УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Бојана Б. Белеслин Чокић

ПСЕУДОХИПОКСИЈА У КАРЦИНОМИМА БУБРЕГА

докторска дисертација

Београд, 2014. године

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE

Bojana B Beleslin Čokić

PSEUDIHYPOXIA IN RENAL CELL CARCINOMA

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

МЕНТОР:

Проф. др Светозар Дамјановић, редовни професор на катедри интерне медицине, Медицинског факултета Универзитета у Београду

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

1. **Проф. др Цане Тулић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду

2. **Проф. др Јасмина Марковић Липковски**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду

3. **Проф. др Гордана Матић**, редовни професор Биолошког факултета у Београду

ДАТУМ ОДБРАНЕ: ______________________

Целокупан експериментални део обраде и припреме узорака тумора и здравог ткива за докторску дисертацију урађен је у генетској лабораторији, клинике за ендокринологију, дијабетес и болести метаболизма, Клинички центар Србије (КЦС). Сакупљање узорака тумора и здравог ткива је урађено у сарадњи са клиником за урологију, Клинички центар Србије уз сагласност Етичког комитета Медицинског факултета у Београду. Експериментални део гајења ендотелних ћелијских линија у нормалним и хипоксичним условима је урађен у Националном Институту за дијабетес, дигестивне болести и болести бубрега, Секцији за молекуларну биологију ћелија при Националним институтима за здравље (NIDDK, Nationl Institutes of Helath, NIH) у Бетезди, САД.

Захваљујем се Constance T Noguchi из Секције за молекуларну биологију ћелија, Националног Института за дијабетес, дигестивне болести и болести бубрега при Националним Институтима за здравље (National Institutes of Health, NIH) у Бетезди, САД на подршци током експрименталне израде докторске дисертације.

Ментору проф. др Светозару Дамјановићу, начелнику одељења за туморе ендокриног система и шефа лабораторије за генетско испитивање, клинике за ендокринологију, дијабетес и болести метаболизма, захваљујем на великој помоћи око планирања, израде, обраде и писања докторске дисертације. Такође захваљујем целокупном тиму генетске лабораторије, клинике за ендокринологију, дијабетес и болести метаболизма, на поверењу и времену у обављању обимне докторске дисертације паралелно са радом свакодневне рутинске генетске дијагностике оболелих пацијената.

Велику захвалност дугујем проф. др Цанету Тулићу и главној сестри операционог блока, сестри Зорици Тепавчевић клинике за урологију, на помоћи око организовања и прибављања узорака за израду дисертације.

Посебну захвалност упућујем својој ужој и широј породици, супругу Владану Чокићу на добрим саветима око писања доктората и помоћи око деце како би докторат био урађен, деци Милици, Јелисавети и Наталији на великом стрпљењу и разумевању и мајци Мирјани Белеслин на помоћи око свакодневних обавеза у кући и око деце, како би свој докторат привела крају. Захвалност је најмање што им дугујем.

ПСЕУДОХИПОКСИЈА У КАРЦИНОМИМА БУБРЕГА

Бојана Б Белеслин Чокић

САЖЕТАК:

Циљ: Тумор реналних ћелија (RCC) је високо васкуларизовани тумор са израженом способношћу деобе ћелија захваљујући смањеној периферној концентрацији кисеоника. Цео систем хипоксија индуцибилних протеина представља значајан патогенетски механизам у настанку и промоцији тумора бубрега, као и настанку повећане отпорности на терапију са тирозин киназним инхибиторима (ТКИ) и блокаторима васкуларног ендотелног фактора раста (VEGF) и његових рецептора. Главни циљеви рада су: 1) секвенцирање von Hippel-Lindau (*VHL*) гена и утицај на активност хипоксија активираних гена као што су хипоксија индуцубилни фактор (*HIF-1α*), који следствено активира еритропоетин (*EPO*) и *VEGF* и њихове рецепторе. 2) испитивање регулације VHL активности кисеоник зависним (пролил хидроксилазе-PHD) и независним путевима (“heat shock протеин-Hsp”). 3) поређење митоген активишуће протеин киназе (MAPK) и фосфатидилинозитол-3 киназе (PI-3), пролиферативних путева у туморском ткиву и здравом ткиву, као и активност „Janus kinaze” и “Signal Transducer and Activator of Transcription” (JAK2-STAT5) пута. 4) експресија гена и сигналних путева у ендотелијалним ћелијама гајених у нормалним и хипоскичним условима као модела развоја крвних судова у туморском ткиву.

Методологија: У студију је укључено 50 пацијената који су били индиковани за хируршки захват тј. парцијалну или тоталну нефректомију. Локални етички комитет Клиничког центра Србије је одобрио студију. Пацијенти су били упознати са студијом, тако да се пре почетка операције узимала крв у цитрату за изолацију ДНК и након операције узимао се мали исечак туморског и здравог ткива за изолацију РНК, ДНК и

протеина. Коришћен модел ендотелијалних ћелија које су гајене у нормалним и хипоксичним условима и касније изолована РНК и протеини за анализу.

Резултати: Директним секвенцирањем и мултиплекслиганд-зависном пробном амплификацијом (MLPA) *VHL* гена у туморском ткиву оболелих пацијената детектоване су мутације у 58% узорака туморског ткива. У здравом ткиву и крви оболелих пацијената није детектована промена у *VHL* гену, што говори у прилог стечених мутација у ткиву тумора бубрега. С обзиром да у туморима бубрега доминирају хипоксични услови, детектовали смо експресију EPO у 23/50 узорака, већином светлоћелијских тумора, док експресија EPOR постоји у свим узорцима, али без статистички значајне разлике између тумора и здравог ткива. Показана је повећана експресија VEGF у туморима, нарочито у туморима са мутацијом у *VHL* гену. VEGF се везује за рецепторе, рецептор васкуларног ендотелног фактора раста 1 (VEGFR-1, flt-1) и рецептор васкуларног ендотелног фактора раста 2 (VEGFR-2, KDR, flk-1), чија су експресије имала тенденцију раста али без статистичке значајности. Пошто се VHL везује за HIF-1α, показана је смањена експресија HIF-1α у туморима, такође без статистички значајне разлике. Експресија PHD1 протеина у туморима је значајно статистички смањена или изостаје у односу на здраво ткиво, док је експресија PHD2 протеина статистички значајно повећана у туморима са мутацијом у *VHL* гену у односу на околно здраво ткиво. Из овог налаза произилази да је PHD1 активност смањена и да је компензаторно повећана активност PHD2 протеина у туморском ткиву. MAPK сигнални пут је показао статистички значајну разлику у експресији у свим туморима у односу на здраво ткиво, док је експресија PI-3/Акт и JAK2-STAT5 сигналних путева остала непромењена. Ови резултати сугеришу постојање две групе тумора, прва група која користи MAPK пут и друга која је кисеоник зависна. На моделу ендотелијалних ћелија које су гајене у нормалним и хипоксичним условима, показана је већа експресија EPOR на транскрипционом и транслационом нивоу у условима снижене концентрације кисеоника, а нарочито после третмана са EPO. За разлику од туморског ткива, EPO активира PI-3/Акт сигнални пут у хипоксији и нормоксији у ендотелијалним ћелијама, са такође присутном MAPK зависношћу.

Закључак: На основу ових резултата показали смо присуство стечених мутација у *VHL* гену тумора бубрега. Како у нормалним условима убиквитинација HIF-1α протеина зависи од VHL протеина, показано је да у туморском ткиву ова веза не постоји због реалне хипоксије и да фунционални стаус *VHL* гена не утиче на експресију HIF-1α како на нивоу информационе РНК (иРНК) тако и на нивоу протеина. С друге стране, активност пролил хидроксилаза, PHD1 и PHD2 су инверзно регулисане, PHD1 експресија је смањена а PHD2 је повећана, посебно у туморима са мутираним *VHL* геном. Експресија хипоксијом активираних гена, *VEGF-a* нарочито у туморима са мутацијом и *EPO* у појединим туморима, указује на хипоксија-зависну регулацију за коју је вероватно одговоран HIF-2α, а не HIF-1α, и то потпуно независно од функционалног стауса *VHL* гена. Показано је да MAPK пут је доминантано активан у туморима бубрега, независно од присуства мутације у *VHL* гену. За разлику од туморских ћелија, ендотелијалне ћелије су показале другачије механизме активације сигналних путева у хипоксичним и нормалним условима. Оваквим приступом дефинисани су хипоксија индуцибилни гени активирани у туморима бубрега и ендотелијалним ћелијама као и механизам њихове активације што може допринети развоју терапије спречавања прогресије тумора у пре- или пост-оперативном току.

КЉУЧНЕ РЕЧИ: *RCC, хипоксија активни гени, MAPK, PI-3, карциноми бубрега, ендотелијалне ћелије*

PSEUDIHYPOXIA IN RENAL CELL CARCINOMA

Bojana B Beleslin Čokić

SUMMARY

Objective: Renal cell carcinoma (RCC) is highly vascularized and proliferative tumor in relation to reduced oxygen tension, The entire system of hypoxia-inducible proteins represents a relevant pathogenetic mechanism in the initiation and promotion of renal tumors as well as development of enhanced therapy resistance to anti-angiogenic drugs and tyrosine kinase inhibitors. The aims of this study were: 1) to sequence von Hippel-Lindau *(VHL)* gene and to examine the influence of mutations in *VHL* gene on hypoxia activated genes, like hypoxia inducible factor 1 (*HIF-1α)* together with erythropoietin (*EPO)* and vascular endothelial growth factor (*VEGF)* and their receptors. 2) to estimate the regulation of VHL activity by oxygen dependent prolil hydroxylases (PHD) and independent heat shock protein (Hsp) pathway. 3) to compare two major proliferative pathways MAPK (mitogen activated protein kinase) and PI-3 (phosphatidylinositol 3-kinase) in tumor and healthy tissue, and activity of Janus kinaze and Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK2-STAT5) pathway. 4) to identify activated genes and signaling pathways in endothelial cells under low and normal oxygen tension, as a model for oxygen regulation and proliferation of endothelial cells in tumor tissue.

Methodology: In our study we analyzed 50 renal tumor and surrounding normal tissue samples of patients after radical nephrectomy, for DNA, RNA and protein analysis. Together with tissues, blood samples were collected for DNA isolation. This study was approved by the local comity of Clinical Center of Serbia. Primary endothelial cells and endothelial cell lines were cultured under low and normal oxygen tension and used for RNA and protein extraction.

Results: With direct sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) methods of *VHL* gene, in tumors and surrounding healthy tissues, somatic mutations in *VHL*

gene were present in 58% of all tumor samples. Sporadic disease was confirmed by analysis of constitutive DNA obtained from normal kidney tissue and blood leukocytes. We detected erythropoietin (EPO) expression in 23 out of 50 tumor samples, mostly in clear renal cell carcinoma (ccRCC). EPO receptor (EPOR) was detected in all examined samples, with no significant difference between tumorous and surrounding healthy tissues. The expression of VEGF was significantly higher in tumors, particularly in those with VHL mutations. However, this was not the case with its receptors, VEGFR-1 and VEGFR-2. Expression of HIF-1α in tumors, with or without mutations in *VHL* gene, was lowered than in corresponding control tissues, but with no statistical significance difference. The expression of PHD1 protein was significantly reduced in tumors in comparison to control tissue or it could not be detected at all, irrespectively to presence or absence of mutations in *VHL*. On the contrary to PHD1, the expression of PHD2 protein was increased in tumors with mutations in *VHL* gene as compared to control tissue. These results suggest inverse regulation of PHD1 and PHD2 in tumors in comparison to surrounding tissue. MAPK pathway was induced in all tumors tissues, but there was no difference in JAK2-STAT5 and PI-3/Aкт expression in comparison to control healthy tissue. Our data suggest the existence of two clusters of tumors, those utilizing primarily MAPK pathway and those that depend on hypoxic pathways. Endothelial cells were used as a model system to check EPO response under low oxygen tension. We observed that hypoxia and EPO increased *EPOR* gene expression and protein levels in endothelial cells. However, EPO did not significantly increase MAPK activity while EPO stimulated Akt phosphorylation in normoxia and hypoxia in endothelial cells.

Conclusion: : Somatic *VHL* mutations were found in 58% of analyzed tumor tissue samples. There was no statistical difference in the expression of HIF-1α between tumor and correspnding healthy tissue, suggesting that regulatation of HIF-1α expression is independent of functional status of *VHL* gene. In tumorous tissues with mutated *VHL* gene, the expression of PHD1 was downregulated and PHD2 upregulated. Hypoxic tumor microenviroment induced genes encoding VEGF and EPO, and shifting toward expression of HIF-2α that was indepentent of functional status of *VHL* gene. MAPK was significantly activated in a cluster of tumors, also not related to *VHL* gene function. Distinct from tumor tissues, different pathways were induced

in endothelial cells in which EPO triggered PI-3/Akt signaling pathway in normoxia and in early response to hypoxia. Whether these phenomona could be used for targeted anticancer therapy remains to be elucidated.

KEY WORDS: *RCC****,*** *hypoxia activated genes, MAPK, PI-3, RCC, endothelial cells.*

.

Садржај

1. Увод

Тумор реналних ћелија или аденокарцином бубрега, је високо васкуларизовани тумор који потиче из ћелија проксималних тубула и нефрона. Јавља се у 2-3% свих тумора одраслих и има тенденцију раста[1]. RCC је најчешћи узрок смрти код уролошких пацијената са туморима и преживљавањем око 13 месеци код пацијената са метастатским RCC-ом. Чешће се јавља у мушкој него у женској популацији, а хередитарни фактори, пушење, гојазност, хипертензија и хронична бубрежна инсуфицијенција су неки од фактора који доприносе настанку болести[2].

Поред великог напретка у развоју биолошке и имуно базиране терапије код пацијената са RCC-ом, одговор на терапију је и даље мали, у свега 12-13% случајева. Због тога је јако битно да се и даље истражују биолошка и клиничка понашања разних типова RCC-а, као и молекуларна основа развоја тумора и следствено допринесу проналажењу ефективније терапије у лечењу пацијената са RCC-ом.

1.1 Класификација реналних тумора

Према "Heidelberg"-овој класификацији, ренални тумори су класификовани на основу хистопатолошких и генетских карактеристика на: светлоћелијске („clear"-ccRCC), папиларне (хромофилни), хромофобне, онкоцитоме, туморе сабирних каналића („collecting-duct"), и остале. Светлоћелијски тумори се најчешће јављају у око 65% свих RCC-а, папиларни у 15%, хромофобни у 10%, онкоцитоми у 5%, док остали тумори као што су саркоми, тумори сабирних каналића, итд у преосталих 5% RCC-а. Тумори су наследни у око 4% случајева и показано је да скоро све фамилије са светлоћелијским типом RCC-а имају наслеђену мутацију у *VHL* тумор супресорском гену[3,4]. Спорадични тумори се јављају у преосталих 96% RCC-а, с тим што је показано да у две трећине случајева *VHL* ген остаје инактивиран тачкастом мутацијом, делецијом или промоторском хиперметилацијом[5-7].

Поред ccRCC-а и други ренални тумори могу имати промењену генску основу. Код хередитарних папиларних RCC-а позната је тачкаста мутација тирозин киназног домена *c-MET* протоонкогена, па и код спорадичних папиларних тумора јавља се тачкаста мутација у *MET* протоонкогену у 5-13% случајева[8]. Знатно ређа је инактивишућа мутација ензима Кребсовог циклуса *фумарат хидратазе* (*FH*) тумор супресорског гена код хередитарног папиларног карцинома, док иста мутација код спорадичних није пронађена[9-11]. Хромофобни RCC је виђен код пацијената који имају наследни "Birt-Hogg-Dube" (BHD) синдром, док је *BHD* тумор супресорски ген и протеин фоликулин, ретко мутиран у спорадичним хромофобним туморима[12]. Код тумора сабирних каналића још увек нису пронађени гени који могу бити мутирани, али су зато детектоване делеције хромозома 1q, 8p and 13q[13]. Поједини аутори су RCC описали као метаболичку болест јер бројни гени као што су *VHL, MET, FH, фоликулин (FLCN*), *сукцинат дехидрогеназе (SDH*), *туберо склерозирајућу фактор (TSC1* и *TSC2*) су укључени у метаболички пут осетљив на кисеоник, енергију и исхрањеност[14].

Туморске ћелије имају велику способност деобе захваљујући смањеној периферној концентрацији кисеоника, а показано је да у појединим туморским ћелијама услед хипоксије долази до експресије EPO, EPOR и VEGF.

1.2 Еритропоетин и еритропоетински рецептор

EPO је 35 kD гликопротеин, неопходан за пролиферацију и диференцијацију еритроидних прогениторских ћелија у зреле еритроците[15]. Примарно место синтетисања EPO је у бубрегу тј. перитубуларним интерстицијалним ћелијама[16]. Такође, и други сегменти бубрега тј. перитубуларне ендотелијалне ћелије, тубуларне епителне ћелије и сегменти нефрона имају способност продукције и секреције EPO[17,18]. Синтетисани EPO се крвотоком преноси до костне сржи, везује за EPOR и доводи до продукције еритроцита. У току еритроидне диференцијације, EPOR се први пут јавља у burst forming unit-erythroid (BFU-E). BFU-E диференцирају у colony forming unit-erythroid (CFU-E), при чему је транзиција EPO зависна и број рецептора достиже максимум када ћелије прелазе из CFU-E у проеритробласт[19-21]. Ретикулоцит и еритроцит не експримирају EPOR па самим тим тада престаје активност EPO.

Поред хематорпоетских прекурсорских ћелија, EPO и EPOR су експримирани у ендотелијалним, неуралним, срчаним, и мишићним ћелијама[22-27]. У ендотелијалним ћелијама, у условима снижене количине кисеоника ендотел крвних судова након стимулације са ЕРО индукује EPOR и ендотелијалну азот-моноксид синтазу (eNOS), што резултира у временски и дозно зависној продукуји NO[23]. Такође у примарним ендотелијалним ћелијама пореклом из плућног ткива ЕРО стимулише експресију индуцибилне форме азот моноксида (iNOS), што опет говори у прилог NOS зависне ЕРО стимулције у ендотелијалним ћелијама[27].

ЕРО и EPOR су такође детектовани у туморском ткиву, у тумору бубрега, дојке, колона, плућа, простате, у туморима главе и врата [28-32]. EPOR је даље пронађен и у меланому, епителијалном тумору јајника, тумору простате, HEP3B хепатому, HeLa цервикалном караципому, SHSY5Y неуробластому, глиома ћелијским линијама U87, U251 и U373[33,34].

Показано је да светлоћелијски карциноми показују експресију ЕРО у 33% (37/113) узорака ткива[35]. У истој студији, пацијенти код којих је ткиво експримирало ЕРО су имали лошију прогнозу у односу на пацијенте са ЕРО негативним туморима. Експресија ЕРО и EPOR у туморском ткиву не корелира са серумским ЕРО и хемоглобином[36]. У скорије објављеној студији пацијената са RCC, показано је да су пацијенти са истовременим високим серумским ЕРО и израженом експресијом EPOR у тумору, имали значајно лошије преживљавање и прогнозу[37]. Такође микроваскуларна инвазија је била потпуно независни фактор у односу на високи серумски ЕРО, сугеришући да ЕРО-EPOR сигнални пут може бити значајан у метастазама, туморском расту, прогресији и прогнози пацијента.

1.3 VEGF

VEGF је гликопротеин, члан фамилије “platelet-derived growth factor (PDGF)” суперфамилије фактора раста. VEGF је круцијалан фактор у развоју крвних судова како у здравом тако и у туморском промењеном ткиву, а такође показује бројне улоге и у повећаној микроваскуларној пермеабилности за плазма протеине, индукује деобу и миграцију ендотелијалних ћелија и утиче на преживљавање ендотелијалних ћелија штитећи их од апоптозе [38-41]. Ген за *VEGF* кодира четири главне изоформе, $VEGF_{121}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{189}$ и $VEGF_{206}$, при чему је $VEGF_{165}$ предоминантна форма[42].

Дејство остварује везујући се за трансмембранске тирозин киназне рецепторе који обухватају VEGFR-1 (Flt-1) и VEGFR-2 (KDR/Flk-1), експримиране у васкуларним ендотелијалним ћелијама, затим VEGFR-3 (Flt-4) експримиран у лимфатичном и васкуларном ендотелијуму и неурофилин рецептор (NRP-1) који се налази у васкуларном ендотелијуму и неуронима[43]. Генетски недостатак *flk-1* и *flt-1* гена код мишева доводи до смрти ембриона, с тим што губитак *flk-1* гена проузрокује губитак развоја крвних судова а *flt-1* прекомерно насумично стварања крвних судова и дисморфогенезе[44,45]. Када се VEGF веже за екстрацелуларни домен рецептора, долази до димеризације и аутофосфорилације интрацелуларног дела тирозин киназног рецептора и активације и адаптације целуларних протеина. Ефекторни путеви који су укључени у активацију су фосфоинозитид 3 киназа (PI-3)/Akt, p38 митоген активишућа протеин киназа (MAPK), екстрацелуларна сигнал регулишућа киназа (ERKs), фокал адхезиона киназа (FAK), Rho фамилија GTP-азе и ендотелни NO. VEGFR-2 (KDR/Flk-1) је главни рецептор одговоран за проангиогенетски ефекат VEGF.

Многе студије су показале да је VEGF индукован у разним туморским линијама, у карциномима бубрега, плућа, дојке, гастроинтестиналног тракта, бешике, јајника, ендометријума итд. RCC је изразито васкуларизован тумор, тј. показано је да је ccRCC много више васкуларизован, и до 5 пута, у односу на папиларни и хромофобни RCC[46]. У неколико студија је показана корелација између VEGF протеина и прогностичких параметара код пацијената са ccRCC-ом[47,48,]. Повећане количине VEGF протеина у туморском ткиву и у плазми корелисале су са присуством некрозе у тумору и већим степеном туморске прогресије, пролиферације и метастазама. С друге стране, иРНК за VEGF имала је различит степен корелације са туморском агресивношћу и прогнозом болести код пацијената са ccRCC-ом, па је тако показано да је иРНК VEGF-а већа у туморима са већим пролиферативним индексом[49]. Свакако, експресија VEGF, VEGFR-1 и VEGFR-2 у туморским ћелијама је већа него у здравом кортексу бубрега. У односу на тип и стадијум тумора, експресија VEGF-a је већа у ccRCC-у него у папиларном карциному, док је VEGFR-2 више експримиран у I и II него у каснијим стадијумима болести. Смањена експресија VEGF у светлоћелијским туморима удружена је смањеним преживљавањем, док је код пацијента са папиларним RCC-ом већа експресија VEGF, VEGFR-1 и VEGFR-2 удружена са лошијм преживљавањем[50]. Постоји повезаност између веће експресије других проангиогених фактора у туморском ткиву, нпр. ангиопоетина-2, са мањом агресивношћу и бољом прогнозом болести[47,50]. Када туморска маса достигне критичну величину, хипоксија активира путеве који утичу на активност гена. Како је већ поменуто, VHL протеин (pVHL) је инактивиран у 70% ccRCC-а, и тада долази до стабилизације HIF-1α и активације *VEGF* и других хипоксија активних гена. Због свега, сматра се да молекули који блокирају активирање HIF зависних путева могу бити потенцијални лекови у терапији тумора бубрега.

1.4 Хипоксија

Молекули HIF-а, заједно са EPO и VEGF и њиховим рецепторима су ефектори ангиогенезе и пролиферације у RCC. Показано је да регулише гене укључене у развој ангиогенезе, затим гене у туморској пролиферацији, ћелијском преживљавању и прогресији, ширењу метастаза, апоптози и глукозном метаболизму[51]. HIF је „helix-loop-helix“ хетеродимерични транскрипциони фактор кога индукује снижена количина кисеоника[52]. HIF садржи две субјединице, HIF-1α и арил хидркарбон рецептор нуклеарни транслокатор (HIF-1β/ARNT) субјединице и везује се за хипоксија одговорни елемент (hypoxia response element-HRE) на ДНК[53]. HIF-1β је конститутивно експримирана субјединица величине 91-94 kDa. HIF-1α је 120 kDa, кисеоник-осетљива субјединица што значи да у присуству нормалне количине кисеоника ова субјединица подлеже убиквитин-протеазомалној деградацији.

HIF-1α садржи два транскрипционо активна домена N-терминални трансактивациони домен (NTAD) и C-терминални трансактивациони домен (CTAD)[54]. У нормалним условима HIF-1α активност је спречена, јер HIF-1α подлеже хидроксилацији на два пролинска остатка (Pro402 i Pro564) који се налазе на NTAD, и са аспарагин хидроксилазом (Asn 803) преко инхибитор фактора HIF-1 (FIH) на CTAD крају[55,56]. За пролинску хидроксилацију одговорна су четири ензима, означени као пролил хидроксилациони домен (PHD1-4) која имају два хидроксилациона места у такозваном кисеоник зависном деградационом домену (ODD), поред NTAD домена[57,58]. PHD-2 је најактивнија и најбитнија компонента HIF активности. Хидроксилација са пролил хидроксилазом омогућава везивање HIF-1α за pVHL и на тај начин омогућава убиквитинацију и деструкцију HIF-1α у протеозомалним путевима. pVHL заједно са елонгин протеинима C i B везује кулин-2 протеин (члан „cullin“ фамилије убиквитин лигазних протеина) и „ring-box 1“ (RBX1) E3 убиквитин лигазе, доводећи до убиквитинације и деструкције протеина преко 26S протеозома[59]. Хидроксилација са аспарагин хидроксилазом преко FIH, блокира интеракцију HIF-1α са транскрипционим коактиватором p300 и CREB-везујућим протеином (CBP).

У хипоксичним условима, HIF-1α хидроксилација са PHD и FIH је спречена. Не хидролизовани HIF-1α не може да веже pVHL па се самим тим нагомилава у ћелији[53,60]. HIF-1α транслоцира у нуклеус, спаја се са HIF-1β, па је транскипциони фактор HIF-1 стабилизован. Комплекс HIF-1α/HIF-1β се везује за HRE на нуклеарној ДНК, активира ко-активаторе p300/CBP на CTAD крају HIF-1α, отпочиње транскрипцију гена који учествују ћелијском расту, ангиогенези, глукозном метаболизму, pH регулацији и ћелијском преживљавању/апоптози.

RCC је често компонента аутозомно доминантне болести, Von Hippel-Lindau синдрома. Код скоро свих фамилија са VHL синдромом пронађена је герминативна мутација у *VHL* тумор супресорском гену (делеција или дефект у сплајсингу) и соматска инактивација *VHL* гена метилацијом или мутацијом у скоро 91% пацијената са спорадичним RCC-ом[61-63]. Герминативна мутација у *VHL* гену код пацијената доводи до неколико високо васкуларизованих бенигних и малигних тумора, укључујући ccRCC, хемангиобластом централног нервног система и феохромоцитом, а ређе и туморе панкреаса, средњег ува и тестиса.

Значи да у случају губитка функције VHL протеина, долази до конститутивне активације сигналног пута HIF-1 и следствено индукције хипоксија индуцибилних гена, нарочито *EPO* и *VEGF*. Прва таква објављена студија је била студија из 2002. године где је код једног пацијента показано да је инфаркт миокарда услед тромбозе била прва манифестација RCC-а, са високом серумском концентрацијом EPO и еритроцитозом[64]. Тумор је експримирао EPO и HIF-1α иРНК, а секвенцирањем туморског исечка идентификована је тачкаста мутација *VHL* гена, тј. егзона 3 (нуклеотид 701 T>C) са одговарајућом заменом аминокиселине (Leu163Pro). Ова структурна промена, иако се налази даље од HIF-везујућег региона, инхибирала је везивање HIF-1α за VHL, што је довело од накупљања HIF-1 и стумулације продукције EPO. Затим следи студија која је показала јасну израженост EPO и EPOR у 11 VHL-везаним RCC-овима. Коекспресија EPO и EPOR пронађена у 10 од 16 реналних цисти док преосталих 6 цисти је експримирало само EPO[29]. Показано је да су цисте са израженим EPO и EPOR потенцијални прекурсори RCC. Студија из 2008 године објављена је код пацијента код кога је прво пронађена секундарна еритроцитоза и повишен хематокрит а затим на скенеру унилатерална локализација тумора бубрега[65]. Тумор је секретовао EPO јер убрзо након нефректомије, концентрација EPO се нормализовала а VEGF је остао у нормалним границама све време. Директним секвенцирањем 3 егзона VHL у тумору, пронађене су две мисенс мутације у егзону 2 VHL: c.383T>C (p.Leu128Pro) и c.393C>G (p.Asn131Lys). Објашњење за две мутације у истом егзону лежи у томе што се вероватно налазе на 2 алела. Обе мутације су соматске, пошто у здравом ткиву није нађена герминативна мутација. Инетресантно је да је ова студија показала да у култури мононуклеарних ћелија крви уочен велики број колонија ендотелијалних ћелија добијених од прекурсора ендотелијалних ћелија, што говори у прилог чињенице да циркулишуће ендотелијалне прогениторске ћелије могу учествовати у ангиогенези тумора. Најновија истраживања показују да мутација у VHL може бити разлог конгениталне полицитемије, али не и тумора[66]. Ова студија је показала нову мутацију у 2 егзону *VHL* гена: c.413C>T:P138L, затим да pVHL има смањену стабилност *in vitro*, да еритроидни прекурсори показују хиперсензитивност на EPO и да нивои 2 транскрипта RUNX1/AML1 и NF-E2 који су повећани у полицитемији уједно повећани и у VHL(P138L) гранулоцитима.

Деградација HIF-1α може да буде регулисана независно од PHD/ pVHL пута преко Hsp 90, који штити протеине од увијања и деградације преко АТП-азне активности[67]. Пронађен је протеин, рецептор који активира C-киназу (RACK1) који доводи до протеозомалне деградације HIF-1α независно од кисеоник/ PHD/ pVHL пута. Hsp 90 и RACK1 се такмиче за исто место везивања на HIF-1α[68]. Везивање Hsp 90 за HIF-1α доводи до његове стабилизације, док RACK1 везује елонгин C, елонгин B и друге компоненте E3 убиквитин лигазе HIF-1α. Скоро је откривен још један кисеоник независтан модулатор HIF-1α деградације, назван хипоксија-помоћни фактор (HAF) који је E3 лигаза за HIF-1α при чему не учествује у деградацији HIF-2α[69].

Сви наведени гени учествују у ћелијском одговору на оксидативни стрес и васкулогенезу.

1.5 Сигнални путеви

1.51 JAK-2, STAT5

Када се EPO веже за рецептор на ћелијској мембрани, долази до димеризације EPOR. За разлику од других рецептора, EPOR нема унутрашњу тирозин киназну активност у смислу активирања сигналиних путева унутар ћелије. Због тога сигнализација се одвија преко JAK2, цитоплазматске тирозин киназе која је стално присутна уз интрацелуларни домен EPOR. Када дође до хомодимеризације EPOR, JAK2 молекули долазе близу један другоме индукујући њихову трансфосфорилацију и активацију. Активирани JAK2 фосфорилише неколико интрацелуларних протеина укључујући и сам EPOR. Између осталих протеина, такође фосфорилише и димеризује STAT5. Активација STAT5 доводи до формирања стабилног STAT димера, који транслоцира у нуклеус, везује за специфичну регулаторну секвенцу и активира транскрипцију одговарајућих гена.

Конкретан рад на сигналном путу JAK2-STAT5 у карциномима бубрега је јако мало проучаван. Прва позната студија је објављена на ћелијским линијама тумора бубрега, где је показана индукција 3 члана JAK фамилије од 4, JAK2, JAK3 и TYK2. JAK1 експресија није детектована. JAK2 у ћелијским линијама је своје дејство остварио преко STAT3. Такође у моделима који симулирају метастазе, су показали да постоји изражена пролиферација код ћелијских линија и ако се дода JAK инхибитор блокира се раст ћелија, сугеришући да JAK инхибитори би били алтернативна терапију у лечењу тумора и метастаза[70]. Позната је мутација JAK2 у мијелопролиферативним болестима, где постоји супституција фенилаланина у валин на 617 кодону. Урађена је анализа за исту промену на JAK2 код 35 пацијената са ccRCC и није нађена мутација, што је говорило у прилог томе да активација EPOR-JAK2-STAT5 није последица мутације у JAK2[71]. Објављено је пар радова са сигналним путем као што је JAK1-STAT1 пут у ћелијским линија RCC. Показано је да интерферон γ који се даје код пацијената са RCC, некада нема ефекта у терапији и могући разлог је недовољна активација JAK1-STAT1 пута[72]. Такође, интерферон γ је доводио до инхибиције раста ћелијских линија RCC у G1 фази раста без индукције апоптозе[73]. Резистенција RCC на интерферон γ је била удружена са смањеном експресијом STAT1 протеина, сугеришући да JAK-STAT пут би се могао разматрати као циљани пут у бољем одговору на интерферон γ код пацијената са RCC-ом.

1.52 PI-3K/Akt пут

Протеин киназа Б-Akt пут се сматра главним путем у онкогенетским процесима који су укључени у ћелијску пролиферацију, преживљавање и ангиогенезу. Фамилија PI-3 киназа има способност да фосфорилише 3'-OH групу у инозитол липидима и садржи три различите класе, класа I, II, и III. Класа I као супстрат користи фосфатидилинозитол 4,5 бифосфате (PIP2) која га фосфорилише у фосфатидилинозитол 3,4,5 трифосфат (PIP3)[74]. PIP3 везује PH везујуће протеине у плазма мембрани укључујући 3-фосфоинозитид-зависну протеин-киназу 1 (PDK1) и Akt. Класа I је подељена у 2 класе, класу А коју активира рецептор тирозин киназа-RTK, Ras и G протеин везани рецептор–GPCR и Б класу коју активира GPCR. Класа II PI-3 фосфорилише фосфатидилинозитол у фосфатидилинозитол 3 фосфат. Иако је класа II PI-3 експримирана у органима и ткивима, тачна улога у ћелијској сигнализацији и туморској билогији још увек није разјашњена[75]. “Vacuolar protein sorting 34 (vps34)” је једини члан класе III PI-3, а показано је да има битну улогу у сигналном путу исхране, ендоцитози и аутофагији[76].

Akt је 57 kDa серин/треонин протеин киназа. Akt садржи NH2 завршни PH домен, који интереагује са PIP3. Једном када се Akt веже за плазма мембрану, долази до фосфорилације са 3-фосфоинозитид-зависном протеин-киназом 1 (PDK1), док mTOR complex 2 (mTORC2) фосфорилише на COOH крају Akt-а. Пуна активација Akt захтева обе фосфорилације. Активиран Akt мигрира кроз цитосол у нуклеус[77,78]. Сматра се да активирана Akt киназа, смањује активност *VHL* гена, тако што стабилизује HIF-1 и тубеpо склерозис комплекс 1 и 2 (TSC1/2) тумор супресор, активишући mTOR киназу[79-81]. Инактивација VHL и TSC1/2 и активација mTOR-а има критичну улогу у RCC туморогенези[82]. Са друге стране, пронађена је мутација у гену који кодира каталитичку субјединицу p110 PI-3 у великом броју туморских ткива, као што је тумор колона, мозга, јајника, јетре и желудца и може делимично да објасни активирани пут у овим неоплазмама[83].

Главни негативни регулатор Akt/PI-3 је протеин/липид фосфатаза-фосфатаза и тензин делетирани хомолог хромозома 10 (PTEN). PTEN антагонизује PI-3 функцију, тако што спречава Akt активацију[84]. Тада долази до апоптозе и заустављања ћелијског циклуса у G1 фази, повећава се $p27^{kip1}$ експресија и смањује циклин D1 експресија[85]. PTEN је такође мутиран у извесним туморима као што је тумор дојке, тироидеје и ендометријума, што доводи до повећане активности Akt/PI-3 сигналног пута[86].

У задњих пар година много се проучавао Akt/PI-3 сигнални пут и известан број радова је објављен и о RCC-у. Један од скоријих је рад објављен на узорцима тумора код пацијената са ccRCC где је поред неодговарајуће протеолизе VHL, пронађена мутација у такозваном *TCEB1* гену који спречава везивање елонгин C-VHL и накупљања HIF-a[87]. Такође и у другим сигналним путевима су нађене промене као што је у PI-3/Akt/mTOR сигнални пут, KEAP1/NRF2/CUL3 апарату, ДНК метилацији, p53-везаним путевима, иРНК процесингу. Ова интегрисана молекуларна анализа је обухватила корелације између ДНК метилације, генске мутације и генске експресије омогућавајући процену клиничког исхода код пацијената оболелих од RCC. Рађена су и друга испитивања фосфорилисаног Akt (pAkt) и PTEN микроарејом у реналном карциному и околном здравом ткиву[88]. pAkt се чешће налази у нуклеусу пре него у цитоплазми и PTEN је сразмерно био смањен у 50% случајева. Ни степен тумора, ни стадијум, нису утицали на pAkt експресију, с тим што су ccRCC и папиларни RCC показали већу индукцију pAkt, него саркоматоидни и хромофобни тип RCC. Према томе Akt и mTOR сигнални пут, показују да су ови путеви углавном конститутивно активирани у RCC у поређењу са здравим ткивом.

1.53 МАРК пут

Митоген активишућа протеин киназа-МАРК је једна од важнијих биолошких путева у ћелији, која утиче на ћелијску пролиферацију, регулацију ћелијског циклуса, преживљавање, ангиогенезу и ћелијску миграцију. Каскада укључује читаву групу цитоплазматских протеина, а описана је као линеарни пут Raf/MEK/ERK пут, од рецептора тирозин киназе на ћелијској мембрани до регулације генске транскрипције у једру преко екстрацелуларне сигнал регулисане киназе (Erk).

Први у низу активатора Raf/MEK/ERK, па чак и Akt/PI-3 пута је мали GTP-зависни протеин Ras. Када дође до везивања цитокина, хормона раста или митогена за рецептор активира се комплекс Shc/Grb2/SOS, инактивирани Ras мења GDP за GTP, долази до конформационе промене протеина и постаје активан. GTP везани Ras онда везује Raf за ћелијску мембрану[89]. Raf је серин/треонин киназа, коју поред Ras-a, могу да активирају и Hsp 90, протеин киназа C итд[90]. Raf ген чине A-Raf, B-Raf и C-Raf, при чему је B-Raf најпотентнији активатор тирозин и серин/треонин киназе, митоген активишуће протеин киназа/Erk киназе (MEK1)[91]. MEK1 предоминантно активира Erk 1,2 које су такође серин/треонин киназе и које директно могу да фосфорилишу многе транскрипционе факторе. Познати су и као p44 и p42 митоген активишуће протеин киназе, које су кодиране од стране 2 различита гена али имају велику структуралну и функционалну сличност тј. 84% сличности.

Показано је да Erk сигнални пут има битно учешће у туморогенези и развоју метастаза[92]. Активиран Erk је детектован у различитим хуманим туморима као што је тумор бубрега, дојке, колона, плућа и код глиобластома[93-95]. Истраживања на хуманим ccRCC указују да долази до веће експресије MAPK тј. Erk 2, као и да неселективна блокада са токсином антракса инхибира фосфорилацију Erk-a и других киназа (као што је p38 MAPK и JNK), супримира раст тумора и ремети туморску васкуларизацију у *in vivo* условима[96]. Студија из 2009 године урађена код 328 оболелих пацијената са RCC-ом, је показала да пацијенти код којих је отклоњен мањи тумор су имали већу експресију фосфорилисаног Erk-a, бољу прогнозу и преживљавање, а код прогресивног RCC је долазило до смањене активације па и прекида поменутог пута, што је остало без објашњења[97]. Скорија студија је показала улогу RKTG (Raf Kinase Trapping to Golgi), негативног регулатора митоген активишуће протеин киназе (Raf/MEK/ERK), чија је улога да смањи трансактивацију HIF-1α тако што спречава формирање HIF-1α/p300 комплекса и самим тим спречава транскрипцију VEGF[98]. Код узорака са ccRCC експресија RKTG је била смањена и при томе постоји инверзна корелација у експресији VEGF. Такође је уочен повећани ризик од метастаза и смрти код пацијената са RCC-ом код којих је постојала повећана експресија 8q, где се поред читавих група гена налази и прото-онкоген c-Myc који може бити асоциран са агресивним туморским фенотипом[99]. Новија истраживања показују да и други путеви независно од VHL-HIF-1 пута могу бити активирани, као што је фосфорилисан c-Jun, супстрат c-Jun-NH(2)-киназе (JNK) који је селективно активиран код пацијената оболелих од ccRCC[100].

1.6 Терапија RCC

Дефинитивно су ресекција бубрега или нефректомија, када је то могуће, најуспешнији вид лечења пацијената са RCC. Цитокини и други лекови који су се користили у терапији узнапредовалог или метастатског тумора, као што су високе дозе интерлеукина 2 или интерферона α су се показале ефикасне код малог броја пацијената са RCC-ом[101]. Метастатски RCC се данас лечи тирозин киназним инхибиторима (ТКИ) као што су сунитиниб, сорафениб и пазопаниб. Сунитиниб се показао као лек избора код више од 80 различитих тирозин киназних инхибитора у лечењу раста тумора, ангиогенезе и метастаза[102,103] Овај молекул инхибира различите тирозин киназне рецепторе, као што су VEGFR-1, VEGFR-2 и VEGFR-3, PDGF рецепторе (PDGFRα и PDGFRβ), fms-везујућу тирозин киназу 3 (FLT3) и рецептор ћелијски стем фактор (KIT). Сорафениб покрива још већи спектар киназа, али његова инхибиторна активност је слабија него код сунитиниба. Пазопаниб је још један ангиогенетски инхибитор који је скоро уведен у терапију узнапредовалог RCC-a[104].

Терапија са бевацизумабом, хуманим VEGF-неутралишућим антителом, је показала значајне резултате у инхибицији тумор ангиогенезе, с тим што се сматра да је предоминантни ефекат на ендотелијалним ћелијама које окружују тумор а не на самим ћелијама тумора[105-107]. Ефекат је инхибиција ангиогенезе са последичним смањењем допремања кисеоника и хране туморским ћелијама.

Темсиролимус и еверолимус су инхибитори PI-3/Akt/mTOR пута и лекови су избора код пацијената са метастатским RCC-ом[108-110]. Припадају групи инхибитора рапамицин аналога, и показано је такође да смањује активност HIF-1 и VEGF-a у *in vitro* условима[56]. Еверолимус се користи код пацијенати са метастатским RCC-ом који су развили резистенцију на сунитиниб и сорафениб. Деферолимус је још један mTOR инхибитор који може да нађе своје место у терапији RCC-а.

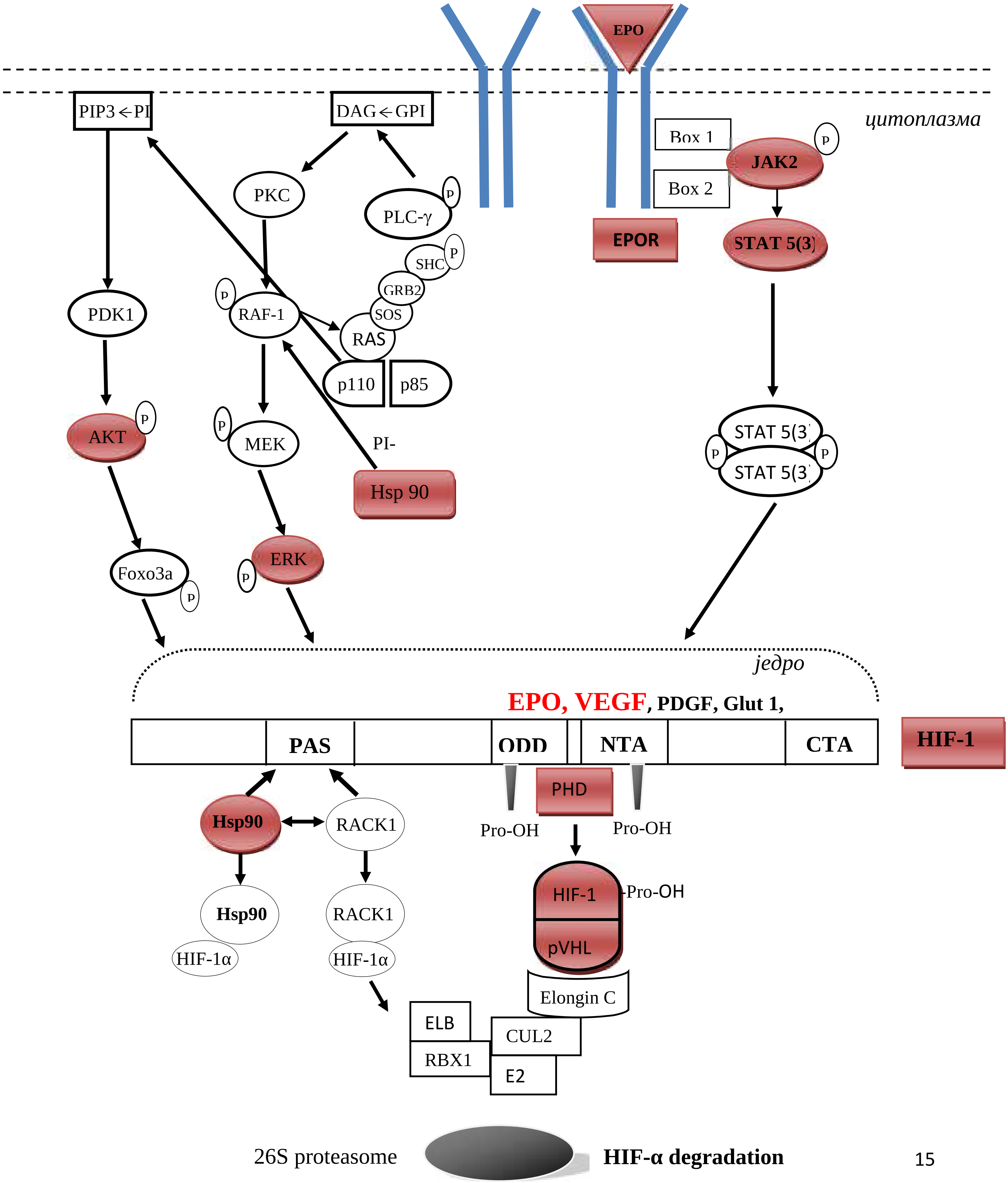
Пошто туморска ткива експримирају EPO и EPOR и при томе могу да утичу на раст тумора, постоји реална опасност од утицаја EPO на пропагацију малигних ћелија, нарочито у случају давања EPO код пацијената са анемија-удруженим туморима. Извесне студије су показале да EPO блокира тумор ћелијску апоптозу преко Акт/PI-3 пута, повећава туморску прогресију и метастазе [111,112]. У студији пацијената са туморима главе и врата , EPO је кориговао анемију, али није имао утицаја на контролу развоја тумора нити преживљавање[32]. Слични резултати су добијени и у случају метастатских карцинома дојке код жена које нису имале анемију на почетку лечења[113]. Свакако потенцијални ризик од давања EPO у смислу туморског раста или туморске прогресије је још увек под знаком питања.

На основу данашњих сазнања, тзв. нове циљане терапије повећавају дужину преживљавања пацијената са RCC-ом, али не лече примарну болест. И поред великог напретка са увођењем новим лекова у задњих пар година, постоји и даље проблем стечене резистенције на нову терапију што захтева проналажење нових лекова у лечењу тумора бубрега.

2. Циљеви истраживања

На основу предходно изнетих и објављених сазнања о туморима бубрега циљеви истраживања су следећи:

1. Детекција мутација *VHL* гена секвенцирањем и MLPA методом.
2. Испитивање експресије EPO, EPOR, VEGF, VEGFR1 и VEGFR2 у туморском и контролном, здравом ткиву бубрега.
3. Испитивање експресије EPOR, HIF-1, PHD1, PHD2 и Hsp90 протеина у туморима бубрега и околом здравом ткиву бубрега.
4. Мапирање JAK2-STAT5, PI-3/Акт и MAPK сигналних путева унутар туморских и здравих ћелија “Western blot“ анализом.
5. Испитивање генске експресије EPOR на нивоу иРНК и протеина *in vitro*, у ћелијским линијама и примарним ендотелијалним ћелијским културама у нормалним ($pO_2$21%) и условима хипоксије ($pO_2$2%) као и пре и после третмана са EPO.
6. Детекција PI-3/Акт и MAPK сигналних путева у ендотелијалним ћелијама у нормалним ($pO_2$21%) и хипоксичним ($pO_2$2%) условима “Western blot“ анализом.


EPO
цитоплазма
PIP3←PI
DAG←GPI
Box 1
Box 2
JAK2
p
PKC
PLC-γ
SHC
GRB2
SOS
RAS
EPOR
STAT 5(3)
PDK1
RAF-1
p110
p85
AKT
MEK
PI-
Hsp 90
STAT 5(3)
STAT 5(3)
Foxo3a
ERK
једро
EPO, VEGF, PDGF, Glut 1,
PAS
ODD
NTA
CTA
HIF-1
PHD
Pro-OH
Pro-OH
Hsp90
RACK1
Hsp90
RACK1
HIF-1α
HIF-1α
HIF-1
pVHL
-Pro-OH
Elongin C
ELB
RBX1
CUL2
E2
26S proteasome
HIF-α degradation

3. Материјали и методе

3.1 Пацијенти

Сакупљање узорака тумора и здравог ткива је урађено у сарадњи са клиником за урологију, Клинички центар Србије и уз сагласност Етичког комитета Медицинског факултета у Београду. У студију је укључено 50 пацијената мушког (65.4%) и женског пола (34.6%), просечне године старости за мушке особе 57 година и 59 година за особе женског пола. Пацијенти су били индиковани за хируршки захват тј. парцијалну или тоталну нефректомију након спроведених дијагностичких процедура као што су клинички преглед, биохемијске анализе и радиолошки преглед, компјутеризована томографија, нуклеарна магнетна резонанца. Локални етички комитет Клиничког центра Србије је одобрио студију. Пацијенти су били упознати са студијом, тако да се пре почетка операције узимала крв у цитрату за изолацију ДНК и након операције узимао се мали исечак туморског и здравог ткива за изолацију РНК, ДНК и протеина. Ткиво које је било намењено за изолацију РНК, паковано је у стерилне тубе у којима се налазила посебна течност за очување РНК (“RNAlater Qiagen”, Хилден, Немачка). Ткива за изолацију ДНК и протеина су преношена у стерилним тубама на леду до лабораторије. Сва ткива су чувана на -80C° све до момента изолације ДНК, РНК и протеина.

3.2 Секвенцирање

Целокупан експериментални део обраде и припреме узорака тумора и здравог ткива за докторску дисертацију урађен је у генетској лабораторији, клинике за ендокринологију, дијабетес и болести метаболизма, Клинички центар Србије (КЦС).

3.21 Изолација ДНК из крви

Пацијентима је пре операције вађена крв за изолацију ДНК. Крв је скупљана у вакутајнерима (BD Vacutainer, Франклин Лејкс, Њу Џерци, САД) у којима се налазио трисодијум цитратни раствор погодан за каснију изолацију ДНК. Крв је аликвотирана и чувана на -20 C^o до изолације ДНК.

За изолацију ДНК коришћен је један од аликвота крви дотле чуван на -20 C^o и ТЕ пуфер. ТЕ пуфер се правио од 10 mM Tris HCl и 1mM EDTA pH=8, јер је показано да нуклеазе на поменутој вредности pH имају најмању могућу активност, па самим тим и ДНК може дуже да се одржи.

Процес захтева да се крв са раствором ТЕ пуфера меша и центифугира 4-5 пута, одлива се супернатант а талог се испира са свежим ТЕ пуфером. У последњем кораку се додаје ТЕ пуфер, содијум додецил сулфат (SDS) анјонски сурфактант тј. детерџент који потпомаже у лизирању ћелија током изолације ДНК и протеиназа К, серин протеаза која утиче на разградњу нативних протеина и инактивацију калцијум зависних ензима, односно ДНазе и осталих нуклеаза. Активност протеиназе К се повећава неколико пута на 50-60 C^o у присуству SDS због чега се смеша инкубира на 56 C^o сат времена а након тога на 37 C^o преко ноћи.

Следећи дан, изолација ДНК се наставља фенол-хлороформском методом која се заснива на примени раствора фенол/хлороформ/изоамил алкохолом у односу 25:24:1. Фенол-хлороформ је течно-течна екстракција која се много користи у молекуларној биологији не само за изолацију РНК, него и ДНК и протеина и одговара методи за изолацију на колонама са силика мембраном с тим што је на овај начин чистоћа узорка много већа. Улога фенола је да преципитира протеине, хлороформа да раствара фенол а изоамилалкохола да снижава површински напон. Раствор фенола са узорцима се добро мешао а затим центрифугирао на собној температури. Након центрифугирања издвајале су се две фазе, горња-водена фаза и која садржи ДНК и РНК, а друга доња која је органска фаза. Протеини се налазе у органској фази на граници са воденом фазом-интерфаза. Горња фаза са ДНК се пребацивала у нову тубу где се додавао хлороформ, затим се све заједно вортексовало и центрифугирало. Након издвајања горње фазе, ДНК се пребацивала у нову тубу и вршила се преципитација са 7,5M амино-ацетата и хладним апсолутним етанолом. Тубе су остављене на -20°C преко ноћи како би се ДНК преципитирала. Сутрадан су се узорци центрифугирали, супернатанти одливали и додавао се 70% алкохол, поново се центрифугирало, одливали супернатанти и талог сушио. Осушеном талогу се додавала стерилна дестилована вода и ДНК се растварала на 37°C преко ноћи. Након растварања, ДНК је била спремна за ланчану реакцију умножавања (PCR).

3.22 Изолација ДНК из ткива

Ткива која су била замрзнута, одлеђивана су и одмеравана, по 30 mg туморског и здравог ткива. Додаван је дигестиони пуфер, који чини 100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl, 25 mM EDTA, pH=8, који инхибира нуклеазе, затим SDS и протеиназа K и остављено је било преко ноћи на 37°C. Наредног дана се додавала иста количина протеиназе K, затим температура је повећана на 56°C, сат времена и након тога на 37°C преко ноћи у термомиксеру. Следила је екстракција ДНК према већ горе описаној процедури.

3.23 Реакција ланчаног умножавања (Polymerase Chain Reaction) PCR VHL гена

Након изолације ДНК, радила се реакција ланчаног умножавања молекула ДНК за *VHL* ген. *VHL* ген се састоји од три егзона (то су сегменти гена који садрже информацију за синтезу протеина) а између егзона се налазе некодирајући низови-интрони. Када се ради секвенцирање гена то подразумева да сваки синтетисани прајмер или граничник на 5’ (директан) и на 3’ (реверзни) крају ДНК молекула буде дубоко у интрону и покрије цео егзон. У случају *VHL* гена направљена су три пара прајмера сваког егзона *VHL* гена.

Реакција ланчаног умножавања је метода којом се умножава молекул ДНК. Метода омогућава стварање великог броја копија, кратког унапред одређеног дела молекула ДНК користећи малу почетну количину ДНК узорка. У реакцији поред граничника и ДНК молекула који служи као образац за формирање комплементарног ланца, потребан је и ензим ДНК полимераза. Улога ДНК полимеразе је да синтетише нов ланац на основу матрице. Ензим је изолован из термофилних бактерије (*Thermus aquaticus*) које се налазе у термалним изворима, са високим температурама воде и до 110C°. Оваква ДНК полимераза је довољно стабилна при високим температурама и не долази до уништења када се користи током PCR процеса. У реакцију поред ДНК, граничника и ДНК полимеразе, додавали су се нуклеотиди, основни структурни елементи од којих се ДНК гради и одговарајући пуфер са обавезним садржајем магнезијум-хлорида.

PCR за *VHL* ген се радио у 35 циклуса, а сваки циклус у принципу чине 3 различите температуре које се мењају периодично. Први корак је денатурација и тада се водоничне везе у дволанчаном молекулу ДНК раскидале на температури од 95°C. У другом кораку, снижавала се температура на 60°C и на раздвојеним ланцима ДНК везивали су се прајмери на оба ланца. Прајмери су били дизајнирани да оганиче регион од интереса у секвенци гена и величине су обичо до 20 нуклеотида. Трећи корак је била елонгација и тада ДНК полимераза попуњава празнине на ланцима од почетког прајмера на температури од 72°C. На крају реакције умножавања узорци су се проверавали на 1% агарозном гелу, тако што су се наносили заједно са маркером и на основу величине потврђивала се тачност амплификованог гена. Након провере вршило се пречишћавање узорака.

3.24 Пречишћавање узорака

PCR продукти су се пречишћавали по протоколу из кита (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Хилден, Немачка) како би узорци били погодни за читање секвенце одређеног гена. Укратко, узорци су се наносили на силика мембрану са високо засићеним раствором соли који везује ДНК молекуле, затим се испирају и на крају растварају са ниско засићеним раствором соли или водом. Пречишћавањем се уклањају прајмери, нуклеотиди, ензими, минерална уља, соли, агароза, етидијум бромид и све друге нечистоће из узорка. Овако добијен узорак је био спреман за асиметрични PCR.

3.25 Асиметрична реакција ланчаног умножавања-PCR

За секвенцирање смо користили једну од варијација PCR технике тј. асиметрични PCR. Асиметрични PCR је метода која предходи секвенцирању и којом се првенствено амплификује један ланац молекула ДНК. Сама метода се не разликује од обичног PCR, једина разлика је што се додаје само једна прајмер, директни или реверзни прајмери. Прајмер се додаје у вишку специфичан је за један ланац ДНК који се амплификује и због споре (аритметичке) амплификације касније у реакцији када се потроше прајмери, неопходни су додатни циклуси.

С обзиром да се одређивање секвенце нуклеотида у ланцу ДНК у секвенатору одвија по Сангеровој методи, у реакциону смешу су се додавали и дидеоксинуклетиди обележени флуоресцентним бојама (ddNTP). Дидеоксинуклеотидима недостаје 3' хидроксилна група тако да када се они уграде у ланац, следећи нуклеотид не може да се веже у растући ланац и полимеризација се прекида. Самим тим када се припремају узорци за асиметрични PCR и секвенцирање, у смешу поред 4 дидеоксинуклеотида (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP), додавали су се и 4 нормална нуклеотида, ДНК полимераза, прајмери и матрични ланац. Како ДНК полимераза катализује додавање коплементарних база на 3' крају, дидеоксинуклетотиди се такмиче у уградњи са одговарајућим нормалним нуклеотидима. На тај начин се на матрици производе ланци ДНК различитих дужина. Најкраћи ланци су најближи 5' крају растућег ДНК ланца, с обзиром да ланац расте у смеру 5' ка 3' крају. Ако се ови ланци подвргну гел електрофорези, секвенце од 5' ка 3' крају ланца ДНК комплеметарног матрици могу се одредити очитавањем од дна ка врху гела.

Након асиметричног PCR узорци су били спремни за преципитацију и секвенцирање.

3.26 Секвенцирање VHL гена

Овако добијени узорци су се даље преципитирали са гликогеном, амонијум-ацетатом и етилен диамин тетра сирћетном киселином (EDTA). Након вортексовања додаван је 90% алкохол и остављано је преко ноћи на -20°C. Следећег дана узорци су центрифугирани, одливени супернатанти а талог испиран са 70% алкохолом. Узорци су поново центрифугирани, одливени су супернатанти, талог прво сушен а потом и растворен у формамиду. Овако растворени узорци су се денатурисани на 95°C, хладили на -20°C пар минута и спремљени за секвенцирање.

Секвенцирање је урађено на Applied Biosystem 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Карлсбад, Калифорнија, САД) четворокапиларном аутоматском секвенатору (што значи да анализира 4 узорка у исто време) и који као методу користи капиларну електрофорезу. Када капиларе уроне у узорке, фрагменте ДНК из узорка привлачи катода тј. електрода од платине које се налазе на крају капилара, која је отворена и испуњена полимером. ДНК фрагменти увучени у капиларе, путују кроз полимер и кроз део капиларе које ласер побуђује, па се емисија из узорка открива и евидентира преко камере. Сакупљени подаци су се у виду електронског сигнала слали у компјутер и секвенца са појединачним нуклеотидима се очитавала на екрану а затим се ручно упоређивала са нормалном секвенцом *VHL* гена.

3.27 Мултиплекс лиганд-зависна пробна амплификација (MLPA)

MLPA је мултиплекс PCR метода којом се открива неодговарајући број копија и самим тим свака промена у нуклеотидном низу ДНК или РНК. Типично за ову методу је што се тзв. MLPA пробе хибридизују са одговарајућим секвенцама гена и на тај начин се најчешће откривају велике делеције и дупликације гена од интереса. За разлику од стандардног мултиплекс PCR-а један пар универзалних PCR прајмера се користи за MLPA амплификацију. Амплификациони продукти су између 130 и 480 нуклеотида и анализирају се капиларном електорфорезом. На основу величине пика узорка и контролног узорка који се пушта заједно са узорком, може да се утврди која секвенца показује не одговарајући број копија у односу на контролни узорак.

MLPA реакција је урађена за *VHL* ген у туморском и контролном здравом ткиву, само у узорцима где се класичним секвенцирањем нису пронашле промене у VHL гену. Сама MLPA метода се састоји од 5 главних корака. Први корак је ДНК денатурација и хибридизација преко ноћи са миксом MLPA проба. MLPA проба се састоји од 2 одвојена сета олигонуклеотида комплементарна ланцу ДНК, везана за један PCR прајмер који је универзалан за сваки сет олигонуклеотида. Други корак је лигација, када се две пробе везују за одговарајућу комплементарну секвенцу ДНК. Само пробе које су потпуно хибридизоване за одговарајућу секвенцу ДНК могу ући у реакцију лигације. Трећи корак је PCR реакција, када се пробе у лигацији експоненцијално амлификују током PCR реакције. Четврти корак је сепарација PCR продукта капиларном електрофорезом на секвенатору, Applied Biosystem 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Карлсбад, Калифорнија, САД). Пети корак је читање резулатата. Олигонуклеотидне пробе које се нису везале у реакцији лигације, због делеција или дупликација, нису се амплификовале у PCR реакцији и у тим узорцима је изостајао сигнал.

3.3 Изолација РНК из тумора

Сама процедура изолације РНК захтева припрему пре почетка изолације. Особа која ради на изолацији РНК мора да носи маску, мантил и да често мења рукавице, јер се ендогене и егзогене RNазе налазе свуда, па чак и на кожи сваког човека. За наше експерименте, коришћени су стерилне пластичне посуде и наставци са филтером који не поседују RNазе (тј. са ознаком “Rnase free”). Коришћено је и стаклено посуђе које је преко ноћи остављено у 0.1% диетил пирокарбонату (DEPC) на 37C° а затим аутоклавирано на 100C° 15 минута како би се обезбедило комплетно разлагање DEPC-а на угљен диоксид и етанол.

Узорци су одмеравани на леду, по 30 mg туморског и здравог ткива. Сваки узорак је ручно хомогенизован и лизиран у присуству пуфера који садржи гуанидин изоцијанат (означен као RLT пуфер).

Даљи поступак изолације РНК је урађен по устаљеном протоколу “RNeasy Mini Kit” (Qiagen, Хилден, Немачка). Растворени узорак се пребацивао на шредере (QIAshredder, Qiagen, Хилден, Немачка), специфичан епендорф који обезбеђује хомогенизацију узорка, редукује вискозност лизата и елиминише геномску ДНК. Лизат се третирао етанолом који обезбеђује везивање РНК за силика мембрану и потом се пребацивао на RNeasy мини колону. Тотална РНК се везивала за силика гел-мембрану, док се све остало из туморског и здравог ткива спирало и центрифугирало са мембране специфичним пуферима. Тотална РНК се на крају спирала са мембране помоћу “RNase free” воде.

3.31 ДНК третман

Након изолације урађено је мерење концентрације РНК на спектофотометру (GeneQuant pro, Amresham Pharmacia Biotech, Пискатавеј, САД). Концентрација РНК је мерена у киветама на апсорбанци од 260 nm, а прерачунавањем односа на 260 nm и 280 nm добијене су вредности које су говориле у прилог чистоће РНК.

Коришћена је РНК у концентрацији од 1μg за 1U/μl DNase (DNase I, RNase-free, Fermentas, Шверте, Немачка). DNаза је ендонуклеаза која сече једноструки и двоструки ланац ДНК, тако што хидролизује фосфодиестерске везе у молекулу ДНК на моно- и олиго-деоксирибонулеотиде са слободним 5'фосфатним и 3'хидроксилним групама. Ензимска активносте је зависна од присуства Ca^{2+}, а за активацију је потребан Mn^{2+} или Mg^{2+} који сече двостуки ДНК ланац отприлике на истим местима или Mg^{2+} који насумично сече сваки ланац независно.

Смеша је направљена од 1μg РНК, 1μl 10X пуфера са $MgCl_2$, 1μl (1U) DNase I, RNase-free и DEPC вода до финалног волумена. Затим је смеша инкубирана на 37C° 30 минута и накона тога коришћена у фенол-хлороформ екстракцији. Метода се базира на сепарацији фаза центрифугирањем, при чему се одваја горња-течна фаза са РНК и доња органска фаза углавном са фенолом. Горња фаза се пребацивала у нову тубу, додавао се хлорофом и поново се центрифугирала. Опет издвојена горња фаза се издвајала у нову тубу а затим се додавао 3М натријум ацетат и 100% етанол, остављена на -20C° преко ноћи како би се РНК испреципитирала.

Следећег дана туба се центифугирала на максималној брзини на +4C° око 45 минута. Вадио се супернатант, додавао се 75% алкохол и поново центрифугирала 15 мин. Након тога се одливао супернатант, туба се сушила и додавао се 20 μl DEPC воде. Овај корак је неопходан јер присуство соли, металних јона, етанола или фенола који су се користили у изолацији РНК и ДНК третману, би инхибирало кДНК синтезу. Узорак је прво био измерен на спектофотометру, а затим и спреман за кДНК синтезу.

3.32 кДНК синтеза

Пречишћена РНК је коришћена у реверзној транскрипцији у кДНК (First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas, Шберте, Немачка). Примењиван је кит који користи M-MULV реверзну транскиптазу (Moloney Murine Leukemia Virus) тј. РНК-дириговану ДНК полимеразу, ензим који синтетише комплементарни ДНК ланац и своју активност остварује на 37C°. Рекомбинантни RiboLock RNase инхибитор се додавао у смешу, који ефективно штити РНК од деградације на температури од 55C°. Иницијација копирања је омогућена са две врсте прајмера олиго$(dT)_{18}$ и random hexamer прајмерима. Random hexamer прајмери се везују неспецифично и обично се користе у синтези тоталне РНК (рРНК и иРНК). Олиго$(dT)_{18}$ је специфичнији прајмер у смислу везивања за 3' крај поли(А) репа иРНК и он је даље коришћен у синтези кДНК. Туба са свим набројаним компонентама је била инкубирана на 37C° 60 минута, затим на 70C° 5 минута и спремљена за *real time* PCR реакцију.

3.33 Real time PCR

Квантитативна генска експресија EPO, EPOR, HIF-1α, VEGF, VEGFR1, VEGFR2 и β-актина (као интерне контроле) је урађена на LightCycler 1.5 инстументу (Roche, Манхајм, Немачка).

LightCycler 1.5 (LC) подржава три система детекције сигнала. Један је са SYBR Green I, боја која се неспецифично везује за двоструки ланац ДНК и није толико препоручена метода са генску квантификацију. Друга метода је са хибридизационом пробом, погодна је за квантификацију и уједно откривање тачкастих мутација. Трећа метода је метода са хидролизационом пробом.

Метода коју смо ми користили за квантификацију је са хидролизационом пробом. Специфичност ове методе у односу на друге две је примена специфичне пробе (TaqMan probe) обележене са две боје, једна је означена као репортер боја (REPORTER) а друга као сузбијајућа боја (QUENCHER), чија је улога да сузбије сигнал докле год је проба интактна. Ова реакција је рађена за сваки узорак кДНК туморског и здравог ткива (један пацијент) увек у трипликату. У рекацију су се поред 1 μl кДНК, стављали прајмери или граничници за одговарајући регион гена који се квантитативно испитује. Прајмери и пробе су дизајнирани применом посебних програма LightCycler Probe Designer Software 2.0 (Roche, Манхајм, Немачка). Величина прајмера и проба је око 20 нуклеотида, а регион који је амплификован био је око 200 базних парова. Такође, приликом дизајнирања важно је да проба буде на споју 2 егзона (кодирајући региони) и да температура анилинга буде за око 10C° већа од температуре анилинга прајмера, како би било довољно времена за везивање проба, пре него буду уклоњене од стране Taq полимеразе. У микс поред узорка стављена је Taq ДНК полимераза. Такође се додаван пуфер за оптимално дејство полимеразе и $MgCl_2$ јер доприноси специфичном везивању пробе за узорак.

За све три методе детекције је карактеристично да пролазе кроз четири фазе циклуса. Прва је фаза денатурације која се ради на 95C° где долази до раздвајања двоструког ланца. Друга је анилинг фаза или фаза хибридизације и обично се ради на 55C° када се хидролизациона проба везује за специфично место на молекулу ДНК. У овој фази циклуса се везују и прајмери (граничници) недалеко удаљени од места везивања хидролизационе пробе. Трећа је фаза елонгације која се ради на 62C° и у овој фази је значајна улога Taq ДНК полимеразе. Taq ДНК полимераза уграђује нове нуклеотиде од прајмера тј. у 5'-3' правцу и како наилази на пробу, исеца је и ослобађа репортер боју од сузбијајуће боје, па је сигнал слободан и може да се региструје компјутерски. Четврта фаза је детекција. У овој фази, интензитет сигнала који ће се детектовати зависи од количине амплификованог узорка, односно ослобођене пробе. Све четири фазе се понављају обично 40 пута, тако да са сваким циклусом продукт је умножен једном или по формули $N=No \times (E)^n$, где No представља количину амплификата на почетку реакције, E је амплификациона ефикасност која је обично негде око 80-90%, n је број циклуса и N је количина амплификованих молекула. Узорци се на крају реакције проверавају на 1% агарозном гелу, тако што се наносе заједно са маркером и на основу величине потврђује тачност амплификованог гена.

Заједно са узорцима пуштени су били и стандарди. Ради се увек минимум пет разблажења стандарда са познатим концентрацијама и увек у трипликату као и узорци. Када су се узорци и стандарди амплификовали довољно пута, крива почне да расте сразмерно експресији гена и излази из тзв."background-a". У том моменту се сигнал детектовао а тачка изласка се назива "Crossing point" или скраћено Cp. С обзиром да се стандардна крива радила са пет разблажења добило се и пет Cp тачака. На основу величине и количине стандарда прерачунати су амоли (amoles) сваког стандарда, а затим су вредности логаритмоване како би биле престављене на X оси. У посебним колонама се уписују вредности Cp за сваки стандард које је компјутер срачунао (јер је рађено у трипликату) и средња вредност трипликата, која као таква се уписују на Y осу. Према томе цртао се график, који је на X оси представљао логаритмоване вредности стандарда (logamoles), а на Y оси средњу вредност Cp свих 5 задатих стандарда. Компјутерски се цртала и рачунала једначина праве, преко које се касније прерачунава генска експресија гена узорка.

Када се израчунала експресија гена од интереса на основу вредности Cp које су добијене након анализе, прерачунавали су се логамоли који су се добијаји из једначине праве (вредност X), затим су се прерачунавале вредности амоли по μg РНК (антилогаритам) који је коришћен за прављење кДНК. Након анализе гена од интереса за сваки узорак је урађен и β-актин такође на предходно описан начин. β-актин је конститутивно експримиран ген у ћелијама и у већини случајева резулати добијени за експресију гена од инетерса (у амолима по μg РНК) се деле са вредностима β-актина што је урађено и за наше узорке. Добијене вредности су представљене графички.

3.4 Изолација протеина и Western blot

Туморско и околно здраво ткиво су се одмеравали на леду до 100 mg. Ткива су се хомогенизовала ручно и у сваку тубу је стављено по 1 ml RIPA пуфера (1M Tris-HCl, 0.5 M EDTA, 10% SDS, 10% деоксихолна киселина, Triton-X100), фенилметан-сулфонилфлуорид или фенилметилсулфонил флуорид (PMSF), који је серин протеазни инхибитор и коктел протеазних инхибитора (Protease Inhibitor Coctail Tablets, Roche, Манхајм, Немачка). RIPA пуфер врло ефикасно лизира и издваја протеине из ћелија тј. мембранске, нуклеарне и цитоплазматске протеине. Након додавања пуфера, узорци су се остављали на леду 30 минута и сонификовали 3 пута по 10 секунди са 1 минутом паузе. Сонификација је процес којим се електрични сигнал преводи у физичку вибрацију, при чему делујући на ћелију, доводи до цепања ћелије на делове. Узорци су се стављали на лед 30 минута, цетрифугирали 20 минута на +4°C и извлачили супернатанти, одакле су се мерели протеини.

Након изолације мерени су протеини на спектофотометру таласне дужине од 595 nm. Коришћен је пуфер (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, Херкулес, САД) и коме су се растварали и узорци и стандарди. За стандард је коришћен говеђи серум албумин (BSA, Bio-Rad, Херкулес, САД) у 10 разблажења. На основу 10 вредности добијених мерењем бовин албумин серума на спектофотометру цртана је крива, добијена једначина праве на основу које се прерачунавала концентрација протеина узорака.

За сепарацију протеина туморског и околног здравог ткива коришћен је содиум додецил сулфат-полиакриламид гел електрофореза (SDS-PAGE, Invitorgen, Карлсбад, САД). Након електрофорезе радио се трансфер од 20V 2 сата на нитроцелулозну мембрану. Мембрана је затим била блокирана 1 сат са 5% млеком са 0.1 Tween 20 на собној температури а затим и примарним антителом преко ноћи на +4°C. Коришћена су разна примарна антитела VEGF (Santa Cruz Biotechnology, Санта Круз, САД), EPO (Santa Cruz Biotechnology, Санта Круз, САД), EPOR (Santa Cruz Biotechnology, Санта Круз, САД), HIF-1α (BD Transduction Laboratories, Сан Хозе, САД), PHD1 (Santa Cruz Biotechnology, Санта Круз, САД), PHD2 (Santa Cruz Biotechnology, Санта Круз, САД), p44/p42 (Cell Signaling, Данверс, САД), Akt (Cell Signaling, Данверс, САД), Hsp 90 (Cell Signaling, Данверс, САД), JAK2 (Cell Signaling, Данверс, САД) и STAT5 (Cell Signaling, Данверс, САД). Као секундарно антитело коришћена је пероксидазом обележено анитело IgG класе. Филмови (X-ray, AGFA, Мортсел, Белгија) су коришћени за визуализацију протеина који су појачани хемилуминисценцијом секундарних антитела (ECL, Amresham Pharmacia Biotech, Пискатавеј, САД). Мембране су затим стриповане са 0.2 M NaOH 10 минута на собној темепературии, испране, блокиране 1 сат са 5% млеком са 0.1 Tween 20 на собној температури, инкубиране са β-актином (Santa Cruz Biotechnology, Санта Круз, САД) преко ноћи на +4°C и сликане на филму. Сви филмови су скенирани а сваки бенд протеина посебно квантификован и нормализован у односу на β-актин вредности.

3.5 Ендотелијалне ћелије

Експериментални део гајења ендотелијалних ћелијских линија у нормалним и хипоксичним условима је урађен у Националном Институту за дијабетес, дигестивне болести и болести бубрега, Секцији за молекуларну биологију ћелија при Националним институтима за здравље (NIDDK, Nationl Institutes of Helath, NIH) у Бетезди, САД.

Користишћене су две врсте ендотелијалних ћелија, ћелијска линија- transform human bone marrow endothelial cells (TrHBMEC) и примарне ћелије плућа, human microvascular endothelial cells from lung (HMVEC-L) гајене у инкубатору (Forma Scinetific, Мариета, Охајо, САД) на 37°C са 5% CO_2 и 95% осталих гасова. TrHBMEC су расле у медији- DMEM (Dulbecco modifified Eagle medium) са 10% серума- FBS (fetal bovine serum), 3mM глутамина, 1 µg/ml фолне киселине, 50 µg/ml пеницилина и 50 µg/ml стептомицина. Пре него што су ћелије стављане у инкубатор са сниженом количином кисеоника и третиране EPO (5U/ml), ћелије су трипсинизоване, испране са PBS-ом и стављане у медију са 2% FBS, 3mM глутамина, 1 µg/ml фолне киселине, 50 µg/ml пеницилина и 50 µg/ml стрептомицина. HMVEC-L су расле у ендотел базалној медији (EBM-2 или EBM-2MV) са 2% FBS и цитокинима (хуман ендотелни, VEGF, хуман фибробластни и инсулин зависни фактор раста) или 5% FBS и цитокинима. Обе врсте примарних ћелија пре него што су третиране EPO, трипсинизоване су, испране са HEPES пуфером и гајене у EBM-2 медији у којој се налазио 1% FBS-a за HMVEC-L и цитокинима и потом коришћене за експерименте са сниженом количином кисеоника (2% O_2).

3.51 Изолација РНК и Real time PCR ендотелијалних ћелија

Након инкубације ендотелијалних ћелија у 21% и 2% O_2, ендотелијалне ћелије су коришћене за изолацију РНК. За саму изолацију коришћен је STAT 60 (Tel-Test, Френдсвуд, Тексас, САД) и сваки узорак је третиран са RNase-Free DNase (Promega, Медисон, Висконсин, САД). Тотална РНК сваког узорка је коришћена за синтезу кДНК са реверзном транскриптазом и олиго d(T)16 (Applied Biosystems, Фостер Сити, Калифорнија, САД). Квантитативни real time је рађен на 7700 или 7900 Sequence Detector и са Taqman олигинуклеотидним пробама (Applied Biosystems, Фостер Сити, Калифорнија, САД).

3.52 Изолација протеина и Western blot ендотелијалних ћелија

TrHBMEC су 2 пута испиране са хладним PBS док су HMVEC-L исприране са HEPES пуфером и одвајане са дна посуде. Ћелијски лизат је центрифугиран 10 минута и супернатант је пребациван у нову тубу. За EPOR анализу, 1 mg протеина је инкубиран са EPOR поликлонским антителом у разблажењу 1:1000 преко ноћи на 4°C. Следећи дан је у имунокомплекс додавана протеин-А-агароза (Santa Cruz Biotechnology, Санта Круз, САД), затим су тубе стављане у орбитални шејкер два сата на 4°C. Тубе су центрифугиране а затим су имунокоплекси oпрани 2 пута са хладним PBS и били спремни за наливање на гел. Даља процедура електрофорезе и трансфера је напред описана.

За анализу MAPK и Akt фосфорилације, TrHBMEC су опране са хладним PBS, остављене у медију без серума 6 сати и затим третиране са EPO на 15, 30 и 60 минута са/без MAPK инхибитора PD98059 (50μM). Ћелије су затим лизиране а протеини су били инкубирани са фосфоMAPK/MAPK (pMAPK/MAPK) и фосфоAkt/Akt антителима (pAkt/Akt) (Cell Signaling, Данверс, САД) преко ноћи. Протеини су били одвајани на SDS-PAGE гелу и преношени на нитроцелулозну мембрану где су и визуализовани хемилуминисценцијом. Мембрана је затим била стрипована, испрана, блокирана млеком и инкубирана са MAPK и Akt антителима преко ноћи на 4°C. Следећи дан мембране су сликане за добијање тоталног MAPK и Akt.

3.6 Статистичка анализа

Континуалне варијабле су претстављене као средња вредност ± SD. Разлике између континуалних варијабли су детектоване анализом варијанси (ANOVA) или парним *t* тестом према потреби. Разлике између категоријских варијабли би се утврђивале по потреби χ^2 тестом. Pearson-ов коефицијенат је коришћен за процену међусобне повезаности варијабли. Независни предиктори биолошких карактеристика тумора би се одређивали применом мултиваријантне логистичке регресионе анализе.

4.0 Резултати

4.1 Секвенцирање VHL гена из крви и туморског ткива пацијената са RCC

VHL ген се налази на краћем краку хромозома 3 (3p25.3)[114]. Ген се састоји из 3 егзона, 1 егзон је од 1-113 кодона (нуклеотиди 1-340), егзон 2 је од 114-154 кодона (нуклеотиди 341-463) и егзон 3 је од 155-213 кодона (нуклеотиди 464-642)[115]. *VHL* ген кодира VHL протеин који се секретује у две изоформе: 30 kDa цео протеин (p30, 213 аминокиселина, NM_000551.2) и 19 kDa протеин (p19, 160 аминокиселина NM_198156.1), добијен алтренативном транслацијом на позицији 54 кодона 1 егзона *VHL* ген[116]. За обе изоформе протеина је показано да супримују туморску формацију у експериментима на мишевима, а такође обе регулишу HIF-1.

Директним секвенцирањем сва 3 егзона *VHL* гена у туморском ткиву оболелих пацијената пронађене су три тачкасте мутације, десет делеција, једна делеција са инсерцијом и један полиморфизам (Табела 1). Две тачкасте мутације су нађене у 1 егзону *VHL* гена, c.263G>T са супституцијом триптофана у леуцин (p.Trp88Leu) и друга c.214T>C са супституцијом серина у пролин (p.Ser72Pro). У егзону 2 *VHL* уочена је тачкаста мутација c.343C>T са супституцијом хистидина у тирозин (p.His115Tyr). Потврђено је 10 делеција у туморским узорцима тумора бубрега, у егзону 1 *VHL* гена у три узорка нађена је делеција једног нуклеотида c.317del кодон 106, c.189del кодон 63, c.258del кодон 86, затим у једном узорку делеција 12 нуклеотида c.270_281del кодон 90 и делеција 26 нуклеотида у 89 кодону (c. 267_292del). У егзону 2 *VHL* гена, делеција 1 нуклеотида је детектована у два узорка тумора, c.346del, кодон 116 и c.439del кодон 147, затим делеција 2 нуклеотида c.358_359del у 120 кодону и 3 нуклеотида c. 364_366del у 122 кодону. У само једном узорку тумора пронађена је делеција 2 нуклеотида у егзону 3 *VHL* гена c.530_531del у 177 кодону. Делеција 5 нуклеотида и инсерција 1 нуклеотида је уочена је у узорку тумора у егзону 1 *VHL* гена c.172_176delinsG у 58 кодону. Секвенцирање ДНК за *VHL* ген је такође урађено и у околном, контролном здравом ткива и у узорцима крви оболелих пацијената и наведене промене нигде нису нађене, што говори у прилог чињенице да су промене стечене у ткиву бубрега и да су довеле до туморске трансформације. Изузетак чини један полиморфизам, који је пронађен у крви, туморском ткиву и околном здравном ткиву.

Табела 1. Мутације у 15 узорака тумора бубрега добијене секвенцирањем

RCC	**Мутација**	**Кодон**	**Егзон**
RCC 1	c.263G>T	88	1
RCC 2	c. 364_366del	122	2
RCC 3	c.346del	116	2
RCC 4	c.317del	106	1
RCC 5	c.439del	147	2
RCC 6	c.74C>T (SNP)	25	1
RCC 7	c. 267_292del	89	1
RCC 8	c.172_176delinsG	58	1
RCC 9	c.530_531del	177	3
RCC 10	c.270_281del	90	1
RCC 11	c.189del	63	1
RCC 12	c.258del	86	1
RCC 13	c.358_359del	120	2
RCC 14	c.343C>T	115	2
RCC 15	c.214T>C	72	1

4.2 MLPA из крви и туморског ткива пацијената са RCC

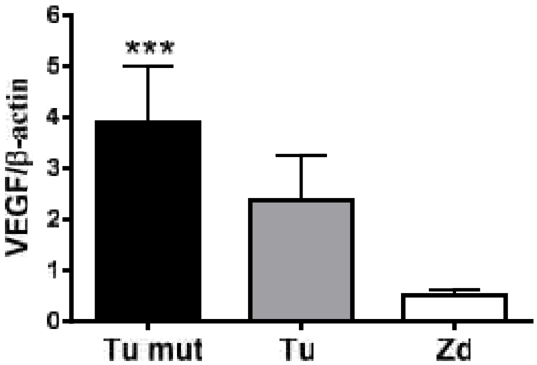
MLPA је метода детекције великих делеција и дупликација. Код свих преосталих узорака ткива пацијената код којих секвенцом нису пронађене промене у сва 3 егзона *VHL* гена урађена је MLPA метода. Установљено је да од преосталих 35 узорака ткива у 11 узорака тумора пронађена делеција и у 3 узорка дупликација једог од егзона *VHL* гена. У околном здравом ткиву нису нађене промене.

На основу добијених резултата детекција мутација и великих делеција *VHL* гена, установили смо да од 50 узорака туморског ткива у 58% узорака су детектоване промене.

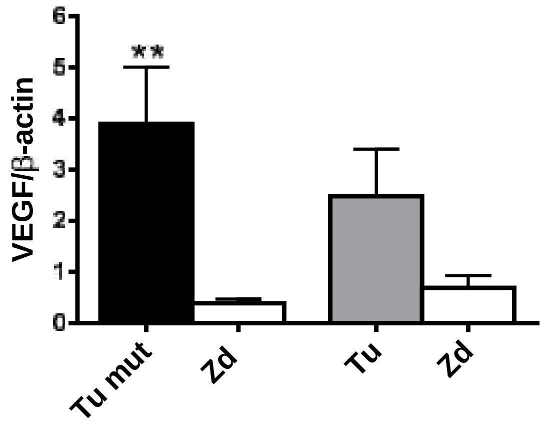
4.3 Експресија VEGF, VEGFR-1 и VEGFR-2 у туморском ткиву пацијената са RCC

Мутација у *VHL* гену доводи до конститутивне активације HIF пута и про-ангиогенетских гена као што је *VEGF*, његови рецептори и *EPO*. На основу анализе узорака ткива тумора са мутацијом и ткива без мутације у *VHL* гену и околног здравог ткива бубрега, показано је да постоји стастистички значајна разлика у експресији VEGF иРНК у туморском ткиву у односу на околно здраво ткиво (Слика 1А) ($p<0.001$). Када је раздвојено ткиво са/без мутације у *VHL* гену и њихово околно здраво ткиво, показано је да постоји статистички значајно већа експресија ($p<0.01$) VEGF иРНК у туморима са мутацијом у VHL гену и до 8 пута је већа у односу на околно ткиво (Слика 1Б). Такође је већа експресија VEGF иРНК у туморима без мутације у односу на њихово околно здраво ткиво (Слика 1Б).

А.



Б.



Слика 1. Експресија VEGF у туморима бубрега. (А) VEGF експресија је детектована квантитативним “real time PCR”, у туморима са мутацијом у VHL гену у туморима без мутације у VHL гену и у околном здравом ткиву . (Б) “Real time PCR” VEGF, у туморима са мутацијом у VHL гену , у туморима без мутације у VHL гену и у околном здравом ткиву . Резултати су нормализовани у односу на β-актин. (***p<0.001; **p<0.01). Грешка представља SD.

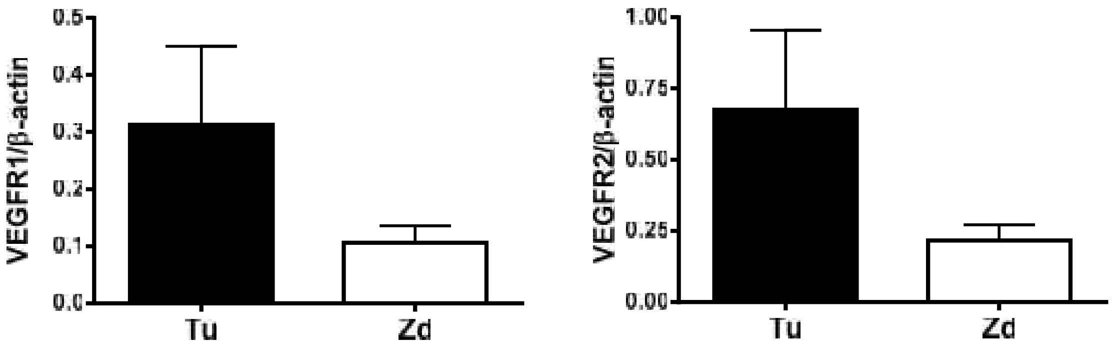
Статистички значајан део варијабилитета у експресији VEGF иRNK у здравом ткиву (65.4%) се објашњава променама у експресији MAPK протеина, као EPO иРНК, и протеинима EPO и VEGF (EPOp и VEGFp) (Табела 2). На варијабилитет у експресији VEGF иRNK утиче MAPK пролиферативни пут (29.4%), с тим да хипоксија активни гени као што су EPO и VEGF протеин (36%) такође имају велики удео у варијабилитету VEGF иRNK у здравом ткиву. У туморима са и без мутације у *VHL* гену значајан део варијабилитета у експресији VEGF иRNK има HIF-1α транскрипт, у туморима са мутацијом 54.3% док у туморима без мутације 50.6% (Табела 2). Takođe, у туморима без мутације у *VHL* гену, пролиферативни пут, Акт има извесног удела у варијабилитету VEGF иРНК (21.5%).

Узорак	Variables in Equation	Coefficient B	SE (B)	*P* Value	Model R^2
Здраво ткиво					
	1. MAPK	0.624	0.12	p<0.001	29.4
	2. EPO иРНК	320.4	81.460	p<0.001	44.6
	3. EPOp	-0.858	0.223	p<0.001	55.2
	4. VEGFp	0.452	0.132	0.001	**65.4**
Тумори са мутацијом					
	1. HIF-1α иРНК	233.7	42.0	p<0.001	**54.3**
Тумори без мутација					
	1. HIF-1α иРНК	12.9	19.9	p<0.001	50.6
	2.Akt	1.8	0.477	0.001	**72.1**

Табела 2: Мултипла регресиона анализа са VEGF иРНК зависном варијаблом

VEGF се везује за 2 своја рецептора, један је VEGFR-2 (Flk-1, KDR) и VEGFR-1 (Flt-1). Везивањем за VEGFR-2 стимулише пролиферацију ендотелијалних ћелија, миграцију и преживљавање а преко VEGFR-1 такође утиче на ангиогенезу, с тим што се он сматра негативним модулатором прекомерне секреције VEGF и стимулације сигналног пута током развоја. На основу урађене генске квантификације VEGFR-1 (Слика 2А) и VEGFR-2 (Слика 2Б) у туморском и здравом ткиву, добијено је да су оба рецептора више експримирана у туморском него у здравом ткиву, без статички значајне разлике. Резултати такође указују да је експресија VEGFR-2 већа у односу на експресију VEGFR-1 у анализираним узорцима. Посматрана је и експресија оба рецептора одвојено у туморима са мутацијом и у туморима без мутације у *VHL* гену и показана је слична експресија (резултат није приказан).

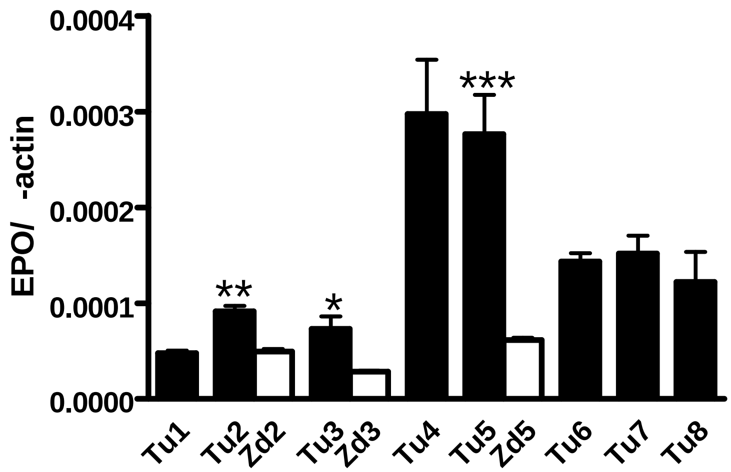
А. Б.



Слика 2. Експресија VEGFR у туморима бубрега. (А) VEGFR-1 експресија је детектована квантитативним “real time PCR”, у свим туморима ■ и у околном здравом ткиву □. (Б) VEGFR-2 експресија је детектована квантитативним “real time PCR”, у свим туморима ■ и у околном здравом ткиву □. Резултати су нормализовани у односу на β-актин. Грешка представља SD.

4.4 Експресија EPO и EPOR у туморском ткиву пацијената са RCC

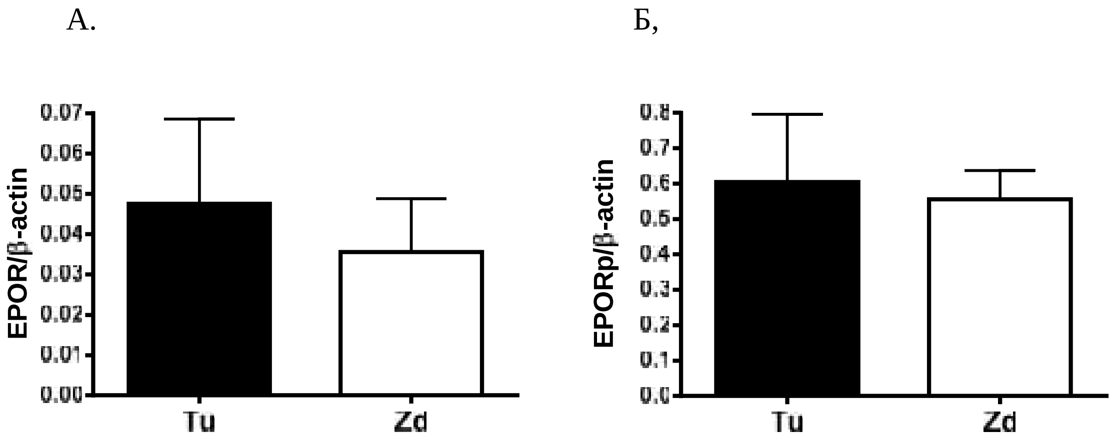
Анализирањем узорака туморског и здравог ткива пацијената путем “Real time PCR” методе, добијено је да 23 од 50 узорка је показало експресију на EPO. Такође, експресија у туморском ткиву није сваки пут пратила и експресију у здравом ткиву. Највероватнији разлог је што експресија EPO није униформна у целом ткиву него само у перитубуларним интерстицијалним ћелијама бубрега[16], како је већ напоменуто. На слици 3 приказана је експресија EPO у осам узорака тумора испод 30-тог циклуса и код само три узорка детектована је статистички значајна (*$p<0.05$; **$p<0.01$, ***$p<0.001$) експресија EPO у односу на околно здраво ткиво. Код осталих узорака тумора није детектована или је експресија била јако мала у околном здравом ткиву.



Слика 3. Експресија ЕРО у туморима бубрега. ЕРО експресија је детектована квантитативним “real time PCR”, у туморима ■ и у околном здравом ткиву □. Код три узорка урађена је компарација експресије ЕРО у односу на околно здраво ткиво ($p<0.001$; $p<0.01$; $p<0.05$). Резултати су нормализовани у односу на β-актин. Грешка представља SD.

Такође након провере хистопатолошких налаза, установљено је да већина тумора који су показали експресију ЕРО су светлоћелијски тумори и да су два тумора била онкоцитоми.

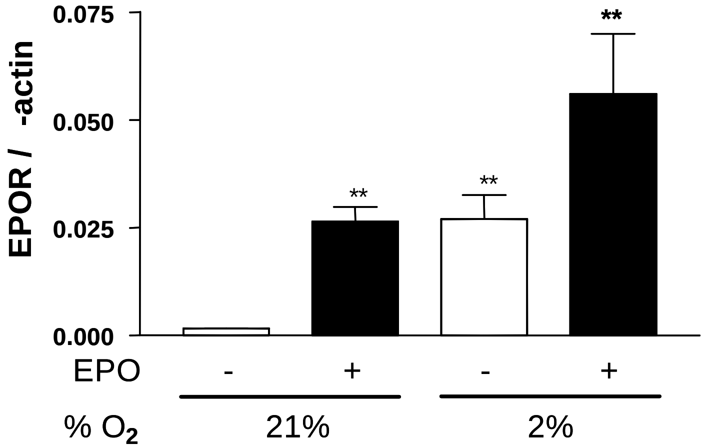
С обзиром да ЕРО своје дејство остварује везујући се за EPOR, урађена је и експресија EPOR у свим туморским и околним здравим ткивима. Класичан “Western blot” EPOR није приказан, само резултат добијен квантификацијом EPOR протеина и β-актин као контроле у свим узорцима. Анализирањем екпресије EPOR како на транскрипционом (Слика 4А) тако и на нивоу протеина (Слика 4Б), показано је да експресија постоји у свим узорцима туморског и здравог ткива, али без статистички значајне разлике у експресији.



Слика 4. Експресија EPOR у туморима бубрега. (А) EPOR експресија је детектована квантитативним “real time PCR”, у свим туморима ◆ и у околном здравом ткиву □ (Б) “Western blot” EPOR у свим туморима ◆ и у околном здравом ткиву □ . Резултати су нормализовани у односу на β-актин. Грешка представља SD.

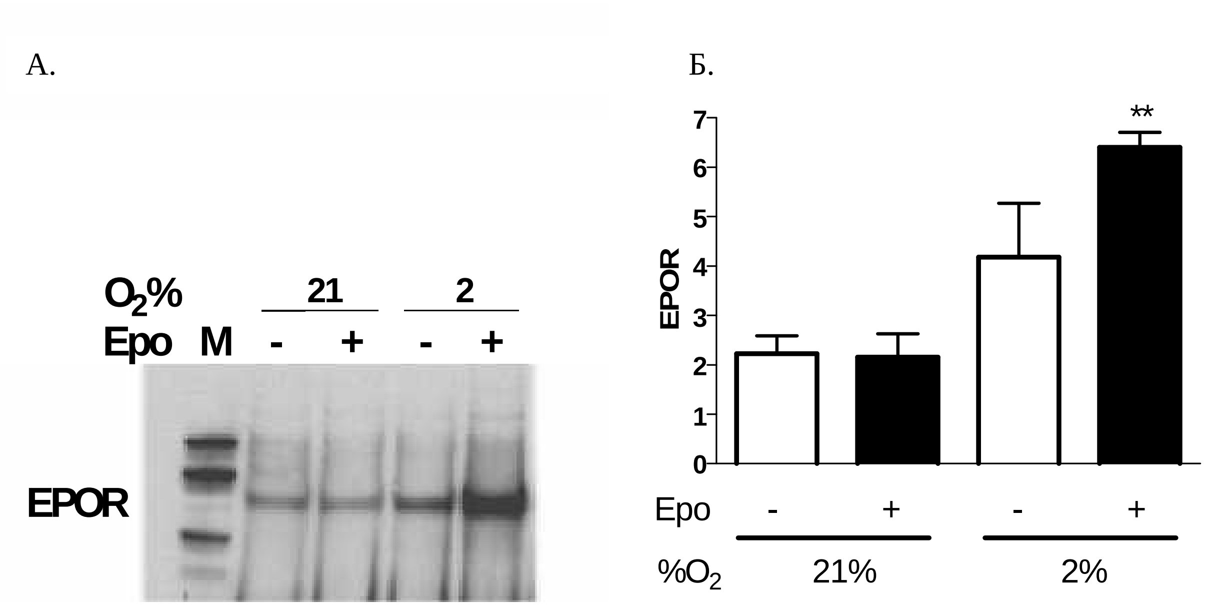
4.5 Експресија EPOR у ендотелијалним ћелијама

Детекција EPOR у ендотелијалним ћелијама у хипоксичним условима (2% O_2) и након стимулације са EPO (5 U/ml) је показана на нивоу ендотелијалних ћелија костне сржи[23]. У нашим експериментима смо испитивали експресију EPOR на нивоу микроваскуларних ендотелијалних ћелија (HMVEC-L) у нормалним условима (21% O_2) и условима снижене концентрације кисеоника (2% O_2) након 48h узгајања. Стимулација са EPO довела је до индукције EPOR иРНК у условима нормалне количине кисеоника (Слика 5). Такође повећана експресија EPOR иРНК је детектована и у условима снижене количине кисеоника (2% O_2) а додавање EPO је дупло повећало експресију EPOR.



Слика 5. Експресија EPOR у HMVEC-L ћелијама. EPOR експресија је детектована квантитативним "real time PCR" у 21% и 2% кисеоника у узорцима без EPO □ и са 5U/ml EPO ■. Резултати су нормализовани у односу на β-актин. (**p<0.01). Грешка представља SD

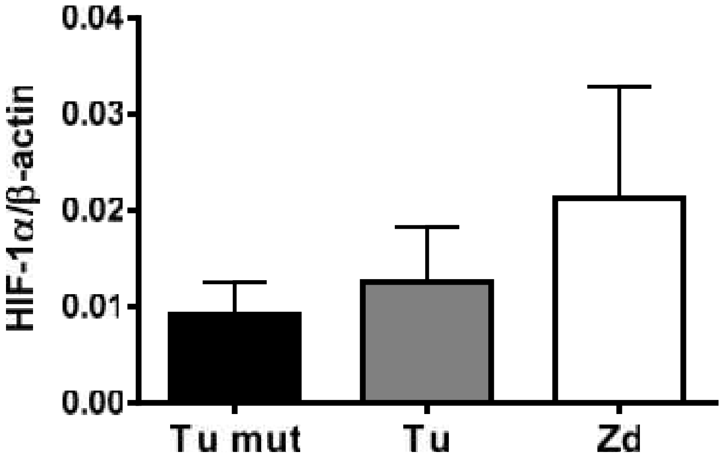
"Western blot" је показао да након стимулације са EPO у HMVEC-L ћелијама у условима снижене количине кисеоника EPOR је био индукован више од 3 пута у поређењу са експресијом протеина у 21% (Слика 6 А, Б). И поред тога што EPO није имао ефекта на експресију EPOR протеина у 21% кисеоника, "Western blot" је показао сигнификантну индукцију EPOR након EPO стимулације у условима снижене концентрације кисеоника (2% O_2), што свакако указује на повећану активност EPOR након стимулације EPO у условима хипоксије.



Слика 6. Western блот EPOR протеина у HMVEC-L ћелијама. Експресија EPOR протеина у узорцима. (Б) Квантификација протеина EPOR у у узорцима без ЕРО □и са 5U/ml ЕРО ◆ (**p<0.01). Грешка представља SD.

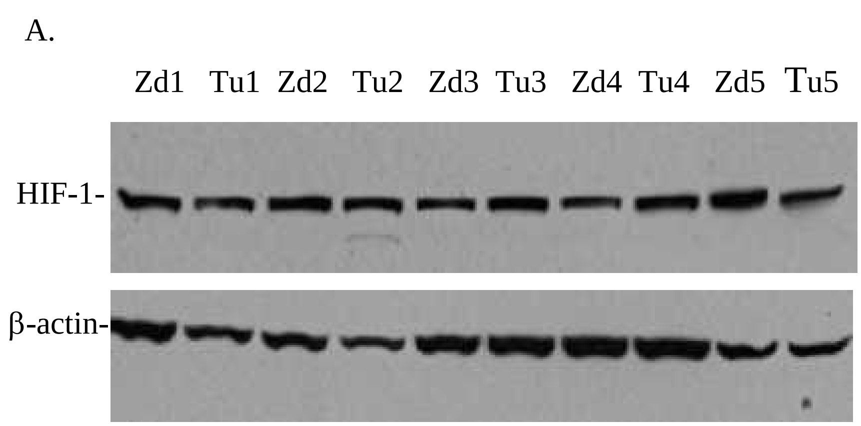
4.6 Експресија HIF-1 у туморском ткиву пацијената са RCC

Раније студије су показале да HIF-1 има битну улогу у развоју RCC нарочито у туморима са мутираним *VHL* геном. Када је урађена експресија HIF-1 на нивоу РНК, експресија је била снижена нарочито у туморима са мутираним *VHL* геном али без статистички значајне разлике у односу на туморе без мутације у *VHL* гену и околном здравом ткиву (Слика 7).

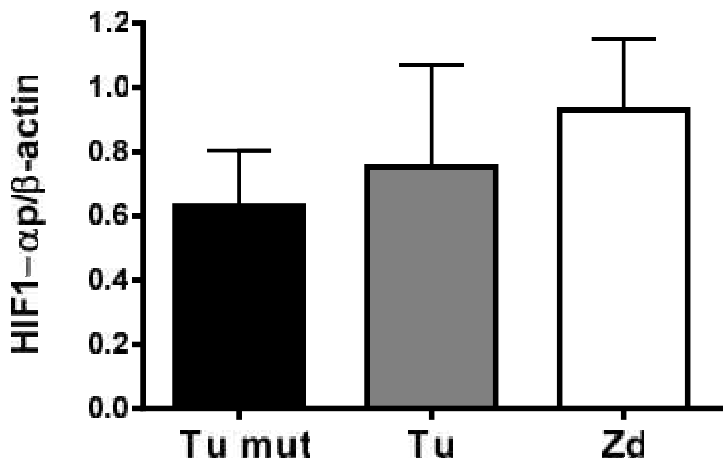


Слика 7. HIF-1 експресија је детектована квантитативним “real time PCR”, у туморима са мутацијом у *VHL* гену ■, у туморима без мутације у *VHL* гену ■ и у околном здравом ткиву □. Резултати су нормализовани у односу на β-актин. Грешка представља SD.

HIF-1 експресију на нивоу РНК је пратила и слична експресија и на нивоу протеина. У експериментима који су урађени на нивоу HIF-1 протеина (Слика 8А) у туморима и у околном здравом ткиву, показано је да HIF-1 експримиран у свим узорцима. На основу квантификације експресије протеина показано је да нема статистички значајне разлике у експресији HIF-1, без обзира да ли се ради о туморима са или без мутације у *VHL* гену у односу на здраво ткиво (Слика 8Б).



Б.



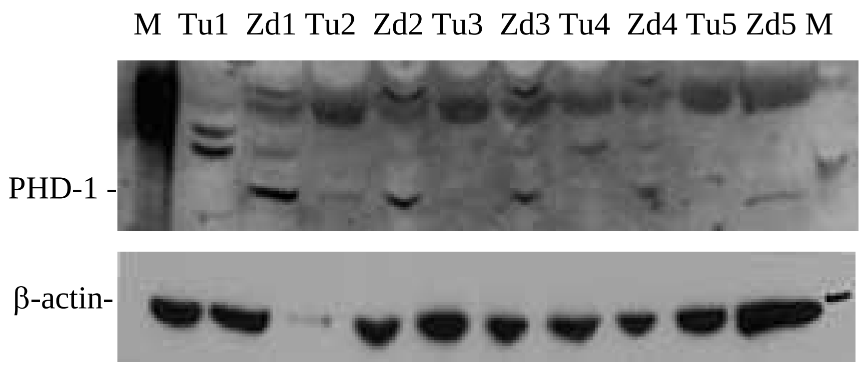
Слика 8. Експресија HIF-1 у туморима бубрега. (А) Western blot за HIF-1 протеин у туморима и околном здравом ткиву. (Б) Квантификација протеина у узорцима са мутараним *VHL* геном ◆у туморима без мутације у *VHL* гену ■ и у околном здравом ткиву □. Резултати су нормализовани у односу на β-актин. Грешка представља SD.

4.7 Експресија PHD1, PHD2 у туморском ткиву пацијената са RCC

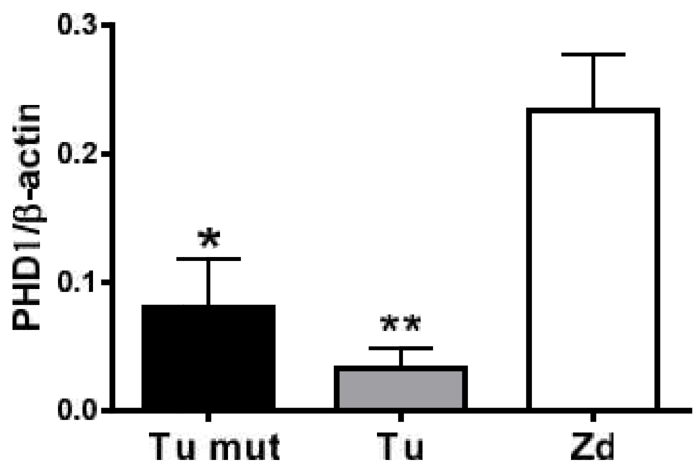
У условима нормалне количине кисеоника, способност HIF-1-α да активира транскрипцију гена је спречена HIF хидроксилацијом са пролил хидроксилазама, PHD1 и PHD2. VHL протеин се везује за хидроскилизован HIF усмеравајући HIF-1-α ка убиквитинацији и деградацији са 26S протеозомима.

На основу анализе експресије PHD1 протеина Western блотом, показано је да је експресија протеина у туморском ткиву изостаје или је смањена у односу на здраво ткиво у којем је увек присутно (Слика 9А). β-актин је коришћен као интерна контрола присуства протеина. Квантификацијом свих узорака протеина и околног ткива, установљено је да експресија статистички значајно снижена у туморима са мутацијом у *VHL* гену ($p<0.05$), нарочито у туморима без мутације у *VHL* гену ($p<0.01$) у поређењу са околним здравим ткивом (Слика 9Б).

A.



Б.



Слика 9. Western блот PHD1 протеина. (A) Експресија PHD1 и β-актина протеина у узорцима тумора и околног здравог ткива. (Б) Квантификација протеина PHD1 у туморима са мутацијом у VHL гену ■, у туморима без мутације у VHL гену ■ и у околном здравом ткиву □ (**p<0.01; *p<0.05). Резултати су нормализовани у односу на β-актин. Грешка представља SD.

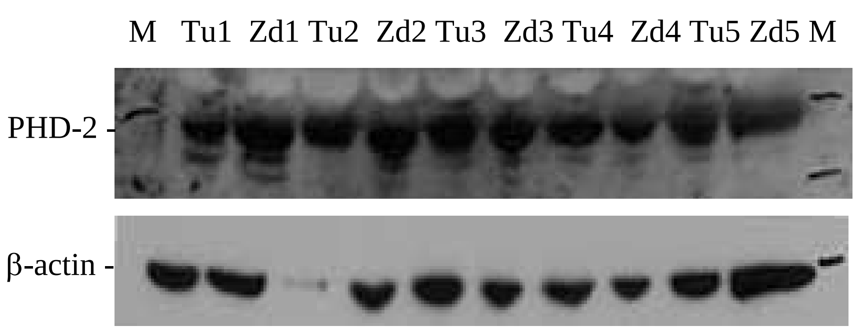
Урађена је мултипла регресиона анализа где је PHD1 протеин била зависна варијабла и једино у туморима са мутацијом је пронађен значајни удео у варијабилитету. Па се тако варијабилитет PHD1 протеина само у туморима са мутацијом (78%) се може објаснити великим уделом у променами са EPO протеином (EPOp) (72.8%) и мањим уделом са PHD2 протеином (5.2%) (Табела 3).

Узорак	Variables in Equation	Coefficient B	SE (B)	*P* Value	Model R^2
Тумори са мутацијом					
	1. EPOр	5.115	0.628	0.001	72.8
	2. PHD2	0.138	0.056	0.021	**78.0**

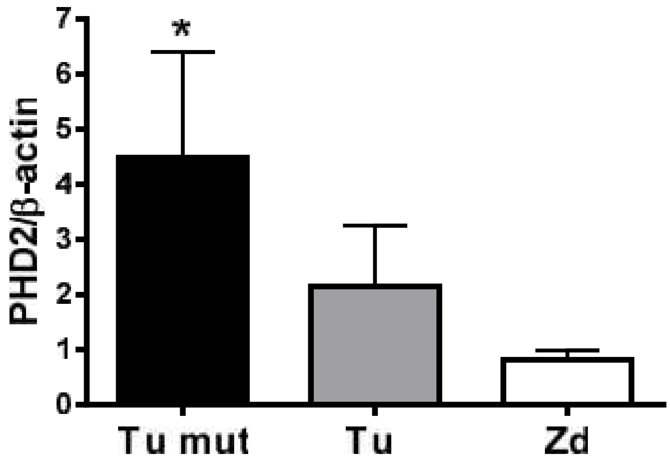
Табела 3. Мултипла регресиона анализа са PHD1p зависном варијаблом

За разлику од PHD1 протеина, PHD2 је експримиран у свим узорцима тумора и околном здравом ткиву (Слика 10А). Квантификација PHD2 протеина је показала значајну статистичку експресију протеина у туморима са мутацијом у *VHL* гену ($p<0.05$) као и већу експресију у осталим туморима у односу на околно здраво ткиво (Слика 10Б). Поређењем експресије PHD1 и PHD2 протеина у узорцима, уочава се израженија експресија PHD2 протеина у односу на PHD1 протеин.

A.



Б.



Слика 10. Western блот PHD2 протеина. (А) Експресија PHD2 протеина и β-актина у узорцима тумора и околног здравог ткива. (Б) Квантификација протеина PHD2 у туморима са мутацијом у VHL гену ■, у туморима без мутације у VHL гену ■ и у околном здравом ткиву □ ($*p<0.05$). Резултати су нормализовани у односу на β-актин. Грешка представља SD.

Значајан део варијабилитета у експресији PHD2 (71.3%) у туморима са мутацијом се може објаснити променама у протеинима Hsp90 и PHD1 (Табела 4). Велики део удела у променама PHD2 протеина се може објаснити утицајем Hsp90 (40.3%) као и узајамном дејству пролил хидркслаза тј са PHD1 (31.3%) у туморима са мутацијом у VHL гену. С друге стране у туморима без мутације у *VHL* гену значајан део варијабилности у PHD2 (71.3%) настаје због промена у експресији MAPK протеина (Табела 4).

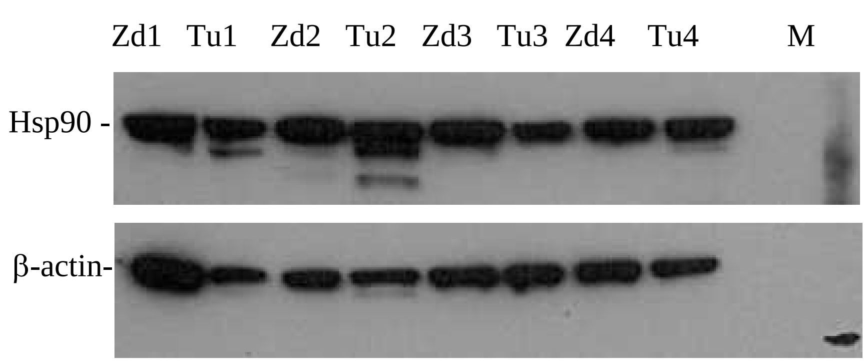
Узорак	Variables in Equation	Coefficient B	SE (B)	*P* Value	Model R^2
Тумори са мутацијом					
	1. Hsp90	6.459	0.967	p<0.001	40.3
	2. PHD1	0.963	0.182	p<0.001	**71.3**
Тумори без мутација					
	1. MAPK	1.818	0.298	p<0.001	**71.3**

Табела 4. Мултипла регресиона анализа са PHD2p зависном варијаблом

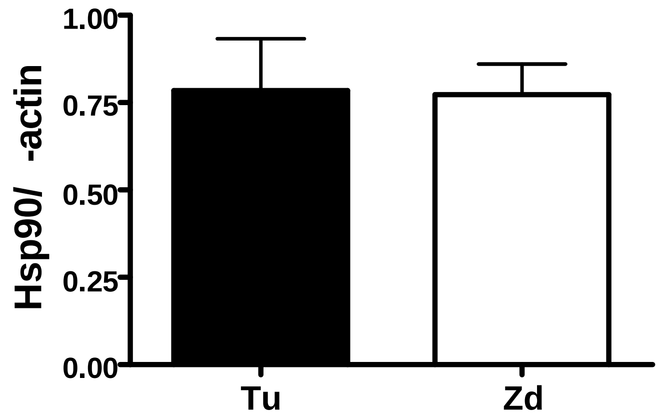
4.8 Експресија Hsp90 у туморском ткиву пацијената са RCC

HIF-1-α протеин такође има способност везивања за Hsp90 путем механизма потпуно независног од кисеоника и VHL-а, чиме стабилизује своју активност. На основу урађеног Western-а показана је експресији Hsp90 протеина у туморском ткиву и околном здравом ткиву без статистички значајне разлике (Слика 11). Није постојала статистички значајна разлика између тумора са мутацијом и тумора без мутације у односу на здраво ткиво.

A.



Б.



Слика 11. Western блот Hsp90 протеина. (А) Експресија Hsp90 и β-актина протеина у узорцима тумора и околног здравог ткива. (Б) Квантификација протеина PHD1 у свим туморима ■ и у околном здравом ткиву □. Резултати су нормализовани у односу на β-актин. Грешка представља SD.

4.9 Сигнални путеви у туморском ткиву пацијената са RCC

Испитивани су сигнални путеви који су могли бити одговорни за раст и развој тумора. Међу њима су најважнији MAPK и Акт сигнални пут за које је познато да могу биту укључени у туморску пролиферацију. Такође, с обиром да је бубрег примарно место синтезе ЕРО, испитиван је и JAK2-STAT5 пут као последица активације ЕРО и EPOR.

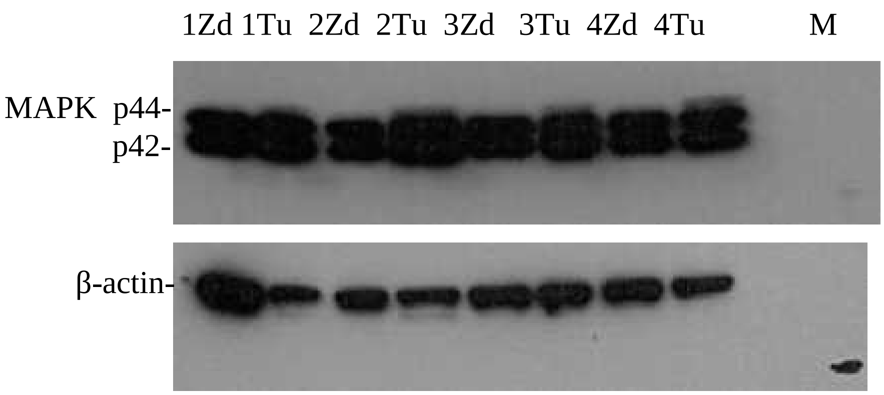
4.91 MAPK пут у туморском ткиву пацијената са RCC

MAPK каскада обухвата Raf/MEK/ERK пут са крајњим ERK1/2 (p44/42) не-рецепторским протеином. С обзиром да се обе форме p44 и p42 митоген активишуће протеин киназе експримирају и детектују заједно, испитивана је свака форма у узорцима са мутацијом и без мутације у *VHL* гену, и у околном здравом ткиву, одвојено и заједно (Слика 12).

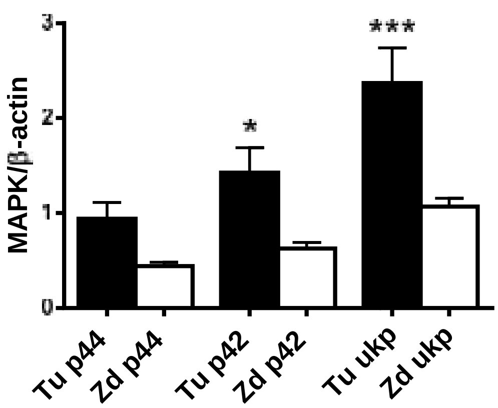
Резултати указују да постији појачана активност MAPK пута у свим узорцима тумора у односу на околно здраво ткиво. Статистичка значајност је показана код p42 форме у туморима без мутације у *VHL* гену ($p<0.05$) у односу на околно здраво ткиво.

Када су сабране обе форме МАРК протеина (p44/p42) добијена је висока статистичка значајност у активацији МАРК пута у узорцима тумора без мутације (p<0.001) и значајна активност у узорцима са мутацијом у *VHL* гену (p<0.05) у односу на околно здраво ткиво, што свакако указује на појачану активност МАРК пута у туморским узорцима.

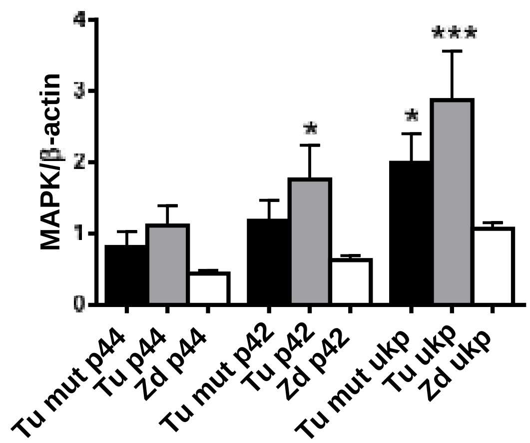
А.



Б.



В.



Слика 12. Western блот МАРК протеина. (А) Експресија МАРК протеина и β-актина у узорцима тумора и околног здравог ткива. (Б) Квантификација протеина МАРК у свим туморима и у околном здравом ткиву. (В) Квантификација протеина МАРК у туморима са мутацијом у *VHL* гену ■ , у туморима без мутације у *VHL* гену ■ и у околном здравом ткиву□(*p<0.05, *** p<0.001). Резултати су нормализовани у односу на β-актин. Грешка представља SD.

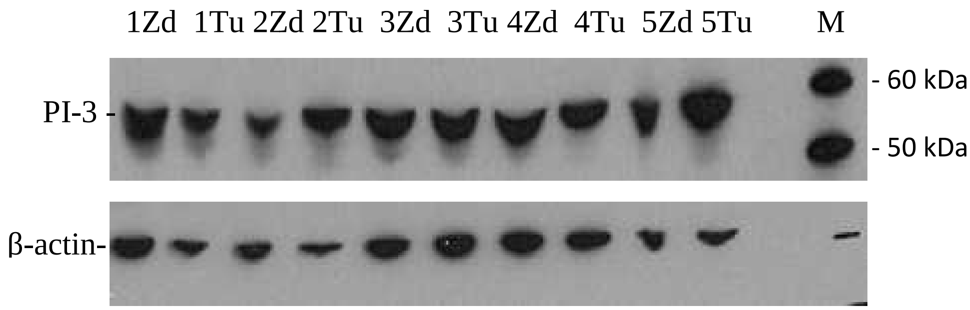
Статистички значајан део варијабилитета у експресији МАРК у здравом ткиву (50.4%) се може објаснити променама у експресији STAT5 и VEGF иРНК (Табела 5). У туморима са мутацијом у *VHL* гену, Акт и Hsp 90 учествују са 47.1% у регулацији МАРК сигналног пута (Табела 5). Велики део варијабилности (93.1%) у експресији МАРК у туморима са функционалним *VHL* геном, објашњавају промене у синтези протеина PHD2 и VEGF (Табела 5).

Узорак	Variables in Equation	Coefficient B	SE (B)	*P* Value	Model R^2
Здраво ткиво					
	1. STAT5	0.337	0.078	p<0.001	29.6
	2. VEGF иРНК	0.381	0.089	p<0.001	**50.4**
Тумори са мутацијом					
	1. Акt	0.454	0.106	p<0.001	29.8
	2.Hsp90	0.819	0.280	p=0.007	**47.1**
Тумори без мутација					
	1.PHD2	0.413	0.033	p<0.001	71.3
	2.VEGFp42	0.284	0.043	p<0.001	**93.1**

Табела 5: Мултипла регресиона анализа са МАРК зависном варијаблом

4.92 PI-3 пут у туморском ткиву пацијената са RCC

Други заначај пут који је показан у онкогенетским процесима је PI-3/Акт пут. Своју значајност је показао и у самом развоју тумора бубрега. На основу анализе експресије протеина PI-3/Акт пут показано је да је протеин експримиран у свим узорцима тумора и околног здравог ткива (Слика 13). Међутим квантификацијом експресије протеина код тумора бубрега без и са мутацијом у VHL гену у односу на околно здраво ткиво није пронађена ститистички значајна разлика.

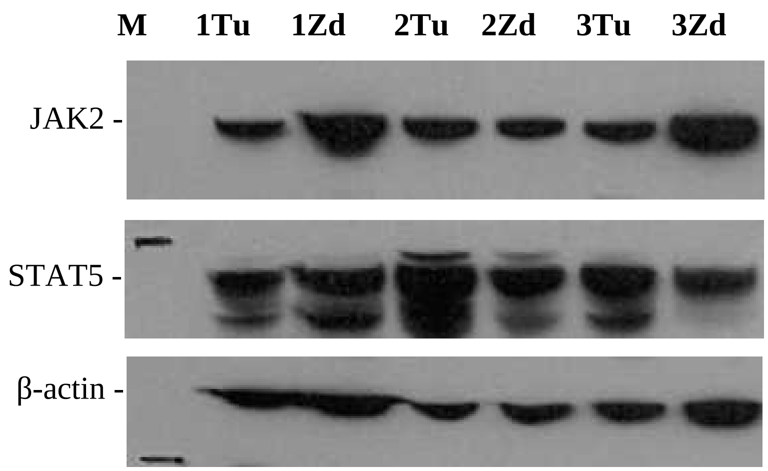


Слика 13. Western блот PI-3 протеина код пет узорака тумора (Tu) и околног здравог ткива (Zd). Резултати су нормализовани у односу на β-актин.

4.93 JAK2-STAT5 пут у туморском ткиву пацијената са RCC

JAK2-STAT5 је тирозин киназни пут који се активира када се EPO веже за EPOR на ћелијској мембрани. Тада долази до димеризације рецептора и активације JAK2 молекула, који долазе близу један другоме индукујући њихову трансфосфорилацију и активацију тј. фосфорилацију сигналних трансдјусера и активатора транскрипције, STAT5. Активација STAT5 доводи до активације специфичне регулаторне секвенце и активирања транскрипције одговарајућих гена.

У узорцима тумора бубрега и околног здравог ткива испитивана је експресија сваког протеина сигналног пута. У свим узорцима и тумора и околног здравог ткива је показана јасна експресија JAK2 и STAT5 протеина (Слика 14). Међутим квантификацијом протеина тумора са и без мутације у VHL гену и околног здравог ткива није нађена статистички значајна разлика. β-actin је коришћен као контрола концентрације стављања протеина.



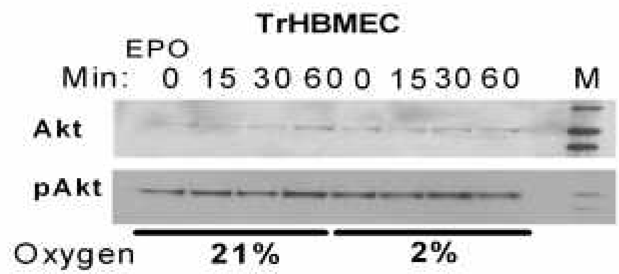
Слика 14. Western блот JAK2-STAT5 пут код три узорака тумора (Tu) и околног здравог ткива (Zd). Резултати су нормализовани у односу на β-актин.

4.10 Сигнални путеви у ендотелијалним ћелијама

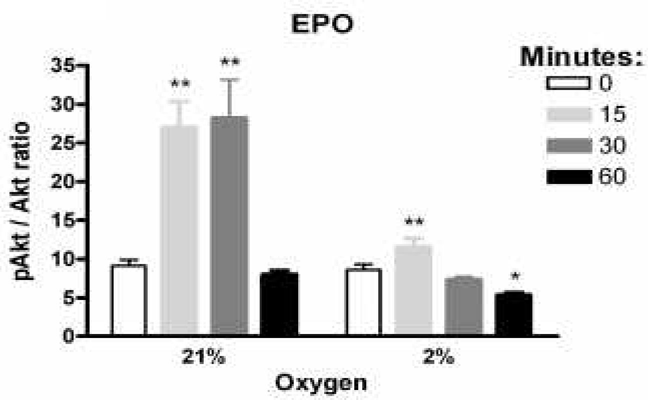
4.101 Експресија Акт пута у ендотелијалним ћелијама

Познато је да EPO стимулише Акт фософорилацију у нормалним условима кисеоника. На нивоу ендотелијалних ћелија су урађени експерименти стимулације са EPO након 15, 30 и 60 минута и мерења активности фосфорилисаног Акт (pAkt) пута у нормалним и хипоксичним условима (Слика 15 А). Квантификацијом је показано да EPO стимулише Акт фосфорилацију у току првих 15 минута у условима нормоксије до 3 пута и хипоксије до 1.5 пута у ендотелијалним ћелијама (Слика 15 А). Активација пута у нормалним условима траје и до 30 минут од момента додавања EPO у ендотелијалне ћелије а након 60 минута активност пута се враћа на базни ниво у нормалним и у хипоксичним условима.

А.



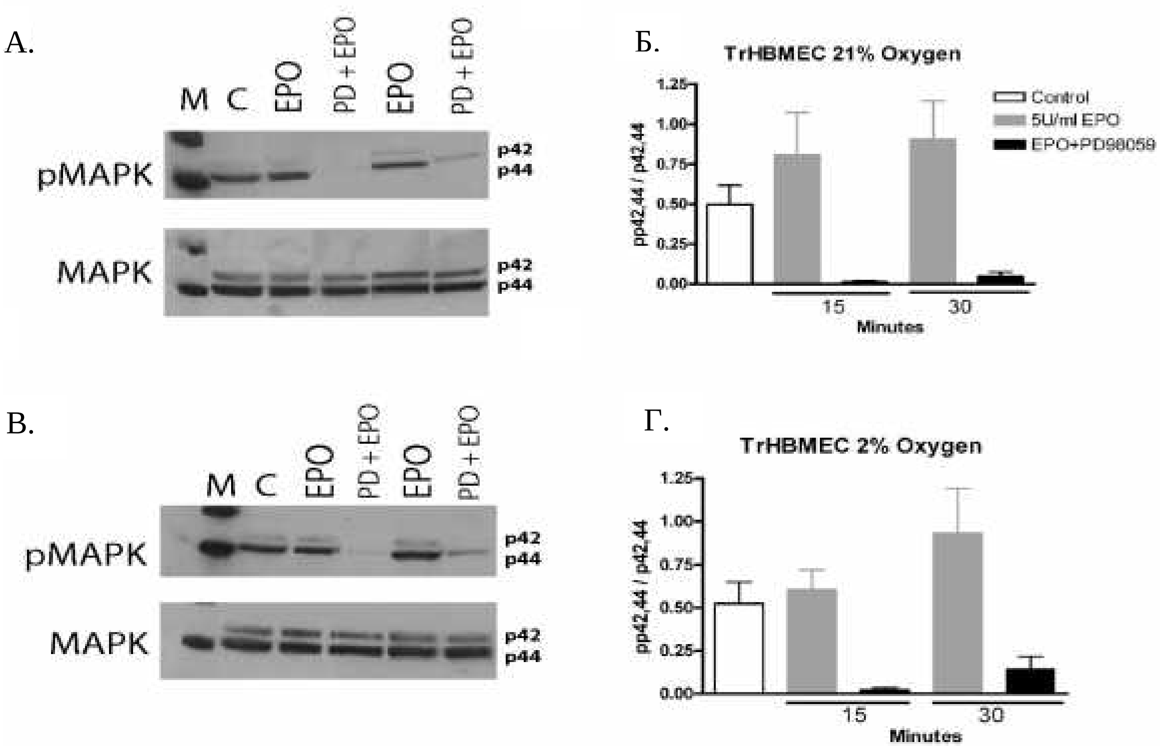
Б.



Слика 15. Western блот pAkt/Akt пута у TrHBMEC са 21% и 2% кисеоника након стимулације са EPO. (А) Мерење активности пута је вршено без EPO (0 минута) након 15, 30 и минута третмана са EPO. (Б) Квантификација протеина pAkt/Akt пута у у узорцима без EPO □ и са 5U/ml EPO након 15 минута ▢, 30 минута ■ и 60 минута ■ (**p<0.01). Грешка представља SD.

4.102 Експресија MAPK пута у ендотелијалним ћелијама

Познато је да EPO везујући се за EPOR може да активира најмање 3 пута, први је JAK2-STAT5 пут, други је PI-3/Акт пут и трећи је MAPK пут. На основу експеримената који су урађени на ћелијској линији ендотелних ћелија TrHBMEC у условима са 21% и 2% кисеоника, показано је да након стимулације са 5U/ml EPO долази до повећане активности фосфорилисаног MAPK (pMAPK) пута већ после 15 минута у 21% кисеоника (Слика 16 А,Б). Активност је била повећана и након 30 минута стимулације са EPO а инхибитор MAPK пута PD98059 је блокирао MAPK активност изазвану EPO. У условима снижене количине кисеоника (2% O_2) такође је дошло до повећане активности МАРК пута али тек након 30 минута стимулације са ЕРО при томе опет без статистичке значајности (Слика 16 В, Г). Инхибитор МАРК пута PD98059 је блокирао МАРК активност изазвану ЕРО и у условима снижене количине кисеоника.



Слика 16. Western блот pMAPK/MAPK пута у TrHBMEC са 21% и 2% кисеоника након стимулације са ЕРО и инхибитором МАРК пута PD98059. (А) Мерење активности пута је вршено без ЕРО и након 15 и 30 минута стимулације са ЕРО у 21% кисеоника. (Б) Квантификација протеина pMAPK/MAPK пута пута у узорцима без ЕРО □,са 5U/ml ЕРО након 15 минута и 30 минута стимулације ■ и са инхибитором PD98059◆ (В) Мерење активности пута је вршено без ЕРО и након 15 и 30 минута стимулације са ЕРО у 2% кисеоника. (Г) Квантификација протеина pMAPK/MAPK пута пута у узорцима без ЕРО □ ,са 5U/ml ЕРО након 15 минута и 30 минута стимулације ■и са инхибитором PD98059 ■. Грешка представља SD.

5.0 Дискусија

5.1 Мутације у *VHL* гену

У нашој студији испитивано је 50 узорака туморског и здравог ткива и исто толико узорака крви пацијената са тумором бубрега, директним секвенцирањем и MLPA методом. Директним секвенцирањем у туморском ткиву нађене су три тачкасте мутације, десет делеција, једна делеција са инсерцијом и један полиморфизам, а MLPA методом у 11 узорака пронађена је велика делеција и у 3 узорка дупликација једог од егзона VHL гена. У крви и околном здравном ткиву сем једног полиморфизма, нису нађене промене ни секвенцирањем ни MLPA методом. Према томе од 50 узорака туморског ткива у 58% узорака су детектоване стечене соматске мутације у *VHL* гену. Велика већина ових мутација нађена је у ткивима ccRCC што иде у прилог специфичне улоге инактивације *VHL*-а у настанку овог типа RCC-а. Друге групе су такође објавиле студије генетских и епигенетских промена у VHL региону код пацијената са тумором бубрега. Један од првих радова је објављен 2006 године где је показано да код 115 узорака ткива оболелих, нефректомисаних пацијената, у 71% случајева су детектоване мутације, у 78,4% губитак хетерозиготности и у 20,4% промоторска метилација[117]. Слично смо показали и ми, наиме код ccRCC око 90% мутације је удружено са LOH-ом у *VHL* региону, што значи да је присуство мутације маркер биалеле инактивације *VHL*-а. Интересантно је да не постоји значајна разлика у хистопатолошким карактеристикама између тумора са и без генетске грешке у *VHL* гену, укључујући стадијум, хистолошко градирање, величину тумора и свеукупно преживљавање, осим сигнификатне удружености губитка хетерозиготности и стадијума тумора[117]. Иста група 2009 године објављује рад на 177 узорака ткива са сличним процентуалним распоредом мутација, губитка хетерозиготности и промоторске метилације, с тим да је мутација дијагностикована у 74,6% узорака са дистрибуцијом углавном између кодона 65-76, 86-90 и 158-168 као и на спојевима егзон-интрон 114 и 155[118]. Свеукупно, сматра се да је *VHL* ген одговоран за већину спорадичних ccRCC са учесталошћу мутација од 75-82% а у комбинацији са губитком хетерозиготности и промоторском метилацијом и биалелном инактивацијом *VHL* ген у 86% RCC[66,118].

5.2 Убиквитинација HIF-1α у туморском и контролном здравом ткиву

Експресија HIF-1α на нивоу РНК и протеина у туморома са мутацијом у *VHL* гену је непромењена у односу на туморе без мутације и околно здраво ткиво. Овде је битно напоменути да би овај резултат могао да буде и другачији када би се анализирали поједини подтипови тумора посебно ccRCC. Велики број радова је показао да се *HIF-1α* понаша као тумор супресор у бубрезима. С обзиром да се *HIF-1α* налази на хромозому 14q, показано је да су делеције у том региону удружене са лошијом прогнозом[119,120]. Код многих ccRCC доказане су фокалне, хомозиготне делеције које резултују у мутацијама померања оквира читања-frameshift (FS), са потпуним или непотпуним губитком протеина због појаве стоп кодона[119]. Имунохистохемија је показала повећану експресију *HIF-1α* гена код пацијената са ccRCC у односу на здраво ткиво[121]. Међутим све већи број радова указује на много битнију улогу *HIF-2* у туморима бубрега у односу на *HIF-1*, иако деле много заједничких циљних гена. Показано да у ћелијским линијама VHL -/- ccRCC постоји углавном експресија *HIF-2~* а већина не експримира *HIF-1α*[122-124]. Елиминација *HIF-2α* у VHL -/- ccRCC ћелијским линијама се понашала као да је поновно враћена активност *VHL* гена тј супримована је могућност развоја тумора код мишева. У супротном ако је појачана активност *HIF-2~* али не и *HIF-1~*, довешће до најдачавања *VHL* тумор супресорске активности код мишева. Самим тим *HIF-2~* се понаша као ренални онкопротеин. На основу претходних резултата постављене су претпоставке упоређивањем *HIF-1~* и *HIF-2α* активности које могу бити значајне у реналној карциногенези. Стабилизација *HIF-2α* у VHL -/- ccRCC ћелијским линијама бар делом је омогућена функцијом FIH1 који селективно хидроксилише CTAD домен HIF-1α. Није јасно да ли са недостаком HIF-1α заостаје парадоксна активност његових таргет гена, или се ради о генима који су регулисани са оба, HIF-1α и HIF-2α протеинима. Друго, такође је могуће да HIF таргет гени који су примарно регулисани са HIF-1α смањују раст тумора бубрега и/или да други HIF таргет гени који су примарно регулисани са HIF-2α повећавају раст тумора бубрега. Такође је доказана и разлика у способности активације два одвојена сигнална пута, један, c-myc који је медијатор HIF-2α активности и други p53 који је медијатор HIF-1α активности. Ова два пута су у реципрочном односу. Другим речима HIF2α делује преко c-myc пута и супримује p53 пут, и обрнуто HIF-1α делује преко p53 и супримује активност c-myc пута. У нашем материјалу експресија иРНК за HIF-1α и сам протеин, била је слична у туморском и здравом ткиву са трендом пада у туморима посебно оним са мутацијом у *VHL*-у. Међутим ови резултати такође указују да функционални статус *VHL* гена не утиче на образац стабилизације HIF-1α протеина у туморима бубрега.

Експресија PHD1 протеина је снижена у туморима бубрега у односу на здраво ткиво. При томе најнижа је у туморима без мутације у *VHL* гену, али нема разлике између тумора са и без мутације. Варијабилитет PHD1 протеина само у туморима са мутацијом (78%) се може објаснити променама у EPOp и PHD2p. Наши резултати показују аналогију са не туморским анималним моделима у којима недостатак PHD2 доводи до еритроцитозе због повећане синтезе EPO[125]. Познато је да изоформе PHD различито регулишу HIF-α стабилност на нивоу јетре и бубрега, смањујући EPO експресију и еритропоезу. У експериментима са разлиличитим степеном смањења до потпуног недостатка експресије PHD1/3 такође долази до еритроцитозе активацијом хепатичног и бубрежног HIF2α/EPO пута и овај ефекат је најизраженији у експериментима који се односе на PHD2[125,126]. Мутације у *VHL* гену, експресија HIF-α i PHD1-3 протеинима су без ефекта на преживљавање пацијената са туморима бубрега што индиректно указује на улогу хроничне хипоксије у метаболичкој адаптацији PHD1/HIF2α/EPO пута у тумору[127]. У условима нормалне количине кисеоника све три пролил хидроксилазе (PHD1-3) учествују у модификацији HIF-α протеина у комбинацији са кисеоником, гвожђем, аскорбатом и 2-оксоглутаратом као кофакторима[128]. Међутим када је количина слободног кисеоника смањена, што је честа појава у хипоксичној микросредини тумора, долази до смањене PHD активности и HIF-1α акумулације. PHD2 је најчешће примарна пролил хидроксилаза у нормоксији док су PHD1 и PHD3 садејствујући ензими [129-131]. Мутације у генима који кодирају ове ензима, најчешће за PHD2, доводе до фамилијарног облика полицитемије[132-134]. Коначно све три форме PHD су присутне у туморима бубрега. Присуство PHD1 је показано у 39%, PHD2 у 63% и PHD3 у 84% једара туморских ћелија уз позитивну корелацију са HIF-1α и VHL протеинима[127]. Мутације у генима за PHD ензиме код пацијената са параганглиомима и RCC-ом до сада нису нађене[135].

PHD2 протеин се значајно више експримира у туморима са мутацијама у *VHL* гену у односу на здраво контролно ткиво, али не и у односу на туморско ткиво без мутације. Ово указује на већу туморску продукцију ензима, која није у вези са функционалним стаусом *VHL* гена. И овај податак иде у прилог схватања да је главни сензор туморске хипоксије PHD2, за разлику од PHD1 у чијем молекулу не постоји HRE[136]. Ово је у складу са претходим радовима који показују експресију HIF-1α само у нормалном бубрегу и у цистама бубрега раног стадијума туморигенезе у VHL синдрому, док се HIF-2α детектује само код клинички јасно формираног ccRCC[137-139].

Значајан део варијабилитета у експресији PHD2 (71.3%) у туморима са мутацијом се може објаснити променама у Hsp90 и PHD1. Не постоје подаци о директној вези између PHD2 и Hsp90 у ткиву бубрега. У неким ћелијским линијама показано је присуство PHD2 у комплексу са кошаперонима p23 и FKBP38 i Hsp90. Сматра се да је овај комплекс битан за одржавање конформације која омогућује ензимску активност PHD2 молекула и хидроксилацију HIF-α молекула[140]. Иста група је показала да код Тибетанаца који су живе на великим висинама, постоје специфични полиморфизми у гену који кодира PHD2 што доводи до конформационе промене протеина због чега се теже формира поменути комплекс (ослабљена је интер-реакције p23/PHD2). Ово доводи до смањене ензимске активности HIF-α[141]. У туморима који не поседују VHL протеин или у којима постоји хаплоинсуфицијенција, значај хидроксилације HIF-α протеина није јасан. Не постоје подаци о биолошкој активности и ефектима хидроксилисаних молекула HIF-α на циљне гене. Ови резултати указују на општи значај Hsp90 у кисеоник-зависној и не зависној деградацији HIF-α молекула. Према нашим резултатима постоји независни и адитивни утицај PHD1 на активност PHD2 који је највероватније ткивно специфичан[142].

У туморима без мутације у VHL гену значајан део варијабилности у PHD2 (71.3%) настаје због промена у експресији MAPK протеина. Код ових тумора не постоји проблем разградње HIF-α протеина. Вероватно је да активирани пролиферативни путеви, укључујући и MAPK условљавају метаболичку адаптацију на хипоксију.

Деградација HIF-1α не зависи у потпуности од VHL зависне убиквитинације. У последњих десетак година година пуно пажње се посвећује малим молекулима, инхибиторима Hsp90 као алтернативна терапија или допуна за друге анти-туморске лекове. Мали молекули који везују HIFα и ометају ATP зависну шаперонску активност блокирају конформационо свијање протеина. У *in vitro* експериментима са ћелијским линијама порекла RCC-а које имају инактивиран *VHL* ген, гелданамицин и неки други мали молекули који везују Hsp90 доводе до убрзане деградације HIF-1α[143-145]. Показано је да је Hsp90 у компетицији са RACK1 киназом за PAS секвенцу HIF-α молекула. Ови експеременти су омогућили да се дефинише кисеоник-независна деградација HIFα, али нису донели и напредак у лечењу ових тумора[146]. Наши резултати указују на сличан ниво експресије Hsp90 протеина у туморском и у околном здравом ткиву. Ово може да укаже да је хипоксија-независна разградња слична у свим ткивима и да је капацитет деградације сличан у туморском и нетуморском ткиву.

5.3 Хипоксија-индуцибилни гени и пролиферативни путеви: туморско и здраво ткиво

Показали смо да тумори са мутацијом и без мутације у *VHL* гену експримирају више иРНК за VEGF него здраво ткиво, при томе је највећа експресија у туморском ткиву са мутацијом. Наши резултати су у складу са другим. Мутације у VHL протеину асоциране су са конститутивном активацијом сигналног пута HIF-1α и индукцијом хипоксија зависних гена, нарочито *EPO* и *VEGF*. VEGF је централни регулатор физиолошке и патолошке-туморске ангиогенезе. Туморске ћелије секретују велике количине VEGF и других проангиогених фактора како би обезбедили кисеоник и исхрану у туморкој микросредини. Показано је на различитим туморима, укључујући и туморе бубрега, да је VEGF на транслационом и на транскрипционом нивоу више експримиран у туморима него у здравом ткиву[53]. Експресија VEGF-а је корелацији са стадијумом тумора и нуклераним градусом (Фурманова градација)[147].

Статистички значајан део варијабилитета у експресији VEGF иРНК у здравом ткиву (65.4%) се објашњава променама у експресији MAPK протеина, EPO иРНК, EPO протеина и VEGF протеина. VEGF у подоцитима бубрега своје дејство остварује преко p38 MAPK пута. Показано је да супресија VEGF активности има рено-протективни ефекат у анималним моделима са дијабетесом типа два[148]. Оба, EPO иРНК и EPO протеин учествују у регулацији количине VEGF иРНК у здравом ткиву. У првом случају веза је позитивна и указује на то да је хипоксија у здравом ткиву физиолошки регулатор транскрипције *VEGF* и *EPO* гена. Постоји негативна веза између VEGF иРНК и EPO протеина. Реална је могућност да EPO протеин доводи до смањења ефекта хипоксијом индукованих гена. Тешко је претпоставити да се ради о директној интер-реакцији EPO протеина са генима, али је показано да EPO може довести до повећања или смањења екпресије специфичних miRNAs, као што се дешава у неким ћелијским линијама порекла нервног система[149]. Такође није искључен индиректни ефекат на стабилност VEGF иРНК. Паралелно егзистира позитивна веза између VEGF иРНК и VEGF протеина. Ово указује на реципрочан однос EPO протеина и VEGF протеина у здравом бубрежном ткиву. Овај однос је битан за експресију VEGF иРНК и вероватно је регулисан на пост транскрипционом нивоу. Физиолошки смисао може да буде у томе да ефекат EPO протеина није само локални-паракрини, већ да EPO протеин им и системски ефекат. На жалост, о кординацији продукције ова два протеина у здравом ткиву нема много литературних података.

Промене у експресији иРНК за VEGF у туморима са мутацијом у VHL гену (54.3%) и туморима без мутације (72.1%), објашњавају промне у експесији HIF-1α иРНК. Ово указује да је реална хипоксија у тумору основни покретач у продукцији VEGF иРНК у туморском ткиву и да не зависи од VHL зависне разградње HIF-α протеина. У туморима без мутације Акт протеин је важан регулатор експресије VEGF иРНК и ово се вероватно може објаснити појачаном активношћу mTOR пута и ефектом mTORC1 комплекса на Акт протеин.

Ми нисмо нашли разлике у експресији VEGFR-1 и VEGFR-2 између туморског и здрвог ткива. Другим речима постоји тенденција њихове повећане експресије у туморима али она није досегла статиститички значајност. У том смислу наши резултати нису у складу са досадашним које показују да је експресија VEGFR-1/2 повећана у туморима бубрега, посебно у светлоћелијским и узнапредовалим туморима према TNM класификацији[53,150]. У последњој деценији спроведено је више клиничких студија у којима су коришћени ТКИ као што су сунитиниб, сорафениб, пазопаниб и акситиниб са идејом да се блокира ефекат VEGF-а преко својих рецептора, нажалост без значајног резултата [151].

Поред VEGF, други молекул који је регулисан транскрипционим факторима, HIF-1/2 је EPO. Експресија EPO је присутна у 23 од 50 узорка туморског ткива. У 15/ 23 (65%) узорка туморског ткива детектована је мутација у VHL гену. Ово указује да није само мутација у VHL гену битна за екпресију EPO-а већ и сама локалзација тумора. Сматра се да ccRCC потиче из епителних ћелија проксималног тубула, које не експримирају EPO чак ни у условима хипоксије. Зато се верује да мутација у *VHL* гену може да има улогу у трансформацији ћелија из EPO непродукујуће у продукујуће епителне ћелије[67,152]. Индукција EPO у хипоксичним условима поготову у тумору је генерално велики проблем у туморској биологији. EPO је једини хематопоетски фактор раста чија продукција је регулисана локалном хипоксијом, и он углавном своје дејство у туморској прогресији остварује локалним паракриним ефектима[153]. Његова улога у метастатском ширењу је нејасна.

Екпресија, EPOR на транскрипционом и на нивоу протеина, присутна је у свим узорцима туморског и здравог ткива, за разлику од EPO који се детектује у 23/50 (46%) узорака туморског и 18/50 (36%) здравог ткива. Присуство или одсутво EPO-а у туморском ткиву је без ефекта на експресију EPOR. Биолошки ефекти ERO/EPOR се не везују само за хематопоетски систем. Овај систем функционише и у другим ткивима укључујући и туморе попут RCC-а[154,155,29,30]. По свему судећи место настанка тумора бубрега вероватно утиче на експресију као и место синтезе имају улогу у настанку паракриних и системских дејстава EPO[156]. Доказана је улога EPOR у мултиплим туморима у мозгу, ретини и феохромоцитомима код пацијената са VHL синдромом [157-162], али је за овај ефекат дефинитивно потребно присуство EPO. Сматра се да активација пута ERO/EPOR у туморима бубрега има утицаја на прогресију, инвазију, преживљавање и сензитивност на тирозин киназни инхибитор сунитиниб[163]. Хипопролиферативне анемије које су удружене са малигним болестима вероватно јесу контраиндикација за примену рекомбинантног хуманог EPO иако његова примена потенцијално смањује ефекте хипоксије и HIF-α индуцибилних гена одговорних за туморску неоангиогенезу[164]. Ми нисмо показали разлике у експресији JAK2-STAT5 протеина у туморском и здравом контролном ткиву. Познато је када се EPO веже за EPOR на мембрани ћелије долази до активирања JAK2-STAT5 пута што резултује у активацији – транскрипцији одређених гена. Овај пут је добро проучен у еритопоези доказана је директна веза између мутације у 14 егзону *JAK2* и развоја мијелопролиферативних болести, што се користи у рутинској дијагностици[165,166]. Овај пут има значај у прогресији тумора дојке[167]. Мутације у *JAK2* гену до сада није доказана у туморима бубрега[75]. Међутим у неким радовима је показано учешће других чланови JAK и STAT фамилије у туморигенези бубрега као што је JAK1-STAT1 пут[76,77]. Све заједно, у туморима бубрега према нашим подацима EPOR/JAK2-STAT5 није одговоран за прогресију тумора.

5.4 ERO/EPOR у HMVEC-L ћелијама ћелијама

Показали смо у *in vitro* експериментима да сама хипоксија доводи до повећане експресије иРНК за EPOR. Стимулација са EPO у овим условима доводи до адитивног повећања експресије иРНК за EPOR у HMVEC-L ћелијама. Сам EPOR протеин у условима нормоксије остаје непромењен након стумулације са EPO и експресија протеина расте само у условима хипоксије. Другим речима експресија EPOR након стимулације са EPO у нормоксичним условима је регулисана на транскрипционом нивоу, а у условима хипоксије на транскрипционом и транслационом нивоу. Међутим активација EPOR/JAK2-STAT5 у ендотелијалним ћелијама је ткивно зависна. У костној сржи оне не експримирају JAK2 и STAT5 протеине у условима нормалне и снижене количине кисеоника[23]. Доказано је да је индукција EPOR хипоксијом са и без EPO, праћена паралелном стимулацијом експресије ендотел зависне азот оксид синтазе (eNOS) са значајним порастом NO само у условима хипоксије[23]. Слични резултати су добијени и на примарним хуманим ендотелијалним ћелијама вена (HUVEC) и артерија (HUAEC)[23]. У суштини уколико у туморском ткиву постоји експресија EPO могућ је његов локални ефекат преко eNOS/NO пута на ендотелне ћелије у условима реалне туморске хипоксије. Вероватно је да овакав систем може да представља сурогат за догађања у процесу ангиогенезе у условима туморске хипоксије.

5.5 Пролиферативни MAPK (Erk1/2) и PI-3 (Akt) путеви у здравом и туморском ткиву

Значајно је повећана екпресија обе изоформе MAPK (p44/p42) у туморима у односу на здраво контролно ткиво и то независно од присуства мутације у *VHL* гену. Статистички значајан део варијабилитета у експресији MAPK у здравом ткиву (50.4%) се може објаснити променама у експресији STAT5 и VEGF иРНК. Веза између MAPK и STAT5 сигналних путева је врло мало проучена у ткиву бубрега. До сада је показана независна активација JAK2-STAT5 и MAPK пута хормоном раста код дијабетесне нефропатије у анималним моделима[169]. VEGF је експримиран у нормалном ткиву бубрега, у подоцитима бубрежног гломерула. Показан је локални - паракрини ефекат VEGF-а у синтези колагена мезангијалних ћелија преко p42/p44 MAPK пута [170]. Овај налаз сугерише да у регулацији MAPK пута у здравом ткиву конвергирају два пута EPO/EPOR/JAK2-STAT5 и VEGF/ VEGFR/ MAPK.

У туморима са мутацијом у *VHL* гену, Акт и Hsp 90 учествују са 47.1% у регулацији MAPK сигналног пута. По свему, експресија Акт протеина се може објаснити ефектом MTORC1 и MTORC2 комплекса. Експресија Акт протеина је битна за синтезу молекуларних шаперона укључујући и Hsp90. У великој већини тумора са мутацијом постоји биалела инактивација *VHL* гена, што је праћено немогућношћу Е3 убиквитинације и стабилизацијом HIF-α протеина. Додатно, стабилна активност Акт-а обезбеђује синтезу Hsp90 чиме је онемогућена хипоксија независна разградња HIF-α. У суштини патофизиолошки значај интеракције Акт-а и Hsp90 у овој групи тумора је у стабилизацији медијатора туморске хипоксије HIF-α [171].

Велики део варијабилности (93.1%) у експресији MAPK у туморима са функционалним *VHL* геном, објашњавају промене у синтези PHD2 и VEGF протеин. Доминантан ефекат чини експресија PHD2 протеина који регулише хидроксилацију HIF-1α, на тај начин уводећи га у убиквитинацију. Индукција HIF-1α зависних гена међу које спада и *VEGF* ген објашњава експресију MAPK у овој групи тумора.

Ми смо показали да је регулација експресије MAPK у здравом и туморском ткиву различита и да су различити молекулски механизми укључени у регулацију експресије MAPK у туморима са мутацијом (инактивацијом) и без мутације у *VHL* гену.

Нисмо нашли разлике у експресији PI-3K/AKT пута између туморског и нетуморског ткива. У нашим узорцима тумора по свему је доминантан MAPK пут, што није обавезно у супротности са резултатима других који су имали прилику да користе mTOR инхибиторе. Осим тога показано је да код примене ових лекова брзо долази до тзв. резистенције[172].

5.6 Пролиферативни путеви у ендотелијалним ћелијама

За разлику од туморског ткива, у ендотелијалним ћелијама нема разлике у експресији MAPK пута у нормалним и хипоксичним условима. У условима нормоксије и хипоксије EPO је без ефекта на фосфорилацију MAPK. У истим условима, у нормоксији и хипоксији долази до значајног пораста фосфорилације Акт-а која више изражена у нормоксији. Ови резултати су у складу са другим резултатима и само у једном раду је показано да стимулација са EPO стимулише пролиферацију ћелија у хипоксичним условима делујући на експресију циклина D1 и p21cip1 и p27kip1 преко JAK2/ERK1/2 пута[173,174].

6.0 Закључци

1. У анализираним узорцима спорадичних RCC детектовано је у 58% тумора присуство соматске мутације у *VHL* гену. Нисмо показали зависност између експресије HIF-1α протеина и присуства мутација у *VHL* гену. Ово је вероватно последица присутва реалне туморске хипоксије у којој доминантну улогу има синтеза а не разградња HIF-1α протеина.

2. Експресија PHD1 протеина је снижена у туморима бубрега посебно у туморима без мутације у *VHL* гену. Промене у експресији овог протеина објашњавају се променама у експресији EPO и PHD2 (78%). Овај ефекат се може објаснити потребом ткива за кисеоником који се обезбеђује системским ефектом EPO, а не локалним паракриним ефектом VEGF-а.

3. PHD2 протеин се значајно више експримира у свим туморима и ово није у вези са функционалним стаусом *VHL* гена. Промене у PHD2 у туморима са мутацијом детерминисане су експресијом Hsp90, а у туморима без мутације са MAPK; у оба случаја са по 71.3% варијабилитета. Ово потенцијално указује на постојање два кластера тумора, они у којима примарно долази до хипоксије и стабилизације HIF-α због промена у *VHL* гену и они у којима су метаболичке адаптације секундарне и следе по индукцији пролиферације.

4. Тумори експримирају више иРНК за VEGF него здраво ткиво, нарочито туморско ткиво са мутацијом у *VHL* гену и то без промене у експресији VEGFR-1 и VEGFR-2. Ми нисмо радили HIF-2α, у туморском ткиву, али се овај ефекат може тумачити његовим дејством.

5. У здравом тквиу експресија иРНК VEGF-а се објашњава променама у експресији MAPK протеина, EPO иРНК, EPO протеина и VEGF протеина (65.4%). VEGF у подоцитима бубрега своје дејство остварује преко p38 MAPK

пута. Хипоксија у здравом ткиву је физиолошки регулатор транскрипције *VEGF* и *EPO* гена. Постојији негативна веза између иРНК VEGF и EPO протеина, што има физиолошку подлогу, обзиром да би EPO протеин требало да довођењем кисеоника смањи ефекат хипоксијом индукованих гена.

6. Промене у експресији иРНК за VEGF у свим туморима заједно великим делом су индуковане променама у експесији HIF-1α иРНК (око 50%). Ово указује да је реална хипоксија у тумору основни покретач у продукцији VEGF иРНК у туморском ткиву и да не зависи од VHL зависне разградње HIF-α протеина. У туморима без мутације, додатни регулатор експресије иРНК за VEGF је Акт протеин што се може објаснити појачаном активношћу mTOR пута и ефектом mTORC1 комплекса на Акт протеин.

.

7. Само неки тумори (23/50) експримирају EPO независно од присуства мутација у *VHL*, али вероватно зависно од локалзације тумора. За разлику од EPO, EPOR је присутан у свим узорцима туморског и здравог ткива, што указује да оба, локални паракрини ефекат зависи искључиво од EPO. Није јасан разлог овакве туморске селекције.

8. Разлика у експресији JAK2-STAT5 протеина у туморском и здравом контролном ткиву није детектована. У туморима бубрега EPOR-JAK2-STAT5 није одговоран за прогресију тумора.

9. MAPK протеин је више експримиран у туморима бубрега и то независно од присуства мутације у *VHL* гену. Експресија Акт протеина у склопу PI-3 пута је иста у туморском и нетуморском ткиву.

10. У здравом ткиву експресију MAPK (50.4%) објашњавају промене у експресији STAT5 и VEGF иРНК, што указује на балансиран ефекат и међусобни утицај метаболичких-хипоксичких и пролиферативних EPO/EPOR/JAK2/STAT5 и VEGF/ VEGFR/ MAPK путева.

У туморима са мутацијом у *VHL* гену, Акт и Hsp 90 учествују са 47.1% у регулацији MAPK сигналног пута. Патофизиолошки значај интеракције Акт-а и Hsp90 огледа се у стабилизацији медијатора туморске хипоксије HIF-α.

Велики део варијабилности (93.1%) у експресији MAPK у туморима са функционалним *VHL* геном, објашњавају промене у синтези PHD2 и VEGF протеина. Експресија PHD2 протеина објашњава убиквитинацију HIF-1α па самим тим и индукцију HIF-1α зависних гена међу које спада и *VEGF*.

11. Ниво експресије Hsp90 протеина је сличан у туморском и у околном здравом ткиву, што може да укаже да је хипоксија-независна разградња слична у свим ткивима као и да је капацитет деградације сличан у туморском и нетуморском ткиву.

12. EPO стимулише EPOR у ендотелијалним ћелијама. Активност EPO у ендотелијалним ћелијама доводи до значајног пораста фосфорилације Акт-а која је више изражена у нормоксији, док је без ефекта на фосфорилацију MAPK.

Литература

1. Mc Laughlin JK, Lipworth L: Epidemiologic aspects of renal cell carcinoma. Semin Oncol 2000; 27:115.

2. Grossman E, Messerli FH: Diuretics and renal cell carcinoma – What is the risk/benefit ratio? Kidney Int 1999; 56:1603.

3 Pavlovich CP, Schmidt LS: Searching for the hereditary causes of renal-cell carcinoma. Nat Rev Cancer 2004; 4:381.

4. Zbar B, Klausner R, Linehan WM: Studying cancer families to identify kidney cancer genes. Annu Rev Med 2003; 54:217.

5. McRonald FE, Morris MR, Gentle D, et al: CpG methylation profiling in VHL related and VHL unrelated renal cell carcinoma. Mol Cancer 2009; 8:31.

6. Ratcliffe PJ: New insights into an enigmatic tumour suppressor. Nat Cell Biol 2003; 5:7.

7. Kaelin WG Jr: Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. Nat Rev Cancer 2002; 2:673.

8. Schmidt L, Junker K, Nakaigawa N, et al: Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. Oncogene 1999; 18:2343.

9. Cohen HT, McGovern FJ: Renal-cell carcinoma. N Engl J Med 2005; 353:2477.

10. Valladares Ayerbes M, Aparicio Gallego G, Diaz Prado S, Jimenez Fonseca P, Garcia Campelo R, Anton Aparicio LM: Origin of renal cell carcinomas. Clin Transl Oncol 2008; 10:697.

11. Kiuru M, Lehtonen R, Arola J, et al: Few FH mutations in sporadic counterparts of tumor types observed in hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer families. Cancer Res 2002; 62:4554.

12. Gad S, Lefevre SH, Khoo SK, et al: Mutations in BHD and TP53 genes, but not in HNF1beta gene, in a large series of sporadic chromophobe renal cell carcinoma. Br J Cancer 2007; 96:336.

13. Polascik TJ, Cairns P, Epstein JI, et al: Distal nephron renal tumors: micro-satellite allelotype. Cancer Res 1996; 56:1892.

14. Linehan WM, Srinivasan R, Schmidt LS: The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. Nat Rev Urol 2010; 7:277.

15. D'Andrea AD, Lodish HF, Wong GG: Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. Cell 1989; 57:277.
16. Fisher JW: Erythropoietin: physiology and pharmacology update. Exp Biol Med 2003; 228:1.
17. Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P, et al: Erythropoietin: sites of synthesis and regulation of secretion. Am J Kidney Dis 1991; 18:14.
18. Mujais SK, Beru N, Pullman TN, Goldwasser E: Erythropoietin is produced by tubular cells of the rat kidney. Cell Biochem Biophy 1999; 30:153.
19. Broudy VC, Lin N, Brice M, Nakamoto B, Papayannopoulou T: Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. Blood 1991; 77:2583.
20. Sawada K, Krantz SB, Kans JS: Purification of human erythroid colony-forming units and demonstration of specific binding of erythropoietin. J Clin Invest 1987; 80:357.
21. Sawada K, Krantz SB, Dai CH, et al: Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. J Cell Physiol 1990; 142:219.
22. Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N, Levinson R, Steiner M: Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87:5978.
23. Beleslin-Cokic BB, Cokic VP, Yu X, Weksler BB, Schechter AN, Noguchi CT: Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. Blood 2004; 104:2073.
24. Chin K, Yu X, Beleslin-Cokic B, et al: Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in brain. Brain Res Mol Brain Res 2000; 81:29.
25. Yu X, Shacka JJ, Eells JB, Suarez-Quian C, Przygodzki RM, Beleslin-Cokic B, et al: Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. Development 2002; 129:505.
26. Wu H, Lee SH, Gao J, Liu X, Iruela-Arispe ML: Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. Development 1999; 126:3597.
27. Beleslin-Cokic BB, Cokic VP, Wang L, et al: Erythropoietin and hypoxia increase erythropoietin receptor and nitric oxide levels in lung microvascular endothelial cells. Cytokine 2011; 54:129.

28. Papworth K, Bergh A, Grankvist K, Ljungberg B, Rasmuson T. Expression of erythropoietin and its receptor in human renal cell carcinoma. Tumour Biol 2009; 30:86.
29. Lee YS, Vortmeyer AO, Lubensky IA, Vogel TW, Ikejiri B, Ferlicot S, Benoît G, Giraud S, Oldfield EH, Linehan WM, Teh BT, Richard S, Zhuang Z. Lee YS, Vortmeyer AO, Lubensky IA, Vogel TW, Ikejiri B, Ferlicot S, Benoît G, Giraud S, Oldfield EH, Linehan WM, Teh BT, Richard S, Zhuang Z. Coexpression of erythropoietin and erythropoietin receptor in von Hippel-Lindau disease-associated renal cysts and renal cell carcinoma. Clin Cancer Res 2005;11:1059.
30. Gong K, Zhang N, Zhang Z, Na Y. Coexpression of erythopoietin and erythopoietin receptor in sporadic clear cell renal cell carcinoma. Cancer Biol Ther 2006;5:582.
31. Arcasoy MO, Jiang X, Haroon ZA. Expression of erythropoietin receptor splice variants in human cancer. Biochem Biophys Res Commun 2003; 307:999.
32. Henke M, Laszig R, Rübe C, Schäfer U, Haase KD, Schilcher B, Mose S, Beer KT, Burger U, Dougherty C, Frommhold H. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet 2003; 362:1255.
33. Kumar SM, Zhang G, Bastian BC, Arcasoy MO, Karande P, Pushparajan A, Acs G, Xu X. Erythropoietin receptor contributes to melanoma cell survival in vivo. Oncogene 2012; 31:1649.
34. Acs G, Acs P, Beckwith SM, Pitts RL, Clements E, Wong K, Verma A. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. Cancer Res 2001; 61:3561.
35. Michael A, Politi E, Havranek E, et al: Prognostic significance of erythropoietin expression in human renal cell carcinoma. BJU Int 2007; 100:291.
36. Papworth K, Bergh A, Grankvist K, Ljungberg B, Rasmuson T: Expression of erythropoietin and its receptor in human renal cell carcinoma. Tumour Biol 2009; 30:86.
37. Ito K, Yoshii H, Asano T, Horiguchi A, Sumitomo M, Hayakawa M, Asano T. Impact of increased erythropoietin receptor expression and elevated serum erythropoietin levels on clinicopathological features and prognosis in renal cell carcinoma. Exp Ther Med 2012; 3:937.
38. Dvorak HF, Orenstein NS, Carvalho AC, et al: Induction of a fibrin-gel investment: an early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumor-secreted products. J Immunol 1979; 122:166.

39. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, et al: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. Am J Pathol 1995; 146:1029.
40. Ferrara N, Davis-Smyth T: The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev 1997; 18:4.
41. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, et al: Selective ablation ofimmature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. J Clin Invest 1999; 103:159.
42. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al: The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. J Biol Chem 1991; 266:11947.
43. Dvorak HF: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. J Clin Oncol 2002; 20:4368.
44. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. Nature 1995; 376:62.
45. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. Nature 1995; 376:66.
46. Takahashi M, Yang XJ, Sugimura J, et al: Molecular subclassification of kidney tumors and the discovery of new diagnostic markers. Oncogene 2003; 22:6810.
47. Baldewijns MM, Thijssen VL, Van den Eynden GG, et al: High-grade clear cell renal cell carcinoma has a higher angiogenic activity than low-grade renal cell carcinoma based on histomorphological quantification and qRT-PCR mRNA expression profile. Br J Cancer 2007; 96:1888.
48. Rioux-Leclercq N, Fergelot P, Zerrouki S, et al: Plasma level and tissue expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma: a prospective study of 50 cases. Hum Pathol 2007; 38:1489.
49. Hemmerlein B, Kugler A, Ozisik R, Ringert RH, Radzun HJ, Thelen P: Vascular endothelial growth factor expression, angiogenesis, and necrosis in renal cell carcinomas. Virchows Arch 2001; 439:645.

50. Ljungberg BJ, Jacobsen J, Rudolfsson SH, Lindh G, Grankvist K, Rasmuson T: Different vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-receptor 1 and -2 mRNA expression profiles between clear cell and papillary renal cell carcinoma. BJU Int 2006; 98:661.
51. Semenza GL: Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nature Rev Cancer 2003; 3:721.
52. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL: Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 5510.
53. Semenza GL: Regulation of mammalian O_2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. Annu Rev Cell Dev Biol 1999; 15:551.
54. Sang N, Fang J, Srinivas V, Leshchinsky I, Caro J. Carboxyl-terminal transactivation activity of hypoxia-inducible factor 1 alpha is governed by a von Hippel-Lindau protein-independent, hydroxylation-regulated association with p300/CBP. Mol Cell Biol 2002; 22:2984.
55. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. Hum Mol Genet 2001; 10:1019.
56. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. Science 2002; 295:858.
57. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. Science 2001; 292:468.
58. Koivunen P, Tiainen P, Hyvärinen J, Williams KE, Sormunen R, Klaus SJ, Kivirikko KI, Myllyharju J. An endoplasmic reticulum transmembrane prolyl 4-hydroxylase is induced by hypoxia and acts on hypoxia-inducible factor alpha. J Biol Chem 2007; 282:30544.
59. Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, Pavletich N, Chau V, Kaelin WG. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. Nat Cell Biol 2000; 2:423.

60. Pugh CW, Ratcliffe PJ. The von Hippel-Lindau tumor suppressor, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) degradation, and cancer pathogenesis. Semin Cancer Biol 2003; 13:83.

61. Stolle C, Glenn G, Zbar B, et al: Improved detection of germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. Hum Mutat 1998; 12:417.

62. Gnarra JR, Tory K, Weng Y, et al: Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. Nat Genet 1994; 7:85.

63. Nickerson ML, Jaeger E, Shi Y, et al: Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. Clin Cancer Res 2008; 14:4726.

64. Wiesener MS, Seyfarth M, Warnecke C, Jürgensen JS, Rosenberger C, Morgan NV, Maher ER, Frei U, Eckardt KU. Paraneoplastic erythrocytosis associated with an inactivating point mutation of the von Hippel-Lindau gene in a renal cell carcinoma. Blood 2002; 99:3562.

65. Rad FH, Ulusakarya A, Gad S, Sibony M, Juin F, Richard S, Machover D, Uzan G. Novel somatic mutations of the VHL gene in an erythropoietin-producing renal carcinoma associated with secondary polycythemia and elevated circulating endothelial progenitor cells. Am J Hematol 2008; 83:155.

66. Lanikova L, Lorenzo F, Yang C, Vankayalapati H, Drachtman R, Divoky V, Prchal JT. Novel homozygous VHL mutation in exon 2 is associated with congenital polycythemia but not with cancer. Blood 2013; 121:3918.

67. Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. Nat Rev Cancer 2005; 5:761.

68. Liu YV, Baek JH, Zhang H, Diez R, Cole RN, Semenza GL. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. Mol Cell 2007; 25:207.

69. Koh MY, Powis G. HAF : the new player in oxygen-independent HIF-1alpha degradation. Cell Cycle 2009; 8:1359.

70. Wu KL, Miao H, Khan S. JAK kinases promote invasiveness in VHL-mediated renal cell carcinoma by a suppressor of cytokine signaling-regulated, HIF-independent mechanism. Am J Physiol Renal Physiol 2007; 293:F1836.

71. Zhao J, Moch H. Absence of JH2 domain mutation of the tyrosine kinase JAK2 in renal cell carcinomas. Acta Oncol 2008; 47:474.

72. Shang D, Liu Y, Ito N, Kamoto T, Ogawa O. Defective Jak-Stat activation in renal cell carcinoma is associated with interferon-alpha resistance. Cancer Sci 2007; 98:1259.
73. Shang D, Yang P, Liu Y, Song J, Zhang F, Tian Y. Interferon-α induces G1 cell-cycle arrest in renal cell carcinoma cells via activation of Jak-Stat signaling. Cancer Invest 2011; 29:347.
74. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. Nat Rev Drug Discov 2009; 8:627.
75. Kok K, Geering B, Vanhaesebroeck B. Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression inhealth and disease. Trends Biochem Sci 2009; 34:115.
76. Backer JM. The regulation and function of Class III PI-3Ks: novel roles for Vps34. Biochem J
2008; 410:1.
77. Alessi DR. Discovery of PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction. Colworth Medal Lecture. Biochem Soc Trans 2001; 29:1.
78. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. Science 2005; 307:1098.
79. Mazure NM, Chen EY, Laderoute KR, Giaccia AJ. Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. Blood 1997; 90:3322.
80. Blancher C, Moore JW, Robertson N, Harris AL. Effects of ras and von Hippel-Lindau (VHL) gene mutations on hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha, HIF-2alpha, and vascular endothelial growth factor expression and their regulation by the phosphatidylinositol 3′-kinase/Akt signaling pathway. Cancer Res 2001; 61:7349.
81. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR, Genes Dev 2004; 18:1926.
82. Linehan WM, Vasselli J, Srinivasan R, Walther MM, Merino M, Choyke P, Vocke C, Schmidt L, Isaacs JS, Glenn G, Toro J, Zbar B, Bottaro D, Neckers L. Genetic basis of cancer of the kidney: diseasespecific approaches to therapy. Clin Cancer Res 2004; 10:6282S.
83. Ligresti G, Militello L, Steelman LS, Cavallaro A, Basile F, Nicoletti F, Stivala F, McCubrey JA, Libra M. PIK3CA mutations in human solid tumors: role in sensitivity to various therapeutic approaches. Cell Cycle 2009; 8:1352.

84. Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96:4240.
85. Besson A, Robbins SM, Yong YW. PTEN/MMAC1/TEP1 in signal transduction and tumorigenesis. Eur J Biochem 1999; 263:605.
86. Paramio JM, Navarro M, Segrelles C, Gomez-Casero E, Jorcano JL. PTEN tumour suppressor is linked to the cell cycle control through the retinoblastoma protein. Oncogene 1999; 18:7462.
87. Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, Maekawa S, Okuno Y, Kamura T, Shimamura T, Sato-Otsubo A, Nagae G, Suzuki H, Nagata Y, Yoshida K, Kon A, Suzuki Y, Chiba K, Tanaka H, Niida A, Fujimoto A, Tsunoda T, Morikawa T, Maeda D, Kume H, Sugano S, Fukayama M, Aburatani H, Sanada M, Miyano S, Homma Y, Ogawa S. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. Nat Genet 2013; 5:860.
88. Hager M, Haufe H, Kemmerling R, Hitzl W, Mikuz G, Moser PL, Kolbitsch C. Increased activated Akt expression in renal cell carcinomas and prognosis. J Cell Mol Med 2009; 13:2181.
89. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. Biochim Biophys Acta 2007; 1773:1263.
90. Blagosklonny MV. Hsp-90-associated oncoproteins: multiple targets of geldanamycin and its analogs. Leukemia 2002; 16:455.
91. Alessi DR, Saito Y, Campbell DG, Cohen P, Sithanandam G, Rapp U, Ashworth A, Marshall CJ, Cowley S. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. EMBO J 1994; 13:1610.
92. Ward Y, Wang W, Woodhouse E, Linnoila I, Liotta L, Kelly K. Signal pathways which promote invasion and metastasis: critical and distinct contributions of extracellular signal-regulated kinase and Ral-specific guanine exchange factor pathways. Mol Cell Biol 2001; 21:5958.
93. Sivaraman VS, Wang H, Nuovo GJ, Malbon CC. Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer. J Clin Invest 1997; 99:1478.

94. Mandell JW, Hussaini IM, Zecevic M, Weber MJ, VandenBerg SR. In situ visualization of intratumor growth factor signaling: immunohistochemical localization of activated ERK/MAP kinase in glial neoplasms. Am J Pathol 1998; 153:1411.

95. Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, et al. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. Oncogene 1999; 18:813.

96. Huang D, Ding Y, Luo WM, Bender S, Qian CN, Kort E, Zhang ZF, VandenBeldt K, Duesbery NS, Resau JH, Teh BT. Inhibition of MAPK kinase signaling pathways suppressed renal cell carcinoma growth and angiogenesis in vivo. Cancer Res 2008; 68:81.

97. Lee HJ, Kim DI, Kang GH, Kwak C, Ku JH, Moon KC. Phosphorylation of ERK1/2 and prognosis of clear cell renal cell carcinoma. Urology 2009; 73:394.

98. Zhang Y, Jiang X, Qin X, Ye D, Yi Z, Liu M, Bai O, Liu W, Xie X, Wang Z, Fang J, Chen Y. RKTG inhibits angiogenesis by suppressing MAPK-mediated autocrine VEGF signaling and is downregulated in clear-cell renal cell carcinoma. Oncogene 2010; 29:5404.

99. Klatte T, Kroeger N, Rampersaud EN, Birkhäuser FD, Logan JE, Sonn G, Riss J, Rao PN, Kabbinavar FF, Belldegrun AS, Pantuck AJ. Gain of chromosome 8q is associated with metastases and poor survival of patients with clear cell renal cell carcinoma. Cancer 2012; 118:5777.

100. An J, Liu H, Magyar CE, Guo Y, Veena MS, Srivatsan ES, Huang J, Rettig MB. Hyperactivated JNK is a therapeutic target in pVHL-deficient renal cell carcinoma. Cancer Res 2013; 73:1374.

101. Biswas S, Eisen T: Immunotherapeutic strategies in kidney cancer—when TKIs are not enough. Nat Rev Clin Oncol 2009; 6:478.

102. Faivre S, Delbaldo C, Vera K, et al: Safety, pharmacokinetic and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. J Clin Oncol 2006; 24:25.

103. Mendel DB, Laird AD, Xin X, et al: In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. Clin Cancer Res 2003; 9:327.

104. Sternberg CN, Davis ID, Mardiak J, et al: Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial. J Clin Oncol 2010; 28:1061.
105. Ellis LM, Hicklin DJ: VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. Nat Rev Cancer 2008; 8:579.
106. Huang D, Ding Y, Li Y, et al: Sunitinib acts primarily on tumor endothelium rather than tumor cells to inhibit the growth of renal cell carcinoma. Cancer Res 2010; 70:1053.
107. Mulders P. Vascular endothelial growth factor and mTOR pathways in renal cell carcinoma: differences and synergies of two targeted mechanisms. BJU Int 2009; 104:1585.
108. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, et al: Temsirolimus, interferon alfa or both for advanced renal-cell carcinoma. N Engl J Med 2007; 356:2271.
109. Del Bufalo D, Ciuffreda L, Trisciuoglio D, et al: Antiangiogenic potential of the Mammalian target of rapamycin inhibitor temsirolimus. Cancer Res 2006; 66:5549.
110. Houghton PJ. Everolimus. Clin Cancer Res 2010; 16:1368.
111. Maiese K, Chong ZZ, Shang YC. Raves and risks for erythropoietin. Cytokine Growth Factor Rev 2008; 19:145.
112. Lai SY, Grandis JR. Understanding the presence and function of erythropoietin receptors on cancer cells. J Clin Oncol 2006; 24:4675.
113. Leyland-Jones B, Semiglazov V, Pawlicki M, Pienkowski T, Tjulandin S, Manikhas G, Makhson A, RothвA, Dodwell D, Baselga J, Biakhov M, Valuckas K, Voznyi E, Liu X, Vercammen E. Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: a survival study. J Clin Oncol 2005; 23:5960.
114. F M Richards, E R Maher, F Latif, M E Phipps, K Tory, M Lush, P A Crossey,B Oostra, K H Gustavson, J Green, G Turner, J R W Yates, W M Linehan, N A Affara, M Lerman, B Zbar, M A Ferguson-Smith. Detailed genetic mapping of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene. J Med Genet 1993; 30:104.
115. Kuzmin I, Duh FM, Latif F, Geil L, Zbar B, Lerman MI. Identification of the promoter of the human von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. Oncogene 1995; 10:2185.

116. Blankenship C, Naglich JG, Whaley JM, Seizinger B, Kley N. Alternate choice of initiation codon produces a biologically active product of the von Hippel Lindau gene with tumor suppressor activity. Oncogene 1999; 18:1529.
117. Banks RE, Tirukonda P, Taylor C, Hornigold N, Astuti D, Cohen D, Maher ER, Stanley AJ, Harnden P, Joyce A, Knowles M, Selby PJ. Genetic and epigenetic analysis of von Hippel-Lindau (VHL) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer. Cancer Res 2006; 66:2000.
118. Young AC, Craven RA, Cohen D, Taylor C, Booth C, Harnden P, Cairns DA, Astuti D, Gregory W, Maher ER, Knowles MA, Joyce A, Selby PJ, Banks RE. Analysis of VHL Gene Alterations and their Relationship to Clinical Parameters in Sporadic Conventional Renal Cell Carcinoma. Clin Cancer Res 2009; 15:7582.
119. Shen C, Beroukhim R, Schumacher SE, Zhou J, Chang M, Signoretti S, Kaelin WG Jr. Genetic and functional studies implicate HIF-1α as a 14q kidney cancer suppressor gene. Cancer Discov 2011; 1:222.
120. Klatte T, Rao PN, de Martino M, LaRochelle J, Shuch B, Zomorodian N, Said J, Kabbinavar FF, Belldegrun AS, Pantuck AJ. Cytogenetic profile predicts prognosis of patients with clear cell renal cell carcinoma. J Clin Oncol 2009; 27:746.
121. Klatte T, Seligson DB, Riggs SB, Leppert JT, Berkman MK, Kleid MD, Yu H, Kabbinavar FF, Pantuck AJ, Belldegrun AS. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in clear cell renal cell carcinoma. Clin Cancer Res 2007; 13:7388.
122. Shen C, Beroukhim R, Schumacher SE, Zhou J, Chang M, Signoretti S, Kaelin WG Jr. Genetic and functional studies implicate HIF-1α as a 14q kidney cancer suppressor gene. Cancer Discov 2011; 1:222.
123. Gordan JD, Lal P, Dondeti VR, Letrero R, Parekh KN, Oquendo CE, Greenberg RA, Flaherty KT, Rathmell WK, Keith B, Simon MC, Nathanson KL. HIF-alpha effects on c-Myc distinguish two subtypes of sporadic VHL-deficient clear cell renal carcinoma. Cancer Cell 2008; 14:435.
124. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. Nature 1999; 399:271.

125. Minamishima YA, Kaelin WG Jr. Reactivation of hepatic EPO synthesis in mice after PHD loss. Science 2010; 329:407.
126. Takeda K, Aguila HL, Parikh NS, Li X, Lamothe K, Duan LJ, Takeda H, Lee FS, Fong GH. Regulation of adult erythropoiesis by prolyl hydroxylase domain proteins. Blood 2008; 111:3229.
127. Kroeze SG, Vermaat JS, van Brussel A, van Melick HH, Voest EE, Jonges TG, van Diest PJ, Hinrichs J, Bosch JL, Jans JJ. Expression of nuclear FIH independently predicts overall survival of clear cell renal cell carcinoma patients. Eur J Cancer 2010; 46:3375.
128. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. Cell 2001; 107:43.
129. Berra E, Benizri E, Ginouvès A, Volmat V, Roux D, Pouysségur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. EMBO J 2003; 22:4082.
130. Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Gleadle JM. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. J Biol Chem 2004; 279:38458.
131. Minamishima YA, Moslehi J, Padera RF, Bronson RT, Liao R, Kaelin WG Jr. A feedback loop involving the Phd3 prolyl hydroxylase tunes the mammalian hypoxic response in vivo. Mol Cell Biol 2009; 29:5729.
132. Minamishima YA, Moslehi J, Bardeesy N, Cullen D, Bronson RT, Kaelin WG Jr. Somatic inactivation of the PHD2 prolyl hydroxylase causes polycythemia and congestive heart failure. Blood 2008; 111:3236.
133. Percy MJ, Zhao Q, Flores A, Harrison C, Lappin TR, Maxwell PH, McMullin MF, Lee FS. A family with erythrocytosis establishes a role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103:654.

134. Percy MJ, Furlow PW, Beer PA, Lappin TR, McMullin MF, Lee FS. A novel erythrocytosis-associated PHD2 mutation suggests the location of a HIF binding groove. Blood 2007; 110:2193.
135. Astuti D, Ricketts CJ, Chowdhury R, McDonough MA, Gentle D, Kirby G, Schlisio S, Kenchappa RS, Carter BD, Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ, Schofield CJ, Latif F, Maher ER. Mutation analysis of HIF prolyl hydroxylases (PHD/EGLN) in individuals with features of phaeochromocytoma and renal cell carcinoma susceptibility. Endocr Relat Cancer 2010; 18:73.
136. Metzen E, Stiehl DP, Doege K, Marxsen JH, Hellwig-Bürgel T, Jelkmann W. Regulation of the prolyl hydroxylase domain protein 2 (phd2/egln-1) gene: identification of a functional hypoxia-responsive element. Biochem J 2005; 387:711.
137. Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Hörstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PH, Eckardt KU. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. FASEB J 2003; 17:271.
138. Mandriota SJ, Turner KJ, Davies DR, Murray PG, Morgan NV, Sowter HM, Wykoff CC, Maher ER, Harris AL, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron. Cancer Cell 2002; 1:459.
139. Kim CM, Vocke C, Torres-Cabala C, Yang Y, Schmidt L, Walther M, Linehan WM. Expression of hypoxia inducible factor-1alpha and 2alpha in genetically distinct early renal cortical tumors. Urol 2006; 175:1908.
140. Song D, Li LS, Heaton-Johnson KJ, Arsenault PR, Master SR, Lee FS. Prolyl hydroxylase domain protein 2 (PHD2) binds a Pro-Xaa-Leu-Glu motif, linking it to the heat shock protein 90 pathway. J Biol Chem 2013; 288:9662.
141. Song D, Li LS, Arsenault PR, Tan Q, Bigham AW, Heaton-Johnson KJ, Master SR, Lee FS. Defective Tibetan PHD2 binding to p23 links high altitude adaption to altered oxygen sensing. J Biol Chem 2014; 289:14656.
142. Willam C, Maxwell PH, Nichols L, Lygate C, Tian YM, Bernhardt W, Wiesener M, Ratcliffe PJ, Eckardt KU, Pugh CW. HIF prolyl hydroxylases in the rat; organ distribution and

changes in expression following hypoxia and coronary artery ligation. J Mol Cell Cardiol 2006; 41:68.
143. Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, Martinez A, Cuttitta F, Neckers LM. Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway. J Biol Chem 2002; 277:29936.
144. Mabjeesh NJ, Post DE, Willard MT, Kaur B, Van Meir EG, Simons JW, Zhong H. Geldanamycin induces degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha protein via the proteosome pathway in prostate cancer cells. Cancer Res 2002; 62:2478.
145. Katschinski DM, Le L, Schindler SG, Thomas T, Voss AK, Wenger RH. Interaction of the PAS B domain with HSP90 accelerates hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization. Cell Physiol Biochem 2004; 14:351.
146. Bohonowych JE[1], Peng S, Gopal U, Hance MW, Wing SB, Argraves KM, Lundgren K, Isaacs JS. Comparative analysis of novel and conventional Hsp90 inhibitors on HIF activity and angiogenic potential in clear cell renal cell carcinoma: implications for clinical evaluation. BMC Cancer 2011; 11:520.
147. Minardi D, Santoni M, Lucarini G, Mazzucchelli R, Burattini L, Conti A, Bianconi M, Scartozzi M, Milanese G, Primio RD, Montironi R, Cascinu S, Muzzonigro G. Tumor VEGF expression correlates with tumor stage and identifies prognostically different groups in patients with clear cell renal cell carcinoma. Urol Oncol 2014: S1078-1439(14)00220-8. [Epub ahead of print]
148. Cha JJ, Kang YS, Hyun YY, Han SY, Jee YH, Han KH, Han JY, Cha DR. Sulodexide improves renal function through reduction of vascular endothelial growth factor in type 2 diabetic rats. Life Sci 2013; 92:1118.
149. Alural B, Duran GA, Tufekci KU, Allmer J, Onkal Z, Tunali D, Genc K, Genc S. EPO Mediates Neurotrophic, Neuroprotective, Anti-Oxidant, and Anti-Apoptotic Effects via Downregulation of miR-451 and miR-885-5p in SH-SY5Y Neuron-Like Cells. Front Immunol 2014; 5:475.
150. Rivet J, Mourah S, Murata H, Mounier N, Pisonero H, Mongiat-Artus P, Teillac P, Calvo F, Janin A, Dosquet C. VEGF and VEGFR-1 are coexpressed by epithelial and stromal cells of renal cell carcinoma. Cancer 2008; 11:433.

151. Park K, Lee JL, Park I, Park S, Ahn Y, Ahn JH, Ahn S, Song C, Hong JH, Kim CS, Ahn H. Comparative efficacy of vascular endothelial growth factor (VEGF) tyrosine kinase inhibitor (TKI) and mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor as second-line therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma after the failure of first-line VEGF TKI. Med Oncol 2012; 29:3291.
152. Wiesener MS, Münchenhagen P, Gläser M, Sobottka BA, Knaup KX, Jozefowski K, Jürgensen JS, Roigas J, Warnecke C, Gröne HJ, Maxwell PH, Willam C, Eckardt KU. Erythropoietin gene expression in renal carcinoma is considerably more frequent than paraneoplastic polycythemia. Int J Cancer 2007; 121:2434.
153. Lacombe C, Mayeux P. The molecular biology of erythropoietin. Nephrol Dial Transplant 1999;14 Suppl 2:22.
154. Westenfelder C, Baranowski RL. Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. Kidney Int 2000; 58:647.
155. Hardee ME, Arcasoy MO, Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Dewhirst MW. Erythropoietin biology in cancer. Clin Cancer Res. 2006; 12:332. Review.
156. Lombardero M, Kovacs K, Scheithauer BW. Erythropoietin: a hormone with multiple functions. Pathobiology 2011; 78:41. Review.
157. Sacko O, Bouillot-Eimer S, Sesay M, Uro-Coste E, Roux FE, Loiseau H. Hemangioblastoma of the corpus callosum: A case report and review of the literature on its origin. Neurochirurgie 2010; 56:382. Review.
158. Vortmeyer AO, Frank S, Jeong SY, Yuan K, Ikejiri B, Lee YS, Bhowmick D, Lonser RR, Smith R, Rodgers G, Oldfield EH, Zhuang Z. Developmental arrest of angioblastic lineage initiates tumorigenesis in von Hippel-Lindau disease. Cancer Res 2003; 63:7051
159. Park DM, Zhuang Z, Chen L, Szerlip N, Maric I, Li J, Sohn T, Kim SH, Lubensky IA, Vortmeyer AO, Rodgers GP, Oldfield EH, Lonser RR. von Hippel-Lindau disease-associated hemangioblastomas are derived from embryologic multipotent cells. PLoS Med 2007; 4:e60.

160. Chan CC, Chew EY, Shen D, Hackett J, Zhuang Z. Expression of stem cells markers in ocular hemangioblastoma associated with von Hippel-Lindau (VHL) disease. Mol Vis 2005; 11:697.
161. Chan CC, Collins AB, Chew EY. Molecular pathology of eyes with von Hippel-Lindau (VHL) Disease: a review. Retina 2007; 27:1. Review.
162. Vogel TW, Brouwers FM, Lubensky IA, Vortmeyer AO, Weil RJ, Walther MM, Oldfield EH, Linehan WM, Pacak K, Zhuang Z. Differential expression of erythropoietin and its receptor in von hippel-lindau-associated and multiple endocrine neoplasia type 2-associated pheochromocytomas. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:3747.
163. Wu P, Zhang N, Wang X, Zhang C, Li T, Ning X, Gong K. The erythropoietin/erythropoietin receptor signaling pathway promotes growth and invasion abilities in human renal carcinoma cells. PLoS One 2012; 7:e45122.
164. Farrell F, Lee A. The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues. Oncologist 2004;9 Suppl 5:18. Review
165. Reinbothe S, Larsson AM, Vaapil M, Wigerup C, Sun J, Jögi A, Neumann D, Rönnstrand L, Påhlman S. EPO-independent functional EPO receptor in breast cancer enhances estrogen receptor activity and promotes cell proliferation. Biochem Biophys Res Commun 2014 ;445:163.
166. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature 2005; 434:1144.
167. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. N Engl J Med 2005; 352:1779.
168. Ward Y, Wang W, Woodhouse E, Linnoila I, Liotta L, Kelly K. Signal pathways which promote invasion and metastasis: critical and distinct contributions of extracellular signal-regulated kinase and Ral-specific guanine exchange factor pathways. Mol Cell Biol 2001; 21:5958.

169. Landau D, Eshet R, Troib A, Gurman Y, Chen Y, Rabkin R, Segev Y. Increased renal Akt/mTOR and MAPK signaling in type I diabetes in the absence of IGF type 1 receptor activation. Endocrine 2009; 36:126.

170. Amemiya T, Sasamura H, Mifune M, Kitamura Y, Hirahashi J, Hayashi M, Saruta T. Vascular endothelial growth factor activates MAP kinase and enhances collagen synthesis in human mesangial cells. Kidney Int 1999; 56:2055.

171. Zhou J, Schmid T, Frank R, Brüne B. PI-3K/Akt is required for heat shock proteins to protect hypoxia-inducible factor 1alpha from pVHL-independent degradation. J Biol Chem 2004; 279:13506.

172. Figlin RA, Kaufmann I, Brechbiel J. Targeting PI-3K and mTORC2 in metastatic renal cell carcinoma: new strategies for overcoming resistance to VEGFR and mTORC1 inhibitors. Int J Cancer 2013; 133:788.

173. Zhang X, Simons M. Receptor tyrosine kinases endocytosis in endothelium: biology and signaling. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2014; 34:1831. Review.

174. Miyake M, Goodison S, Lawton A, Zhang G, Gomes-Giacoia E, Rosser CJ. Erythropoietin is a JAK2 and ERK1/2 effector that can promote renal tumor cell proliferation under hypoxic conditions. J Hematol Oncol 2013; 6:65.

СПИСАК СКРАЋЕНИЦА

RCC-renal cell carcinoma

ccRCC-“clear” RCC

EPO-еритропоетин

EPOR-еритропоетински рецептор

VEGF-васкуларни ендотелни фактор раста

VEGFR1 (flt-1)- рецептор васкуларног ендотелног фактора раста 1

VEGFR2 (flk-1, KDR)- рецептор васкуларног ендотелног фактора раста 2

VHL- von Hippel-Lindau

pVHL-протеин VHL

PHD-пролил хидроксилаза

MAPK-митоген активишуће протеин киназе

PI-3-фосфатидилинозитол-3 киназе

JAK2-Janus kinaze 2

STAT5- Signal Transducer and Activator of Transcription

ТКИ- тирозин киназним инхибиторима

ДНК- Дезоксирибонуклеинска киселина

РНК- Рибонуклеинске киселине

MLPA- Мултиплекс лиганд-зависна пробна амплификација

PCR- Реакција ланчаног умножавања

кДНК- First Strand cDNA

Hsp90- heat shock protein 90

Tu mut- тумори са мутацијом у VHL гену

Tu- тумор и без мутације у VHL гену

Zd-здраво ткиво

.

БИОГРАФИЈА

Др Бојана Белеслин Чокић рођена је 06.09.1971. године у Београду. Основно и средње образовање на смеру, техничара за биохемију и молекуларну биологију стекла је 1990. године. Исте године уписује Медицински факултет у Београду, а титулу доктора медицине стиче 1996. године са средњом оценом 9.75. Године 1997. обавља обавезан лекарски стаж а од 1998. године запошљава се на институт за фармакологију, клиничку фармакологију и токсикологију као асистент приправник. Стучно усавршавање од априла 1999. до 2004. године је урадила у лабораторији Constance T Noguchi из Секције за молекуларну биологију ћелија, Националног Института за дијабетес, дигестивне болести и болести бубрега при Националним Институтима за здравље (Nationl Institutes of Helath, NIH) у Бетезди, САД. По повратку, од септембра 2004. године и даље запослена је у генетској лабораторији, Клинике за ендокринологију, дијабетес и болести метаболизма, КЦС, Београд. Децембра 2004. године брани магистарску тезу под насловом:" Модулација К-канала и вазодилатација артерија и вена". Специјализацију из клиничке биохемије започиње априла 2007. године а октобра 2012. године је положила са одличним успехом. У септембру 2010. године изабрана је у звање истраживача сарадника на Институту за медицинска истраживања. Носилац је годишње награде Медицинског факултета Универзитета у Беогрдау 1994. и 1995. године, као и награде Националног Института за здравље 2003. године (The ninth annual Fellows Award for Research Excellence 2003, NIH, Бетезда, САД). У току досадашњег рада објавила је 61 публикацију. Поред магистарске тезе, објавила је 19 радова: 9 радова је штампано у целини у врхунским међународним часописима (М21), 5 радова у истакнутим међународним часописима (М22) и 5 рада у међународним часописима (М23). Објављена су и 2 рада у часопису националног значаја (М52), а 34 рада је саопштено на међународним (М34) и 6 на скуповима националног значаја (М64). Импакт фактор свих објављених радова износи 81,555. Радови од међународног значаја су цитирани у 689 пута према подацима индексне базе SCOPUS и 918 пута према подацима индексне базе Google Scholar, где се издвајају цитати у часописима Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA и Circulation.

.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Бојана Белеслин Чокић

broj upisa 4600/11

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Псеудохипоксија у карциномима бубрега

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 10.12.2014.

Бојана Белеслин Чокић

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Бојана Белеслин Чокић

Broj upisa 4600/11

Studijski program ____________________

Naslov rada Псеудохипоксија у карциномима бубрега

Mentor Проф. др Светозар Дамјановић

Potpisani ____________________

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 10.12.2014.

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković" da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Псеудохипоксија у карциномима бубрега

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilozima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 10.12.2014.

Бојана Тешичевић