske karakteristike luminalne epitelne ćelije (Allred sa sar., 2001; Anderson, 2002). Tumori dojke, takođe, sadrže

receptore za estrogen i progesteron, koji se u normalnom tkivu eksprimiraju samo u luminalnim epitelnim ćelijama. Luminalne epitelne ćelije su te koje kreću u malignu transformaciju. U njima se akumuliraju primarne genetičke promene i počinje evolucija od normalnog mlečnog epitela preko benignih proliferativnih lezija i atipičnih proliferativnih lezija, pa do karcinoma *in situ* i invazivnih karcinoma.

### 1.1.1. Histološka podela kancera dojke

Kancer dojke uglavnom potiče od epitela mlečne žlezde, te pripada grupi karcinoma. Ređe, u dojci mogu nastati drugi tipovi tumora kao što su limfomi, sarkomi ili melanomi. Prema dosadašnjim saznanjima, postavljen je model po kome invazivni karcinom nastaje akumulacijom višestrukih genetičkih promena koje se dešavaju paralelno sa serijom patoloških promena, koje dalje nose rizik za nastanak invazivnog tumora dojke. Prema sadašnjoj klasifikaciji, širok spektar preneoplastičnih i preinvazivnih lezija dojke, može se, bar u didaktičke svrhe, grupisati u neproliferativne i proliferativne. Sa aspekta malignih neoplazija, koje vode poreklo od epitelne ćelije terminalne duktalne jedinice (TDLU), od značaja su proliferativne lezije koje mogu biti sa, ili bez atipije. Atipične proliferativne lezije, kao i karcinom *in situ*, su predmet istraživanja kao mogući prethodnici invazivnih karcinoma. Postoji više nivoa i načina podele kancera, koje se mogu sumirati sledećom histološkom klasifikacijom (Edge *et al.*, 2010):

- Karcinom koji nije drugačije klasifikovan, „NOS“ (engl. „not otherwise specified“).
- Duktalni karcinom
  - Intraduktalni (*in situ*) (DCIS – duktalni karcinom *in situ*),
  - Invazivni, sa dominantnom intraduktalnom komponentom, (mešoviti invazivni-*in situ* tip) .
  - Invazivni, (IDC- invazivni duktalni karcinom)
  - Ređe zastupljeni tipovi (comedo, inflamatorni, medularni, mucinozni, papilarni, serozni i drugi)

- Lobularni karcinom.
  - In situ, (LCIS- lobularni karcinom in situ)
  - Invazivni, sa dominantnom in situ komponentom (mešoviti invazivni-in situ tip)
  - Invazivni, (ILC-invazivni lobularni karcinom).
- Kancer bradavice
  - Pagetova bolest, „NOS“ (engl. „not otherwise specified“).
  - Pagetova bolest sa intraduktalnim karcinomom.
  - Pagetova bolest sa invazivnim duktalnim karcinomom.
- Ostali,
  - Nediferentovani karcinom.

Infiltrirajući ili invazivni duktalni kancer je najčešći i predstavlja 70% to 80% svih kancera dojke. Invazivni kancer počinje u duktusima ili lobulima dojke i širi se ka drugim tkivima dojke. Za razliku od invazivnog, neinvazivni kancer koji se naziva i “in situ karcinom” obavijen je bazalnom membranom i nije se proširio ka okolnim tkivima. U karcinomima in situ, ćelije kancera još nisu prošle kroz bazalnu membranu koja ih odvaja od zdravog tkiva dojke. Ako se ne dijagnostifikuje u ovoj fazi, neinvazivni kancer može preći u invazivni.

### **1.1.2. Gradus i TNM klasifikacija tumora dojke**

Osim histološke podele, značajna je i podela na osnovu gradusa. Gradus se određuje poređenjem izgleda ćelija kancera sa izgledom normalnih ćelija. Ćelije kancera gube sposobnost diferencijacije i postaju neorganizovane, sa atipičnim jedrima, i imaju veći mitotski indeks. Analizom morfološkog izgleda ćelije, odnosa veličine citoplazme i jedra, mitotičkog indeksa, prisustva tubularnih struktura, može se izvršiti sledeća podela:

- Gradus 1: nizak gradus (dobro diferencirane ćelije koje najviše nalikuju normalnim ćelijama i rastu i dele se sporo),
- Gradus 2: intermedijerni gradus (umereno diferencirane),

- Gradus 3: visok gradus (veoma slabo diferencirane),
- Gradus 4: visok gradus (nediferencirane; pacijenti imaju najlošiju prognozu).

Kao važan prognostički parametar u klinici se koriste i patološke karakteristike tumora: veličina, prisustvo regionalnih metastaza i postojanje udaljenih metastaza. Na osnovu ovih karakteristika napravljena je TNM podela, tj. podela prema stadijumu bolesti. Određivanje stadijuma kancera dojke se vrši na osnovu TNM sistema, a on uzima u obzir veličinu tumora (T), status regionalnih limfnih čvorova u pazušnim jamama (N) i da li je tumor metastazirao (M), odnosno proširio se ka udaljenim delovima tela.

Prema veličini tumora uočavaju se: T1 (manji od 2 cm), T2 (2-5 po najvećoj osi) i T3 (veći od 5 cm po bilo kojoj osi).

Prema prisustvu regionalnih metastaza u limfnim čvorovima pazuha tumori su definisani kao: N0 (bez metastaza), N1 (1-3 metastaze) i N2 (više od 4 metastaze).

Prema prisustvu udaljenih metastaza tumori su definisani kao: M0 (bez detektovanih udaljenih metastaza) i M1 (sa detektovanim udaljenim metastazama).

Opisana podela je osnovna podela koja je danas, sa unapređenjem dijagnostičkih metoda, proširena. Najjednostavnija TNM klasifikacija je prikazana u **Tabeli 1**.

Osnovni stadijumi kancerogeneze su:

- Stadijum I - prekancerozno stanje, odnosno marker stanje: duktalni karcinom in situ ili lobularni karcinom in situ. Ovi pacijenti imaju najbolju prognozu.
- Stadijumi I-III su smešteni u okviru dojke ili regionalnih limfnih nodusa.
- Stadijum IV je metastatski, uznapredovali kancer dojke, koji ima najlošiju prognozu.

**Tabela 1. TNM klasifikacija**

<b>Stadijum</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
T0	T0	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
	T3	N1	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
IIIB	T3	N2	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
IIIC	T4	N2	M0
	Bilo koje T	N3	M0
IV	Bilo koje T	Bilo koji N	M1

### **1.1.3. Podela tumora dojke na osnovu statusa receptora.**

Normalne i maligne ćelije dojke eksprimiraju receptore za hormone i faktore rasta od kojih su sa kliničkog aspekta najznačajniji: estrogenski receptori (ER), progesteronski receptor (PR) i receptor 2 humanog epidermalnog faktora rasta (HER2), engl. "Human Epidermal Growth Factor Receptor 2"). Ekspresija ovih receptora je u malignim ćelijama deregulisana i može biti povećana, smanjena, ili može doći do potpunog gubitka njihove ekspresije. Tumori dojke, čije ćelije ne eksprimiraju ni jedan od ovih receptora, nazivaju se "trostruko negativni"; oni u malom procentu odgovaraju na hormonsku terapiju i imaju najlošiju prognozu.

Oko 75% kancera dojke eksprimiraju povišene količine receptora za estrogen te se nazivaju ER pozitivni (ER+) i njihov nastanak i rast zavisi od estrogena. Od njih, 65% je PR pozitivno (PR+). Kanceri dojke koji imaju ER+/PR+ fenotip, u 60% slučajeva odgovaraju na endokrinu terapiju (npr. tamoksifen), dok ER-/PR- negativni kanceri dojke samo u 5-10% slučajeva odgovaraju na terapiju. U 20-25% kancera dojke, dolazi do povećane amplifikacije HER2, a najčešće korišćen lek za terapiju HER pozitivnih

pacijentkinja je herceptin. 10-17% kancera dojke je „trostruko negativno“, jer ne ekspimiraju ER i PR i nemaju uvećanu ekspresiju HER2. Ovi kanceri dobro odgovaraju na dodatnu hemioterapiju, ali imaju lošiju prognozu od ostalih tipova kancera. Do danas nije utvrđena ciljana terapija za ovaj tip kancera.

Patološka podela kancera dojke na osnovu gradusa i stadijuma pruža primarne informacije o ishodu bolesti, međutim ove informacije nisu dovoljne za tačnu prognozu toka i ishoda bolesti i odgovora na terapiju. Sa napredovanjem tehnika genetike, danas je moguće izvršiti podelu kancera dojke na osnovu ekspresije gena u celom genomu. Perou i saradnici su 2000. godine na 65 uzoraka dojke izvršili „microarray“ analizu ekspresije 496 gena i na osnovu njihove diferencijalne ekspresije izvršili podelu kancera dojke na: (i) Luminalni A; (ii) Luminalni B; (iii) HER2/neu, koji liče na bazalni (engl. „basal-like“) i (iv) oni koji liče na normalnu dojku (engl. „normal breast-like“) (Perou sa sar., 2000). Luminalni A i Luminalni B su ER pozitivni i ekspimiraju keratin 8/18 specifičan za luminalne ćelije; HER2/neu imaju povećanu ekspresiju HER2/neu onkogeno, pri čemu je ekspresija ER $\alpha$  u ovim tumorima veoma niska. „Basal-like“ kanceri dojke su ER $\alpha$  negativni i imaju ekspresiju keratina 5/6 koji je karakterističan za bazalne mioepitelijalne ćelije (Han, 2011).

#### **1.1.4. Faktori rizika za nastanak kancera dojke**

Za razliku od većine drugih malignih bolesti, kancer dojke nastaje kao posledica kombinacije genetičkih i endokrinih faktora, te predstavlja primer hormon-promovisane kancerogeneze. Rano-nastali kancer dojke (pre 45-e godine; često nasledan) uglavnom je povezan sa prisustvom mutacija u BRCA1 i BRCA2 genima. Nasuprot njemu, kasno-nastali (nakon 45-e godine, uglavnom nije nasledan, engl. „sporadic“) nastaje kao kombinacija akumuliranih somatskih genetičkih promena i faktora rizika tokom života. Najčešće somatske mutacije koje se dešavaju u tumorskim ćelijama su mutacije tumor supresor gena (P53, RB1) i onkogeno (ras, myc, neu), kao i gena koji učestvuju u kontaktnoj inhibiciji ćelija-ćelija, adheziji ćelija-ćelija, angiogenezi, DNK reparaciji i apoptozi.

Obzirom na činjenicu da je epitel mlečne žlezde tokom najvećeg dela života žene pod neprekidnom hormonskom stimulacijom, najveći faktor rizika je stepen izloženosti estrogenu. Pri tome su bitni ne samo nivoi hormona (pre svega estrogena) već i dužina izloženosti tokom života. Niže su nabrojani glavni faktori rizika i većina njih je povezana sa izloženoću estrogenu:

- Uzimanje alkohola: više od jedne do dve čaše dnevno povećava rizik za obolevanje. Povišen nivo alkohola u krvi dovodi do rastvaranja estrogena iz masnog tkiva.
- Ukupan broj menstruacija tokom života: rana menarha i kasna menopauza produžuju vreme izlaganja estrogenu (McGuire, 1975).
- Rađanje dece: žene koje nikada nisu rađale decu ili su ih rodile posle 30. godine imaju povećan rizik za obolevanje od kancera dojke. Žene koje su rodile između 20. i 30. godine i imaju više dece imaju manji rizik za pojavu kancera dojke, a mogući uzrok je što trudnoća redukuje broj menstruacija tokom života tj. omogućuje period izloženosti samo progesteronu.
- Dojenje: žene koje su dojile imaju smanjen rizik za obolevanje od kancera dojke, pri čemu ova veza nije u potpunosti izučena. Mogući uzrok je što dojenje smanjuje ukupan broj menstruacija tokom života. Druga hipoteza je da dojenje predstavlja jedini period kada se mlečni epitel regeneriše i „zameni“, te se tom prilikom eventualno prisutne premaligne lezije mehanički gube.
- Neke vrste terapija:
  - DES (diethylstilbestrol): Žene koje su uzimale DES, lek za sprečavanje pobačaja, imale su veći rizik za obolevanje od kancera dojke posle 40. godine. Ovaj lek je davan ženama od 40-ih do 60-ih godina prošlog veka.
  - HRT (“hormone replacement therapy”): Hormonska terapija estrogenima, u trajanju od nekoliko ili više godina povećava rizik za pojavu kancera dojke. Ova terapija je promovisana krajem devedesetih u cilju tretmana menopauzalnih simptoma i smanjenja rizika za bolesti povezanih sa



menopauzom; većina kliničkih studija je obustavljena do 2003. Godine, usled povećane incidence kancera dojke u ispitivanoj populaciji.

- Gojaznost: ne zna se tačna veza između gojaznosti i kancera dojke, ali smatra se da je u gojaznih žena povišen nivo estrogena u serumu.
- Radijacija: zračenje grudnog koša u detinjstvu ili mladosti povećava rizik za pojavu kancera dojke, naročito ako je zračenje učestalo primenjivano tokom razvoja grudi.
- Starost: rizik za pojavu kancera dojke se povećava sa starošću. Oko 1 od 8 invazivnih kancera dojke je pronađeno kod žena mlađih od 45 godina, a oko 2 od 3 invazivna kancera dojke su pronađena kod žena koje imaju, ili su starije od 55 godina.

## **1.2. Estrogen i estrogenski receptori u kanceru dojke**

17 $\beta$ -estradiol (E2) je steroidni hormon koji ima bitnu ulogu u razvoju i rastu mlečnih žlezda tokom puberteta, trudnoće i laktacije, kao i u ćelijskoj proliferaciji u fiziološkim i patofiziološkim stanjima (Nilsson sa sar., 2001). Estrogen povećava intenzitet ćelijskih deoba, a time i verovatnoću da dođe do grešaka tokom replikacije (Preston-Martin sa sar., 1990). Proliferacija ćelije u dojci odrasle osobe je najveća kada su estrogen i progesteron na najvišem nivou (Yue sa sar., 2013). Pokazano je da je kod žena u menopauzi terapija hormonima estrogenom ili estrogenom i progesteronom, povećala proliferaciju ćelija u lobularnim jedinicama terminalnih duktusa, što je pretpostavljeno mesto nastanka kancera (Hofseth sa sar., 1999).

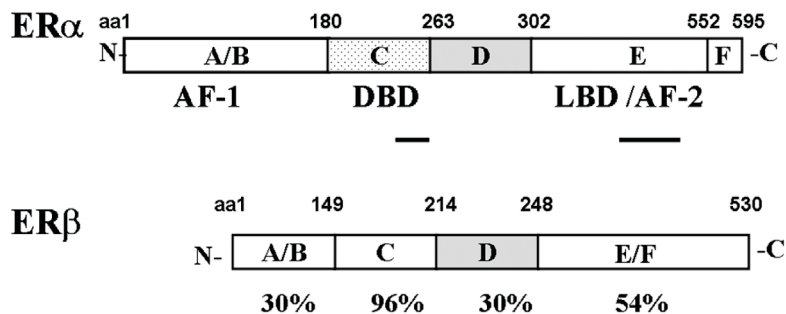
Većina kancera dojke je na početku estrogen-zavisna, odnosno u procesu nastanka i progresije kancera veliku ulogu ima estrogen i estrogenski receptori: estrogenski receptor alfa (ER $\alpha$ ) i estrogenski receptor beta (ER $\beta$ ). Gubitak ekspresije ER-a znači da rast ćelija više nije regulisan estrogenom i ne može biti zaustavljen endokrinom terapijom. To vodi ka nastanku agresivnijih fenotipova tumora i lošijoj prognozi bolesti. Postavlja se pitanje da li su ER pozitivni i ER negativni tumori različitog porekla ili su različiti stadijumi u razvoju

bolesti. Nandi i saradnici su 1995. postavili model (Nandi sa sar., 1995) prema kome: i) u normalnoj dojci postoje skupovi ćelija sa specifičnim mitogenim odgovorom na hormonsku stimulaciju; ii) specifični skup hormona će indukovati specifičan set gena odgovornih za deobu u svakom odeljku; iii) kancerogen izaziva mutaciju(e) koje se fiksiraju u narednim deobama; iv) kasnije deobe i progresija tumora vode ka nastanku tumora specifičnog fenotipa. U okviru ovog modela je pretpostavljeno da među epitelijalnim ćelijama dojke postoje dve vrste ćelija koje odgovaraju na estrogen, one koje eksprimiraju ER (ER pozitivne) i one koje ne eksprimiraju ER (ER negativne), što je potvrđeno eksperimentima (Clarke sa sar., 1997; Shoker sa sar., 1999). Iz skupa ćelija koje su zavisne od hormona nastaju hormon zavisni tumori, a iz skupa hormon nezavisnih ćelija nastaju hormon nezavisni tumori. Noviji modeli tumorigeneze podržavaju model Nandi i saradnika (Allred sa sar., 2004).

### **1.2.1. Organizacija gena i transkripciona aktivnost estrogenskog receptora $\alpha$ i estrogenskog receptora $\beta$**

Estrogen ostvaruje svoje fiziološke efekte vezivanjem za receptore ER $\alpha$  i ER $\beta$  (Thomas sa sar., 2011). ER $\alpha$  (595 aminokiselina) i ER $\beta$  (530 aminokiselina) su članovi superfamilije jedarnih receptora. Ova dva receptora su kodirana sa dva visoko homologa gena, pri čemu gen ESR1, smešten na šestom hromozomu kodira ER $\alpha$ , a gen ESR2, smešten na četrnestom hromozomu kodira ER $\beta$ . Humani ER $\alpha$  i ER $\beta$  geni su izolovani i sadrže 8 eksona (Nilsson sa sar., 2001; Herynk sa sar., 2004). Za oba gena je karakteristično alternativno isecanje (engl. „splicing“) iRNK, gde se jedan ili više kodirajućih eksona iskraja, što vodi ka nastanku proteina sa izmenjenim funkcionalnim domenima i dominantno negativnoj ili dominantno pozitivnoj aktivnosti, ili izostanku biološke aktivnosti proteina (Herynk sa sar., 2004).

Iako su kodirani različitim genima, koji se nalaze na različitim hromozomima, ovi receptori imaju visoko homologe proteinske strukture, što je prikazano na **Slici 1**.



**Slika 1. Estrogenski receptori  $\alpha$  i  $\beta$ :** Strukture dva ER podtipa. Aminokiselinske pozicije za svaki strukturni motiv su prikazane iznad proteina, a procenat homologije između ova dva proteina je prikazan ispod ER $\beta$ . Preuzeto iz (Fox sa sar., 2008b).

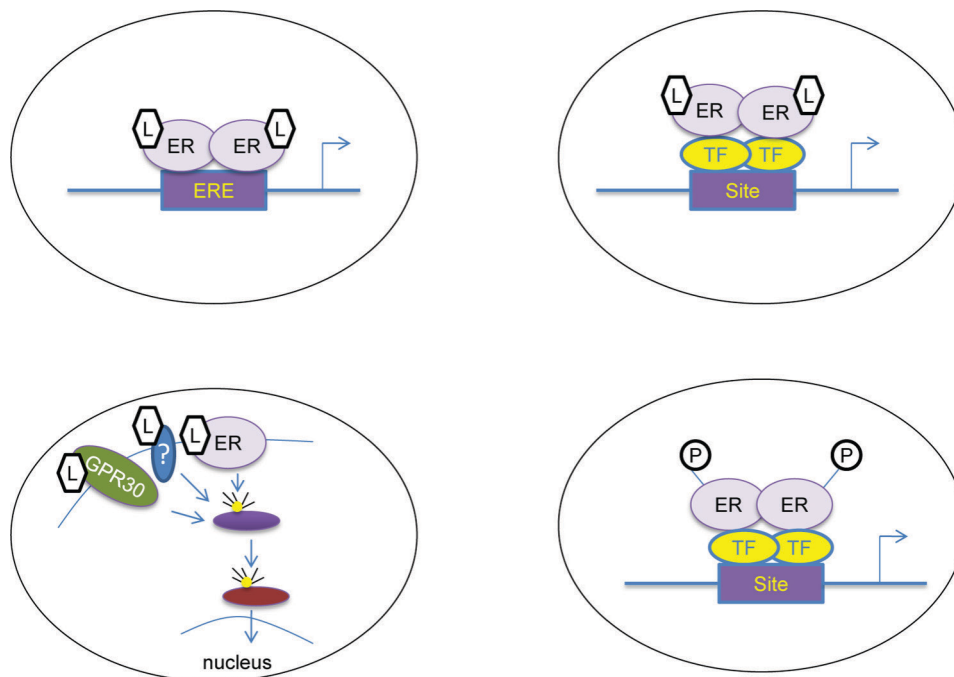
Kao i drugi članovi familije jedarnih receptora, ER-i sadrže šest funkcionalnih regiona, od N-terminalnog A/B domena do C-terminalnog F-domena, koji poseduju različit stepen konzervacije sekvence (Kong sa sar., 2003). Slabo konzerviran A/B region kodira deo proteina koji ima autonomnu transaktivacionu funkciju AF-1 (aktivaciona finkcija 1). C region je visoko konzerviran i sadrži DNK –vezujući domen (DBD), a konzervirani E region kodira ligand-vezujući domen (LBD), kao i transaktivacionu funkciju AF-2 (aktivaciona funkcija 2) (Bai sa sar., 2009). D domen se može smatrati zglobnim peptidom koji povezuje DBD i LBD region, a F region se nalazi u C-terminalnom regionu, produžetak je LBD-a i nije konzerviran (Ruff sa sar., 2000). Vezivanje za odgovarajući ligand izaziva promenu konformacije receptora, što vodi ka dimerizaciji receptora i vezivanja za specifične sekvence DNK, nazvane ERE (engl. “estrogene response elements”). Aktivirani receptor/DNK kompleks zatim interaguje sa drugim kofaktorima iz nukleusa, a to vodi ka transkripciji DNK nizvodno od ERE i aktiviranju estrogenom-regulisanih gena (Koehler sa sar., 2005). DNK-vezujući regioni ER-a imaju 96% homologije i identično vezuju većinu ERE (Fox sa sar., 2008a). Međutim pošto se ER $\alpha$  i ER $\beta$  različito vezuju za transkripcione faktore (kao što su Sp1 ili AP-1), regulacija transkripcije može biti ER-podtip specifična (Hall sa sar., 2001; Nilsson sa sar., 2001). LBD regioni ER $\alpha$  i ER $\beta$  imaju oko 54% homologije, vezuju prirodne estrogene, ali i neke selektivne modulare estrogen receptora

(SERMs) (Kuiper sa sar., 1998). Domeni aktivacije AF-1 i AF-2 u sinergiji interaguju sa različitim koaktivatorima da bi se vezali za DNK/ER kompleks (Fox sa sar., 2008a). U zavisnosti od ćelije i promotora, vezivanje koaktivatora isključivo za AF-1 ER $\alpha$ , vodi ka delimičnoj aktivaciji ili ka izostanku aktivacije (Tzukerman sa sar., 1994). Da bi se ostvarila potpuna aktivacija ER $\alpha$ , koaktivatori se moraju simultano vezati za AF-1 i AF-2 regione (Benecke sa sar., 2000). Za razliku od ER $\alpha$ , izgleda da ER $\beta$  ima smanjenu AF-1 aktivnost, ali istovremeno potpuno funkcionalnu AF-2 (Delaunay sa sar., 2000).

Oba estrogenska receptora stimulišu transkripciju gena koji sadrže ERE sekvence (Kuiper sa sar., 1997). Postoje dva osnovna puta dejstva ER-a: genomski i negenomski put. Klasični, genomski put obuhvata vezivanje liganda za ER, dimerizaciju ER-a i vezivanje ER dimera za ERE sekvence ciljnih gena. Estrogen difunduje kroz plazma-membranu i citoplazmu i ulazi u jedro, gde se vezuje za ER što dovodi do konformacione promene ER-a i prelaska u aktivnu formu (Pratt sa sar., 1997). Aktivirani ER se dimerizuje, pri čemu nastaju homodimeri ER $\alpha$ /ER $\alpha$ , ER $\beta$ /ER $\beta$  ili heterodimeri ER $\alpha$ /ER $\beta$  (Cowley sa sar., 1997; Pace sa sar., 1997), koji se zatim translociraju u jedro pomoću mesta jedarne lokalizacije i vezuju za ERE ciljnih gena. ER vezan za ERE aktivira koregulatore koji stimulišu transkripciju gena (Bai sa sar., 2009). Drugi način genomskog dejstva ER-a predstavlja indirektno vezivanje ER-a za DNK, posredstvom drugih transkripcionih faktora, npr AP-1 i Sp1 (Jakacka sa sar., 2001). Direktna i indirektna interakcija ER sa ERE vodi ka aktivaciji koregulatora i komponenata transkripcionog kompleksa II RNK polimeraze, čime se povećava transkripcija gena (Klinge, 2000).

Pored genomskih puteva, postoje i negenomski putevi dejstva ER-a. Oni obuhvataju signalne puteve regulisane membranskim ER-a, faktorima rasta (epidermalni faktor rasta, „insulin-like“ faktor rasta-1, insulin i transformišući faktor rasta-b), neurotransmiterima (dopamin) i drugim molekulima koji utiču na kaskadu protein-kinaze (Katzenellenbogen sa sar., 1997; Shao sa sar., 2004; Edwards, 2005). Poslednji način negenomskog dejstva ER-a predstavlja aktivaciju ER-a putem ekstracelularnih signala u odsustvu liganda. Signalizacija putem faktora rasta ili stimulacija drugih signalnih puteva vodi ka aktivaciji kinaza koje mogu da fosforilišu i time aktiviraju ER-e ili koregulatore asociirane sa njima, u odsustvu

liganda (Zhao sa sar., 2010). Putevi negenomske signalizacije su još uvek nerazjašnjeni. Putevi dejstva ER-a su prikazani na **Slici 2**.

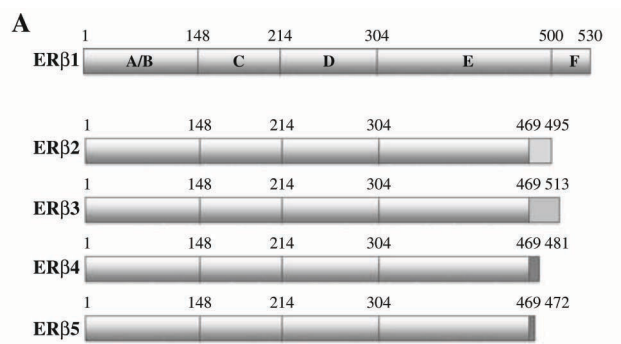


**Slika 2. Četiri različita načina dejstva ER-a:** Gore levo: Klasični put dejstva ER-a: Aktivacijom pomoću liganda (L) dimeri ER-a se direktno vezuju za ERE elemente. Gore desno: Posle vezivanja liganda (L) ER-i se vezuju za TF (npr. AP-1, Sp1). Dole levo: Estrogen može ostvariti svoje dejstvo putem negenomskih mehanizama, preko ER $\alpha$  ili GPR30 u ćelijskoj membrani, što uključuje interakciju sa citoplazmatskim proteinima signalne transdukcije. Dole desno: ER aktivnost može da bude regulisana preko ligand-nezavisnog puta u kome protein kinaze fosforilišu ER-e. Preuzeto iz (Zhao sa sar., 2010).

Da li će prevladati dejstvo ER $\alpha$  ili ER $\beta$ , verovatno zavisi od: kompleksne interakcije između nivoa ekspresije svakog ER-a, relativnog afiniteta za specifičnu sekvencu na DNK, dostupnosti liganda i kofaktora i interakcije sa drugim transkripcionim faktorima u datom momentu (Dahlman-Wright sa sar., 2006). Na stabilnost i aktivnost ER-a utiču i posttranslacione modifikacije: acetilacija, fosforilacija, sumoilacija i ubikvitinacija (Dahlman-Wright sa sar., 2006). Uloga posttranslacionih mehanizama u funkciji ER $\beta$  još nije razjašnjena.

### 1.2.2. Estrogenski receptor beta

Pored wt ER $\beta$  izoforme (označene kao ER $\beta$ 1), identifikovano je još četiri proteinske izoforme (ER $\beta$ 2, ER $\beta$ 3, ER $\beta$ 4 i ER $\beta$ 5) koje nastaju sa istog gena. Pokazano je da ove izoforme postoje kao transkripti koji imaju zajedničke eksone od 1-7 i 8. egzon specifičan za svaku izoformu (Poola sa sar., 2005a; Leung sa sar., 2006), (Slika 3). Pošto sve izoforme imaju iste eksone od 1 do 7, sve imaju isti AF-1 domen, DBD, zglobni domen i LBD, dok je AF-2 domen na C kraju specifičan za svaku izoformu (Leung sa sar., 2012). Osim ovih pet izoformi koje nastaju alternativnom ugradnjom jednog od 5 različitih osmih egzona na 3' kraju gena, pokazano je da postoje i alternativno obrađeni transkripti koji nastaju delecijom unutrašnjih egzona.



Slika 3. Šematski prikaz humanog „wildtype” ER $\beta$  i njegovih izoformi: Struktura domena ER $\beta$ 1 i njegovih izoformi ER $\beta$ 2- ER $\beta$ 5. Preuzeto iz (Swedenborg sa sar., 2009).

### 1.2.3. Značaj ER $\alpha$ i ER $\beta$ u progresiji tumora dojke i odgovoru na terapiju

ER $\beta$  se eksprimira u duktalnom i lobularnom epitelu i stromalnim ćelijama mlečne žlezde (Gotteland sa sar., 1995). ER $\alpha$  je pronađen samo u duktalnom i lobularnom epitelu, ali ne i u stromi (Gotteland sa sar., 1995). Opšte je prihvaćeno da tumori dojke zavise od stimulatornih efekata estrogena, bar na početku, ali deo tumora dojke prelazi u estrogen – nezavisne kako bolest odmiče (Dahlman-Wright sa sar., 2006).

Status ER $\alpha$  i PR je nezavisni prognostički faktor kancera dojke i danas se rutinski određuje kod pacijenata, koji se, ako su ER $\alpha$  pozitivni, podvrgavaju terapiji antiestrogenima (Balfe sa sar., 2004). Sa otkrićem ER $\beta$ , postavljeno je pitanje da li se i on

može koristiti kao marker predikcije i/ili prognoze kancera dojke. Kao što je rečeno, ER $\alpha$  je važan za rast i proliferaciju ćelija dojke. Međutim, uloga ER $\beta$  još nije potpuno razjašnjena, a u dosadašnjim studijama su pronađena neslaganja ekspresije ER $\beta$  na nivou iRNK i proteina (Balfé sa sar., 2004). Delom, kontradiktornosti potiču od nepouzdanih metoda za merenje statusa ER $\beta$ . Takođe, postojanje ER $\beta$  u pet različitih izoformi komplikuje rasvetljavanje njegove uloge u kancerogenezi. U tkivu dojke izgleda da dominiraju ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 2 i ER $\beta$ 5 i izgleda da svaka od ovih izoformi ima različitu biološku funkciju. ER $\beta$ 3 se eksprimira u testisima (Moore sa sar., 1998), a ER $\beta$ 4 je takođe pronađena u dojci (Tong sa sar., 2002). Postoje razlike u ekspresiji ER $\beta$  izoformi u normalnom tkivu i tkivu kancera dojke. Pokazano je da se ekspresija ER $\beta$  smanjuje u ćelijama kancera u odnosu na normalne ćelije, što ukazuje na to da on može imati ulogu supresora tumora (Leung sa sar., 2012). ER $\beta$ 2 ne vezuje estrogen, niti može aktivirati transkripciju gena, ali formiranjem heterodimera sa ER $\alpha$  deluje inhibitory na vezivanje ER $\alpha$  za DNK (Warner sa sar., 2010).

Izgleda da se ekspresija ER $\alpha$  povećava, a ER $\beta$  smanjuje u početnim fazama kancera dojke (ranom kanceru), dok se u uznapredovalim fazama ekspresija oba receptora smanjuje (Leygue sa sar., 1998; Jarvinen sa sar., 2000; Roger sa sar., 2001). Neki autori smatraju da je odnos između ova dva proteina najbitniji u determinaciji karaktera signalnog puta ER-a (Leygue sa sar., 1998). Pokazano je da ER $\beta$ 1 formira funkcionalne homodimere ili heterodimere sa drugim izoformama, kao i sa ER $\alpha$ , čime inhibitory deluje na ER $\alpha$  signalni put (Peng sa sar., 2003; Leung sa sar., 2006). Smatra se da izoforme ER $\beta$ 2/cx i ER $\beta$ 5 nemaju samostalno dejstvo, već da grade dimere sa ER $\beta$ 1 i ER $\alpha$  i tako utiču na njihovu aktivnost (Inoue sa sar., 2000; Saji sa sar., 2002; Peng sa sar., 2003; Leung sa sar., 2006). Skorije su pronađene i skraćene forme ER $\beta$  na N-kraju koje se funkcionalno razlikuju od ER $\beta$ 1 izoforme (Savinov sa sar., 2006; Tateishi sa sar., 2006). Iz svega ovoga sledi da je pored ekspresije wt izoforme ER $\beta$ 1, veoma bitno meriti i ostale ER $\beta$  izoforme u kancerima.

Još nije utvrđeno koji mehanizmi utiču na promenu ekspresije ER $\beta$  izoformi u normalnom tkivu i tkivu kancera dojke, ali izgleda da veliku ulogu ima metilacija promotorskih regiona ER $\beta$  gena, čime se smanjuje ekspresija ER $\beta$  transkripata. Takođe regulacija translacije preko 5'-netranslirajućih regiona ER $\beta$  gena (5'-UTR, engl. „5'-untranslated regions“) ima ulogu u različitoj ekspresiji izoformi (Hirata sa sar., 2001).

### 1.3. Epigenetički procesi u nastanku kancera dojke

Molekularni mehanizmi koji uzrokuju nastanak i razvoj kancera dojke su pre svega mutacije gena (Vo sa sar., 2012). Pored njih sve veći značaj se pridaje epigenetičkim mehanizmima. Epigenetički mehanizmi regulišu biološke procese kao što su inaktivacija X-hromozoma, genomski imprinting, RNK interferenca i reprogramiranje genoma tokom diferencijacije i razvika (Veeck sa sar., 2010). Poremećaj bilo kog od ovih procesa može da izazove bolesti, uključujući i kancer dojke. Poremećaji epigenetičkih procesa se manifestuju kroz aberantnu metilaciju gena i i acetilaciju histona koji učestvuju u normalnom razvoju tkiva, pri čemu dolazi do poremećaja ili aktivacije ekspresije gena. Gubitak proteina ćelijske adhezije i prekomerna aktivacija signalnih puteva estrogenskih receptora izaziva abnormalni rast i diferencijaciju tkiva. Migracije abnormalnih ćelija se povećavaju. Uključuju se i važni intracelularni putevi: apoptoza, DNK reparacija, detoksifikacija (Vo sa sar., 2012).

Jedan od najvažnijih epigenetičkih mehanizama koji su povezani sa nastankom i razvojem tumora je metilacija CpG ostrvaca. CpG ostrvca su sekvence u promotorskim delovima DNK i ponekad u prvom egzonu gena, dužine od 0,5 do nekoliko hiljada baznih parova (Bird, 1986), u kojima je učestalost CpG dinukleotida veća nego na drugim mestima u genu (Millis, 2011). Nemetilovana CpG ostrvca se uglavnom nalaze u 5'-regulatornim (promotorskim) regionima mnogih strukturnih gena (engl. „housekeeping“) (koji su esencijalni za opšte ćelijske funkcije) kao i u nekim tkivno-specifičnim genima, omogućavajući neophodnu ekspresiju gena (Esteller, 2002). Iako je značajan broj CpG ostrvaca smešten u 5'-netranslirajućim regionima i u prvom egzonu gena, oni se takođe mogu naći i u 3'-regionu i unutar samih gena (Vo sa sar., 2012). Kod raznih bolesti, kao i kod kancera dojke, hipermetilacija CpG ostrvaca nastaje kao rezultat prekomerne aktivnosti DNK metiltransferaza (DNMT) u sadejstvu sa još nekim mehanizmima koji potpomažu proces metilacije citozina i remodelovanje hromatina. DNMT-e katalizuju transfer metil grupe sa S-adenozil L-metionin-a (SAM) na 5'-citozin CpG dinukleotida (Vo sa sar., 2012). Kod ljudi, najvažnije DNMT-e su: DNMT1, DNMT3a i DNMT3b. DNMT1 je najzastupljenija i uloga joj je održavanje obrasca metilacije, dok su druge DNMT-e



posrednici *de novo* metilacije (Meeran sa sar., 2010). Posledica hipermetilacije citozina u CpG ostrvcu je (reverzibilna) inaktivacija tumor supresor gena, što je nasledni proces koji se prenosi na generacije ćelija putem mitotičkih deoba (Vo sa sar., 2012). Metilacija citozina u CpG dinukleotidima promotorskih regiona kodirajućih gena, suprimira ekspresiju gena u normalnim ćelijama (Dworkin sa sar., 2009). Izgleda da u ćelijama kancera dolazi do globalne hipometilacije genomske DNK u kodirajućim delovima gena, unutrašnjim egzonima i intronima i do hipermetilacije u normalno nemetilovanim promotorskim regionima gena određenih tkiva, čime nastaje „metilaciona neravnoteža“ (Baylin sa sar., 1998). Dok metilacija histona dovodi do kratkotrajne inhibicije ekspresije gena, metilacija citozina na CpG ostrvcima promotorskih regiona vodi ka dugotrajnom utišavanju gena i nedostupnosti hromatina za transkripciju (Cedar sa sar., 2008). Smatra se da se obrazac metilacije uspostavlja veoma rano u embriogenezi tokom implantacije (Michaelson-Cohen sa sar., 2011).

Ekspresija estrogenskih receptora u tumorima zavisnim od hormona je povezana sa kliničkim ishodima kancera dojke (Thomas sa sar., 2011). Metilacija specifičnih klastera gena može biti asocirana sa prisustvom receptora za estrogen i progesteron, relapsom bolesti i metastazom limfnih čvorova (Hill sa sar., 2011).

U procesu kancerogeneze bitna je i modifikacija histona kao jedan od epigenetičkih događaja a koja je katalizovana sa nekoliko enzima: histon acetiltransferazom, histon metiltransferazom i histon demetilazom. U zavisnosti od toga koje je aminokiselinsko mesto histona modifikovano, dolazi do histonske metilacije ili acetilacije, pri čemu se aktivira, ili inaktivira ekspresija gena (Vo sa sar., 2012). Acetilacijom histona na mestima lizina koji su smešteni u promotorskim regionima gena mogu se aktivirati geni otvaranjem hromatina, čime se omogućuje da transkripcioni enzimi i drugi faktori imaju bolji pristup molekulu DNK (Meeran sa sar., 2010).

ER $\alpha$  se eksprimira u oko 75% dijagnostifikovanih tumora dojke (ER $\alpha$  pozitivni) i ER $\alpha$  pozitivne pacijentkinje imaju bolju prognozu, jer bolje odgovaraju na hormonsku terapiju (Di Leva sa sar., 2010). Sa druge strane ER $\alpha$  negativne pacijentkinje imaju lošiju prognozu (Nass sa sar., 2000). Aberantna metilacija CpG ostrvaca u promotoru gena za ER $\alpha$  bi mogla biti jedan od mehanizama, kojim nastaje negativni fenotip ovog gena (Nass

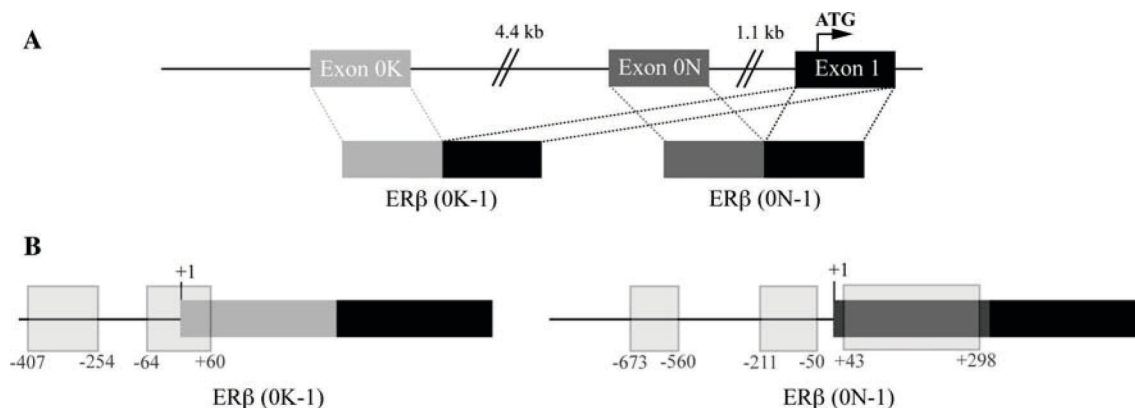
sa sar., 2000). Takođe je pokazano da aberantna metilacija u promotoru E-cad gena utiče na njegovu smanjenu ekspresiju (Graff sa sar., 2000; Nass sa sar., 2000). U normalnom epitelu dojke CpG ostrvca u promotoru ER $\alpha$  i E-cad gena nisu metilovana, a metilacija je zapažena u svim stadijumima tumora, sa većom učestalošću pri prelasku iz DCIS u metastazirane tumore (Nass sa sar., 2000). Gubitak ER $\alpha$  tokom progresije tumora je povezan sa lošom histološkom diferencijacijom, visokom frakcijom rasta i različitim kliničkim ishodima i može predstavljati ključni mehanizam za sticanje rezistencije na terapiju hormonima (Nass sa sar., 2000). Moguće je da gubitak ER $\alpha$  i E-cad tokom progresije tumora predstavlja adaptaciju u pravcu zaustavljanja rasta tumora, ali ta adaptacija još nije toliko uznapredovala da bi zaustavila rast tumora, pre nego što tumorske ćelije steknu invazivni potencijal (Vo sa sar., 2012).

Ekspresija ER $\beta$  se takođe menja tokom progresije tumora dojke. U početnim fazama razvoja tumora se njegov nivo smanjuje, da bi u uznapredovalim karcinomima visokog stadijuma došlo do potpunog gubitka ekspresije ER $\beta$  (Horvath sa sar., 2001; Latil sa sar., 2001; Pasquali sa sar., 2001). Sa druge strane, visok nivo ER $\beta$  je primećen u većini metastaza kancera prostate, u kostima i limfnim čvorovima (Leav sa sar., 2001). Uloga ER $\beta$  u metastazama je nejasna, a jedna od pretpostavki je da lokalni faktori vode ka ponovnoj ekspresiji ER $\beta$  na mestima metastaza (Swedenborg sa sar., 2009).

Nekoliko skorašnjih studija je pokazalo da povećana ekspresija ER $\beta$  smanjuje ćelijsku proliferaciju i da ER $\beta$  kao tumor supresor ima anti-proliferativnu funkciju u tkivu dojke (Speirs sa sar., 2004; Strom sa sar., 2004; Nilsson sa sar., 2011). Smanjena ekspresija ER $\beta$  je pokazana u invazivnom kanceru dojke (Skiris sa sar., 2003), dok je očuvana ekspresija ER $\beta$  povezana sa manje invazivnim tumorima (Jarvinen sa sar., 2000). Pokazano je da je jedan od razloga smanjene ekspresije ER $\beta$  u kancerima povećana metilacija promotorskih regiona (Zhao sa sar., 2003). Takođe je pokazano da demetilacija promotora ćelija kancera prostate sa valproinskom kiselinom utiče na ponovnu ekspresiju ER $\beta$  (Stettner sa sar., 2007).

Promotorski region humanog ER $\beta$  je kloniran i okarakterisan 2000. godine (Li sa sar., 2000). Ubrzo su opisane i dve ER $\beta$  izoforme koje vode poreklo od dva različita netranslirajuća prva egzona, egzon OK i egzon ON (Hirata sa sar., 2001). Ovi egzoni se

pripajaju egzonu jedan i tako nastaju dve informacione RNK (OK-1) i (ON-1) (Slika 4). Originalno opisana promotorska sekvenca (Hirata sa sar., 2001) sadrži sekvencu egzona ON. Egzon OK se nalazi oko 50 kb uzvodno od egzona 1 (Slika 4) i nije detaljno okarakterisan. Međutim detektovani su ER $\beta$  transkripti cele dužine koji ne poseduju ni egzon ON ni egzon OK (Ogawa sa sar., 1998), što nagoveštava prisustvo još jednog neidentifikovanog egzona, ako ne i više njih. Smith i saradnici su 2010. Godine, otkrili i treći promotorski region, koji se prepisuje u funkcionalni transkript (Smith sa sar., 2010b). Raspodela OK-1 i ON-1 izoformi je različita u tkivima (Hirata sa sar., 2001) i njihov odnos se menja u ćelijama tumora (Suzuki sa sar., 2008).



**Slika 4. Metilacija DNK u netranslirajućem regionu ER $\beta$ .** A: Šematski prikaz netranslirajućeg regiona ER $\beta$  i iskrcanje primarnog transkripta koje vodi ka formiranju dve ER $\beta$ - iRNK-e: (OK-1) i (ON-1). Lokacija CpG ostrva u ER $\beta$  (OK-1) i ER $\beta$  (ON-1) (svetlosivi pravougaonici). Mesto inicijacije transkripcije je označeno kao +1. Preuzeto iz (Swedenborg sa sar., 2009).

ER $\beta$  je dominantna forma ER-a u prostati (Swedenborg sa sar., 2009). Povećana DNK metilacija u promotorskom regionu ER $\beta$  je najpre utvrđena u karcinomu prostate. Nojima i saradnici su prvi pokazali da DNK metilacija u 5'-netranslirajućem regionu ER $\beta$  gena inverzno koreliše sa njegovom ekspresijom u prostati (Nojima sa sar., 2001). Oni su analizirali 19 CpG mesta između 376 i 117 bp uzvodno od ATG, u eksonu ON, u humanom karcinomu prostate i benignoj hiperplaziji prostate (BPH). Pokazali su da je svih 19 CpG mesta bilo metilovano u karcinomima, a to je bilo povezano sa nedostatkom ekspresije

ER $\beta$ . U BPH, ova CpG mesta nisu bila metilovana i ER $\beta$  se ekspimirao. Tretman ćelija kancera prostate sa demetilacionim agensom 5-aza-2-deoksicitidin-om (5-AZAC) je vodio ka ponovnoj ekspresiji ER $\beta$ , što ukazuje na reaktivaciju metilacijom inaktiviranog gena. Ovi rezultati su potvrđeni i u studiji Sasaki i saradnika (Sasaki sa sar., 2002).

Zhu i saradnici (Zhu sa sar., 2004) su uključili i promotorski region uzvodno od eksona ON u DNK metilacionu analizu i poredili različite stadijume kancera prostate i metastaziranog tkiva. Zaključili su da se u oba CpG ostrva (u promotorskom regionu i eksonu ON) metilacija povećavala kako je kancer napredovao. Identifikovana su tri CpG klastera koji su bila visoko metilovana, kada je transkripcija bila inaktivirana. Ovi rezultati su potvrđeni u ćelijskim linijama. Takođe su utvrdili da povećanje metilacije počinje u prvom CpG klasteru, a zatim se širi nizvodno.

Obzirom na dokaze da se ER $\beta$  gen manje ekspimiru u kanceru ovarijuma i dojke (Brandenberger sa sar., 1998; Pujol sa sar., 1998; Rutherford sa sar., 2000; Tong sa sar., 2002), nego u normalnim tkivima, pretpostavljeno je da ER $\beta$  deluje kao supresor tumora (Bardin sa sar., 2004; Hartman sa sar., 2006). Pokazano je da je ekspresija ER $\beta$  u malignom tkivu ovarijuma i dojke regulisana DNK metilacijom. Zhao i saradnici su merili ekspresiju ER $\beta$  i metilaciju CpG ostrvaca u promotorskom regionu ESR2 gena u ćelijskim linijama i primarnim tumorima kancera dojke (Zhao sa sar., 2003). Autori su pokazali da je niska ekspresija ER $\beta$  u tumorima povezana sa metilacijom ON promotora, za razliku od OK promotora koji je bio nemetilovan i u zdravim i u tumorskim ćelijama. Povećana metilacija ON promotora je potvrđena i u studiji od Rody i saradnika, a tretman 5'-AZAC je uticao na povećanu ekspresiju ER $\beta$ -a. Takođe je analizirana metilacija ER $\beta$  u ćelijskim linijama i tkivima kancera ovarijuma (Suzuki sa sar., 2008), gde je ekspresija ER $\beta$  bila smanjena u tkivu kancera u odnosu na zdravo tkivo, što je bilo obrnuto povezano sa metilacijom promotorskog regiona i eksona koji sadrži ON promotor. Ekson OK je opet bio nemetilovan i u zdravom i tumorskom tkivu, a tretman 5'-AZAC-om je vodio ka re-ekspresiji ER $\beta$  u ćelijskim linijama kancera ovarijuma.

#### **1.4. Merenje stepena metilovanja metodom kvantitativnog PCR u realnom vremenu**

Lančana reakcija polimeraze (PCR) je postala nezamenljiva metoda u biomedicinskim istraživanjima. Osim relativne jednostavnosti ove metode, jedna od njenih najvećih prednosti je mogućnost da se nekoliko atograma određene sekvence nukleinskih kiselina (što je nedovoljno za biohemijsku analizu) može nakon 30 – 40 ciklusa amplifikacije prevesti u mikrogramske količine, što je više nego dovoljno za detekciju, sekvenciranje, ili kloniranje.

Za razliku od tradicionalnog, kvantitativni PCR detektuje prinos produkta tokom realnog vremena (tj. na kraju svakog ciklusa) – otuda njegov popularni naziv "real time". U ekspanencijalnoj fazi reakcije, uz pretpostavljenu efikasnost od 100%, dolazi do duplikacije količine produkta u svakom ciklusu, te je ona proporcionalna početnoj količini te sekvence u nepoznatom uzorku. Prinos reakcije prati se merenjem prirasta fluorescentnog signala koji emituju boje – obeleživači koji se vezuju za produkt.

Instrument detektuje broj ciklusa u kome fluorescentni signal dostiže određeni nivo, i taj ciklus se naziva "ciklus praga" a označava Ct, (engl "cycle threshold"). Ct se nalazi u ekspanencijalnoj fazi PCR-a. U prvim PCR ciklusima, fluorescentni signal je suviše slab da bi se registrovao i ne prevazilazi nivo "šuma". Tokom ekspanencijalne faze fluorescencija se duplira u svakom ciklusu amplifikacije. Nakon određenog broja ciklusa, dolazi do usporavanja kinetike PCR reakcije i reakcija ulazi u „plato“ fazu. Pošto je Ct vrednost proporcionalna logaritmu početne količine ispitivanog ciljnog molekula u uzorku, relativna zastupljenost jedne ciljne sekvence u odnosu na drugu predstavlja razliku u broju ciklusa ( $\Delta Ct$ ), koji je potreban da se dostigne isti nivo fluorescencije. Kvantitativni PCR specifičan za metilaciju može detektovati jednu kopiju metilovanog alela u 10000 kopija nemetilovanih alela. Uz to, detekcija fluoroforama, čini ovu tehniku metodom izbora za kvantitativno određivanje obzirom na osetljivost, informativnost i mogućnost kliničke primene.

## 2. CILJEVI RADA

Osnovni cilj ovog rada bio je utvrditi da li je metilacioni indeks promotora ON u genu za estrogenski receptor ER $\beta$  povezan sa klasičnim patohistološkim markerima predikcije i prognoze i da li može predstavljati nezavistan marker prognoze u pacijenata sa karcinomom dojke. Postavljeni su sledeći specifični podciljevi:

1. Prikupiti statistički reprezentativan uzorak sporadičnog, primarnog operabilnog invazivnog karcinoma dojke i relevantne kliničke i patohistološke podatke pacijenata i uzoraka tumora.
2. Izolovati DNK, RNK i proteine iz uzoraka tkiva kancera dojke.
3. Dizajnirati prajmere i optimizovati uslove kvantitativne PCR za detekciju metilovanog alela promotora.
4. Odrediti metilacioni indeks u specifičnom regionu ON promotora ESR2 gena u uzorcima tumorskog tkiva dojke.
5. Kvantifikovati ER $\beta$ 1-iRNK izoforme u uzorcima tumorskog tkiva dojke metodom kvantitativnog RT-PCR u realnom vremenu.
6. Odrediti relativni nivo ekspresije proteina ER $\beta$ 1 u uzorcima tumora dojke metodom Western Blota.
7. Utvrditi asocijaciju između metilacionog indeksa ON promotora ER $\beta$  gena i nivoa ekspresije ER $\beta$ 1-iRNK i ER $\beta$ 1 proteina.
8. Utvrditi asocijaciju između metilacionog indeksa ON promotora ER $\beta$  gena i klasičnih kliničkih i patohistoloških parametara: histološki tip tumora, veličina tumora, status limfnih čvorova, statusi estrogenskog receptora  $\alpha$  i progesteronskog receptora.
9. Utvrditi asocijaciju između nivoa ekspresije ER $\beta$ 1-iRNK i ER $\beta$ 1 proteina i klasičnih kliničkih i patohistoloških parametara: histološki tip tumora, veličina tumora, status limfnih čvorova, statusi estrogenskog receptora  $\alpha$  i progesteronskog receptora.

10. Na osnovu dobijenih rezultata proceniti značaj određivanja metilacionog indeksa ON promotora ER $\beta$  gena u kanceru dojke kao alternativnog biomarkera deregulisane ekspresije ER $\beta$  gena.

## **3. MATERIJAL I METODE**

### **3.1. Pacijenti i uzorci tkiva**

U ovoj studiji je analiziran 131 uzorak tkiva invazivnog kancera dojke. Sve pacijentkinje su operisane na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u periodu od januara 2002. do decembra 2004. godine. Za studiju je dobijena saglasnost Etičkog komiteta Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije br 1031/2-01 od 07.04.2008 i Etičkog komiteta Instituta Vinča od 27.06.2012. Svim pacijentkinjama je dijagnostifikovan primarni invazivni unilateralni karcinom dojke i nisu primale terapiju pre operacije. Uzorci su odmah nakon operacije histološki pregledani, i mikrodisekcijom su odvojeni delovi tkiva sa najmanje 75% malignih ćelija, koji su dalje korišćeni za izolaciju DNK, RNK i proteina. Uzorci tkiva su čuvani i transportovani u tečnom azotu. Simultana izolacija DNK, RNK i proteina obavljena je u istom danu. Klinički podaci o pacijentima i patohistološki podaci o tumorima dobijeni su uz konsultaciju internista i histopatologa Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije i dati su u **Tabeli 2**.



**Tabela 2. Klinički parametri pacijenata i histopatološke karakteristike tumora.**

Parametar	Broj pacijenata
Vreme uspostavljanja dijagnoze (godine) (sredina: 57; opseg: 32 – 84)	
≤ 45	20
45-59	45
≥ 60	56
Nepoznato	10
Menopauzalni status	
Premenopauzalni	33
Perimenopauzalni	11
Postmenopauzalni	77
Nepoznato	10
Histološki tip	
IDC (Invazivni duktalni karcinom)	57
ILC (Invazivni lobularni karcinom)	44
IDC+ILC	5
Nepoznato	25
Veličina tumora	
pT1 (≤ 20mm)	40
pT2 (20-50mm)	73
pT3 (≥ 50mm)	4
Nepoznato	14
Nodalni status	
pN0 (bez metastaze na limfnim čvorovima)	42
pN1 (1 – 3 pozitivnih limfnih čvorova)	37
pN2 (≥ 4 pozitivnih limfnih čvorova)	25
Nepoznato	27
ER status (LBA*)	
ER-negativni (ER $\alpha$ < 10 fmol/mg ukupnih proteina)	45
ER-pozitivni (ER $\alpha$ ≥ 10 fmol/mg ukupnih proteina)	76
Nepoznato	10
PR status (LBA)	
PR-negativni (PR < 20 fmol/mg ukupnih proteina)	80
PR-pozitivni (PR ≥ 20 fmol/mg ukupnih proteina)	41
Nepoznato	10

\*Nivoi ER i PR receptora su određivani testom vezivanja liganda (LBA, engl. „Ligand Binding Assay“).

## 3.2. Izolacija DNK i analiza metilacionog indeksa promotora ON gena za ERβ1

Izolacija DNK iz ispitivanih uzoraka i ćelijskih linija obavljena je klasičnom metodom fenolske ekstrakcije.

### 3.2.1. Izolacija DNK iz tkivnog homogenata

Smrznuta tkiva su usitnjena na ledu, te je svakom uzorku dodato oko 500 µL digestionog pufera koji je sadržao proteinazu K (Fermentas #EO0491, Litvanija) finalne koncentracije 0,2 mg/mL. Odnos zapremine tkivo/digestioni pufer bio je 1:3. Uzorci su inkubirani na 55°C, preko noći, uz povremeno mućkanje. Sastav digestionog pufera je bio: 2,5 mL 0,5 M EDTA, pH 8,0 (fin. 25 mM); 5,0 mL 1 M NaCl (fin. 100 mM); 1,0 mL 0,5 M TRIS-HCl, pH 8,0 (fin. 10 mM); 2,5 mL 10% SDS, pH 7,2 (fin. 0,5%); 39 mL ddH<sub>2</sub>O.

*Fenolska ekstrakcija* (Frederick M. Ausubel, 1999):

- u svaki uzorak (500 µL) dodata je ista količinu smeše fenol/hloroform/izoamil-alkohol (F/H/I) u odnosu 25:24:1 i mešano je ručno 10 minuta. Centrifugirano je 5 min / 10600g, izdvojena vodena faza nastavkom sa širokim vrhom, i prebačena u novu epruvetu. Ceo postupak je ponovljen još jednom;
- vodenoj fazi je dodata ista zapremina smeše H/I (24:1), mešano je ručno 10 minuta i centrifugirano 5 min / 10600g, a zatim izdvojena vodena faza u novu epruvetu.

*Taloženje i rastvaranje DNK:*

- dodato je pola zapremine 7,5 M amonijum acetata, pH 7,0 i dve zapremine izopropil-alkohola, pa ostavljeno na -20°C da se DNK taloži preko noći;
- centrifugirano je 20 min / 12000g / 4°C, odliven supernatant i dodato pola zapremine hladnog 70% etanola;
- centrifugirano je 5 min / 7500g / 4°C, odliven supernatant i dodato pola zapremine hladnog 100% etanola;
- centrifugirano je 15 min / 12000g / 4°C i odliven supernatant. DNK je osušena na vazduhu 15-30 minuta u sterilnoj komori, a zatim rastvorena u odgovarajućoj zapremini (50-100 µl) ddH<sub>2</sub>O i čuvana do analize na 4°C.

### **3.2.2. Izolacija DNK iz limfocita periferne krvi**

Nakon digestije DNK u digestionom puferu sa proteinazom K, na način koji je opisan, pristupljeno je rastvaranju i precipitaciji DNK.

- Vodenoj fazi je dodata desetina zapremine uzorka u tubi 3 M natrijum acetata, pH 5,2 i dve zapremine hladnog apsolutnog etanola. Epruvete su mućkane do pojave, makroskopski vidljivih končića DNK, koji su zatim namotani na staklenu Pasterovu pipetu zatopljenog i zakrivljenog vrha;
- DNK je isprana uranjanjem u 75% etanol, nakon toga u 100% etanol, a zatim sušena na vazduhu 15 minuta. DNK je rastvorena u 100-200  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O i čuvana na 4°C.

### **3.2.3. Izolacija DNK iz ćelijske linije MDA-231**

Ćelije karcinoma dojke (MDA-231 ćelijske linije) su dobijene u suspenziji, prebačene u odgovarajuće tube, a tube su centrifugirane na 800g, 5 minuta. Odbačen je supernatant, a ćelijski talog je ispran u PBS-u (engl. „Phosphate Buffered Saline“), centrifugiran na 800g, 5 minuta i odbačen je supernatant. Postupak ispiranja u PBS-u i centrifugiranja je ponovljen još dva puta, a ćelijski talog korišćen za izolaciju DNK. Digestija i fenolska ekstrakcija DNK je obavljena na opisani način.

### **3.2.4. Merenje koncentracije izolovane DNK**

Koncentracije rastvora DNK su merene na aparatu BioSpec-nano (Shimadzu, SAD). To je spektrofotometar koji meri koncentraciju DNK u maloj zapremini i automatski određuje koncentraciju. Izmerene koncentracije DNK su bile od 10 do 1000 ng/ $\mu$ L.

### **3.2.5. Metilovanje DNK izolovane iz ćelijske linije MDA-231**

DNK izolovana iz ćelijske linije MDA-231 tretirana je enzimom “CpG Methyltransferase-M.SSSI” (Thermoscientific #EM0821, Litvanija). Ovaj enzim katalizuje metilaciju svih molekula citozina, stoga je ova DNK korišćena kao 100% metilovana kontrola. Reakcija je izvedena po sledećem protokolu: 1  $\mu$ g DNK je rastvoreno u dd H<sub>2</sub>O u zapremini od 10  $\mu$ L. Zatim je napravljena reakciona smeša: 6  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ L 10x M.SSSI

pufera, 0,4 µL 50xSAM, 10 mL rastvora DNK i 1 µL M. SSSI. Sve je pažljivo promešano i posle kratkog centrifugiranja inkubirano na 37°C, 15 minuta. Reakcija je prekinuta inkubacijom na 65°C, 20 minuta.

### 3.2.6. Bisulfitna modifikacija DNK

Osnovni koraci protokola za bisulfitnu modifikaciju DNK su: denaturacija genomske DNK natrijum hidroksidom, tretiranje jednolančane DNK koncentrovanim rastvorom natrijum bisulfita i hidrohina na pH = 5,0, desulfonovanje natrijum hidroksidom, uklanjanje soli, neutralizacija, taloženje i rastvaranje modifikovane DNK u vodi ili odgovarajućem puferu.

U ovom radu bisulfitni tretman je izvođen prema protokolu koji su opisali Herman i saradnici (Herman sa sar., 1996), uz manje izmene u pojedinim koracima.

Postupak:

- a) *Denaturacija dvolančane DNK*: 2 µg DNK u zapremini od 50 µl je denaturisano dodavanjem 3 M NaOH (fin. 0,3 M) i inkubirano 30 minuta na 42°C. Potpuna denaturacija dvolančane DNK je neophodna za kompletnu modifikaciju jer NaHSO<sub>3</sub> može da reaguje samo sa citozinima u jednolančanoj DNK.
- b) *Bisulfitna modifikacija*: Prethodno denaturisanoj DNK je dodato 550 µl sveže pripremljenog rastvora\* : natrijum-metabisulfita (5,2 – 5,69 M HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>), pH 5,0 + 10 mM hidrohinon, nakon čega je sledila inkubacija na 55°C / 18h

\*Rastvori korišćeni za modifikaciju:

0,2 M hidrohinon (1 mL): 0,022 g hidrohina (Sigma H – 9003, SAD) se rastvori u 1 mL ddH<sub>2</sub>O.

NaHSO<sub>3</sub> pH 5,0 (10 mL): 4,94 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Sigma S – 8890, SAD) je rastvoreno u 8 mL ddH<sub>2</sub>O i pH podešen na 5,0 dodavanjem odgovarajuće količine 10 M NaOH. Zatim je bisulfitnom rastvoru dodato 500 µl sveže pripremljenog rastvora hidrohina. Nakon kompletnog rastvaranja Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, zapremina rastvora se podesi na 10 mL dodavanjem odgovarajuće količine ddH<sub>2</sub>O.

- c) *Prečišćavanje modifikovane DNK*: Nakon bisulfitnog tretmana, modifikovana DNK je prečišćena od zaostalih komponenata reakcije u kolonama (Millipore, Amicon Ultra-0,5

mL 30K, cat no UFC503096, Ireland). Stavljeno je po 500  $\mu$ l uzorka u kolone, centrifugirano na 25°C, 500g, 20 minuta. i odbačen je filtrat. Zatim je u kolone dodato po 500  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, centrifugirano na 25°C, 500g, 20 minuta i odbačen je filtrat. Ovo je ponovljeno još dva puta.

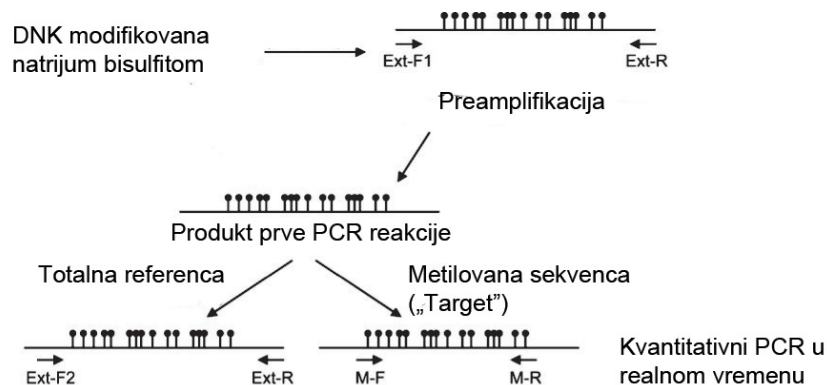
- d) *Desulfonovanje*: Dodato je po 500  $\mu$ L sveže pripremljenog 0,1 M NaOH-a u sve kolone, inkubirano 5 minuta, pa centrifugirano na 25°C, 500g, 20 minuta i odbačen filtrat.
- e) *Ispiranje i rastvaranje DNK*: Stavljeno je po 500  $\mu$ L dd H<sub>2</sub>O i centrifugirano na 25°C, 500g, 20 minuta. Zatim je DNK rastvorena i isprana sa 50  $\mu$ L 1x TE pufera, pH = 8,0, nakon inkubacije od 5 minuta. Postupak ispiranja modifikovane DNK sa kolone je urađen njenim obrtanjem i postavljanjem na novu tubu i sve je centrifugirano na 25°C, 1000g, 3 minuta. Modifikovana DNK je čuvana na -20°C.

### 3.2.7. Metilaciona analiza metodom kvantitativne MS-PCR reakcije

Metilaciona analiza je urađena korišćenjem „MSP MethEvaGreen“ metode, koja je dizajnirana prema metodi opisanoj u radu od Lo i saradnika (Lo sa sar., 2009), tzv. „MethySYBR“ metoda. Sekvenca ER $\beta$  promotora ON (Zhu sa sar., 2004) je dostupna u NCBI bazi podataka i korišćena je za dizajn prajmera. Prajmeri su dizajnirani u programu “Methyl Primer Express® Software Version 1.0”, a njihove sekvence su date u **Tabeli 3**.

Procedura metilacione analize se sastojala iz dva koraka. Prvi korak je bio korak preamplifikacije i predstavljao je PCR reakciju u kojoj su korišćena dva prajmera koja su nezavisna od metilacije: “external forward 1” (ER $\beta$ -Ext-F1) i “external reversible” (ER $\beta$ -Ext-R). Ovi prajmeri su okruživali ciljni region DNK. Svrha ove reakcije je da se poveća količina ciljne sekvence DNK. Drugi korak se sastojao od dve zasebne kvantitativne PCR reakcije, gde je kao matrica korišćen razblaženi produkt prve PCR reakcije. Jedna reakcija je bila „seminested“ kvantitativna PCR reakcija, gde su korišćeni prajmeri nezavisni od metilacije: “ER $\beta$ -EXT-F2” i “ER $\beta$ -EXT-R”. Produkt ove reakcije je predstavljao „totalnu referencu“ (ukupni alel) koja je služila za normalizaciju količine metilovanog alela, koji je detektovan u drugoj reakciji. Druga reakcija je bila „nested“ MSP kvantitativna PCR

reakcija, u kojoj su korišćeni prajmeri specifični za metilaciju: “ERβ-M-F” i “ERβ-M-R” i oni su detektovali ciljnu sekvencu metilovanog alela, **Slika 5**.



**Slika 5. Šematski prikaz MethySYBR metode.** Bisulfitno-modifikovana DNK se koristi kao matrica za MethySYBR metodu. Prajmeri Ext-1 i Ext-R (nezavisni od statusa metilacije) se koriste u prvom koraku preamplifikacije da bi se obogatila specifična DNK sekvencu. U drugom, kvantitativnom PCR koraku, krajnji produkti prve reakcije PCR-a se razblaženi podvrgavaju reakciji kvantitativnog PCR-a. Prvi set prajmera, Ext-F2 i Ext-R (nezavisni od metilacionog statusa) se koriste da se kvantifikuje ukupni unos alela, a drugi set (od metilacije zavisi prajmeri), M-F i M-R se koriste da se kvantifikuju metilovani ciljni aleli. Preuzeto iz (Lo sa sar., 2009).

Prva PCR reakcija preamplifikacije se odvijala u 25 µL PCR reakcione smeše i sadržala 100 ng bisulfitno-modifikovane DNA, eksterni par prajmera (ERβ-Ext-F1 i ERβ Ext-R) gde je finalna koncentracija svakog bila 300 nM, 1x PCR pufer (Herman sa sar., 1996), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 600 nM dNTP, 4% dimetil sulfoksid (DMSO) i 0,65 U Taq DNA Pol (#EP0072, Fermentas, Litvanija). Uslovi pod kojima se odvijala PCR reakcija su bili: inicijalna denaturacija 3 min na 95°C, praćena sa 35 ciklusa amplifikacije (95°C / 45 s, 55°C / 45 s i 72°C /1 min) i finalna ekstenzija 7 min na 72°C. Trake koje potiču od produkta PCR reakcije su proverene na 6% poliakrilamidnom gelu obojenom srebro-nitratom. Produkti su razblaženi 20 x i korišćeni kao matrica za drugu, kvantitativnu PCR reakciju.

Drugi, kvantitativni PCR korak sastojao se od dve zasebne kvantitativne PCR reakcije u odvojenim bunarićima PCR ploče, u 25 µL reakcione smeše. Reakcija

amplifikacije ukupnog alela (nezavisna od statusa metilacije sekvence) sadžala je 250 nM prajmere ER $\beta$ -EXT-F2 i ER $\beta$ -EXT-R, ddH<sub>2</sub>O i ABM 1X EvaGreen qPCR Mastermix-low ROX (ABM, Mastermix-LR, Richmond, CA). Reakcija amplifikacije ciljine metilovane sekvence sadržala je ABM 1X EvaGreen qPCR Mastermix - low ROX, 150 nM prajmere specifične za metilaciju ER $\beta$ -M-F i ER $\beta$ -M-R i 280 nM dNTP-ove. Temperaturni uslovi su bili isti za obe PCR reakcije: jedan ciklus na 95°C, 10 min, praćen sa 30 ciklusa amplifikacije (95°C / 15 s i 60°C / 1 min). Sve reakcije su izvođene na aparatu „7900 Sequence Detection System“ (Applied Biosystems Foster City, CA). Specifičnost prajmera je potvrđena pomoću analize krive topljenja PCR produkta.

Kvantitativne vrednosti su dobijene iz broja ciklusa (Ct vrednost) u kom je porast signala iznad nivoa šuma ("treshold"), udružen sa ulaskom u eksponencijalnu fazu PCR-a, koji detektuje analitički softver aparata. Za izračunavanja je korišćena  $\Delta\Delta C_t$  metoda (Pfaffl, 2001).

Konačan rezultat, izražen je u relativnim jedinicama kao *N-puta razlika u odnosu na kalibrator*, (a normalizovan prema ukupnom alelu) po **Jednakosti 1**:

**Jednakost 1:**  $N_{uzorka} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ , gde je

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ uzorka} - \Delta C_t \text{ kalibratora}$$

$$\Delta C_t \text{ uzorka} = C_t \text{ metilovanog alela} - C_t \text{ ukupnog alela}$$

$$\Delta C_t \text{ kalibratora} = C_t \text{ metilovanog alela} - C_t \text{ ukupnog alela.}$$

Konačan rezultat je pomnožen sa 100, da bi se dobio procenat metilacije svakog uzorka u odnosu na 100% metilovanu kontrolu (metilacioni indeks).

**Tabela 3. Sekvence i pozicije prajmera**

Naziv	Sekvenca	Pozicija (dužina)*
ER $\beta$ -Ext-F1	5'- TTTAGTTGTTGGTTTTTTGGAT -3'	44201 (22)
ER $\beta$ -Ext-F2	5'- GAGAAATAATTGTTTTTTGAAATT -3'	44266 (24)
ER $\beta$ Ext-R	5'- ACCTTACAAATAAACACACC -3'	44501 (20)
ER $\beta$ -M-F	5'-GTAGGGCGAAGAGTAGGC-3'	44291 (18)
ER $\beta$ -M-R	5'- ATTAAAAAAAACGAACGCAC -3'	44398 (20)

\*Pozicije se odnose na NCBI sekvencu NG\_011535.1

### **3.3. Izolacija ukupne RNK i merenje ER $\beta$ 1-iRNK metodom kvantitativnog RT-PCR**

#### **3.3.1. Izolacija ukupne RNK**

Izolacija ukupne RNK obavljena je metodom ekstrakcije kiselim fenolom iz denaturišućeg rastvora guanidin tiocijanata (Chomczynski sa sar., 1987). Tkivo, zamrznuto u tečnom azotu je mehanički sprášeno u porcelanskom avanu. Odmah je dodat denaturišući rastvor guanidin tiocijanata i nakon kratke inkubacije, obavljene su dve ekstrakcije fenol:hloroformom (49:1). Ukupna RNK taložena je pomoću jedne zapremine izopropilalkohola na -20°C preko noći, a zatim rastvorena. Da bi se otklonili tragovi genomske DNK, eventualno zaostale pri izolaciji, deo uzorka koji je korišćen za dalji rad tretiran je DNazom I (Fermentas, Litvanija) 40 min na 37°C. DNaza I je uklonjena fenol:hloroformskom ekstrakcijom. RNK je ponovo taložena izopropanolom na -20°C preko noći, te rastvorena u vodi tretiranoj dietilpirokarbonatom (DEPC-H<sub>2</sub>O). Koncentracija RNK određena je spektrofotometrijski, merenjem absorbance na 260 nm; obavljena su po dva merenja (razblaženja 50x i 25x, u ddH<sub>2</sub>O, pH = 7,0). Za finalnu koncentraciju uzeta je srednja vrednost dva merenja. U slučajevima kada je odstupanje jednog od dva merenja prelazilo 10% od manje izmerene vrednosti, obavljeno je treće merenje u cilju što tačnijeg određivanja koncentracije ukupne RNK. Integritet ovako izolovane RNK proveren je analizom 28S, 18S i 5S traka na denaturišućem agaroznom gelu.

#### **3.3.2. Merenje ER $\beta$ 1-iRNK metodom kvantitativnog RT-PCR**

Kvantifikacija iRNK urađena je u dva koraka. Najpre je sintetisana cDNK iz 1 $\mu$ g ukupne RNK korišćenjem enzima Omniscript Reverzne Transkriptaze (Qiagen, Hilde) uz upotrebu dva amplimera: nasumični heksamer (10  $\mu$ M finalno) i oligo(dT)15 pajmera (0,5  $\mu$ M finalno), 1U RNaznog inhibitora u zapremini od 20  $\mu$ L. Istovremeno korišćenje nasumičnog prajmera i oligo(dT) ima za cilj da „izbalansira“ zastupljenost 5' i 3' krajeva u sintetisanoj cDNK.



PCR reakcije su potom urađene na aparatu “ABI Prism 7900 Sequence Detection System”, u finalnoj zapremini od 25  $\mu$ L koja je sadržala: 1 x TaqMan Universal PCR Master Mix sa AmpErase UNG (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1 x TaqMan Pre-Designed esej specifičan za izoformu ER $\beta$ 1(wt) i cDNK razblaženu 10 puta (odgovara 100 ng RNK prevedeno u cDNK). Temperaturni profil reakcija bio je sledeći: 2 minuta na 50°C, 10 minuta na 95°C, i 40 ciklusa po 15 sekundi na 95°C, 1 minut na 60°C. Svi uzorci su rađeni u triplikatu. Esej specifičan za ER $\beta$ 1(wt) izoformu (esej: ID Hs01100359\_m1) sadrži probu koja je komplementarna spoju 7 i 8b egzona, te tako detektuje samo ovu izoformu koja sadrži egzon 8b. Za detekciju iRNK za  $\beta$ -aktin koji je služio kao endogena kontrola korišćen je esej ID Hs99999903.

Unos ukupne RNK (određene spektrofotometrijskim merenjem) u reakciju reverzne transkripcije, njen kvalitet (manji ili veći stepen degradacije), kao i efikasnost reverzne transkripcije mogu da variraju od uzorka do uzorka. Zbog toga, istovremeno je amplifikovan i gen za  $\beta$ -aktin kao endogena kontrola, te je svaki uzorak normalizovan u odnosu na količinu  $\beta$ -aktina. Relativna ekspresija ciljnih iRNK ER $\beta$ 1(wt) je izražena u odnosu na kalibrator, tj. 1x uzorak. Kao kalibrator, je izabran uzorak koji je bio najmanje ekspimiran u prethodnom eksperimentu i koji je imao najmanju grešku merenja. Konačan rezultat, izražen je u relativnim jedinicama kao N-puta razlika u odnosu na kalibrator, (a normalizovan prema  $\beta$ -aktinu - referentnom genu) po **Jednakosti 2**:

**Jednakost 2:**  $N \text{ uzorka} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , gde je:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ uzorka} - \Delta Ct \text{ kalibratora}$$

$$\Delta Ct \text{ uzorka} = Ct \text{ cilj. trans.} - Ct \beta\text{aktin};$$

$$\Delta Ct \text{ kalibratora} = Ct \text{ cilj. trans.} - Ct \beta\text{aktin}$$

Da bi jednakost mogla da se koristi za kvantifikaciju, ((Pfaffl, 2001); PE Applied Biosystems user bueletin) efikasnost reakcije amplifikacije ciljnih gena i referentnog gena moraju biti približno jednake i bliske jedinici, a razlika nagiba pravih ( $\Delta Ct$  vs koncentracija) da bude manja od 0,1. Za ampikone veličine < 150 bp, koje smo mi koristili ("TaqMan Pre-Designed" esej), efikasnost reakcije je obično blizu jedan. Da bi se utvrdilo

da li dva amplikona imaju sličnu kinetiku reakcije određuje se kako se  $\Delta C_t$  menja sa razblaženjem uzorka. U tu svrhu napravljena su četiri razblaženja cDNK kontrolnog uzorka, te je određena vrednost  $\Delta C_t$  (razlika između srednje vrednosti  $C_t$  ciljnih cDNK i srednje vrednosti  $C_t$  referentnog gena) za svako razblaženje, a zatim su izračunati nagibi prave i razlika nagiba pravih (razblaženje vs  $\Delta C_t$ ) eseja za ciljni i referentni gen.

### **3.4. Izolacija proteina i semikvantitativna analiza ER $\beta$ 1 proteina metodom „Western blot“**

#### **3.4.1. Izolacija proteina iz tkiva tumora**

Zamrznuto tkivo tumora dojke je homogenizovano u puferu za izolaciju proteina (20 mM Tris-HCl, pH = 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10% glicerol; 1% Nonidet-40) pomoću električnog homogenizera (Ultraturex 9000g) i dodat je koktel proteaznih inhibitora (finalna koncentracija: 5  $\mu$ g/mL Leupeptin, 2,5  $\mu$ g/mL Aprotinin, 10 mM NaF, 1 mM PMS-F). Homogenizovano tkivo je inkubirano na ledu 1h. Uzorci su, zatim centrifugirani na +4°C na 16000g 25 minuta, supernatant je odvojen i alikvotiran. Koncentracije proteina su određene modifikovanom metodom po Lowry-ju.

Postupak modifikovane metode po Lowry-ju:

- Napravljen je bakarni reagens od 6,67%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,13% CuSO<sub>4</sub> X 5 H<sub>2</sub>O, 0,17% NaK tartarata i destilovane vode. Od 3 dela bakarnog reagensa sa jednim delom 1% rastvora SDS-a i jednim delom rastvora 1M NaOH je napravljen 2x Lowry koncentrat.
- Pripremljene su tri serije standardnih razblaženja BSA. Osnovni rastvor BSA (20 mg/mL) je razblažen 40 puta do koncentracije 0,5 mg/mL. Zatim su pravljena razblaženja redom: 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 i 0,015625 mg/mL.
- Razblaženim uzorcima 40 x u vodi u zapremini od 400  $\mu$ L, rastvorima BSA iste zapremine, i blank uzorku (400  $\mu$ L pufera za izolaciju proteina ), dodato je po 400  $\mu$ L 2x Lowry koncentrata, odmah je vorteksovano i ostavljeno da se inkubira 10 minuta na sobnoj temperaturi.

- Zatim je dodato po 200  $\mu$ L 0,2 N Folin Ciocalteu reagensa, vorteksovano i inkubirano 30 minuta na sobnoj temperaturi.
- Apsorbance proteina su merene na spektrofotometru u polistirenskim kivetama na talasnoj dužini od 650 nm.
- Svi podaci su ubačeni u program SigmaPlot 10.0, a program na osnovu standardne krive dobijene iz poznatih koncentracija i apsorbanci razblaženja BSA, određuje nepoznate koncentracije proteina.

### 3.4.2. Analiza ER $\beta$ 1 proteina metodom „Western blot“

Izolovani proteini su rastvoreni u Laemmly puferu (Sample Buffer Laemmly) (0,125 M Tris, pH = 6,8; 20% Glicerol; 4% SDS; 0,004% Bromphenol Blue; 10%  $\beta$ -mercaptoethanol) i inkubirani 5 minuta na 95°C. Milliplex™ MCF7 ćelijski lizat (katalog # 47-216), koji je korišćen kao pozitivna kontrola je rastvoren u istom puferu i inkubiran 5 minuta na 95°C. Uzorci su ohlađeni i čuvani na -20°C.

Napravljen je dvokomponentni gel koji se sastojao od donjeg (razdvajajući, engl. „Separating“), koncentracije 10% i gornjeg (koncentrujući, engl. „Stacking“) gela, koncentracije 4%. Receptura je data u **Tabeli 4**.

**Tabela 4. Receptura za pravljenje poliakrilamidnih gelova za elektroforezu**

	Separating gel (10%)	Stacking gel (4%)
PAA štok 30%	6,66 mL	1,3mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8.8	5,0 mL	/
0,5 M Tris-HCl, pH 6.8	/	2,5mL
SDS 10%	200 $\mu$ L	100 $\mu$ L
APS 10%	100 $\mu$ L	50 $\mu$ L
N, N, N', N'-tetrametilendiamin (TEMED)	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
d H <sub>2</sub> O	8,04 mL	6,1 mL

Uzorci proteina su razdvojeni elektroforezom u vertikalnom polju, u kadama sa 1 x puferom za elektroforezu (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicin, 0,1% SDS). U bunariće je nanošeno 50  $\mu$ g svakog uzorka i kalibratora, pozitivna kontrola (MCF7), negativna kontrola (ćelijska linija kancera dojke BT20 u kojima je promotor ON kompletno metilovan) i

marker (Amersham High-Range Rainbow Molecular Weight Marker RPN756E, GE Healthcare). Preforeza je tekla 15 min na 100 V, a zatim je napon povećan na 200 V. Elektroforeza je trajala 60 minuta.

*Transfer proteina:* Nakon elektroforeze izvršen je transfer proteina na Amersham Hybond™ -P PVDF membrane pod uslovima: +4°C, 250 mA, 60 minuta. Efikasnost transfera proteina je proveravana stavljanjem membrana u rastvor Ponceau S boje i TBST pufera u odnosu 1:1. Membrane su nakon toga potopljene u pufer za blokiranje - 5% nemasno mleko u TBST-u (100 mM Tris, pH = 7,8; 0,9% NaCl; 0,05% Tween 20) u trajanju od 60 minuta, na sobnoj temperaturi. Svrha ovog koraka je sprečavanje nespecifičnog vezivanja antitela za membranu. Membrane su zatim inkubirane sa primarnim antitelom „Abcam Estrogen Receptor beta antibody [9.88]“ (ab16813), razblaženim 800 puta u TBST puferu, na +4°C, preko noći, a zatim ispirane u TBST-u 5 minuta. Membrane su inkubirane u rastvoru sekundarnog antitela „Goat anti-mouse, IgG + IgM (H+L)“ vezanim sa alkalnom fosfatazom (Amersham) i razblaženim 10000 puta u TBST-u, na sobnoj temperaturi, 60 minuta. Membrane su ispirane u TBST-u 5 minuta, a zatim inkubirane u ECF supstratu 45 sekundi i postavljene na aparat „Amersham storm 860 Imaging System“, koji služi za vizuelizaciju proteinskih traka.

Membrane su podvrgnute metodi ispiranja. Ispiranje (engl „Stripping“) membrane predstavlja uklanjanje primarnih i sekundarnih antitela sa membrane. Primenjen je sledeći protokol: membrane su ispirane 15 minuta u TBST-u, zatim inkubirane 15 minuta u 0,2 M NaOH, pa opet ispirane u TBST-u 15 minuta.

Posle „stripovanja“, membrane su ponovo blokirane u rastvoru 5% nemasnog mleka u TBST-u 60 minuta, a zatim inkubirane u rastvoru primarnog antitela „GAPDH antibody [6C5] (ab8245)“ u TBST-u u odnosu 1:10000, 60 minuta, na sobnoj temperaturi. Membrane su zatim ispirane u TBST-u i ponovljena je procedura sa rastvorom sekundarnog antitela „Goat anti-mouse, IgG + IgM (H+L)“, vezanim sa alkalnom fosfatazom, razblaženim 10000 puta u TBST-u, na sobnoj temperaturi, 60 minuta. Membrane su opet ispirane u TBST-u 5 minuta, a zatim inkubirane u ECF supstratu 30 sekundi, postavljene na aparat „Amersham storm 860 Imaging System“ i skenirane.

Količina proteina je zatim određena u programu „Image Quant 5.2“ na sledeći način: oko specifične proteinske trake je kreirana zatvorena linija. Program izračunava volumen ispod površine 3D grafikona dobijenog iz intenziteta piksela i mesta piksela u okviru te zatvorene linije. Izračunati volumen predstavlja kvantitet proteina. Relativna količina proteina svakog uzorka je dobijena deljenjem količine proteina svakog uzorka sa količinom proteina kalibratora i GAPDH-a.

Specifičnost trake ER $\beta$ 1 proteinske izoforme potvrđena je metodom imunoprecipitacije na niže opisan način.

U 300  $\mu$ L proteinskog lizata uzorka je dodato po 60  $\mu$ L jednog od antitela specifičnih za ER $\beta$ 1 izoformu, “NCL-ER-beta”, (Leica Biosystems Newcastle Ltd, United Kingdom) i “MCA1974S” (AbD Serotec, Oxford, UK) i antitelom koje detektuje sve izoforme “ab16813”, (Abcam, Cambridge, MA USA). Lizati sa antitelima su inkubirani na +4°C, preko noći. 50  $\mu$ L agaroze “Protein L-Agarose”: sc-2336 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) je dodato u tubu sa Abcam antitelom, a 50  $\mu$ L “Protein A/G PLUS-Agarose”: sc-2003 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) je dodato u ostale dve tube. Tube su inkubirane na 4°C tokom 3h, zatim centrifugirane na +4°C, 5000 rpm, 5 minuta. Supernatant je odbačen, a pelet je ispran 3 puta u PBS-u. Centrifugiranje i ispiranje peleta je ponovljeno još jednom. Nakon ponovnog centrifugiranja, supernatant je odbačen, a 25,5  $\mu$ L 2x Laemmly pufera bez bromfenol plavog je dodato peletu, a pelet je zatim kuvan na 95°C, 5 minuta. Tube su opet centrifugirane na +4°C, 5000 rpm 5 minuta i supernatant (gde su se nalazili proteini) je odvojen u čiste tube. Tube su zatim čuvane na -20°C.

Nakon imunoprecipitacije je urađen Western Blot, pri čemu je svaka membrana sa određenim antitelom, inkubirana u rastvoru tog istog primarnog antitela na način koji je već opisan, zatim sekundarnog antitela, i skenirana na aparatu “Amersham Storm 860 Imaging System“.

#### *Rastvori potrebni za imunoprecipitaciju:*

10x PBS-a: Pomešano je 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> u 800 mL vode. pH je podešen sa koncentrovanom HCl na 7,4, a zatim je doliveno još vode do 1000 mL zapremine.

2 x Laemmly pufer bez bromfenol plavog: Pomešano 6,25 mL 0,5 M Tris-a, pH 6,8; 1 mL 87% glicerola; 0,5 g SDS-a; 2,5 mL  $\beta$ -merkaptetanola sa vodom u zapremini od 25 mL.

### **3.5. Statistička obrada rezultata**

Rezultati su analizirani neparametrijskim statističkim testovima. Stepem povezanosti metilacionog indeksa ER $\beta$  promotora ON sa nivoima ekspresije ER $\beta$ 1-iRNK i ER $\beta$ 1(wt) proteinom, međusobno, kao i sa nivoom ER $\alpha$  i PR proteina, analiziran je Spearman-ovim testom korelacije opsega. Značajnost razlike metilacionih indeksa ER $\beta$  promotora ON i nivoa ekspresije ER $\beta$  (iRNK, protein), u odnosu na kliničko-histopatološke parametre i nivoe ER i PR receptora, analizirana je testom sume opsega (Mann-Withney test) ili Kruskal-Wallis-ovim testom analize varijanse opsega.

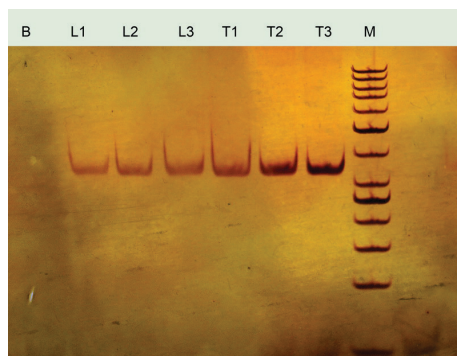
## 4. REZULTATI

U ovoj studiji su korišćeni uzorci tkiva tumora dojke, uzeti iz 131 pacijentkinje. Zbog ograničene veličine tkiva uzoraka, proteini su bili izolovani iz 104 uzorka, iRNK iz 59, a DNK iz 55 uzoraka. Ekspresija ER $\beta$  u uzorcima je određena semikvantitativnim Western Blot-om na proteinskom nivou i pomoću qRT-PCR na nivou iRNK, a metilacioni indeks promotorskog regiona ON je određen pomoću MSP MethEvaGreen testa. Uzorci su na osnovu kliničkih parametara pacijenta i histopatoloških podataka tumora grupisani i analizirani prema statusu receptora za estrogen i progesteron, starosti, menopauzalnom statusu, nodalnom statusu i histološkom tipu tumora.

Status receptora za estrogen (ER $\alpha$ ) definisan je graničnom vrednošću za pozitivnost većom ili jednakom 10 fmol/mg ukupnih proteina. Status PR, definisan je graničnom vrednošću za pozitivnost većom ili jednakom 20 fmol/mg ukupnih proteina.

### 4.1. Analiza metilacionog indeksa promotorskog regiona ON ER $\beta$ gena

Metilacioni indeks promotorskog regiona ON ER $\beta$  gena je određen pomoću prajmera čije su sekvence komplementarne ciljnom regionu u promotoru ON gena za ER $\beta$ . Metilaciona analiza se sastojala iz dva koraka. U prvom koraku je amplifikovan specifični region ON promotora, koji je sadržao 320 bp, korišćenjem prajmera ER $\beta$ -Ext-F1 i ER $\beta$ -Ext-R1. PCR reakcija je verifikovana na 6% poliakrilamidnom gelu (**Slika 6**).

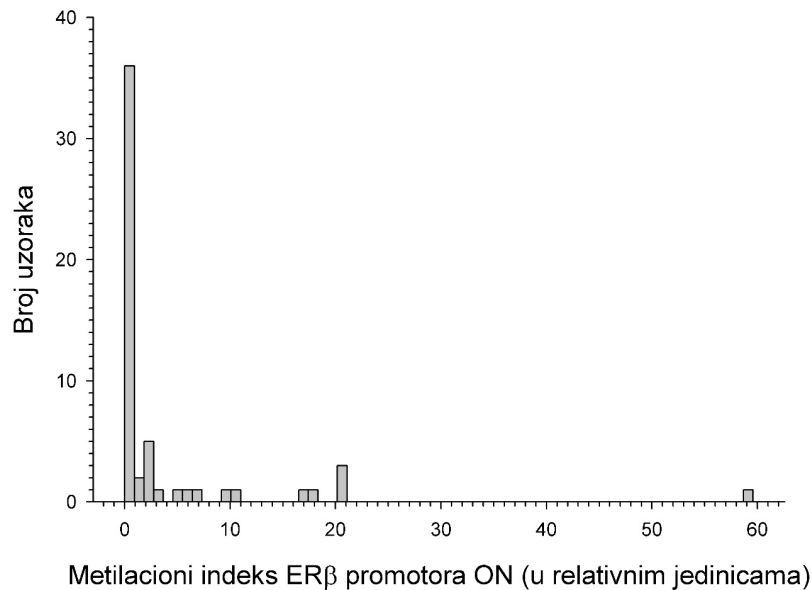


**Slika 6. 6% poliakrilamidni gel sa produktima prve PCR reakcije:** S leva na desno: B - negativna kontrola reakcije (reakcija bez DNK), L1, L2 i L3 - amplifikati iz limfocita (DNK u rastućoj koncentraciji), T1, T2 i T3 - amplifikati iz uzorka tumora (DNK u rastućoj koncentraciji), M-marker 50 bp. Uočava se specifična traka od oko 320 bp.

Drugi korak je činio reamplifikaciju 20 x razblaženog produkta prve reakcije u RealTime PCR reakciji, pri čemu su se odvijale dve reakcije. Jedna od njih je služila za amplifikaciju ukupnog alela pomoću prajmera ER $\beta$ -F2 i ER $\beta$ -R1, a druga za amplifikaciju metilovanog alela, pomoću prajmera ER $\beta$ -MF i ER $\beta$ -MR. Krive amplifikacije ukupnog i metilovanog alela prikazane su u **Prilogu A**.

Specifičnost prajmera je potvrđena analizom krive topljenja (**Prilog B**). Kriva topljenja se određuje nakon završetka PCR reakcije, kada se finalni produkt izlaže postepenom povećanju temperature od 60 do 95°C. Pri tome dolazi do denaturacije dvolančane DNK i disocijacije fluorescentne boje, a to se očitava kao fluorescentni signal u odnosu na temperaturu. Instrument prikazuje promenu fluorescencije u vremenu tokom porasta temperature, pri čemu prisustvo jednog maksimuma ukazuje na visoku specifičnost reakcije, tj. odsustvo nespecifičnih produkata amplifikacije. Metilacioni indeks je izražen kao udeo metilovane sekvence u ukupnoj količini DNK (metilovani i nemetilovani aleli). Vrednosti metilacionog indeksa su u opsegu od 0 to 59,6 (medijana 0.4) i pokazivale su unimodalnu raspodelu (**Slika 7**).



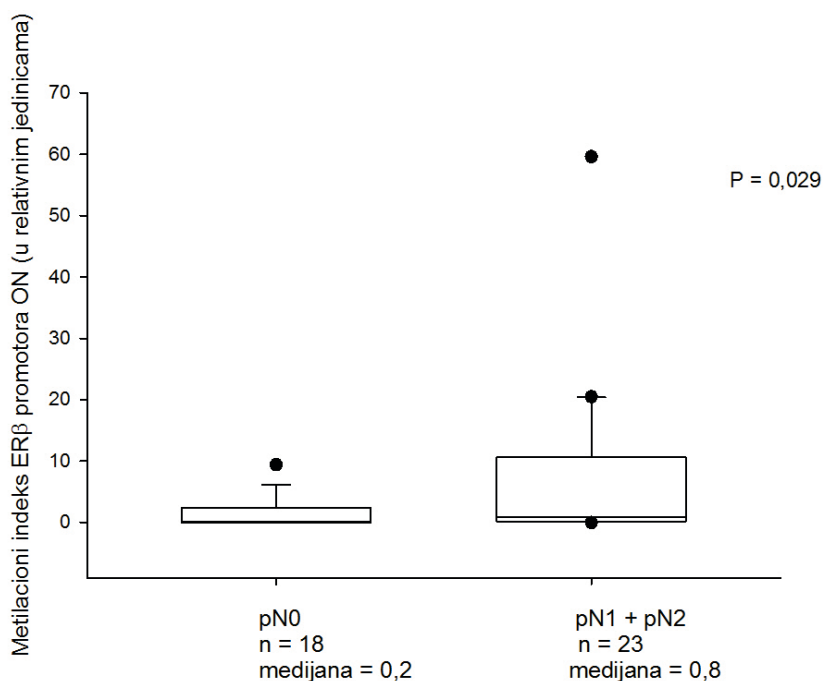


**Slika 7. Histogram raspodele relativnih vrednosti metilacionog indeksa ERβ promotora ON**

Nasuprot očekivanom, nije nađena značajna korelacija metilacionog indeksa ERβ promotora ON sa nivoom izoforme 1 ERβ proteina (ERβ1), određenom metodom Western blot (Spearman-ov test korelacije opsega,  $\rho = 0,080$ ;  $P = 0,572$ ;  $n = 52$ ), niti sa nivoom informacione RNK koja kodira tu izoformu (ERβ1-iRNK) (Spearman-ov test korelacije opsega,  $\rho = -0,130$ ;  $P = 0,522$ ;  $n = 26$ ).

#### **4.1.1. Korelacija metilacionog indeksa promotorskog regiona ON ERβ gena sa kliničkim i patohistološkim parametrima**

Upoređivanjem metilacionog indeksa ERβ ON promotora između grupa bez metastaza (pN0) i sa metastazama (pN1+pN2), utvrđena je značajna razlika (Mann-Whitney test,  $P = 0,029$ , sa medijanama 0,2 i 0,8) (**Slika 8**). Upoređivanjem metilacionih indeksa u grupama pojedinačno (pN0, pN1 i pN2), nije utvrđena značajna razlika (Kruskal-Wallis-ova analiza varijanse između opsega,  $P = 0,277$ ).



**Slika 8. Metilacioni indeks ERβ promotora ON u grupama sa negativnim (N0) i pozitivnim (N1+N2) statusom aksilarnih limfnih čvorova:** Pravougaonici: opseg između vrednosti 25% medijane i 75% medijane sa središnjom linijom koja predstavlja 50 % medijanu; graničnici predstavljaju najveću i najmanju vrednost, a krugovi ekstremne vrednosti; Mann-Whitney test, P = 0,029.

Takođe, nije nađena korelacija metilacionog indeksa promotora ON gena za ERβ sa ostalim kliničkim i patohistološkim parametrima. Metilacioni indeks se ne razlikuje značajno u grupama mlađih i starijih pacijentkinja. Takođe, nema značajne razlike u metilacionim indeksima između grupa premenopauzalnih, perimenopauzalnih i postmenopauzalnih pacijentkinja (Kruskal-Wallis-ova analiza varijanse između opsega, P = 0,266).

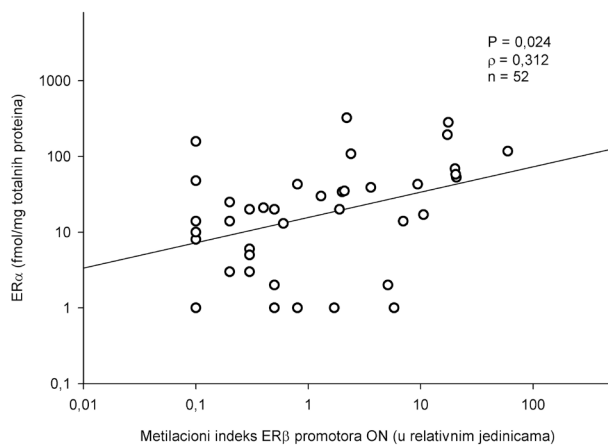
Nema značajne razlike u metilacionom indeksu promotora ON gena za ERβ između IDC i ILC grupa, mada je detektovan trend ka većem metilacionom indeksu u grupi ILC (medijana = 0,3; n = 26) u odnosu na grupu IDC (medijana = 2,2; n = 17) (Mann-Whitney test, P = 0,060). U skladu sa ovim rezultatom je uočen trend ka većim nivoima ERβ1 u

grupi IDC u odnosu na ILC (Mann-Whitney test,  $P = 0,069$ ; medijane = 2,9 i 2,2,  $n = 44$  i 34, respektivno).

Poređenjem metilacionog indeksa promotora ON gena za  $ER\beta$  između grupa malih (T1) i velikih tumora (T2 i T3), nije dobijena značajna razlika (Mann-Whitney test,  $P = 0,977$ ).

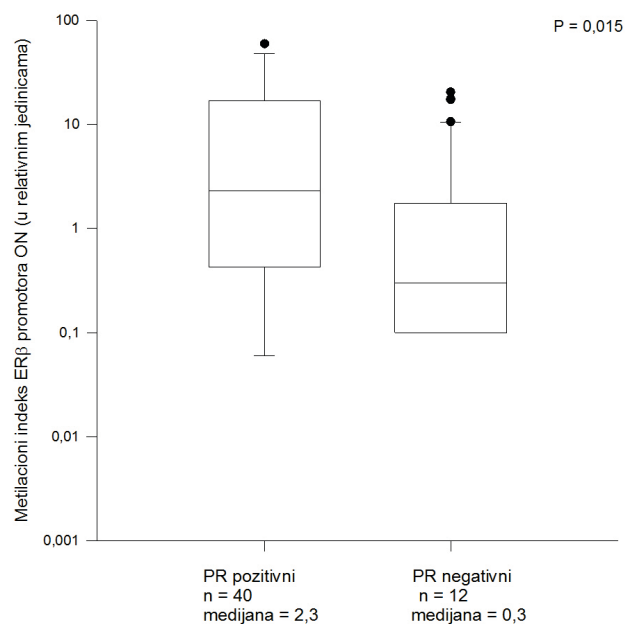
#### 4.1.2. Korelacija metilacionog indeksa promotorskog regiona ON $ER\beta$ gena sa ekspresijom $ER\alpha$ i PR

Nađena je značajna korelacija metilacionog indeksa  $ER\beta$  promotora ON sa nivoima  $ER\alpha$  (Spearman-ov test korelacije opsega,  $\rho = 0,312$ ;  $P = 0,024$ ;  $n = 52$ ), **Slika 9**. Ovaj nalaz potvrđen je i poređenjem metilacionog indeksa u grupama definisanim prema statusu  $ER\alpha$  u tumoru. Utvrđena je značajna razlika u metilacionom indeksu  $ER\beta$  promotora ON između grupa  $ER\alpha$  negativnih ( $ER\alpha^-$ ) i  $ER\alpha$  pozitivnih ( $ER\alpha^+$ ) tumora (Mann-Whitney test,  $P = 0,040$ ), sa većom medijanom indeksa metilacije u  $ER\alpha$  pozitivnim u odnosu na  $ER\alpha$  negativne tumore (medijane su 0,8 i 0,3, respektivno).



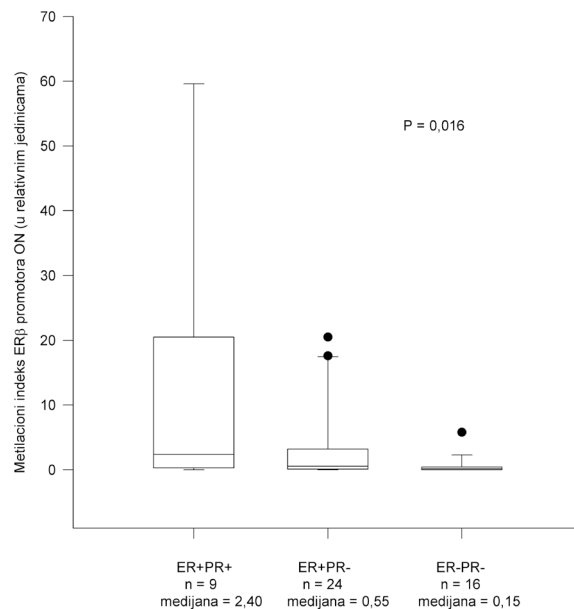
**Slika 9. Korelacija metilacionog indeksa  $ER\beta$  promotora ON i nivoa  $ER\alpha$ .** Metilacioni indeks  $ER\beta$  promotora ON je izražen kao relativni procenat, a nivo  $ER\alpha$  je izražen u fmol/mg totalnih proteina, što je određeno pomoću LBA (Spearman,  $\rho = 0,312$ ;  $P = 0,024$ ;  $n = 52$ ).

Takođe, dobijena je značajna razlika u metilacionom indeksu ER $\beta$  promotora ON između grupa tumora definisanim prema statusu progesteronskog receptora: PR negativnoj (PR-) i PR pozitivnoj (PR+) grupi pacijentkinja, sa većom medijanom indeksa metilacije u PR+ grupi (Mann-Whitney test, P = 0,015; medijane 0,3 i 2,3, n 12 i 40, respektivno). (Slika 10). Metilacioni indeks ER $\beta$  promotora ON ne koreliše sa nivoom PR-a (Spearman-ov test korelacije opsega,  $\rho = 0,242$ ; P = 0,084; n = 52).



**Slika 10. Metilacioni indeks ER $\beta$  promotora ON u PR negativnoj i PR pozitivnoj grupi.** Pravougaonici: opseg između vrednosti 25% medijane i 75% medijane sa središnjom linijom koja predstavlja 50 % medijanu; graničnici predstavljaju najveću i najmanju vrednost, a krugovi ekstremne vrednosti; Mann-Whitney, P = 0,015.

Navedene asocijacije potvrđene su i analizom metilacionog indeksa ER $\beta$  promotora ON u grupama tumora definisanim zajedničkim statusom ER $\alpha$  i PR. Dakle, u grupama tumora definisanim kao ER+/PR+, ER+/PR- i ER-/PR- dobijena je značajna razlika, (Kruskal-Wallis-ova analiza varijanse između opsega, P = 0,016), pri čemu je utvrđeno da statistička značajnost potiče iz razlike metilacionih indeksa ER $\beta$  promotora ON u grupama ER+/PR+ i ER-/PR (P < 0,05), Slika 11.



**Slika 11. Metilacioni indeks ER $\beta$  promotora ON u grupama: ER+PR+, ER+PR- i ER-PR-.** Pravougaonici: opseg između vrednosti 25% medijane i 75% medijane sa središnjom linijom koja predstavlja 50 % medijanu; graničnici predstavljaju najveću i najmanju vrednost, a krugovi ekstremne vrednosti; (Kruskal-Wallis test, P = 0,016).

## 4.2. Analiza ekspresije ER $\beta$ 1-iRNK i korelacije sa kliničkim i patohistološkim parametrima

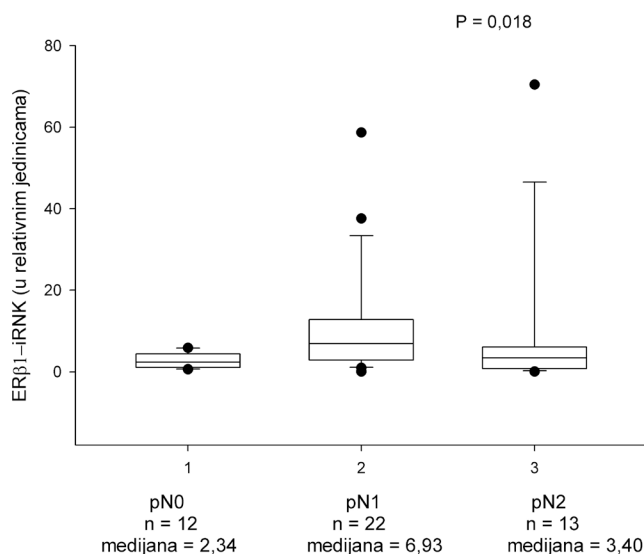
Esej specifičan za ER $\beta$ 1 (wt) izoformu (esej: ID Hs01100359\_m1) sadrži probu koja je komplementarna spoju 7 i 8b egzona, i na taj način detektuje samo izoformu koja sadrži 8b egzon i kodira “wt” protein. U **Prilogu C** prikazani su dijagrami amplifikacije ER $\beta$ 1 izoforme i  $\beta$  aktina. Nije nađena značajna korelacija između nivoa ER $\beta$ 1-iRNK i ER $\beta$ 1 proteina (Spearman-ov test korelacije opsega,  $\rho = 0,082$ ; P = 0,624; n = 38). Takođe, nije dobijena značajna korelacija nivoa ER $\beta$ 1-iRNK i metilacionog indeksa ON promotora (Spearman-ov test korelacije opsega,  $\rho = -0,130$ ; P = 0,522; n = 26).

Vrednosti ER $\beta$ 1-iRNK ne razlikuju se među grupama definisanim statusom ER $\alpha$  (Spearman-ov test korelacije opsega,  $\rho = 0,166$ ; P = 0,208; n = 59), statusom PR-a

(Spearman-ov test korelacije opsega,  $\rho = 0,149$ ;  $P = 0,260$ ;  $n = 59$ ), niti u grupama definisanim zajedničkim statusom ER $\alpha$ /PR.

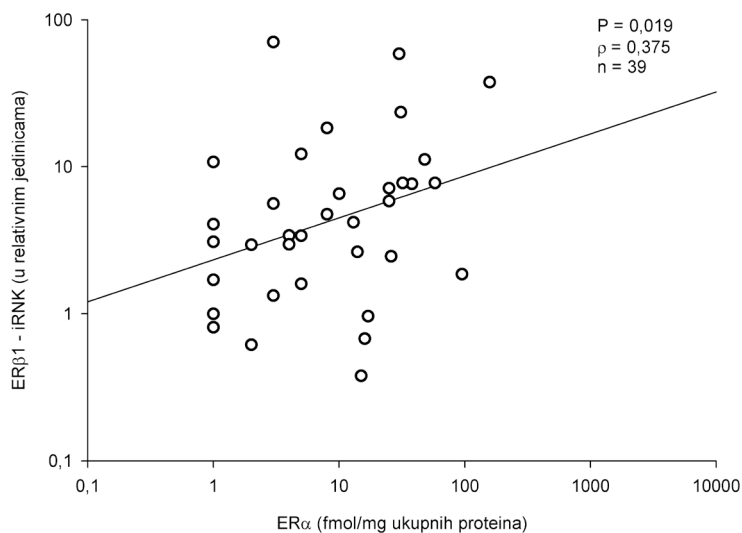
Poređenjem nivoa ER $\beta$ 1-iRNK između grupa pacijentkinja koje su mlađe od 45 godina i onih koje imaju 45 i više godina, utvrđena je značajna razlika (Mann-Whitney test,  $P = 0,021$ ; medijane 7,65 i 3,18;  $n = 11$  i 48, respektivno), sa većom medijanom nivoa iRNK u grupi mlađih od 45 godina. Poređenjem nivoa ER $\beta$ 1-iRNK između premenopauzalnih, perimenopauzalnih i postmenopauzalnih pacijentkinja, nije nađena značajna razlika (Kruskal-Wallis-ova analiza varijanse između opsega,  $P = 0,483$ ).

Poređenjem nivoa ER $\beta$ 1-iRNK između grupa ILC i IDC, nije pronađena značajna razlika (Mann-Whitney test,  $P = 0,991$ ). Utvrđena je značajna razlika u nivoima ER $\beta$ 1-iRNK među grupama pN0, pN1 i pN2 (Kruskal-Wallis-ova analiza varijanse između opsega,  $P = 0,018$ ), koja potiče od razlike nivoa ER $\beta$ 1-iRNK između grupa N0 i N1 (Dunn-ov metod,  $P < 0,05$ ), **Slika 12**.



**Slika 12. Razlika između nivoa ER $\beta$ 1-iRNK u grupama pN0, pN1 i pN2.** ER $\beta$ 1-iRNK nivoi su izraženi kao arbitrarne jedinice u odnosu na endogenu referentnu RNK i kalibrisani u odnosu na 1x uzorak. Pravougaonici: opseg između vrednosti 25% medijane i 75% medijane sa središnjom linijom koja predstavlja 50 % medijanu, graničnici predstavljaju najveću i najmanju vrednost, a krugovi ekstremne vrednosti; (Kruskal-Wallis test,  $P = 0,018$ ).

Nema značajne razlike u nivoima ER $\beta$ 1-iRNK između grupa malih i velikih tumora (Mann-Whitney test,  $P = 0,133$ ). Takođe nema značajne razlike u nivoima ER $\beta$ 1-iRNK između grupa ER $\alpha$ - i ER $\alpha$ + pacijentkinja (Mann-Whitney test,  $P = 0,400$ ), niti među grupama PR- i PR+ pacijentkinja (Mann-Whitney test,  $P = 0,743$ ). Međutim, u grupi PR negativnih pacijentkinja je utvrđena značajna pozitivna korelacija nivoa ER $\beta$ 1-iRNK i ER $\alpha$  (Spearman-ov test korelacije opsega,  $\rho = 0,375$ ;  $P = 0,019$ ;  $n = 39$ ) (Slika 13).

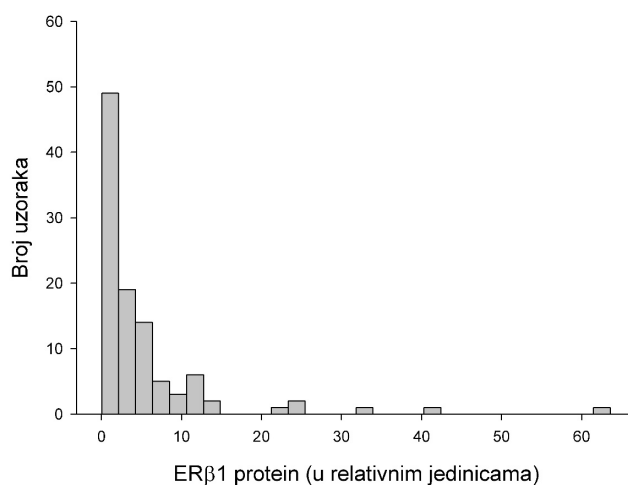


**Slika 13. Korelacija nivoa ekspresije ER $\beta$ 1-iRNK i proteina ER $\alpha$  u grupi PR negativnih pacijentkinja.** ER $\beta$ 1-iRNK nivoi su izraženi kao arbitrarne jedinice u odnosu na endogenu referentnu RNK i kalibrisani u odnosu na 1x uzorak. Nivo ER $\alpha$  je izražen u fmol/mg ukupnih proteina, što je određeno pomoću LBA.

Između grupa definisanih statusom receptora, ER $\alpha$ + PR+, ER $\alpha$ + PR – i ER $\alpha$  –PR – nije nađena značajna razlika nivoa ER $\beta$ 1-iRNK (Kruskal-Wallis-ova analiza varijanse između opsega,  $P = 0,368$ ).

### 4.3. Analiza ekspresije ER $\beta$ 1 proteina

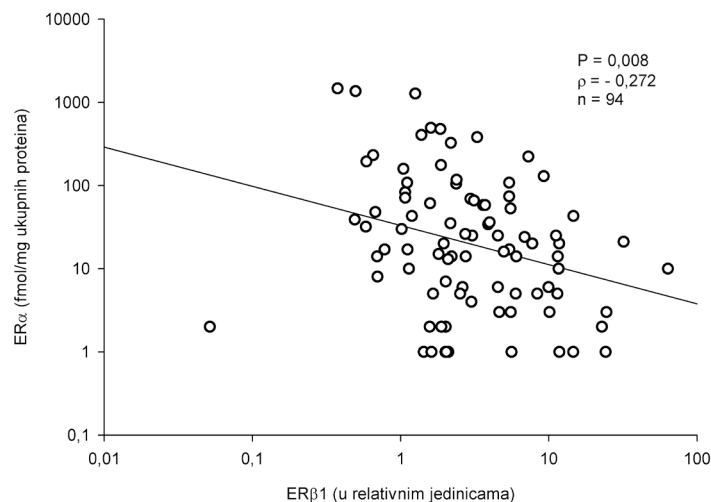
Western Blot analizom je pomoću Abcam antitela [9.88] detektovana traka na MW~52 kDa koja odgovara ER $\beta$ 1 izoformi (**Prilog D**, d)), što je potvrđeno korišćenjem dva specifična antitela za ER $\beta$ 1 wt izoformu (**Prilog D**, b) i c)). Detektovane su takođe i trake koje odgovaraju manjim molekulskim težinama, koje verovatno potiču od izoformi ER $\beta$  proteina nastalim od iRNK bez pojedinih kodirajućih egzona (Poola sa sar., 2002). Za trake većih molekulskih težina se pretpostavlja da potiču od kompleksa ER $\beta$  i drugih proteina. Relativne količine ER $\beta$ 1 proteina koje su dobijene iz 104 uzorka su u opsegu od 0,05 to 63,59 (mediana 2,37), i pokazuju unimodalnu raspodelu (**Slika 14**).



**Slika 14. Histogram raspodele relativnih vrednosti proteina ER $\beta$ 1 u ispitivanoj grupi**

Nije utvrđena korelacija nivoa ER $\beta$ 1 proteina i metilacionog indeksa ER $\beta$  promotora ON (Spearman-ov test korelacije opsega,  $\rho = 0,080$ ;  $P = 0,572$ ;  $n = 52$ ), ali je dobijena značajna negativna korelacija ER $\beta$ 1 proteina sa statusom ER $\alpha$  (Spearman-ov test korelacije opsega,  $\rho = -0,272$ ;  $P = 0,008$ ;  $n = 94$ ), **Slika 15**.



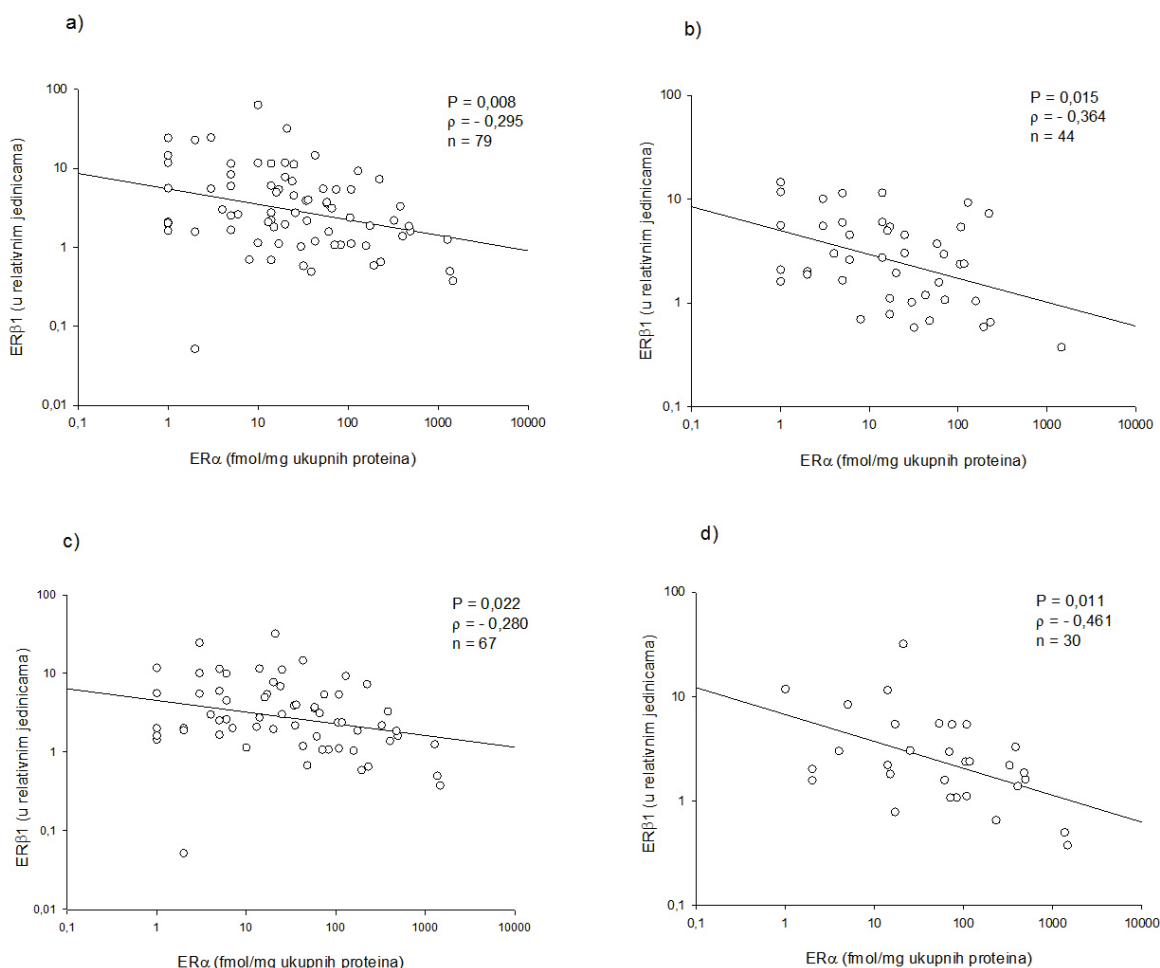


**Slika 15. Korelacija nivoa proteina ERβ1 sa ERα.** Na grafiku je prikazana korelacija ERβ1 i ERα proteina. Prikazane su relativne vrednosti nivoa proteina ERβ1 dobijene Western Blot metodom. Vrednosti su normalizovane u odnosu na nivo GAPDH proteina i izražene u relativnim jedinicama u odnosu na 1x uzorak. Vrednosti ERα su izražene u fmol/mg ukupnih proteina, što je određeno pomoću LBA metode (Spearman,  $\rho = -0,272$ ;  $P = 0,008$ ;  $n = 94$ ).

#### 4.3.1 Analiza korelacije kliničkih i patohistoloških parametara i ekspresije ERβ1 proteina

Značajna negativna korelacija relativnih vrednosti nivoa ERβ1 i ERα pokazana je u sledećim ispitivanim grupama:

- 1) U grupi pacijentkinja starih 45 i više godina (Spearman-ov test korelacije opsega,  $\rho = -0,295$ ;  $P = 0,008$ ;  $n = 79$ ), Slika 16a.
- 2) U grupi pacijentkinja sa metastazama (N1+N2) (Spearman-ov test korelacije opsega,  $\rho = -0,364$ ;  $P = 0,015$ ;  $n = 44$ ), Slika 16b,
- 3) U grupi pacijentkinja sa velikim tumorima (Spearman-ov test korelacije opsega,  $\rho = -0,280$ ;  $P = 0,022$ ;  $n = 67$ ), Slika 16c
- 4) U grupi PR pozitivnih pacijentkinja (Spearman-ov test korelacije opsega,  $\rho = -0,461$ ;  $P = 0,011$ ;  $n = 30$ ), Slika 16d.

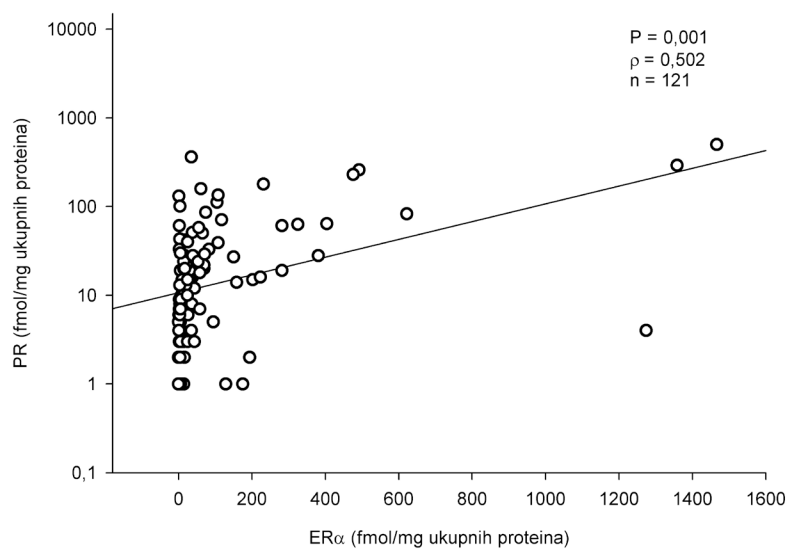


**Slika 16. Korelacija nivoa proteina ERβ1 sa ERα u grupama: a) pacijentkinja koje imaju 45 i više godina; b) sa pozitivnim nodalnim statusom (pN1+pN2); c) sa velikim tumorima (pT2+pT3); d) PR pozitivna grupa pacijentkinja.** Na grafiku vrednosti nivoa proteina ERβ1, dobijene Western Blot metodom, su izražene u relativnim jedinicama u odnosu na 1x uzorak i normalizovane u odnosu na nivo GAPDH-a. Nivo ERα je izražen u fmol/mg ukupnih proteina, što je određeno pomoću LBA metode.

Kada su analizirane samo vrednosti ERβ1 proteina nije utvrđena korelacija sa godinama, prisustvom metastaza, veličinom tumora niti sa nivoima ERα i PR.

Nije dobijena značajna razlika između nivoa ERβ1 u grupama IDC i ILC, mada postoji trend ka većim nivoima ERβ1 u grupi IDC (Mann-Whitney test,  $P = 0,069$ , medijane = 2,9 i 2,2,  $n = 44$  i 34 respektivno). Utvrđena je visoko značajna jaka pozitivna

korelacija nivoa proteina ER $\alpha$  i PR, **Slika 17** (Spearman-ov test korelacije opsega,  $\rho = 0,502$ ;  $P = 0,001$ ;  $n = 121$ ).



**Slika 17. Korelacija nivoa proteina ER $\alpha$  sa PR.** Na grafiku su prikazane vrednosti ER $\alpha$  i PR izražene u fmol/mg ukupnih proteina i određene LBA metodom

## 5. DISKUSIJA

Ekspresioni status receptora za estrogen ( $ER\alpha$ ) predstavlja klasičan i jedan od najvažnijih prognostičkih i prediktivnih markera kod bolesnica obolelih od kancera dojke (Esteva sa sar., 2004). Otkriće drugog, visoko homologog, receptora označenog kao  $ER\beta$  i kodiranog drugim genom, nametnulo je pitanje o njegovom značaju u normalnim i patološkim procesima. Oba receptora eksprimiraju se u vidu brojnih izoformi koje nastaju korišćenjem alternativnih promotora ( $ER\alpha$ ), alternativnih osmihih eksona ( $ER\beta$ ) ili delecijom kodirajućih eksona iz primarnog transkripta ( $ER\alpha$  i  $ER\beta$ ). Za većinu izoformi je pokazano da imaju različitu ulogu u signalnom putu estrogena, ali su najčešće modulatori aktivnosti osnovne, najčešće (engl. „wild type“) izoforme. Stoga se može zaključiti da je estrogenski receptor zapravo skup izoformi čiji je kvalitativni i kvantitativni profil specifičan za tkivo i ćeliju. Sa aspekta prenosa signala hormona nametnulo se važno pitanje o značaju  $ER\beta$  u nastanku i progresiji tumora dojke.

Za razliku od statusa ekspresije  $ER\alpha$ , ni posle više od decenije nakon otkrića drugog receptora za estrogen,  $ER\beta$ , nije utvrđen njegov prognostički i prediktivni značaj u pacijentkinja sa kancerom dojke. Uz pet različitih izoformi ( $ER\beta 1$  do  $ER\beta 5$ ), od kojih se četiri eksprimiraju u zdravom i malignom tkivu dojke (za izoformu  $ER\beta 3$  nije potvrđeno da se ekspirira u dojci), pretpostavljeno je i postojanje varijantnih proteina koji potiču od iRNK bez jednog ili više unutrašnjih kodirajućih eksona. Do sada nije sa sigurnošću potvrđeno postojanje i značaj ovih varijantnih proteina u tkivima.

Dosadašnje studije su pokazale izmenjenu regulaciju ekspresije  $ER\beta$  gena kod kancera dojke, ovarijuma i prostate (Rutherford sa sar., 2000; Nojima sa sar., 2001; Skliris sa sar., 2003). Skliris i saradnici su pokazali da se ekspresija  $ER\beta$  postepeno smanjuje, ali ne gubi, prilikom tranzicije od normalnog tkiva, preko preinvazivnih lezija do invazivnog kancera dojke, dok se ekspresija  $ER\beta$  potpuno gubi u 21% slučajeva (Skliris sa sar., 2003).

Bardin i saradnici su pokazali da  $ER\beta$  može biti ključni regulator u procesu kancerogeneze ovarijuma i da njegov gubitak može biti početni i značajan korak koji vodi ka abnormalnom rastu ćelija. U eksperimentima u kojima su ćelije kancera ovarijuma

transfektovane ER $\beta$ -om, pokazano je da njegovo prisustvo vodi ka povećanoj apoptozi ćelija i smanjenoj proliferaciji i pokretljivosti ćelija kancera (Bardin sa sar., 2004). Kada je ekspresija ER $\beta$  povećana u ćelijama poreklom iz kancera dojke, MCF7, takođe dolazi do inhibicije proliferacije (Paruthiyil sa sar., 2004). Smanjena ekspresija ovog gena vodi ka gubitku njegove inhibitorne uloge na rast i proliferaciju tumorskih ćelija (Skiris sa sar., 2003; Zhao sa sar., 2003). Na osnovu rezultata ovih i drugih studija, zaključeno je da ER $\beta$  gen ima antiproliferativnu ulogu, tj. ulogu supresora tumora (Bardin sa sar., 2004; Hartman sa sar., 2006).

Mnogobrojna istraživanja su pokazala da, pored promena na genetičkom nivou, značajnu ulogu tokom neoplastične transformacije imaju epigenetički mehanizmi. Ovo posebno važi za gene za ER $\alpha$  i ER $\beta$ , u kojima su mutacije povezane sa malignitetima retke i uglavnom nisu povezane sa prognozom. Kod ovih gena dolazi do povećanja ili smanjenja ekspresije što može biti posledica amplifikacije gena (Her2/Neu i delimično ER $\alpha$ ) ili izmenjene metilacije promotora, što je najverovatnije slučaj sa ER $\beta$ .

Mnoge studije su pokazale da povećana metilacija promotorskog regiona ON ER $\beta$  gena utiče na smanjenje ekspresije ER $\beta$  izoformi kod primarnog raka prostate, tkiva kancera dojke, kao i u tumorskim ćelijskim linijama (Zhao sa sar., 2003; Zhu sa sar., 2004). Zhao i saradnici su pokazali da je status metilacije u značajnoj negativnoj korelaciji sa ER $\beta$ -iRNK, a takođe da je ekspresija izoformi ER $\beta$ 1- i ER $\beta$ 2-iRNK u tumorskim ćelijskim linijama značajno niža nego u normalnim epitelijalnim ćelijama dojke (Zhao sa sar., 2003). Izgleda da je promotor ON ER $\beta$  gena glavni regulatorni domen ekspresije ovog gena, jer je različito metilovan u normalnom i tumorskom tkivu (Zhao sa sar., 2003; Rody sa sar., 2005; Zhang sa sar., 2007; Smith sa sar., 2010b).

Zhu i saradnici su u okviru ON promotorskog regiona ER $\beta$  gena identifikovali tri centra metilacije i u okviru njih su uočene najveće promene tokom progresije kancera prostate (Zhu sa sar., 2004). Oni su predložili koncept „rasejavanja metilacije“, pri čemu metilacija počinje kao slučajni proces u nekim CpG mestima, a zatim se odatle širi ka susednim CpG mestima u okviru promotorskog regiona (Zhu sa sar., 2004). Ova tri metilaciona centra se nalaze u konsenzus DNK sekvencama koja su mesta vezivanja transkripcionih faktora, ili cis-regulatornih elemenata. Takođe je pokazano da DNK

metilacija može da deluje na DNK-proteinske interakcije i da utiče na aktivaciju histon-deacetilaza i indukciju kondenzacije hromatina, odnosno inaktivaciju genske ekspresije (Johnson sa sar., 1999; Garinis sa sar., 2002). Iz svega ovoga sledi da ovi centri metilacije mogu biti mesta koja učestvuju u regulaciji transkripcije gena (Zhu sa sar., 2004).

U našoj studiji je ispitivano da li povećana metilacija ON promotora ER $\beta$  gena koreliše sa kliničkim i histopatološkim parametrima (godine, menopauzalni status, veličina tumora, nodalni status i ER $\alpha$  i PR status), kao i sa ekspresijom ER $\beta$  gena - nivoom iRNK i proteina u uzorcima invazivnog tumora dojke. Analiziran je region ON promotora koji obuhvata 13 CpG mesta pomoću specijalno dizajniranog MSP testa, korišćenjem prajmera koji sadrže četiri CpG mesta. Ova četiri mesta su konstantno metilovana u kanceru prostate i nalaze se u takozvanoj „vrućoj tački“ metilacije (Zhu et al. 2004; Zhang et al. 2007). Pošto je test dizajniran da detektuje prisustvo metilacije, kvantitativni rezultat indeksa metilacije specifičnog regiona ON promotora, potiče od broja ćelija u kojima su ova mesta metilovana.

Pokazano je da se indeks metilacije promotora ON, ER $\beta$  gena značajno povećao u grupi pacijentkinja sa metastazama (pN1+pN2) u odnosu na grupu koja nije imala metastaze. Iz toga se može zaključiti da se metilacija promotorskog regiona ON, ER $\beta$  gena povećava sa progresijom tumora. Takođe, može se pretpostaviti da je metilacija jedan od ključnih događaja koji je preduslov za prelazak tumora iz neinvazivnog u invazivni. Zhu i saradnici su pronašli da je ER $\beta$  metilacija CpG ostrva i gubitak receptora najviše izražena u višim stadijumima kancera prostate. Metilacija CpG ostrva je pronađena i u svim ispitivanim metastazama limfnih čvorova (Zhu sa sar., 2004). Međutim, u studiji Zhao-a i saradnika metilacioni status promotorskog regiona ON nije značajno korelisao sa nodalnim statusom (Zhao sa sar., 2003).

Obzirom da je metilacioni indeks bio u korelaciji sa nodalnim statusom pacijentkinja, bilo je očekivano da i relativne vrednosti ER $\beta$ 1 proteina prate ovaj trend. Međutim, u ovoj studiji nije pronađena asocijacija nivoa ER $\beta$ 1 (merenog Western Blot metodom) sa nodalnim statusom, što se delimično može objasniti razlikom u osetljivosti i linearnom dinamičkom opsegu između metode kojom je određivan metilacioni indeks (kvantitativni MSP-PCR) i metode kojim je određivan ER $\beta$ 1 protein (Western blot).

Koristeći metodu Western blot, ni Hopp i saradnici (Hopp sa sar., 2004) nisu potvrdili asocijaciju ER $\beta$ 1 proteina sa nodalnim statusom, dok su studije Jarvinena i saradnika i Sugiura i saradnika pokazale smanjenu ekspresiju ER $\beta$ 1 (određenu metodom IHC) u grupi pacijenata sa pozitivnim nodalnim statusom (Jarvinen sa sar., 2000; Sugiura sa sar., 2007). U nekim studijama gde je ER $\beta$ 1 meren IHC metodom, nije bilo značajne korelacije između nivoa ER $\beta$ 1 i nodalnog statusa (Nakopoulou sa sar., 2004; O'Neill sa sar., 2004). Kontroverzni rezultati analize asocijacije ER $\beta$ 1 i nodalnog statusa mogu se delimično objasniti korišćenjem različitih antitela u različitim studijama, koja obično nisu specifična samo za ER $\beta$ 1 proteinsku izoformu već detektuju i druge izoforme koje su prisutne u značajnim koncentracijama (Poola sa sar., 2005b).

U ovoj studiji je pronađena značajna pozitivna korelacija metilacionog indeksa promotora ON ER $\beta$  gena sa nivoima ER $\alpha$ . Ovaj rezultat je u skladu sa postavljenom teorijom da su tokom razvoja kancera dojke, ekspresija ER $\alpha$  i ER $\beta$  suprotno regulisane, tj. da se ekspresija ER $\alpha$  povećava, a ekspresija ER $\beta$  smanjuje. Povećani indeks metilacije ON promotora u grupi pacijentkinja sa pozitivnim nodalnim statusom, kao i njegova pozitivna korelacija sa statusom i nivoom ER $\alpha$ , ukazuje na to da metilacija promotora ima ulogu u razvoju tumora. To je potvrđeno i u studiji Rody-ja i saradnika gde je pronađeno da je u više od dve trećine uzoraka invazivnih tumora dojke metilacija promotora ON bila povećana, a time smanjena ekspresija iRNK (Rody sa sar., 2005). Ovi autori su pretpostavili da je metilacija promotora ON i smanjena ekspresija iRNK rani događaj u procesu nastanka endokrino zavisnog kancera, što je bilo u skladu sa studijom drugih autora koji su pokazali postepen gubitak ekspresije ukupnog ER $\beta$  u premalignim lezijama dojke (Roger sa sar., 2001). Slično tome, neke studije su pokazale da metilacija promotora utiče na smanjenje ekspresije ER $\beta$ 1, ne samo u tkivu kancera, nego i u premalignim stupnjevima (Zhu sa sar., 2004).

U skladu sa pozitivnom korelacijom metilacije ON promotora ER $\beta$  gena i nivoa ER $\alpha$ , u našem radu je pokazana značajna negativna korelacija ER $\beta$ 1 proteinskog nivoa i ER $\alpha$  statusa u celoj ispitivanoj grupi. Ova negativna korelacija između ER $\beta$ 1 i ER $\alpha$  je povezana sa a) pozitivnim nodalnim statusom (pN1+pN2); b) veličinom tumora (pT2+pT3); c) PR pozitivnošću i d) godinama pacijentkinja. Sve ovo ukazuje na to da

povećanje odnosa ER $\alpha$ /ER $\beta$ 1 utiče na pogoršanje toka bolesti. Povećanje ER $\alpha$ /ER $\beta$ 1 odnosa u grupi pacijentkinja sa pozitivnim nodalnim statusom takođe ukazuje na to da ER $\beta$ 1 ima ulogu u invazivnosti tumora, a njegovo smanjenje u većim tumorima na to da je ER $\beta$ 1 bitan u supresiji kapaciteta ćelija tumora za proliferaciju.

U skladu sa nalazima ove studije i drugi autori su pronašli da se u tumorigenezi ER $\alpha$  nivo povećava, a nivo ER $\beta$ 1 smanjuje (Roger sa sar., 2001; Gustafsson, 2003). ER $\beta$  i ER $\alpha$  formiraju funkcionalne heterodimere u raznim tkivima. Kada su koeksprimirani, ER $\beta$  deluje inhibitorno na estrogenom stimulisano ER $\alpha$  posredovanu gensku ekspresiju (Gustafsson, 2003). Međutim, neki autori su našli pozitivnu korelaciju ER $\beta$  sa ER $\alpha$  (determinisani IHC metodom) (Omoto sa sar., 2002; Bozkurt sa sar., 2012), dok drugi nisu uopšte našli korelaciju (Hopp sa sar., 2004; O'Neill sa sar., 2004). Uzroci kontroverznih nalaza korelacije statusa ER $\beta$  i ER $\alpha$  određenih IHC metodom mogu biti posledica: i) korišćenja različitih antitela i različite obrade tkiva; ii) nedostatka jedinstvenog sistema kvantifikacije, tj različito postavljenih graničnih vrednosti za pozitivnost ER $\alpha$  i ER $\beta$ . Međutim ključni uzrok je nedostatak antitela koja su specifična za svaku izoformu ER $\beta$  (ER $\beta$ 1-5). Mnogi autori su prepoznali potrebu za kvantifikacijom svake pojedinačne ER $\beta$  izoforme, kao i egzon-deletiranih varijanti u kliničkim uzorcima. Trenutno najpouzdaniji način da se kvantitativno detektuju izoforme su studije koje se vrše na nivou iRNK (Poola sa sar., 2002; Poola sa sar., 2005b; Park sa sar., 2006; Mandusic sa sar., 2012) metodom kvantitativnog PCR. Tek u novijim studijama (objavljenim nakon pojave komercijalno dostupnih antitela specifičnih za izoforme ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 2, ER $\beta$ 4 and ER $\beta$ 5) je pokazano da izoforme ER $\beta$  receptora mogu biti različito eksprimirane u tumorima (Honma sa sar., 2008; Shaaban sa sar., 2008).

U našoj studiji nije pronađena značajna korelacija metilacionog indeksa ER $\beta$  promotora ON sa nivoima ER $\beta$ 1 proteina i iRNK, što se može pripisati razlici u osetljivosti i linearnom dinamičkom opsegu korišćenih metoda. Indirektno, izostanak korelacije ukazuje na neophodnost kvantifikacije i analiziranja svake izoforme ponaosob. Nije još utvrđeno da li i u kojoj meri metilacija ON promotora ESR2 gena utiče na nastanak svake izoforme ovog gena (Zhao sa sar., 2003), tj. da li su metilacija promotora i „izbor“ alternativnog osmog, egzona na neki način povezani. Pored toga, nedavno je opisan i drugi



regulatorni lokus koji može uticati na ekspresiju ER $\beta$  u ćelijskim linijama i tumorima dojke (Smith sa sar., 2010a). Takođe, količina iRNK može biti mala, ali može biti visoko funkcionalna i stabilna, tako da ekspresija samog proteina može biti visoka (Balfé sa sar., 2004). Najzad, posttranslacioni mehanizmi, koji se obično ne prate u studijama asocijacije, mogu da utiču na specifičnost i intenzitet detekcije proteina antitelima (Swedenborg sa sar., 2009; Smith sa sar., 2010c). Sa druge strane, Suzuki i saradnici su u karcinomima epitelijalnog tkiva ovarijuma pronašli značajnu korelaciju metilacionog statusa promotora ON i gubitka ekspresije ER $\beta$  (na nivou ER $\beta$  ON iRNK) (Suzuki sa sar., 2008). Konačno, može se pretpostaviti da postoji visoka varijabilnost u zastupljenosti pojedinih izoformi ER $\beta$  i da je ona regulisana mehanizmima nezavisnim od statusa metilacije promotora ON.

U celoj ispitivanoj grupi pacijentkinja, analizirana je korelacija metilacionog indeksa promotora ON gena ESR2 sa nivoima PR-a i nije pronađena značajna korelacija. Međutim u grupi pacijentkinja sa PR pozitivnim statusom metilacioni indeks je bio značajno povećan u odnosu na grupu PR negativnih pacijentkinja. PR je estrogenom regulisan gen, te je za sintezu PR-a u normalnim i ćelijama kancera potreban osim estrogena i ER (Cui sa sar., 2005), tako da je PR status dugo smatran markerom funkcionalnog ER puta (Nakopoulou sa sar., 2004). Takođe, u grupi PR negativnih tumora, prisutna je i negativna korelacija ER $\beta$ 1-iRNK i ER $\alpha$ ., što je u skladu sa gore navedenim.

Metilacioni indeks se smanjuje u grupama definisanim statusom ER $\alpha$  i PR: ER $\alpha$ +/PR+, ER $\alpha$ +/PR- i ER $\alpha$ -PR-. Evidentna je asocijacija između ER $\beta$  i gubitka ekspresije progesterona. Inače, nastanak ER $\alpha$ +PR- fenotipa objašnjava se različitim mehanizmima (Cui sa sar., 2005), a jedno od objašnjenja je visoka ekspresija inhibitornih ER $\beta$  izoformi (Mandusic sa sar., 2012), kao i uzajamno dejstvo između ER $\alpha$  signalnog puta i faktora rasta (Cui sa sar., 2005). Nekoliko studija je pokazalo da visoka aktivnost faktora rasta HER2 u kanceru dojke može biti povezana sa smanjenim nivoom PR-a (Cui sa sar., 2005).

U ovoj studiji nije pronađena značajna korelacija ER $\beta$ 1-iRNK nivoa sa ER $\beta$ 1 proteinskim nivoom, što je u saglasnosti sa nekim drugim studijama (O'Neill sa sar., 2004). Kontradiktorni rezultati studija u kojima se meri ekspresija iRNK, delimično potiču od nedostataka same RT-PCR metode, koja ne uzima u obzir posttranslacione mehanizme, niti

odnos između sinteze i degradacije proteina (Shaw sa sar., 2002; Balfe sa sar., 2004). Sa druge strane, nedovoljna specifičnost antitela (Skliris sa sar., 2001) (koja ne prepoznaju specifične izoforme ER $\beta$  proteina, niti varijantne proteine nastale delecijom jednog ili više exona), kao i niska osetljivost i dinamički opseg metoda zasnovanih na antitelima (pre svega IHC), mogu biti uzrok suprotnih zaključaka u studijama različitih autora.

U ovoj studiji je utvrđena značajna razlika između nivoa ER $\beta$ 1-iRNK u grupama pN0, pN1 i pN2, koja potiče od razlike u nivoima iRNK u grupama N0 i N1. Moguće je dakle da se nivo iRNK različito menja tokom napredovanja bolesti. Ovaj rezultat, iako naizgled nije u skladu sa već predloženom hipotezom da se ekspresija ER $\beta$  smanjuje tokom tumorigeneze i prelaska tumora u invazivno stanje, može se objasniti adaptivnim promenama ćelija tokom razvoja tumora. U studiji Graph-a i saradnika je pokazano da se metilacioni status i ekspresija gena za E-kaderin nekonzistentno menjaju tokom progresije tumora (Graff sa sar., 2000).

U uzorcima tumora pacijentkinja starih 45 i više godina nivoi ER $\beta$ 1-iRNK su niži, pa se može pretpostaviti da je starenje jedan od faktora koji takođe utiču na ekspresiju ER $\beta$ 1 izoforme, verovatno usled smanjenih nivoa estrogena.

Merenje metilacije (kao varijable koja se povećava) metodom kvantitativnog PCR-a može predstavljati pouzdaniji marker smanjene ekspresije ER $\beta$  gena, u poređenju sa merenjem ekspresije iRNK i proteina (kao varijable koja se smanjuje). Stoga se nameće potreba procene značaja metilacionog statusa promotora gena za ER $\beta$  kao markera prognoze i/ili predikcije tumora. Povećana metilacija promotora detektovana je i u cirkulišućoj DNK koja u serumu pacijenata obolelih od kancera potiče od diseminovanih malignih ćelija (Silva sa sar., 1999; Sanchez-Céspedes sa sar., 2000). U serumu pacijentkinja obolelih od tumora dojke, posle mastektomije su pronađene promene u DNK koje su specifične za tumor (Silva sa sar., 2002). Tumorska DNK koja postoji u serumu pacijenata može da ukaže na postojanje tumorskih ćelija koje su se odvojile od primarnog tumora i započinju proces formiranja metastaza na drugim mestima u telu. Čak i kada se glavni izvori tumorskih ćelija otklone (primarni tumor, aksilarni limfni čvorovi), postoji mogućnost da u telu postoje mikrometastaze (Muller sa sar., 2003). Stoga, specifične genetičke promene u DNK, koja se može naći u serumu pacijenata mogu biti marker

nedetektabilnih mikrometastaza. Pored već postojećih klasičnih patohistoloških prognostičkih parametara kao što su nodalni status i veličina tumora, status metilacije promotorskih regiona gena može biti dodatni, lako merljiv i verovatno pouzdaniji prognostički marker, primenljiv i za brzi skrining lako dostupnog uzorka periferne krvi. (Muller sa sar., 2003; Martin Widschwendter sa sar., 2008).

Pošto je povećana metilacija jedan od osnovnih mehanizama utišavanja tumor supresor gena, demetilacija može biti potencijalni cilj u terapiji kancera. U mnogim studijama u kojima je ispitivana metilacija promotora gena za ER $\beta$ , pokazano je da nakon tretmana ćelijskih linija demetilacionim agensom, 5'-AZAC-om, dolazi do ponovne ekspresije ER $\beta$ . Pokazano je da tretman ćelijskih linija 5'-AZAC-om vodi ka demetilaciji promotora ER $\beta$  gena i obnavljanja njegove ekspresije. Demetilacioni agensi zasebno ili u kombinaciji sa inhibitorima histon-deacetilaze (HDAC) se već koriste u terapiji mielodisplastičnih sindroma, leukemije, kancera ovarijuma i prostate, kao što je navedeno u revijalnom radu Kurkjiana i saradnika (Kurkjian sa sar., 2008). In vitro studije takođe pokazuju da DNK demetilacioni agensi, a naročito u kombinaciji sa HDAC inhibitorima indukuju apoptozu, ćelijsku diferencijaciju i/ili prestanak rasta, u ćelijama pluća, dojke, kolona i prostate (Zhu sa sar., 2003; Walton sa sar., 2008). U istraživanjima kancera dojke, ovi agensi su u početnim fazama ispitivanja, zasebno ili u kombinaciji sa endokrinom terapijom, hemioterapijom, ili nekom od novih ciljanih terapija (Huynh sa sar., 2012). U kontekstu kliničke primene trenutno je najveće ograničenje nedostatak demetilacionih agenasa specifičnih za određeni gen ili grupu gena (Swedenborg sa sar., 2009).

Rody i saradnici su predložili da metilacioni status ER $\beta$  može biti marker maligniteta i prognoze bolesti. Oni su pokazali veći stepen metilacije u relapsu tokom studija praćenja, odnosno metilacija je bila u obrnutoj korelaciji sa prognozom, iako nije bila značajna (Rody sa sar., 2005). Dosadašnja saznanja, kao i rezultati prikazani u ovoj studiji, ukazuju na neophodnost utvrđivanja prediktivnog i prognostičkog značaja metilacije svih regulatornih promotora gena za ER $\beta$ . U svetlu činjenice da su epigenetičke promene u mnogim genima povezane sa progresijom malignih bolesti, sledeći korak mogao bi biti razvijanje ciljanih metilacionih i demetilacionih agenasa.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Na osnovu asocijacije metilacionog indeksa promotora ON u genu za ER $\beta$  sa: a) regionalnim metastazama i b) sa nivoom ER $\alpha$  i PR pozitivnošću, može se zaključiti da metilacioni indeks ER $\beta$  promotora ON može biti pokazatelj gubitka funkcionalnosti i aktivnosti produkata ER $\beta$  gena, što dovodi do napredovanja bolesti kod pacijentkinja obolelih od kancera dojke i kao takav, potencijalni target za ciljanu terapiju demetilacionim agensima u budućnosti.
2. Izostanak korelacije statusa metilacije promotora ON u genu za ER $\beta$  i ekspresije izoforme ER $\beta$ 1 (kako na nivou iRNK, tako i na nivou proteina), ukazuje na značaj i ostalih izoformi i varijantnih proteina ER $\beta$  u progresiji bolesti.
3. Iz prethodna dva zaključka sledi da određivanje metilovanja promotora, može biti jednostavniji marker gubitka funkcije gena ER $\beta$ , nego određivanje izoformi i varijantnih proteina ponaosob. Takođe, merenje metilacije (varijabla koja se povećava) metodom kvantitavnog PCR-a može predstavljati pouzdaniji marker smanjene ekspresije ER $\beta$  gena, u poređenju sa merenjem ekspresije različitih iRNK i proteina (varijable koje se smanjuju).
4. Negativna korelacija između nivoa ekspresije ER $\alpha$  i izoforme ER $\beta$ 1 povezana je sa markerima loše prognoze kod kancera dojke a) pozitivnim nodalnim statusom (pN1+pN2) i b) veličinom tumora (pT2+pT3), i potvrđuje dosadašnju pretpostavku da gubitak supresorne uloge ER $\beta$ 1 izoforme na proliferaciju doprinosi rastu tumora i progresiji bolesti.
5. Kvantitativni PCR u realnom vremenu specifičan za metilaciju je superiornija metoda u poređenju sa metodama zasnovanim na antitelima, obzirom na senzitivnost, specifičnost i veliki linearni dinamički opseg.

6. Rezultati dobijeni u ovoj studiji, iako na malom broju uzoraka, u saglasnosti sa drugim studijama, pokazuju da metilacija ER $\beta$  gena može biti koristan marker u prognozi kancera dojke, i to pouzdaniji nego merenje nivoa iRNK ili proteina, osim ako iRNK i proteini nisu analizirani za svaku izoformu ponaosob.

7. U budućim studijama utvrđivanja značaja ekspresije ER $\beta$ , treba uzeti u obzir posttranskripcione i posttranslacione mehanizme.

## 7. LITERATURA

1. Allred DC, Brown P and Medina D. (2004.) The origins of estrogen receptor alpha-positive and estrogen receptor alpha-negative human breast cancer. *Breast Cancer Res.* 6: 240-245.
2. Allred DC, Mohsin SK and Fuqua SA. (2001.) Histological and biological evolution of human premalignant breast disease. *Endocr Relat Cancer.* 8: 47-61.
3. Anderson E. (2002.) The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res.* 4: 197-201.
4. Bai Z and Gust R. (2009.) Breast cancer, estrogen receptor and ligands. *Arch Pharm (Weinheim).* 342: 133-149.
5. Balfe P, McCann A, McGoldrick A, McAllister K, et al. (2004.) Estrogen receptor alpha and beta profiling in human breast cancer. *Eur J Surg Oncol.* 30: 469-474.
6. Bardin A, Hoffmann P, Boulle N, Katsaros D, et al. (2004.) Involvement of estrogen receptor beta in ovarian carcinogenesis. *Cancer Res.* 64: 5861-5869.
7. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, et al. (1998.) Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res.* 72: 141-196.
8. Benecke A, Chambon P and Gronemeyer H. (2000.) Synergy between estrogen receptor alpha activation functions AF1 and AF2 mediated by transcription intermediary factor TIF2. *EMBO Rep.* 1: 151-157.
9. Bird AP. (1986.) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature.* 321: 209-213.
10. Bozkurt KK and Kapucuoglu N. (2012.) Investigation of immunohistochemical ERalpha, ERbeta and ERbetacx expressions in normal and neoplastic breast tissues. *Pathol Res Pract.* 208: 133-139.
11. Brandenberger AW, Tee MK and Jaffe RB. (1998.) Estrogen receptor alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNAs in normal ovary, ovarian serous cystadenocarcinoma and ovarian cancer cell lines: down-regulation of ER-beta in neoplastic tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 83: 1025-1028.
12. Cedar H and Bergman Y. (2008.) Epigenetic silencing during early lineage commitment.
13. Chomczynski P and Sacchi N. (1987.) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162: 156-159.
14. Clarke RB, Howell A, Potten CS and Anderson E. (1997.) Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer Res.* 57: 4987-4991.
15. Cowley SM, Hoare S, Mosselman S and Parker MG. (1997.) Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J Biol Chem.* 272: 19858-19862.
16. Cui X, Schiff R, Arpino G, Osborne CK, et al. (2005.) Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J Clin Oncol.* 23: 7721-7735.

17. Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, et al. (2006.) International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev.* 58: 773-781.
18. Delaunay F, Pettersson K, Tujague M and Gustafsson JA. (2000.) Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors alpha and beta. *Mol Pharmacol.* 58: 584-590.
19. Di Leva G, Gasparini P, Piovan C, Ngankeu A, et al. (2010.) MicroRNA cluster 221-222 and estrogen receptor alpha interactions in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 102: 706-721.
20. Dworkin AM, Huang TH and Toland AE. (2009.) Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. *Semin Cancer Biol.* 19: 165-171.
21. Edge SB and Compton CC. (2010.) The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol.* 17: 1471-1474.
22. Edwards DP. (2005.) Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol.* 67: 335-376.
23. Esteller M. (2002.) CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene.* 21: 5427-5440.
24. Esteva FJ and Hortobagyi GN. (2004.) Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res.* 6: 109-118.
25. Fox EM, Bernaciak TM, Wen J, Weaver AM, et al. (2008a.) Signal transducer and activator of transcription 5b, c-Src, and epidermal growth factor receptor signaling play integral roles in estrogen-stimulated proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Mol Endocrinol.* 22: 1781-1796.
26. Fox EM, Davis RJ and Shupnik MA. (2008b.) ERbeta in breast cancer--onlooker, passive player, or active protector? *Steroids.* 73: 1039-1051.
27. Frederick M, Ausubel RB, Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl. (1999.) Preparation of Genomic DNA from Mammalian Tissue. *Short Protocols in Molecular Biology 4th Edition.* 2: 2-9 - 2-10.
28. Garinis GA, Patrinos GP, Spanakis NE and Menounos PG. (2002.) DNA hypermethylation: when tumour suppressor genes go silent. *Hum Genet.* 111: 115-127.
29. Gotteland M, Desauty G, Delarue JC, Liu L, et al. (1995.) Human estrogen receptor messenger RNA variants in both normal and tumor breast tissues. *Mol Cell Endocrinol.* 112: 1-13.
30. Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB, et al. (2000.) Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J Biol Chem.* 275: 2727-2732.
31. Gustafsson JMaJ-Å. (2003.) Estrogen Signaling: A Subtle Balance Between ERα and ERβ. *Molecular Interventions.* 3: 281-292.
32. Hall JM, Couse JF and Korach KS. (2001.) The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem.* 276: 36869-36872.

33. Han L. (2011.) A new perspective on Estrogen Receptor beta in breast cancer progression. *Cancer Biology & Therapy*. 11: 644-646.
34. Hartman J, Lindberg K, Morani A, Inzunza J, et al. (2006.) Estrogen receptor beta inhibits angiogenesis and growth of T47D breast cancer xenografts. *Cancer Res*. 66: 11207-11213.
35. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, et al. (1996.) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 9821-9826.
36. Herynk MH and Fuqua SA. (2004.) Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr Rev*. 25: 869-898.
37. Hill VK, Ricketts C, Bieche I, Vacher S, et al. (2011.) Genome-wide DNA methylation profiling of CpG islands in breast cancer identifies novel genes associated with tumorigenicity. *Cancer Res*. 71: 2988-2999.
38. Hirata S, Shoda T, Kato J and Hoshi K. (2001.) The multiple untranslated first exons system of the human estrogen receptor beta (ER beta) gene. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 78: 33-40.
39. Hofseth LJ, Raafat AM, Osuch JR, Pathak DR, et al. (1999.) Hormone replacement therapy with estrogen or estrogen plus medroxyprogesterone acetate is associated with increased epithelial proliferation in the normal postmenopausal breast. *J Clin Endocrinol Metab*. 84: 4559-4565.
40. Honma N, Horii R, Iwase T, Saji S, et al. (2008.) Clinical importance of estrogen receptor-beta evaluation in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen therapy. *J Clin Oncol*. 26: 3727-3734.
41. Hopp TA, Weiss HL, Parra IS, Cui Y, et al. (2004.) Low levels of estrogen receptor beta protein predict resistance to tamoxifen therapy in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 10: 7490-7499.
42. Horvath LG, Henshall SM, Lee CS, Head DR, et al. (2001.) Frequent loss of estrogen receptor-beta expression in prostate cancer. *Cancer Res*. 61: 5331-5335.
43. Huynh KT, Chong KK, Greenberg ES and Hoon DS. (2012.) Epigenetics of estrogen receptor-negative primary breast cancer. *Expert Rev Mol Diagn*. 12: 371-382.
44. Inoue S, Ogawa S, Horie K, Hoshino S, et al. (2000.) An estrogen receptor beta isoform that lacks exon 5 has dominant negative activity on both ERalpha and ERbeta. *Biochem Biophys Res Commun*. 279: 814-819.
45. Jakacka M, Ito M, Weiss J, Chien PY, et al. (2001.) Estrogen receptor binding to DNA is not required for its activity through the nonclassical AP1 pathway. *J Biol Chem*. 276: 13615-13621.
46. Jarvinen TA, Pelto-Huikko M, Holli K and Isola J. (2000.) Estrogen receptor beta is coexpressed with ERalpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer. *Am J Pathol*. 156: 29-35.
47. Johnson CA and Turner BM. (1999.) Histone deacetylases: complex transducers of nuclear signals. *Semin Cell Dev Biol*. 10: 179-188.
48. Katzenellenbogen BS, Montano MM, Ekena K, Herman ME, et al. (1997.) William L. McGuire Memorial Lecture. Antiestrogens: mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 44: 23-38.



49. Klinge CM. (2000.) Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids*. 65: 227-251.
50. Koehler KF, Helguero LA, Haldosen LA, Warner M, et al. (2005.) Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocr Rev*. 26: 465-478.
51. Kong EH, Pike AC and Hubbard RE. (2003.) Structure and mechanism of the oestrogen receptor. *Biochem Soc Trans*. 31: 56-59.
52. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, et al. (1997.) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 138: 863-870.
53. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, et al. (1998.) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 139: 4252-4263.
54. Kurkjian C, Kummar S and Murgo AJ. (2008.) DNA methylation: its role in cancer development and therapy. *Curr Probl Cancer*. 32: 187-235.
55. Laron Z, Pauli R., Pertzalan, A. (1989.) Clinical evidence of the role of estrogens in the development of the breast. *Proc R Soc Edinburgh B1*. 95: 13-22.
56. Latil A, Bieche I, Vidaud D, Lidereau R, et al. (2001.) Evaluation of androgen, estrogen (ER alpha and ER beta), and progesterone receptor expression in human prostate cancer by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *Cancer Res*. 61: 1919-1926.
57. Leav I, Lau KM, Adams JY, McNeal JE, et al. (2001.) Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *Am J Pathol*. 159: 79-92.
58. Leung YK, Lee MT, Lam HM, Tarapore P, et al. (2012.) Estrogen receptor-beta and breast cancer: translating biology into clinical practice. *Steroids*. 77: 727-737.
59. Leung YK, Mak P, Hassan S and Ho SM. (2006.) Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103: 13162-13167.
60. Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH and Murphy LC. (1998.) Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Res*. 58: 3197-3201.
61. Li LC, Yeh CC, Nojima D and Dahiya R. (2000.) Cloning and characterization of human estrogen receptor beta promoter. *Biochem Biophys Res Commun*. 275: 682-689.
62. Lo PK, Watanabe H, Cheng PC, Teo WW, et al. (2009.) MethySYBR, a novel quantitative PCR assay for the dual analysis of DNA methylation and CpG methylation density. *J Mol Diagn*. 11: 400-414.
63. Mandusic V, Dimitrijevic B, Nikolic-Vukosavljevic D, Neskovic-Konstantinovic Z, et al. (2012.) Different associations of estrogen receptor beta isoforms, ERbeta1 and ERbeta2, expression levels with tumor size and survival in early- and late-onset breast cancer. *Cancer Lett*. 321: 73-79.
64. Martin Widschwendter, Sophia Apostolidou, Elke Raum, Dietrich Rothenbacher, et al. (2008.) Epigenotyping in Peripheral Blood Cell DNA and Breast Cancer Risk: A Proof of Principle Study. *PLoS ONE*. 3: e2656.

65. McGuire WL. (1975.) Endocrine therapy of breast cancer. *Annu Rev Med.* 26: 353-363.
66. Meeran SM, Ahmed A and Tollefsbol TO. (2010.) Epigenetic targets of bioactive dietary components for cancer prevention and therapy. *Clin Epigenetics.* 1: 101-116.
67. Michaelson-Cohen R, Keshet I, Straussman R, Hecht M, et al. (2011.) Genome-wide de novo methylation in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 21: 269-279.
68. Millis RM. (2011.) Epigenetics and hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 13: 21-28.
69. Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, et al. (1998.) Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun.* 247: 75-78.
70. Muller HM, Widschwendter A, Fiegl H, Ivarsson L, et al. (2003.) DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. *Cancer Res.* 63: 7641-7645.
71. Nakopoulou L, Lazaris AC, Panayotopoulou EG, Giannopoulou I, et al. (2004.) The favourable prognostic value of oestrogen receptor beta immunohistochemical expression in breast cancer. *J Clin Pathol.* 57: 523-528.
72. Nandi S, Guzman RC and Yang J. (1995.) Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 3650-3657.
73. Nass SJ, Herman JG, Gabrielson E, Iversen PW, et al. (2000.) Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5' CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer. *Cancer Res.* 60: 4346-4348.
74. Nilsson S and Gustafsson JA. (2011.) Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. *Clin Pharmacol Ther.* 89: 44-55.
75. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, et al. (2001.) Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 81: 1535-1565.
76. Nojima D, Li LC, Dharia A, Perinchery G, et al. (2001.) CpG hypermethylation of the promoter region inactivates the estrogen receptor-beta gene in patients with prostate carcinoma. *Cancer.* 92: 2076-2083.
77. O'Neill PA, Davies MP, Shaaban AM, Innes H, et al. (2004.) Wild-type oestrogen receptor beta (ERbeta1) mRNA and protein expression in Tamoxifen-treated postmenopausal breast cancers. *Br J Cancer.* 91: 1694-1702.
78. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, et al. (1998.) Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betacx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res.* 26: 3505-3512.
79. Omoto Y, Kobayashi S, Inoue S, Ogawa S, et al. (2002.) Evaluation of oestrogen receptor beta wild-type and variant protein expression, and relationship with clinicopathological factors in breast cancers. *Eur J Cancer.* 38: 380-386.
80. Pace P, Taylor J, Suntharalingam S, Coombes RC, et al. (1997.) Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha. *J Biol Chem.* 272: 25832-25838.
81. Park BW, Kim KS, Heo MK, Yang WI, et al. (2006.) The changes of estrogen receptor-beta variants expression in breast carcinogenesis: Decrease of estrogen

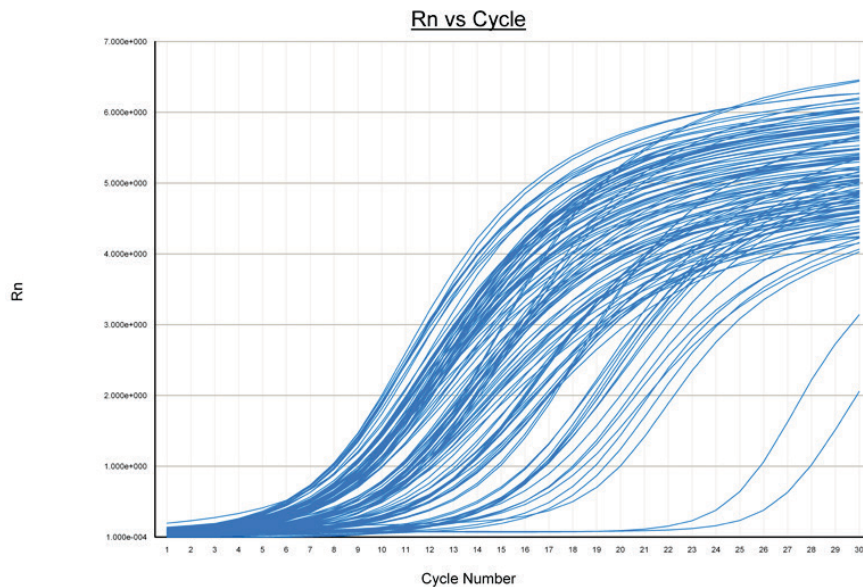
- receptor-beta2 expression is the key event in breast cancer development. *J Surg Oncol.* 93: 504-510.
82. Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, Cunha GR, et al. (2004.) Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res.* 64: 423-428.
  83. Pasquali D, Rossi V, Esposito D, Abbondanza C, et al. (2001.) Loss of estrogen receptor beta expression in malignant human prostate cells in primary cultures and in prostate cancer tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 86: 2051-2055.
  84. Peng B, Lu B, Leygue E and Murphy LC. (2003.) Putative functional characteristics of human estrogen receptor-beta isoforms. *J Mol Endocrinol.* 30: 13-29.
  85. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, et al. (2000.) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 406: 747-752.
  86. Pfaffl MW. (2001.) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: e45.
  87. Poola I, Abraham J, Baldwin K, Saunders A, et al. (2005a.) Estrogen receptors beta4 and beta5 are full length functionally distinct ERbeta isoforms: cloning from human ovary and functional characterization. *Endocrine.* 27: 227-238.
  88. Poola I, Abraham J and Liu A. (2002.) Estrogen receptor beta splice variant mRNAs are differentially altered during breast carcinogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 82: 169-179.
  89. Poola I, Fuqua SA, De Witty RL, Abraham J, et al. (2005b.) Estrogen receptor alpha-negative breast cancer tissues express significant levels of estrogen-independent transcription factors, ERbeta1 and ERbeta5: potential molecular targets for chemoprevention. *Clin Cancer Res.* 11: 7579-7585.
  90. Pratt WB and Toft DO. (1997.) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev.* 18: 306-360.
  91. Preston-Martin S, Pike MC, Ross RK, Jones PA, et al. (1990.) Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res.* 50: 7415-7421.
  92. Pujol P, Rey JM, Nirde P, Roger P, et al. (1998.) Differential expression of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis. *Cancer Res.* 58: 5367-5373.
  93. Rody A, Holtrich U, Solbach C, Kourtis K, et al. (2005.) Methylation of estrogen receptor beta promoter correlates with loss of ER-beta expression in mammary carcinoma and is an early indication marker in premalignant lesions. *Endocr Relat Cancer.* 12: 903-916.
  94. Roger P, Sahla ME, Makela S, Gustafsson JA, et al. (2001.) Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res.* 61: 2537-2541.
  95. Ruff M, Gangloff M, Wurtz JM and Moras D. (2000.) Estrogen receptor transcription and transactivation: Structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors. *Breast Cancer Res.* 2: 353-359.
  96. Rutherford T, Brown WD, Sapi E, Aschkenazi S, et al. (2000.) Absence of estrogen receptor-beta expression in metastatic ovarian cancer. *Obstet Gynecol.* 96: 417-421.

97. Saji S, Omoto Y, Shimizu C, Warner M, et al. (2002.) Expression of estrogen receptor (ER) (beta)cx protein in ER(alpha)-positive breast cancer: specific correlation with progesterone receptor. *Cancer Res.* 62: 4849-4853.
98. Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, Nawroz-Danish H, et al. (2000.) Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res.* 60: 892-895.
99. Sasaki M, Tanaka Y, Perinchery G, Dharia A, et al. (2002.) Methylation and inactivation of estrogen, progesterone, and androgen receptors in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 94: 384-390.
100. Savinov AY, Remacle AG, Golubkov VS, Krajewska M, et al. (2006.) Matrix metalloproteinase 26 proteolysis of the NH2-terminal domain of the estrogen receptor beta correlates with the survival of breast cancer patients. *Cancer Res.* 66: 2716-2724.
101. Shaaban AM, Green AR, Karthik S, Alizadeh Y, et al. (2008.) Nuclear and cytoplasmic expression of ERbeta1, ERbeta2, and ERbeta5 identifies distinct prognostic outcome for breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 14: 5228-5235.
102. Shao W and Brown M. (2004.) Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Res.* 6: 39-52.
103. Shaw JA, Udokang K, Mosquera JM, Chauhan H, et al. (2002.) Oestrogen receptors alpha and beta differ in normal human breast and breast carcinomas. *Journal of Pathology.* 198: 450-457.
104. Shoker BS, Jarvis C, Sibson DR, Walker C, et al. (1999.) Oestrogen receptor expression in the normal and pre-cancerous breast. *Journal of Pathology.* 188: 237-244.
105. Silva JM, Dominguez G, Garcia JM, Gonzalez R, et al. (1999.) Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients: clinicopathological correlations. *Cancer Res.* 59: 3251-3256.
106. Silva JM, Garcia JM, Dominguez G, Silva J, et al. (2002.) Persistence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients after mastectomy. *Ann Surg Oncol.* 9: 71-76.
107. Skliris GP, Carder PJ, Lansdown MR and Speirs V. (2001.) Immunohistochemical detection of ERbeta in breast cancer: towards more detailed receptor profiling? *Br J Cancer.* 84: 1095-1098.
108. Skliris GP, Munot K, Bell SM, Carder PJ, et al. (2003.) Reduced expression of oestrogen receptor beta in invasive breast cancer and its re-expression using DNA methyl transferase inhibitors in a cell line model. *Journal of Pathology.* 201: 213-220.
109. Smith L, Brannan RA, Hanby AM, Shaaban AM, et al. (2010a.) Differential regulation of oestrogen receptor beta isoforms by 5' untranslated regions in cancer. *J Cell Mol Med.* 14: 2172-2184.
110. Smith L, Coleman LJ, Cummings M, Satheesha S, et al. (2010b.) Expression of oestrogen receptor beta isoforms is regulated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Biochem J.* 429: 283-290.
111. Smith L, Speirs V and Hughes TA. (2010c.) Estrogen receptor regulation: don't forget translation. *Breast Cancer Res Treat.* 121: 251-252.

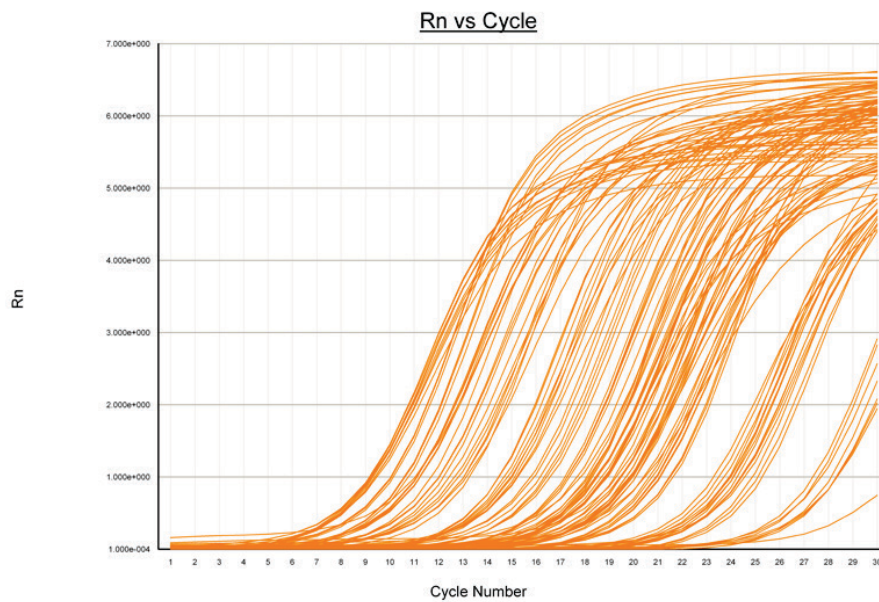
112. Speirs V, Carder PJ, Lane S, Dodwell D, et al. (2004.) Oestrogen receptor beta: what it means for patients with breast cancer. *Lancet Oncol.* 5: 174-181.
113. Stettner M, Kaulfuss S, Burfeind P, Schweyer S, et al. (2007.) The relevance of estrogen receptor-beta expression to the antiproliferative effects observed with histone deacetylase inhibitors and phytoestrogens in prostate cancer treatment. *Mol Cancer Ther.* 6: 2626-2633.
114. Strom A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, et al. (2004.) Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 1566-1571.
115. Sugiura H, Toyama T, Hara Y, Zhang Z, et al. (2007.) Expression of estrogen receptor beta wild-type and its variant ERbetacx/beta2 is correlated with better prognosis in breast cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 37: 820-828.
116. Suzuki F, Akahira J, Miura I, Suzuki T, et al. (2008.) Loss of estrogen receptor beta isoform expression and its correlation with aberrant DNA methylation of the 5'-untranslated region in human epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Science.* 99: 2365-2372.
117. Swedenborg E, Power KA, Cai W, Pongratz I, et al. (2009.) Regulation of estrogen receptor beta activity and implications in health and disease. *Cell Mol Life Sci.* 66: 3873-3894.
118. Tateishi Y, Sonoo R, Sekiya Y, Sunahara N, et al. (2006.) Turning off estrogen receptor beta-mediated transcription requires estrogen-dependent receptor proteolysis. *Mol Cell Biol.* 26: 7966-7976.
119. Thomas C and Gustafsson JA. (2011.) The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer.* 11: 597-608.
120. Tong D, Schuster E, Seifert M, Czerwenka K, et al. (2002.) Expression of estrogen receptor beta isoforms in human breast cancer tissues and cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* 71: 249-255.
121. Tzukerman MT, Esty A, Santiso-Mere D, Danielian P, et al. (1994.) Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol.* 8: 21-30.
122. Veeck J and Esteller M. (2010.) Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 15: 5-17.
123. Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orecchia R, et al. (2005.) Breast cancer. *Lancet.* 365: 1727-1741.
124. Vo AT and Millis RM. (2012.) Epigenetics and breast cancers. *Obstet Gynecol Int.* 2012: 602720.
125. Walton TJ, Li G, Seth R, McArdle SE, et al. (2008.) DNA demethylation and histone deacetylation inhibition co-operate to re-express estrogen receptor beta and induce apoptosis in prostate cancer cell-lines. *Prostate.* 68: 210-222.
126. Warner M and Gustafsson JA. (2010.) The role of estrogen receptor beta (ERbeta) in malignant diseases--a new potential target for antiproliferative drugs in prevention and treatment of cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 396: 63-66.

127. Yue W, Yager JD, Wang JP, Jupe ER, et al. (2013.) Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. *Steroids*. 78: 161-170.
128. Zhang X, Leung YK and Ho SM. (2007.) AP-2 regulates the transcription of estrogen receptor (ER)-beta by acting through a methylation hotspot of the ON promoter in prostate cancer cells. *Oncogene*. 26: 7346-7354.
129. Zhao C, Dahlman-Wright K and Gustafsson JA. (2010.) Estrogen signaling via estrogen receptor {beta}. *J Biol Chem*. 285: 39575-39579.
130. Zhao C, Lam EW, Sunter A, Enmark E, et al. (2003.) Expression of estrogen receptor beta isoforms in normal breast epithelial cells and breast cancer: regulation by methylation. *Oncogene*. 22: 7600-7606.
131. Zhu WG and Otterson GA. (2003.) The interaction of histone deacetylase inhibitors and DNA methyltransferase inhibitors in the treatment of human cancer cells abs *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 3: 187-199.
132. Zhu X, Leav I, Leung YK, Wu M, et al. (2004.) Dynamic regulation of estrogen receptor-beta expression by DNA methylation during prostate cancer development and metastasis. *Am J Pathol*. 164: 2003-2012.

## **Prilozi**



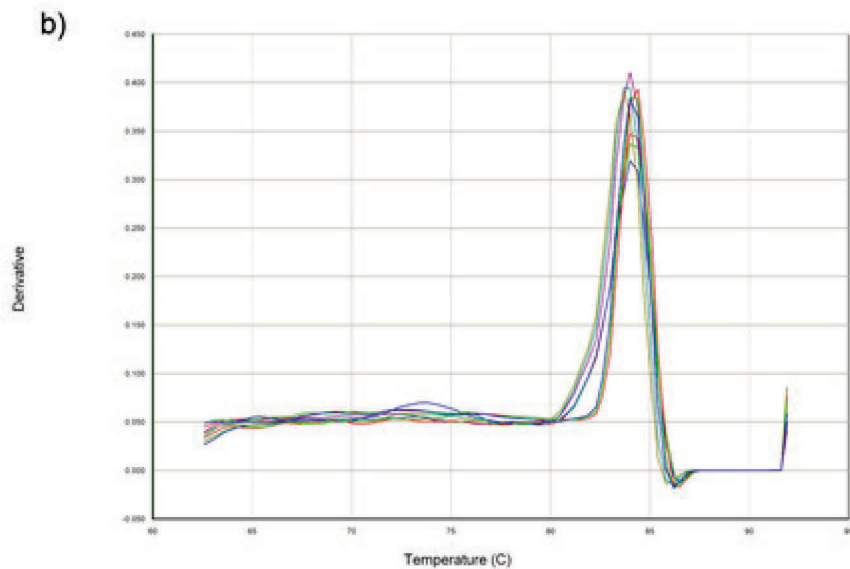
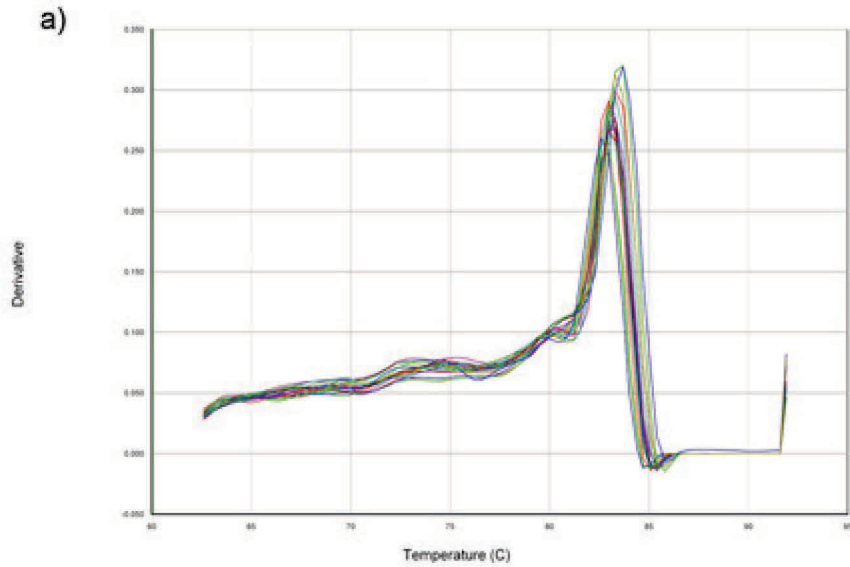
Selected Detector: AnaRef  
Document: Analiza1 (ddCt Study)



Selected Detector: AnaM  
Document: Analiza1 (ddCt Study)

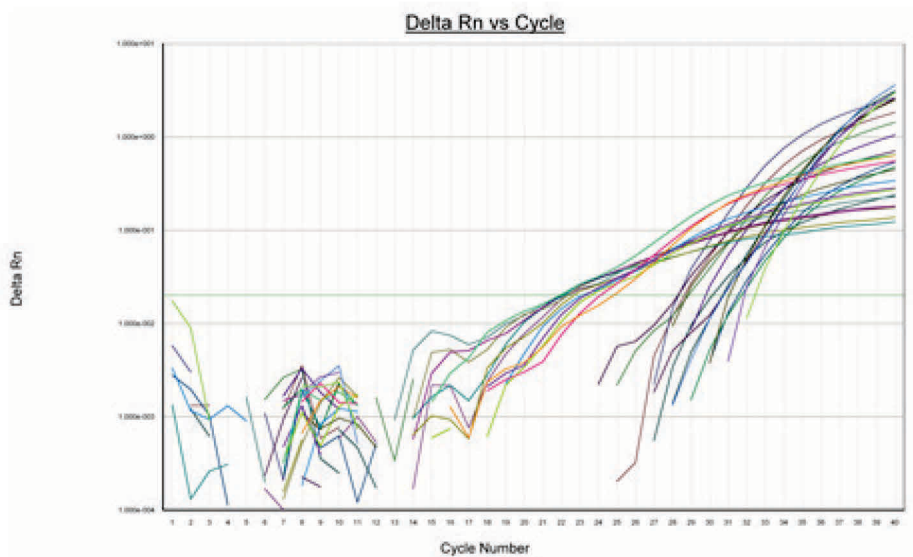
**Prilog A. Krive amplifikacije DNK**, dobijene na aparatu „7900 Sequence Detection System“ (Applied Biosystems Foster City, CA). Količina DNK je prikazana kao  $\log_{10}$  koncentracije (Rn) u odnosu na broj ciklusa amplifikacije. Gore: ukupni alel; Dole: metilovani alel.



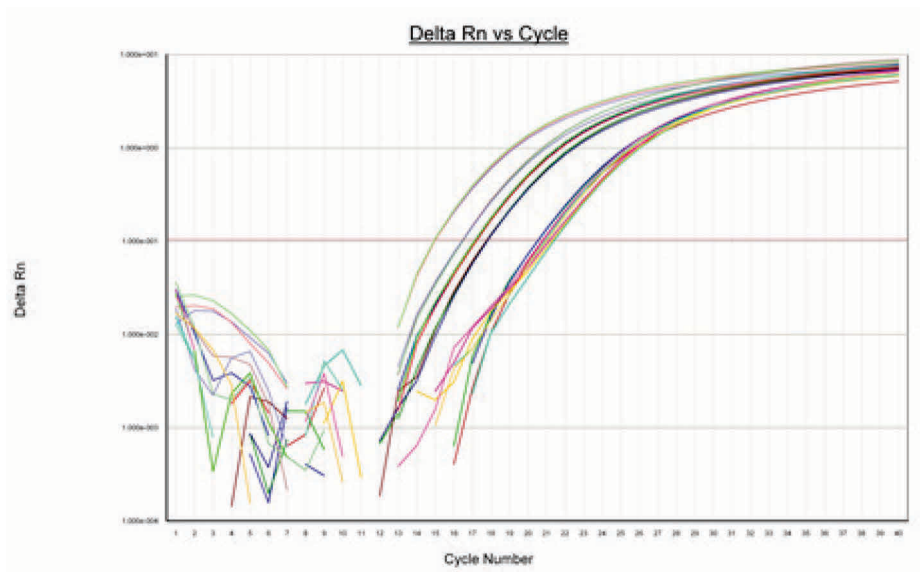


**Prilog B. Analiza profila krive topljenja krajnjih produkata PCR reakcije, amplifikovanih iz uzoraka tumorske DNK za: a) ukupni alel, amplifikovan korišćenjem prajmera ER $\beta$ -EXT-F2 i ER $\beta$ -EXT-R; b) metilovanu ciljnu sekvencu DNK, amplifikovanu korišćenjem MSP prajmera: ER $\beta$ -M-F i ER $\beta$ -M-R.**

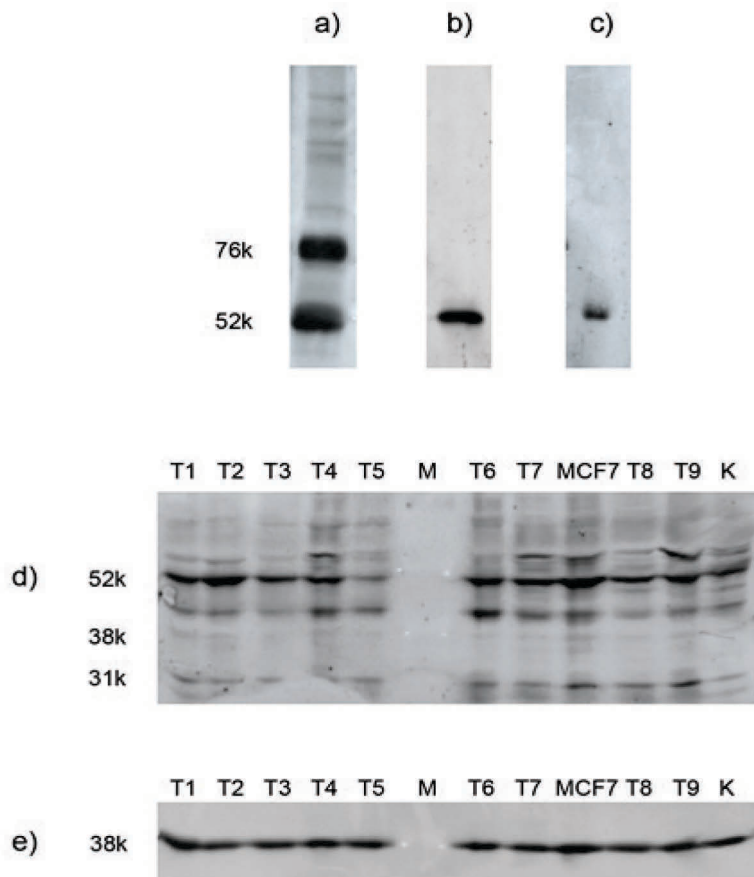
a)



b)



**Prilog C. Krive amplifikacije cDNK**, dobijene na aparatu „7900 Sequence Detection System“ (Applied Biosystems Foster City, CA). Količina cDNK je prikazana kao  $\log(10)$  koncentracije (Rn) u odnosu na broj ciklusa amplifikacije. a) ERβ1 izoforme; b) β aktina.



**Prilog D. ER $\beta$  imunoblotovi:** a), b) i c) ER $\beta$  imunoblotovi posle imunoprecipitacije istog tumorskog uzorka sa različitim antitelima a) Estrogen Receptor beta antibody [9.88] (ab16813, Abcam, Cambridge, MA USA), vide se dve trake proteina, jedna na Mr ~52 KDa i druga na Mr~76 KDa; b) Mouse Anti Human Estrogen Receptor Beta 1 (MCA1974S, AbD Serotec, Oxford, UK), antitelo koje prepoznaje C kraj ER $\beta$ 1 izoforme, vidi se jedna proteinska traka na Mr ~ 52 kDa; c) Novocastra Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody Estrogen Receptor (beta) (NCL-ER-beta, Leica Biosystems Newcastle Ltd, United Kingdom), prepoznaje wt ER $\beta$ , pokazuje jednu traku na Mr ~ 52 kDa.; d) Repräsentativni imunoblot uzoraka tumora (redovi T1-T9), jedan kontrolni uzorak koji je služio kao kalibrator (red K) i MCF7 ćelijska linija, koja je bila pozitivna kontrola, vidi se traka na Mr~ 52 kDa koja odgovara wt ER $\beta$ 1 i trake manjih Mr koje predstavljaju različite ER $\beta$  izoforme, kao i trake većih Mr, koje verovatno predstavljaju komplekse ER $\beta$  sa drugim proteinima; e) odgovarajući GAPDH imunoblot. Red M predstavlja Amersham High Range Rainbow Molecular Weight Marker (RPN756E, GE Healthcare, UK).

## STRUČNA BIOGRAFIJA

Ana M. Božović, rođena 5.marta 1977. godine u Beogradu, završila je Biološki fakultet, studijska grupa Biologija, Univerziteta u Beogradu, sa prosečnom ocenom 9,18. Diplomirala je 13.07.2005. godine, odbranivši diplomski rad, pod naslovom “Učestalost M235T polimorfizma gena za angiotenzinogen kod zdravih osoba i bolesnika sa dijabetesnom nefropatijom”.

Školske 2006/2007. godine upisana je na doktorske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu na studijskom modulu Biomedicinska genetika. 2006. godine zaposlena je u laboratoriji za Radiobiologiju i molekularnu genetiku, Instituta za nuklearne nauke “Vinča“. U zvanje istraživač saradnik je izabrana 17.11.2010. godine. Doktorska disertacija pod naslovom „Metilovanje promotora i ekspresija estrogenskog receptora beta (ER $\beta$ ) u invazivnim karcinomima dojke” prihvaćena je na Univerzitetu u Beogradu 27.09.2012. godine. Iz disertacije su do sada proistekla dva rada, jedan objavljen u Arhivu Bioloških nauka , a drugi na recenziji u međunarodnom časopisu Medical oncology.

Trenutno je angažovana na projektu „Molekularne determinante za dizajn tumor markera“, (br. 173049), Ministarstva za prosvetu i nauku, Republike Srbije.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Ана Божовић

број уписа \_\_\_\_\_

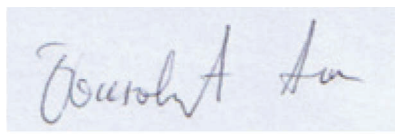
### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Метиловање промотора и експресија ER $\beta$  у инвазивним карциномима дојке

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

**Потпис докторанда**



У Београду, 30.05.2013.

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ана Божовић

Број \_\_\_\_\_ уписа \_\_\_\_\_

Студијски програм Биомедицинска генетика

Наслов рада Метиловање промотора и експресија ERβ у инвазивним карциномима дојке

Ментори др Весна Мандушић, научни сарадник Института за нуклеарне науке „Винча“, Универзитета у Београду

др Марина Стаменковић Радак, ванредни професор Биолошког факултета, Универзитета у Београду

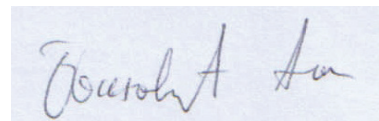
Потписани Ана Божовић

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

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

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

Потпис докторанда



У Београду, 30.05.2013.

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Метиловање промотора и експресија ERβ у инвазивним карциномима дојке

која је моје ауторско дело.

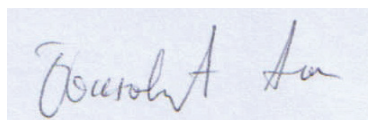
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

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

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

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

**Потпис докторанда**



У Београду, 30.05.2013.

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