Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Marijana Knezović Florijan

Povezanost ekspresije i mutacijskog statusa gena *TP53* sa značajkama karcinoma bubrega

Doktorski rad

Osijek, 2024.

Ocjena rada u tijeku

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Doktorski rad**
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstveno polje: Biologija, Temeljne medicinske znanosti

Povezanost ekspresije i mutacijskog statusa gena *TP53* sa značajkama karcinoma bubrega

Marijana Knezović Florijan

Doktorski rad je izrađen u Laboratoriju za proteinsku dinamiku Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu

Mentori: naslovni izv.prof. dr. sc. Neda Slade, znanstvena savjetnica u trajnom izboru, Institut Ruđer Bošković u Zagrebu i izvanredna profesorica u naslovnom zvanju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

doc. dr. sc. Nikola Raguž-Lučić,dr.med., Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Kratki sažetak doktorske disertacije:
Karcinom bubrega najčešća je solidna novotvorina bubrega, čini oko 90% zloćudnih tumora bubrega. U usporedbi s drugim tumorima, mutacije gena *TP53* u karcinomu bubrega su rijetke, stoga pretpostavljamo da je tumorski supresor protein p53 inaktiviran drugim mehanizmima. Dosadašnja istraživanja su pokazala promijenjenu ekspresiju izoformi gena *TP53* u tumorima ljudi te njihovu ulogu u nastanku tumora, kao i povezanost s lošijim ishodom bolesti. U ovom istraživanju ispitali smo mutacijski status gena *TP53*, apsolutnu gensku ekspresiju izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 te njihovo prognostičko značenje. Rezultati su pokazali da se genska ekspresija izoformi gena *TP53* razlikuje u tkivu karcinoma i pripadajućem zdravom tkivu, te da njihova ekspresija ovisi o mutacijskom statusu gena *TP53*. Promijenjena ekspresija izoformi gena *TP53* može doprinijeti nastanku karcinoma u tkivima koja su zadržala divlji tip gena *TP53* , a tijek bolesti, unatoč tome što gen *TP53* nije mutiran, može imati lošiji ishod.

Broj stranica: 107
Broj slika: 17
Broj tablica: 34
Broj literaturnih navoda: 166
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: karcinom bubrega, p53, izoforme, mutacije p53

Datum javne obrane:
Povjerenstvo za javnu obranu:

Doktorski rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Ocjena rada u tijeku

B**ASIC DOCUMENTATION CARD**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **PhD thesis**
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
Doctoral Study of Molecular biosciences

Scientific Area: Interdisciplinary Area of Science
Field: Biology and Basic Medical Sciences

Association of *TP53* expression and mutation status with characteristics of renal cell

Marijana Knezović Florijan

Thesis performed at: Laboratory for protein dynamics, Division of Molecular Medicine, Ruđer Bošković Institute, Zagreb

Supervisors:
Neda Slade, PhD, Senior Scientist, Ruđer Bošković Institute, Zagreb
Nikola Raguž-Lučić, PhD, Senior Assistant, Department of Pharmacology and Biochemistry, Faculty of Dental Medicine and Health, J.J. Strossmayer University of Osijek

Short abstract:.
Renal cell cancer is the most common solid neoplasm of the kidney, and accounts for about 90% of malignant renal tumors. Compared to other tumors, the *TP53* gene is rarely mutated in renal cell cancer, which is why, we assume that its functions as a tumor suppressor are impaired by other mechanisms. Previous studies have shown altered expression of *TP53* isoforms in human tumors, and their role in tumorigenesis and disease outcome. In this study, we investigated the mutational status of *TP53* and the gene expression profile of *TP53* isoforms and their prognostic significance. We have shown that the gene expression of the p53 isoforms differs in cancer tissues and the normal adjacent tissue, and that the expression of the isoforms depends on the mutation status. Altered expression of *TP53* isoforms may contribute to the development of cancer in tissues with wild type *TP53*, and patients with wild-type *TP53* tumors may have a worse outcome.

Number of pages: 107
Number of figures: 17
Number of tables: 34
Number of references: 166
Original in: Croatian
Key words: renal cell cancer, p53, isoforms, mutation p53

Date of the thesis defense:

Reviewers:

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Obrana rada u tijeku

Zahvala

Zahvaljujem mentorima prof. dr.sc. Nedi Slade i doc. Nikoli Raguž-Lučiću na uloženom trudu, podršci te stručnim i znanstvenim savjetima. Hvala svima koji su mi pomogli tijekom provođenja eksperimentalnog dijela disertacije na Institutu Ruđer Bošković, posebice Martini, Gogi, Petru, Anđeli, Mari. Zahvaljujem svojoj prijateljici Arijani, uvijek prisutnoj, pozitivnoj i spremnoj pomoći u vezi disertacije, a i upoznala me sa sadašnjim suprugom, pa Arijana veliko hvala.

Hvala i svim prijateljima koji su me cijelo vrijeme bodrili.

Zahvaljujem kolegama iz KBC Sestre milosrdnice koju su me uvijek rado zamjenjivali radi studentskih obaveza, kao i kolegama sa studija Molekularnih bioznanosti, bili smo dobra „klapa“.

Posebno zahvaljujem roditeljima, Željku i Blagici, koji su mi pružili priliku za vrhunsko obrazovanje, bez vas svega ovoga ne bi bilo. Dragoj sestri Martini i nećaku Anđelku, hvala na podršci i ohrabrivanju. Baki Nedi i djedu Anđelku hvala na „uskakanju“ kad god je trebalo.

I na kraju, zahvaljujem suprugu Saši i sinu Adamu, bili ste strpljivi i puni razumijevanja, volim vas!

Ocjena rada u tijeku

POPIS KRATICA

ATM, gen (engl. *ataxia teleangiectasia mutated*)

BAP-1, BRCA1 pridruženi protein 1 (engl. *BRCA1 Associated Protein 1*)

Bax, gen (engl. *Bcl-2-associated protein x*)

BID, gen (engl. *BH3 Interacting Domain Death Agonist*)

BAD, gen (engl. *BCL2 Associated Agonist Of Cell Death*)

CAIX, enzim karboanhidraza (engl. carbonic anhydrase IX)

CDKN1A, gen (engl. *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*)

CHEK2, gen za kinazu 2 kontrolne točke (engl. *Checkpoint kinase 2*)

CTD, C-terminalno područje (engl. *C-terminal domain*)

ctDNA, cirkulirajuća tumorska DNA (engl. *circulating tumor DNA*)

CTLA-4, citotoksičnim T-limfocitima pridruženi protein 4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*)

CXCR4, kemokinski receptor (engl. *chemokine receptor type 4*)

DBD, DNA-vezno područje (engl. *DNA-binding domain*)

FAS, gen (engl. *Fas cell surface death receptor*)

FASAY, funkcionalna analiza odvojenih alela u kvascu (engl. *Functional Assay for the Separation of Alleles in Yeast*)

GLUT, transporter glukoze (engl. *glucose transporter*)

HD, područje zgloba (engl. *hinge domain*)

HIF, transkripcijski faktori inducirani hipoksijom (engl. *hypoxia inducible factor*)

HRE, elementi odgovora na hipoksiju (engl. *hypoxia responsive element*)

IARC, Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*)

IMDC, Međunarodni konzorcij baze podataka za metastatski karcinom bubrega (engl. International Metastatic RCC Database Consortium)

IRES, unutarnje mjesto ulaska ribosoma (engl. *internal ribosomal entry site*)

MDM2, gen (engl. *Mouse double minute protein 2*)

MET, protoonkogen koji kodira receptor za čimbenik rasta hepatocita (engl. *mesenchymal-epithelial transition factor*)

MSKCC, Memorijalni centar za liječenje i istraživanje raka Sloan Kettering (engl. *Memorial Sloan Kettering Cancer Center*)

mTOR, kinaza (engl. *mammalian target of rapamycin*)

NES, signalno područje za izlazak iz jezgre (engl. nuclear export signal, NES)

NF2, gen za neurofibromatozu tip 2 (engl. Neurofibromatosis type 2)

Ocjena rada u tijeku

NLS, signalno područje za smještanje u jezgru (engl. *Nuclear localization signal*)

NOXA, gen (engl. *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*)

NSS, parcijalna nefrektomija (engl. *Nephron-sparing surgery*)

OD, oligomerizacijsko područje (engl. *Oligomerization domain*)

PBRM1, gen Polibromo 1 (engl. *Polybromo 1*),

PD-1, receptor na površini limfocita (eng. *programmed death 1*)

PDGF, faktor rasta porijeklom iz trombocita (engl. *platelet derived growth factor*)

PIK3CA, gen za fosfoinozitid 3-kinazu (engl. *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*)

PRD, područje bogato prolinom (engl. *Proline rich domain*)

pRE, ciljna mjesta za protein p53 (engl. *p53-responsive elements*)

PTEN, gen (engl. phosphatase and tensin homolog)

PUMA, gen (engl. *p53 upregulated modulator of apoptosis*)

qPCR, metoda kvantitativne lančane reakcije polimerazom (engl. *Quantitative polymerase chain reaction*)

RCC, karcinom bubrega (engl. *renal cell cancer*)

SETD2, gen za histon lizin metiltransferazu (engl. *SET Domain Containing 2, Histone Lysine Methyltransferase*)

SNP, polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single-nucleotide polymorphism*)

SSCP, polimorfizam konformacije jednolančane DNA (engl. *single-stranded conformation polymorphism*)

SZO/ISUP, Svjetska zdravstvena organizacija/ Internacionalno udruženje uroloških patologa (engl. *International Society of Uropathology*)

TAD, transaktivacijsko područje (engl. *Transactivation domain*)

TGF, transformirajući faktor rasta, (engl. *transforming growth factor*)

TNM, tumor, limfni čvor, metastaza (engl. *Tumor, Node, Metastasis*)

***TP53*; p53**, tumorski protein p53 (engl. *Tumor protein p53*)

TP63, **p63**, tumorski protein p63 (engl. *Tumor protein p63*)

TP73, **p73**, tumorski protein p73 (engl. *Tumor protein p73*)

VEGF, faktor rasta endotela krvnih žila (engl. *vascular endothelial growth*)

VHL, gen za tumorski supresor Von Hippel Lindau (engl. *Von Hippel-Lindau gene)*

WHO, Svjetska zdravstvena organizacija, (engl. *World Health Organization*)

Ocjena rada u tijeku

Sadržaj

1. UVOD ... 1
1.1. Karcinom bubrega ... 2
1.1.1. Anatomski prognostički čimbenici ... 4
1.1.2. Histološki prognostički čimbenici ... 5
1.1.3. Molekularni prognostički čimbenici ... 7
1.1.4. Klinički prognostički čimbenici ... 9
1.1.5. Liječenje karcinoma bubrega ... 10
1.2. Gen *TP53* ... 11
1.2.1. Struktura gena *TP53* ... 12
1.2.2. Struktura proteina p53 ... 14
1.2.3. Uloga i regulacija aktivnosti proteinskih izoformi gena *TP53* ... 16
1.2.4. Gen *TP53* u humanim tumorima ... 21
1.2.5. Izoforme gena *TP53* u humanim tumorima ... 26
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA ... 29
2.1. Ciljevi istraživanja ... 29
2.2. Hipoteza ... 29
2.3. Očekivani znanstveni doprinos ... 29
3. MATERIJALI I METODE ... 30
3.1. Biološki materijal ... 30
3.2. Izdvajanje ukupne RNA iz tkiva ... 32
3.3. Određivanje koncentracije, čistoće i integriteta izolirane RNA ... 34
3.4. Reverzna transkripcija ... 34
3.5. Kvantitativni PCR (qPCR) ... 36
3.6. Funkcionalna analiza odvojenih alela u kvascima (FASAY) ... 40
3.7. Statistička obrada podataka ... 42
4. REZULTATI ... 44
4.1. Klinička i patohistološke obilježja kohorte ... 44
4.2. Povezanost kliničkih i patohistoloških obilježja tumora s mutacijskim statusom gena *TP53* 47
4.3. Genska ekspresija izoformi gena *TP53* ... 50
4.4. Ekspresije izoformi i mutacijski status gena *TP53* u karcinomu bubrega ... 54
4.5. Povezanost ekspresije izoformi *TP53* s kliničkim i patohistološkim obilježjima bolesti ... 58
4.6. Analiza preživljenja ... 61
5. RASPRAVA ... 72
5.1. Učestalost mutacija gena *TP53* u karcinomu bubrežnih stanica ... 76

Ocjena rada u tijeku

5.2. Ekspresija gena *TP53* u karcinomu bubrega 78
5.3. Prognostičko značenje ekspresije i mutacijskog statusa gena *TP53* u karcinomu bubrega... 82
6. ZAKLJUČCI 88
LITERATURA 89
SAŽETAK 105
SUMMARY 106
ŽIVOTOPIS 107

Ocjena rada u tijeku

1. UVOD

Zloćudne novotvorine bubrega čine oko 85 % tumora bubrega. S obzirom na patohistološka i genetička obilježja postoji više podtipova tumora bubrega, a najčešći je svjetlostanični karcinom bubrežnih stanica (1). U zapadnim zemljama u zadnja dva desetljeća bilježi se kontinuirani porast pojavnosti ove bolesti vjerojatno uslijed veće dostupnosti radioloških dijagnostičkih metoda, a tijek bolesti nepredvidiv je unatoč aktualno prihvaćenim prognostičkim čimbenicima (2). U 2018. godini u svijetu je zabilježeno skoro pola milijuna novooboljelih, otprilike 17 % bolesnika imalo je proširenu bolest u vrijeme postavljanja dijagnoze, a 30 % bolesnika imalo je ponovnu pojavu bolesti nakon potpunog kirurškog uklanjanja primarnog tumora (3). U literaturi se kao potencijalni biljezi karcinoma bubrega navode brojni geni i proteini, ali trenutno u kliničkoj praksi ne primjenjuje se niti jedan molekularni biljeg (4).

Tumorigeneza je višestupanjski proces u kojem tumorske stanice prolaze metaboličke promjene i stječu posebne sposobnosti kojima omogućavaju održavanje i progresiju tumorske bolesti. Hanahan i Weinberg (5) navode kako tumorske stanice imaju sposobnost održavanja proliferacijske signalizacije, izbjegavanja supresora rasta, otpora prema programiranoj staničnoj smrti, omogućavanja replikativne besmrtnosti, induciranja angiogeneze, aktiviranja invazije i nastanka presadnica, reprogramiranja energetskog metabolizma, izbjegavanja imunološkog uništenja, promoviranja upale, nestabilnosti genoma i mutacija. Gen *TP53* ubrajamo u skupinu tumorskih supresora, njegov produkt su proteinske izoforme koje djeluju kao transkripcijski faktori uključeni u procese tumorigeneze (4). Glavni regulator aktivnosti proteina p53 je ubikvitinska ligaza MDM2 (engl. *Mouse double minute protein 2*), koja ga označava za proteosomalnu aktivnost. U normalnim uvjetima koncentracija proteina p53 je niska u stanicama. Međutim, u uvjetima staničnog stresa dolazi do aktivacije proteina p53 fosforilacijom što onemogućava njegovu interakciju s proteinom MDM2 pa koncentracija proteina p53 u stanicama raste. Funkcije tumorskog supresora protein p53 ostvaruje kao transkripcijski faktor kroz poticanje ekspresije specifičnih ciljnih gena koji reguliraju brojne stanične procese - stanični ciklus, programiranu staničnu smrt (apoptozu), stanično starenje (senescenciju), diferencijaciju te popravak DNA, pri čemu se protein p53 u obliku tetramera veže na ciljne sljedove molekule DNA (4).

Ocjena rada u tijeku

Gubitak funkcije proteina p53 zabilježen je u više od polovice ljudskih tumora, a većinom je inaktiviran mutacijama. Inaktivacija proteina p53 povezana je s razvojem tumora s klinički agresivnijim fenotipom, koji su otporni na konvencionalne metode liječenja te imaju lošiju prognozu (4).

U usporedbi s drugim tumorima, u karcinomu bubrega gen *TP53* je rijetko mutiran, stoga možemo pretpostaviti da je inaktiviran drugim mehanizmima koji ili narušavaju aktivaciju proteina p53 ili oštećuju djelovanje njegovih nizvodnih ciljnih gena (6). U slučaju mutacije gena *ATM* i *CHEK2*, čiji produkt su kinaze ATM i Chk2, izostaje fosforilacija proteina p53 i njegova aktivacija, pa podliježe razgradnji putem proteina MDM2. Nadalje, tumor-supresorska uloga proteina p53 je narušena ako su mutirani njegovi ciljni geni uključeni u zaustavljanje staničnog ciklusa ili apoptozu, npr. *CDKN1A, Bax, NOXA, PUMA, FAS*. Prekomjerna metilacija promotora, povećana ekspresija inhibitora proteina p53 (npr. MDM2) i ekspresija različitih inaktivirajućih mikroRNA (miRNA) mogu sudjelovati u tumorigenezi bubrega (3–8). Promijenjena ekspresija izoformi proteina p53 mogla bi biti dodatan mehanizam inaktivacije proteina p53 u karcinomu bubrega (9,10). Međutim, zasada se malo zna o ekspresiji izoformi p53 u karcinomu bubrega.

1.1. Karcinom bubrega

Karcinom bubrežnih stanica (engl. *renal cell cancer*, RCC) najčešća je solidna lezija bubrega i čini preko 85 % zloćudnih tumora bubrega i otprilike 3 % ukupnog broja karcinoma u odraslih (2). Većina slučajeva karcinoma bubrežnih stanica je sporadična, dok je u 2 do 3 % bolesnika riječ o obiteljskom obliku tumora, gdje je poznata mutacija gena za tumorske supresore ili protoonkogene (2). Karcinom bubrega je češći u muškaraca, najčešće u šestom i sedmom desetljeću života, a kao rizični čimbenici navode se dob, spol, pušenje, prehrambene navike, hemodijaliza, profesionalna izloženost, kronične infekcije, pretilost, konzumacija alkohola, lijekovi, ionizacijsko zračenje i genetski čimbenici (11).

Više od 50 % tumora bubrega se slučajno dijagnosticira prilikom kliničke obrade nespecifičnih simptoma ili drugih abdominalnih bolesti (2). Klasičnu trijadu simptoma (lumbalna bol, makrohematurija i palpabilna abdominalna masa) ima 6 do 10 % bolesnika, što je povezano s agresivnim histološkim tipom i uznapredovalim stadijem bolesti. Oko 30 % bolesnika ima paraneoplastički sindrom zbog izlučivanja biološki aktivnih tvari iz tumora ili

Ocjena rada u tijeku

zbog reakcije organizma na tumor (2). U dijagnostici se koriste ultrazvuk, kompjutorizirana tomografija (CT) i magnetska rezonancija (MR) abdomena (1). Dijagnoza karcinoma bubrega se potvrđuje patohistološkim nalazom nakon kirurškog zahvata ili biopsije, a iznimno temeljem citološke punkcije.

Karcinom bubrežnih stanica jedan je od najznačajnijih urogenitalnih tumora zbog visokog mortaliteta i sve veće učestalosti. Prema podacima Međunarodne agencije za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC), u svijetu je u 2020. godini zabilježeno 403 000 novih slučajeva i 179 368 umrlih od karcinoma bubrežnih stanica (3). Najviša incidencija zabilježena je u Sjevernoj Americi, Europi, Australiji i Novom Zelandu, dok je najniža u centralnoj Africi (11). U zadnja dva desetljeća primijećen je porast novooboljelih od 2 % godišnje (2). U većini europskih zemalja smrtnost je u padu, no pojedine, među kojima je i Hrvatska, bilježe porast smrtnosti (2,12,13). Petogodišnje preživljenje oboljelih od karcinoma bubrega iznosi 76 %, i varira ovisno o stadiju bolesti, pa tako u prvom stadiju iznosi 93 %, za stadij II/III iznosi 72,5 %, dok za metastatsku bolest iznosi 12 % (11).

U Republici Hrvatskoj je 2020. godine od zloćudnih novotvorina umrlo 13 718 osoba, od kojih je 380 (2,8 %) osoba umrlo od karcinoma bubrežnih stanica (12). Prema populacijskom registru Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (13), u 2020. godini u Hrvatskoj je detektirano 723 novooboljelih od karcinoma bubrega (459 muškaraca i 264 žena). U trenutku dijagnoze većina bolesnika imala je lokaliziranu bolest (264 bolesnika, 36,5 %), dok je 11,2 % imalo regionalno proširenu bolest (81 bolesnika), 9,1 % bolesnika (66 bolesnika) udaljene presadnice, a za 312 bolesnika (43,2 %) nije poznat stadij bolesti (13).

Prema važećim smjernicama Europskog urološkog društva prognostički čimbenici karcinoma bubrega su anatomski, histološki, klinički i molekularni (2).

Ocjena rada u tijeku

1.1.1. Anatomski prognostički čimbenici

Anatomski prognostički čimbenici su sadržani u klasifikacijskom sustavu stadija tumora TNM – tumor, limfni čvor, metastaza (engl. *Tumor, Node, Metastasis*) (tablica 1) (2).

Tablica 1. Klasifikacijski sustav stadija tumora TNM – tumor, limfni čvor, metastaza (engl. *Tumor, Node, Metastasis*) iz 2017. godine (2,14).

Primarni tumor (T)	
TX	Primarni tumor se ne može procijeniti
T0	Nema dokaza primarnog tumora
T1	Tumor do 7 cm u najvećem promjeru, ograničen na bubreg
T1a	Tumor do 4 cm u najvećem promjeru
T1b	Tumor veći od 4 cm, a manji od 7 cm u najvećem promjeru
T2	Tumor veći od 7 cm, ograničen na bubreg
T2a	Tumor veći od 7 cm, a manji od 10 cm u najvećem promjeru
T2b	Tumor veći od 10 cm, ograničen na bubreg
T3	Tumor se širi u glavne vene i perirenalno tkivo, ali ne u ipsilateralnu nadbubrežnu žlijezdu niti izvan Gerotove fascije
T3a	Tumor se širi u bubrežnu venu ili njene segmentalne ogranke ili tumor zahvaća pelvikalicelni sustav ili tumor zahvaća perirenalno i/ili peripelvično masno tkivo, ali se ne širi izvan Gerotove fascije
T3b	Tumor se širi u donju šuplju venu ispod ošita
T3c	Tumor se širi u donju šuplju venu iznad dijafragme ili zahvaća vensku stijenku
T4	Tumor se širi izvan Gerotove fascije (uključujući širenje u ipsilateralnu nadbubrežnu žlijezdu)
Limfni čvorovi (N)	
NX	Nije moguća procjena regionalnih limfnih čvorova
N0	Nema zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova
N1	Zahvaćen regionalni limfni čvor/čvorovi
Udaljene presadnice (M)	
M0	Nema udaljenih presadnica
M1	Udaljene presadnice

Prognostička vrijednost TNM-klasifikacije je potvrđena u istraživanjima, iako i dalje postoji potreba za daljnjim poboljšanjem ovog sustava (2,15,16). U tablici 2 prikazali smo kliničke stadije bolesti prema TNM-klasifikaciji.

Ocjena rada u tijeku

Tablica 2. Klinički stadiji karcinoma bubrega prema klasifikaciji TNM– tumor, limfni čvor, metastaza (engl. *Tumor, Node, Metastasis*) iz 2017. godine (14)

TNM stadij			
stadij I	T1	N0	M0
stadij II	T2	N0	M0
stadij III	T3	N0	M0
	T1, T2,T3	N1	M0
stadij IV	T4		
	Bilo koji T	Bilo koji N	M1

1.1.2. Histološki prognostički čimbenici

Histološki prognostički čimbenici karcinoma bubrežnih stanica su nuklearni gradus, histološki tip, sarkomatoidne i rabdoidne osobitosti tumorskih stanica, limfovaskularna invazija, nekroza tumora i invazija kanalnog sustava (2,14).

Za procjenu diferencijacije tumora ranije se primjenjivao sustav nuklearnog stupnjevanja prema Furhmanovoj, koji se određuje istovremenom procjenom tri parametra pomoću objektiva s povećanjem od 10 puta: veličina jezgre, pleomorfizam jezgre i prominencija jezgrice (tablica 3).

Tablica 3. Sustav nuklearnog stupnjevanja prema Furhmanovoj

NUKLEARNI GRADUS PO FURHMANOVOJ KLASIFIKACIJI	
Gradus I	Tumorske stanice koje imaju male (~ 10 µm) hiperkromatske, okrugle, uniformne jezgre bez vidljivih jezgrica
Gradus II	Veće stanice (~ 15 µm) koje imaju raspršen kromatin, a jezgrice se uočavaju na većem povećanju
Gradus III	Još veće stanice (~ 20 µm) jasno nepravilne konture jezgara s lako prepoznatljivim jezgricama pri povećanju 10x
Gradus IV	pojava pleomorfizma jezgara, hiperkromazije, i jednom ili više velikih jezgrica i odgovara sarkomatoidnoj diferencijaciji

Ocjena rada u tijeku

Trenutno se koristi novi sustav nuklearnog stupnjevanja po SZO/ISUP (Svjetska zdravstvena organizacija/Internacionalno udruženje uroloških patologa, engl. *International Society of Uropathology*). Nuklearni gradus po SZO/ISUP (tablica 4) ocjenjuje samo prominenciju jezgrica za graduse 1, 2 i 3 kako bi se umanjila varijabilnost u dodjeli nuklearnog gradusa od strane patologa i osigurala usporedivost rezultata različitih istraživanja (2). Ovaj sustav je prognostički superiorniji u odnosu na sustav nuklearnoga stupnjevanja prema Furhmanovoj (17).

Tablica 4. Sustav nuklearnog stupnjevanja po SZO/ISUP (Svjetska zdravstvena organizacija/Internacionalno udruženje uroloških patologa, engl. International Society of Uropathology) (14)

SZO/ISUP sustav stupnjevanja	
Gradus I	Jezgrice tumorskih stanica nisu prisutne ili su neprimjetne i bazofilne pri povećanju 400x
Gradus II	Jezgrice tumorskih stanica su vidljive i eozinofilne pri povećanju 400x, i vidljive ali ne i istaknute jezgrice pri povećanju 100x
Gradus III	Jezgrice tumorskih stanica su vidljive i eozinofilne pri povećanju 100x
Gradus IV	Tumori koji pokazuju ekstremni nuklearni pleomorfizam, ogromne tumorske stanice i/ili prisutnost bilo kojeg dijela tumora koji pokazuje sarkomatoidnu i/ili rabdoidnu diferencijaciju

U zadnjih nekoliko godina klasifikacija bubrežnih novotvorina je doživjela značajne promjene, te nam posljednje peto izdanje klasifikacije urogenitalnih tumora Svjetske zdravstvene organizacije iz 2022. godine donosi dijagnostičke kriterije koji uključuju ne samo kliničke, radiološke, histološke i imunohistokemijske značajke, već i molekularne biljege za svaki podtip tumora bubrega (18). Prema ovoj klasifikaciji postoji više histoloških tipova tumora bubrega, ali oko 90% karcinoma bubrega pripada svjetlostaničnom, papilarnom i kromofobnom tipu Najčešći histološki tip karcinoma bubrega je svjetlostanični karcinom bubrežnih stanica, koji čini 75 % svih karcinoma bubrega, dok papilarni karcinom čini 13 do 20 %, a kromofobni oko 5 % karcinoma bubrega. Svjetlostanični karcinom bubrega ima lošiju prognozu u odnosu na papilarni i kromofobni karcinom (2).

Ocjena rada u tijeku

Rabdoidne i sarkomatoidne osobitosti tumora mogu se javljati u svim histološkim tipovima i ekvivalentne su nuklearnom gradusu 4. Prisutnost limfovaskularne invazije, nekroze tumora i invazije kanalnog sustava povezani su s lošijim ishodom bolesnika (14).

1.1.3. Molekularni prognostički čimbenici

U zadnjih nekoliko desetljeća molekularna istraživanja identificirala su gene koji su uključeni u tumorigenezu nasljednih i sporadičnih tumora bubrega i omogućila su liječenje ciljanom terapijom. Od molekularnih biljega, istražuju se brojni markeri staničnog ciklusa i proliferacije, kao što su ugljikova anhidraza IV, VEGF, hipoksija inducibilni faktor (HIF), Ki-67, protein p53, gen *CDKN1A*, gen *PTEN*, E-kadherin, osteopontin CD44, CXCR4, miRNA, polimorfizmi jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphisms*, SNPs), mutacije i metilacija različitih gena (2).

Karakteristične genske promjene u svjetlostaničnom karcinomu bubrežnih stanica su kromosomske aberacije (varijacije u broju kopija vezane uz kromosome 7 i 9, delecije krakova kromosoma 3p i 14q, insercije na kromosomu 5q), hipermetilacija promotora i mutacije pogrešnog smisla (19). Delecije ili mutacije kromosoma 3 i mutacije gena *VHL* su česte u sporadičnim oblicima bolesti. Gubitak kratkog kraka kromosoma 3p dovodi do gubitka jedne kopije gena *VHL*, *PBRM1*, *SETD2 i BAP1*, što rezultira poremećajem u signalnim putevima proteina VHL/HIF i PI3K/AKT/mTOR te poremećajima u remodelaciji kromatina i modifikaciji histona (19). Gen *VHL* kodira protein VHL koji suprimira rast tumorskih stanica (20). Protein VHL ima ulogu u degradaciji transkripcijskih faktora sustava HIF (engl. *hypoxia inducible factor*), koji se akumuliraju u stanicama izloženim hipoksiji. Transkripcijski faktori sustava HIF vežu su na specifične sljedove DNA koji se nazivaju HRE (engl. *hypoxia responsive element*), a ciljni geni kodiraju za proteine koji sudjeluju u:

- angiogenezi (protein VEGF, od engl. *vascular endothelial growth factor*, protein PDGF, od engl. *platelet derived growth factor*),

- rastu stanica (TGFα i TGFβ, od engl. *transforming growth factor*),

- unosu glukoze (GLUT-1 i GLUT-3, od engl. *glucose transporter*),

- migraciji stanica (protein CXCR4, od engl. *chemokine receptor type 4*),

- apoptozi (Bid, Bax, Bad),

-održavanju acidobazne ravnoteže (protein CAIX, od engl *carbo anhydrase IX*),

Ocjena rada u tijeku

- stvaranju eritrocita (eritropoetin).

U prisustvu kisika, transkripcijski faktor HIF se hidroksilira i veže za protein VHL, što uzrokuje njegovu ubikvitinaciju i proteosomsku degradaciju. Točkasta mutacija, delecija ili hipermetilacija gena *VHL* dovode do poremećene ubikvitinacije i razgradnje proteina iz sustava HIF, što rezultira njihovim nakupljanjem unutar stanice i nekontroliranim prepisivanjem gena iz sustava HRE. Sve navedeno objašnjava nastanak karcinoma, njegovu dobru prokrvljenost te prilagodbu tumorskih stanica na uvjete hipoksije i acidoze (1,20).

Osim gena *VHL*, molekularne analize su pokazale da u svjetlostaničnom karcinomu bubrega mogu postojati mutacije i drugih tumorskih supresora, kako što su mutacije gena *BAP1* (engl. *BRCA1 Associated Protein 1*), gena *PBRM1* (engl. *Polybromo 1*), gena *SETD2* (engl. *SET Domain Containing 2, Histone Lysine Methyltransferase*) i gena *PIK3CA* (engl. *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*), te kako su te mutacije čimbenik koji određuje prognozu i odgovor na liječenje (20). Mutacija gena *PBRM1* povezana je s boljom prognozom bolesnika i boljim odgovorom na liječenje, dok su mutacije gena *BAP1 i SETD2* povezane s lošijom prognozom bolesnika (21). Mutacije gena uključenih u popravak DNA pokazatelj su boljeg odgovora na imunoterapiju svjetlostaničnog karcinoma bubrežnih stanica (21).

Najčešće genetske promjene u papilarnom karcinomu bubrežnih stanica su trisomija i tetrasomija kromosoma 7 i 17 te gubitak kromosoma Y (22). Mutacija gena *MET* na sedmom kromosomu vezana je uz nasljedni sindrom karakteriziran multiplim, obostranim papilarnim karcinomima bubrežnih stanica tip 1. Gen *MET* kodira tirozin kinazu, koja se normalno aktivira putem čimbenika rasta hepatocita (engl. *Hepatocyte growth factor*, HGF) i sudjeluje u staničnoj proliferaciji, pokretljivosti i invaziji (21,22). Najčešće genetske promjene vezane uz kromofobni tumor bubrežnih stanica su gubitak kromosoma 1, 2, 6, 10, 13, 17 i 21 (22).

Brojna istraživanja pokušala su utvrditi profil genske ekspresije u karcinomu bubrežnih stanica koji bi se mogao povezati s prognozom bolesnika i odgovorom na terapiju (19,23). Prema jednoj grupi autora nije bilo razlike u varijaciji broja kopija četiri tumorskih supresora (gen *VHL, SETD2, PBRM1* i *BAP1*) između tumorskog i zdravog tkiva, ali su primijetili značajnu razliku u razini njihove genske ekspresije na razini RNA (23). Studija JAVELIN Renal 101 je povezala ekspresiju 25 imunomodulatornih gena s preživljenjem bez progresije bolesti u bolesnika s metastatskim karcinomom bubrežnih stanica, pri čemu je uspoređivala dvije grupe

Ocjena rada u tijeku

bolesnika (bolesnici liječeni kombinacijom bevacizumaba i atezolizumaba naspram onih liječenih sunitinibom) (2,24).

Kompleksnost genetičkih obilježja patogeneze karcinoma bubrega potvrđena je studijom koja je proučavala intratumorsku heterogenost mutacija u bolesnika s metastatskim karcinomom bubrega prije i nakon liječenja everolimusom, inhibitorom proteinske kinaze mTOR (25,26). Ustanovljeno je da je 63 % do 69 % mutacija heterogeno raspodijeljeno na različitima lokacijama tumora kod istog bolesnika, pri čemu su najčešće heterogeno raspodijeljene bile mutacije gena *SETD2, PBRM1, mTOR, PIK3CA, PTEN* i *KDM5C*. Nasuprot tome, sve tumorske stanice na svim lokacijama su imale mutaciju gena *VHL* ili gubitak kromosoma 3p. Istraživači su zaključili kako jedna biopsija otkriva samo manji dio mutacija koji je prisutan u cijelom tumoru (20). Prognostički značaj intratumorske heterogenosti je u činjenici kako tumori s povećanom intratumorskom heterogenosti imaju niži metastatskih potencijal (21). Unatoč brojnim istraživanjima trenutno niti jedan molekularni biljeg nije u kliničkoj primjeni.

1.1.4. Klinički prognostički čimbenici

Klinički prognostički faktori uključuju stupanj opće tjelesne sposobnosti bolesnika, lokalne simptome, kaheksiju, anemiju, broj trombocita, odnos neutrofila prema limfocitima, C-reaktivni protein i albumine (2). Na temelju anatomskih, histoloških i kliničkih parametara definirani su korisni prognostički normogrami i sustavi bodovanja kako bi se procijenio dugotrajni ishod i preživljenje. Za metastatsku bolest koriste se prognostički sustavi MSKCC (engl. *Memorial Sloan Kettering Cancer Center*) i IMDC (engl. *International Metastatic RCC Database Consortium*), koji uključuju opće tjelesne sposobnosti bolesnika, vrijeme od dijagnoze do početka liječenja i laboratorijske parametre (vrijednosti korigiranog kalcija, hemoglobina, neutrofila i trombocita) (2). S obzirom na prognostičke čimbenike bolesnike dijelimo u povoljnu prognostičku skupinu (nemaju negativnih prognostički čimbenik), intermedijarnu (1 do 2 čimbenika) i lošu prognostičku skupinu (3 do 5 čimbenika) (27).

Ocjena rada u tijeku

1.1.5. Liječenje karcinoma bubrega

Multidisciplinarni tim sastavljen od urologa, radiologa, patologa i onkologa donosi plan liječenja bolesnika s karcinomom bubrega na temelju kliničke procjene rizika, uzimajući u obzir parametre kao što su stadij bolesti, bolesnikova dob, histološki tip tumora i stupnja zloćudnosti te sijelo metastatske bolesti (27).

Operativno liječenje bolesnika s lokaliziranim tumorom (stadij I - III) sastoji se od radikalne ili parcijalne nefrektomije (engl. *Nephron-sparing surgery*, NSS) (27). Dosadašnja istraživanja su pokazala da parcijalna i radikalna nefrektomija imaju slične stope preživljenja, a prednosti parcijalne nefrektomije su očuvanje bubrežne funkcije i smanjen rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti (2). Ostale metode liječenja su limfadenektomija, embolizacija tumora, metoda aktivnog nadzora, metode radiofrekventne, termalne i krioablacije, citoreduktivna nefrektomija, kirurško odstranjenje presadnica, palijativna radioterapija koštanih i moždanih presadnica i stereotaktična radiokirurgija moždanih presadnica. (2). Kemoterapija je neučinkovita u metastatskom karcinomu bubrega (27). Bolesnici se postoperativno prate radi otkrivanja povrata bolesti (lokalnog ili udaljenoga) putem anamneze i kliničkog pregleda, pretraga krvi, te radioloških metoda snimanja trbuha, zdjelice i toraksa, (27).

Osnovicu sustavnog liječenja metastatskog karcinoma bubrega čine imunoterapija (inhibitori kontrolnih točaka), tirozin kinazni inhibitori, inhibitori mTOR-a i monoklonalna protu-VEGF protutijela (2)(28). Prva imunoterapija bila je citokinska terapija interferonom alfa (INF-α) i interleukinom-2 (IL-2), imala je nisku stopu odgovora i visoku toksičnost. U novije vrijeme, koriste se inhibitori kontrolnih točaka (engl. *immune checkpoint inhibitors*, ICIs), kao što su pembrolizumab i nivolumab, koji pospješuju protutumorski imunološki odgovor. Ovi lijekovi djeluju na receptore programirane stanične smrti -1 (*engl. programmed cell death protein 1*, PD-1), ligand za PD-1 (engl. *programmed death ligand 1*, PD-L1) i CTLA-4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*) (2,29)

Tirozin kinazni inhibitori, kao što su sunitinib, aksitinib, kabozantinib, lenvatinib, pazopanib, sorafenib i tivozanib, blokiraju signalni put VEGF-a preko receptora VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor receptor*, VEGFR) (29).

Inhibitori mTOR-a (engl. *mammalian target of rapamycin*) su temsirolimus i everolimus, oni onemogućuju kinaznu aktivnost ove molekule, čime ostvaruju

Ocjena rada u tijeku

protuproliferativni i protuangiogeni učinak (29). Bevacizumab je humanizirano monoklonsko protutijelo protu-VEGF.

Suvremene smjernice za liječenje metastatskog svjetlostaničnog raka bubrega savjetuju primjenu dvostruke imunoterapije ili kombinirane imunoterapije s tirozin kinaznim inhibitorom (2). Brojne i česte su nuspojave ovih lijekova, ali interesantno je to što su one zapravo biljezi dobrog odgovora na terapiju. Zahvaljujući primjeni imunoterapije najčešće u prvoj, rjeđe u drugoj liniji liječenja bolesnika s metastatskim rakom bubrega može se potpuno izliječiti oko 15 % bolesnika (2).

1.2. Gen *TP53*

U zadnjih tridesetak godina oko pedeset tisuća istraživanja analiziralo je strukturu i funkciju gena tumorskog supresora *TP53*. Njegov produkt, protein p53 otkriven je davne 1979. godine u tumorskim stanicama zaraženim virusom SV40, kao protein koji ulazi u interakciju s onkogenim T-antigenom virusa SV40, nakon čega dolazi do transformacije stanica (30,31). Iste godine protein p53 pronađen je u serumu miševa s tumorom, koji je sadržavao protutijela koja su reagirala s proteinom p53. S obzirom na povišenu ekspresiju u tumorskim stanicama i sposobnost imortalizacije stanica protein p53 proglašen je onkogenom (31).

Godine 1984. Milner i suradnici su otkrili da postoje različiti oblici proteina p53 u stanicama koje se dijele i one koje se ne dijele, a iste godine Maltzman i Czyzyk su pokazali povišenu razinu proteina p53 u stanici nakon UV-zračenja (32,33). Deset godina nakon otkrića dokazano je da je protein p53 s onkogenim potencijalom mutirani oblik proteina. Otkrivene su točkaste mutacije gena *TP53* u gotovo svim vrstama tumora (34–37). Godine 1990. autori su pokazali da su nasljedne mutacije gena *TP53* uzrok Li-Fraumenijevog sindroma, koji se klinički očituje nastajanjem višestrukih tumora u mlađoj životnoj dobi (38). S obzirom na rezultate navedenih istraživanja, p53 je prihvaćen kao tumorski supresor (39) te je zbog svoje uključenosti u brojne stanične procese proglašen „čuvarom genoma“ (40).

Danas znamo da su mutacije gena *TP53* najčešći genetski poremećaj u zloćudnim tumorima, s visokom prevalencijom mutacija u karcinomu pluća, jajnika, glave i vrata te ezofagusa, srednje učestalo u karcinomu dojke, mokraćnog mjehura i gušterače, a rijetke su u melanomu, sarkomu, karcinomu testisa i karcinomu bubrega (41), kako je navedeno u bazi gena

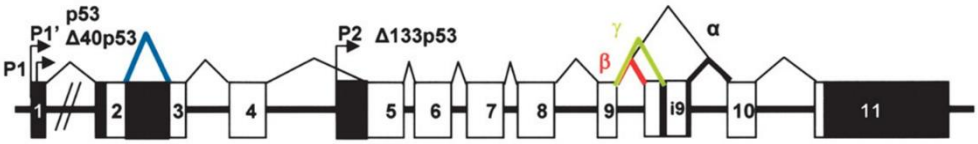
Ocjena rada u tijeku

TP53 Nacionalnog instituta za zdravlje (engl. *National Institutes of Health*, NIH) (baza je dostupna na *https://tp53.isb-cgc.org/*).

Geni *TP73* i *TP63* otkriveni su u kasnim devedesetima i imaju veliku sličnost sekvenci s genom *TP53*. Oni kodiraju proteine p73 i p63, koji mogu inducirati ekspresiju ciljnih gena proteina p53 (42). Postoji 6 proteinskih izoformi gena *TP63*, koje induciraju ekspresiju gena uključenih u diferencijaciju, zaustavljanje staničnog ciklusa i apoptozu te sudjeluju u razvoju epidermisa i udova (43). Gen *TP73* kodira najmanje 11 proteinskih izoformi, koje reguliraju zaustavljanje staničnog ciklusa i apoptozu, a miševi koji nemaju gen *TP73* imaju disgenezu hipokampusa, hidrocefalus, abnormalnosti senzornih puteva, boluju od kronične infekcija, ali nemaju sklonost nastanku tumora (43).

1.2.1. Struktura gena *TP53*

Gen *TP53* se nalazi na kratkom (p) kraku kromosoma 17 na položaju 13.1 i ima 13 eksona (11 klasičnih i 2 alternativno prekrojena), te je veličine je 20 kb. Protein p53 se eksprimira u svim tjelesnim stanicama, ali je u većini tkiva na niskoj razini (43). Gen *TP53* posjeduje dva promotora, pri čemu je promotor P1 smješten uzvodno od eksona 1, a unutarnji promotor P2 se nalazi u intronu 4 (44) (slika 1).

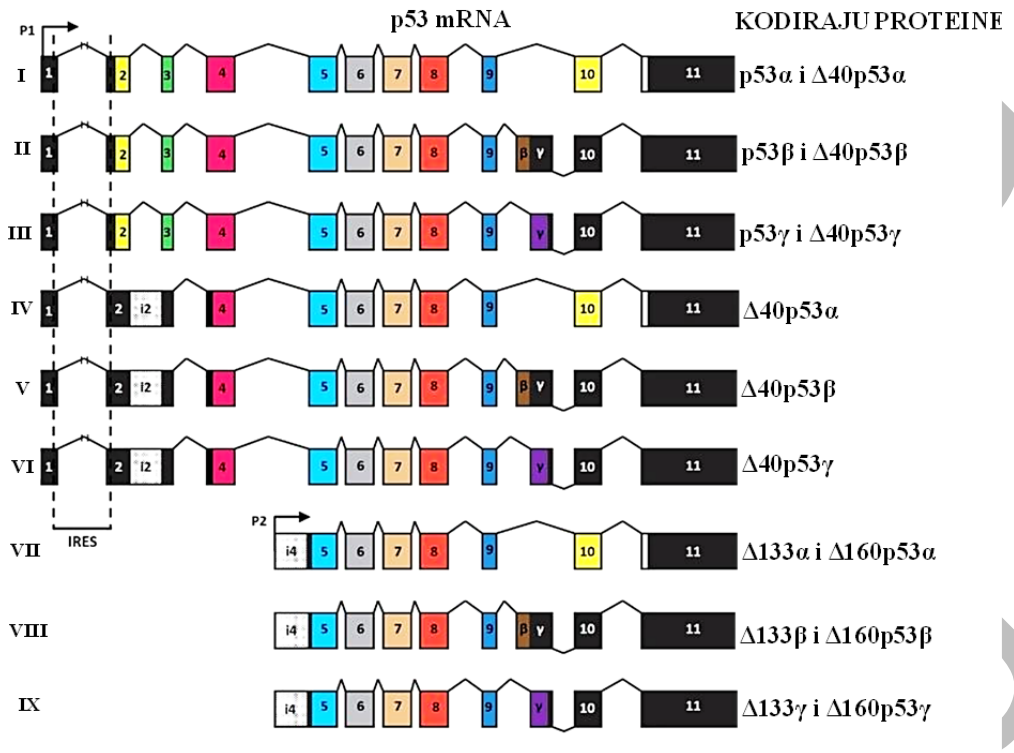


Slika 1. Struktura gena *TP53* (45). Prikazani su promotori gena *TP53* (P1 i P2), mjesta alternativnog prekrajanja (označena znakom ^), crni pravokutnici predstavljaju nekodirajuće sljedove, dok bijeli pravokutnici predstavljaju kodirajuće eksone.

Izoforme gena *TP53* nastaju korištenjem dva različita promotora, alternativnim prekrajanjem mRNA i alternativnim mjestima početka translacije. S gena *TP53* prepisuje se 9 molekula mRNA koje kodiraju 12 proteinskih izoformi (p53α, p53β, p53γ, Δ40p53α, Δ40p53β,

Osjena rada u Vijeku

Δ40p53γ, Δ133p53α, Δ133p53β, Δ133p53γ, Δ160p53α, Δ160p53β i Δ160p53γ) koje su do danas opisane i okarakterizirane u ljudi (slika 2) (46).



Slika 2. Izoforme gena *TP53*. S gena *TP53* prepisuje se 9 transkripata mRNA koje kodiraju za 12 proteinskih izoformi (44). Crni pravokutnici predstavljaju nekodirajuće sljedove, dok pravokutnici u bojama predstavljaju kodirajuće. Na 5´ kraju nalazi se regija koja tvori unutarnje mjesto ulaska ribosoma (engl. *internal ribosomal entry site*, IRES).

Promotor P1 prepisuje kanonsku mRNA koja alternativnim prekrajanjem gubi intron 2 i generira p53α, p53β i p53γ (slika 2, mRNA označene rimskim brojevima I, II, III). Kanonski transkripti mogu zbog alternativnog prekrajanja zadržati intron 2 (koji sadrži stop-kodone) pa translacija započinje s drugog inicijacijskog mjesta i nastaju izoforme Δ40p53α, Δ40p53β i Δ40p53γ (slika 2, mRNA označene rimskim brojevima IV, V, VI).

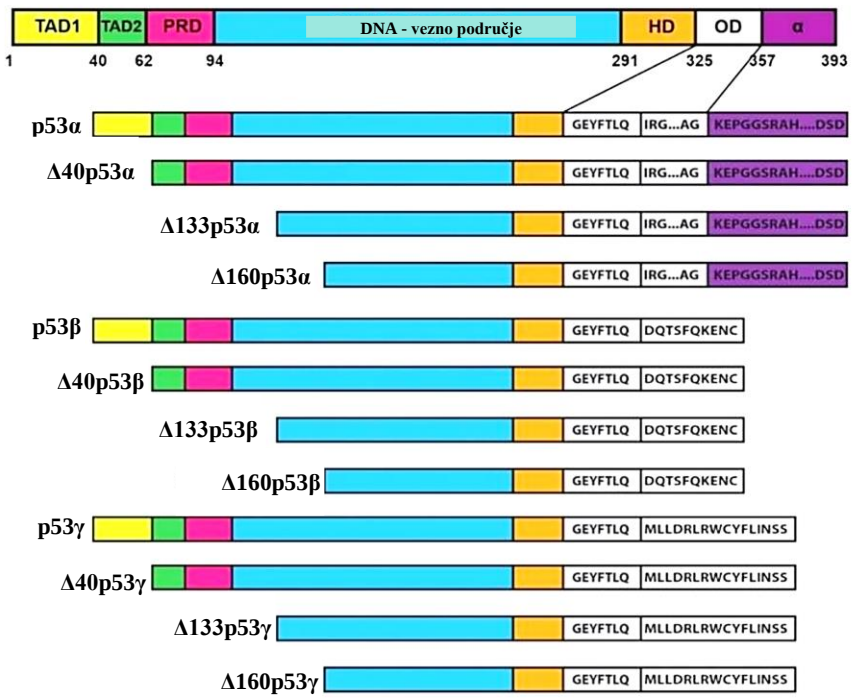
Prepisivanjem s promotora P2 nastaju izoforme Δ133p53 i Δ160p53 koje počinju translaciju s inicijacijskog kodona 133, odnosno 160 (slika 2). Izoforma p53 kontrolira aktivnost promotora P2, što joj omogućava da aktivira ekspresiju izoformi Δ133p53 i Δ160p53, koje povratno formiraju tetramere s izoformom p53, te na taj način inhibiraju njegovu transkripcijsku aktivnost (46). Izoforme p63/p73 također mogu potaknuti ekspresiju izoforme Δ133p53 aktiviranjem promotora P2 (46).

Većina alternativnog prekrajanja p53 mRNA događa se na 3' kraju, te tako nastaju proteinske izoforme koje se razlikuju u karboksi-kraju (varijante α, β i γ) (slika 2) (46). Potpuno izrezivanje introna 9 dovodi do stvaranja α-izoformi s funkcionalnom oligomerizacijskom domenom, dok djelomična retencija introna 9 (9β, odnosno 9γ) dovodi do stvaranja izoformi β i γ. Introni 9β i 9γ sadrže stop-kodone pa se eksoni 10 i 11 prepisuju (47,48).

1.2.2. Struktura proteina p53

Izoforma p53α, poznata pod nazivima p53 pune dužine (engl. *full-length p53*, FLp53), divlji tip proteina p53 ili kanonski protein p53, dominantna je izoforma koja se sastoji od 393 aminokiseline i ima molekularnu težinu 53 kDa. Ima sedam funkcionalnih regija (slika 3) (8,46). Na amino-kraju proteina p53 pune dužine nalaze se dva transaktivacijska područja (TAD I i TAD II od engl. *transactivation domain*), područje bogato prolinom (PRD od engl. *proline rich domain*) i područje sa signalom za izlazak iz jezgre (NES od engl. *nuclear export signal*). Središnje područje koje prepoznaje specifičan slijed DNA naziva se DNA-vezno područje (DBD od engl. *DNA binding domain*). Karboksi-kraj sadrži fleksibilno područje koje povezuje DNA-vezno područje, područje zgloba (HD od engl. *hinge domain*), oligomerizacijsko područje (OD od engl. *oligomerization domain*) te α-regulatorno ili C-terminalno područje (CTD od engl. *C-terminal domain*) (8).

Ocjena rada u tijeku



Slika 3. Funkcionalna područja proteinskih izoformi gena *TP53* (44). Protein p53 pune dužine ima sedam područja: transaktivacijsko područje I (TAD I), transaktivacijsko područje II (TAD II), područje bogato prolinom (PRD), DNA-vezno područje (DBD), područje zgloba (HD), oligomerizacijsko područje (OD) i α- regulatorno ili C-terminalno područje. Ostale proteinske izoforme su skraćene verzije proteina p53 pune dužine.

Transaktivacijska područja su ključna za funkciju proteina p53 u stanicama jer aktiviraju transkripciju ciljnih gena i ulaze u visoko specifičnu interakciju s različitim proteinima, kao što je protein MDM2 (49–51). Prolinom bogato područje povezuje transaktivacijsko područje s DNA-veznim područjem, sadrži četiri kopije s motivima PXXP (P-prolin, X-bilo koja aminokiselina), sudjeluje u promjeni 3D strukture proteina p53 te regulira orijentaciju funkcionalnih područja, ima važnu ulogu u apoptozi i inhibiciji transkripcije (51). Signalno područje za izlazak iz jezgre, NES, bitno je za izlazak proteina p53 iz jezgre i njegovu citoplazmatsku degradaciju. Osim toga, dodatno regulira nuklearno-citoplazmatsku lokalizaciju proteina p53 i time utječe na njegovu funkciju u različitim staničnim procesima (51).

DNA-vezno područje je središnji dio proteina p53 koje omogućuje vezanje ovog proteina za specifične sljedove u molekuli DNA. Oko 80 % do 90 % mutacija gena *TP53* nalazi

Ocjena u tijeku

se u ovom području i one mogu dovesti do gubitka funkcije proteina p53 kao transkripcijskog faktora (44,46,49,52).

Područje zgloba, HD, nalazi se između DNA-veznog i oligomerizacijskog područja proteina p53, te omogućava strukturnu fleksibilnost ovog proteina. Gubitak ovog područja onemogućava proteinu p53 prepoznavanje ciljnih sljedova na molekuli DNA (44).

Oligomerizacijsko područje, OD, omogućava proteinu p53 da formira tetramere. Mutacije u ovom području mogu smanjiti afinitet vezanja proteina p53 za ciljne sekvence molekule DNA (49). C-terminalno područje sadrži i područje sa signalom za smještanje u jezgru, NLS, koje je odgovorno za transport proteina p53 u jezgru stanice gdje može djelovati kao transkripcijski faktor. Osim toga, C-terminalno područje regulira aktivnost proteina p53 putem posttranslacijskih modifikacija, kao što su fosforilacija, metilacija, acetilacija i ubikvitinacija (44,46,49–51,53) Ove modifikacije mogu utjecati na stabilnost i funkciju proteina p53 te na njegovu sposobnost da regulira gene uključene u kontrolu staničnog ciklusa, apoptozu i druge procese u stanicama.

Izoforme p53α, β, γ nose oznaku TA jer sadržavaju cijelu transaktivacijsku domenu. Izoforme Δ40p53 (α, β, γ), Δ133p53 (α, β, γ) i Δ160p53 (α, β, γ) nose oznaku ΔN zato što su skraćene su na N-kraju i nedostaje im cijela ili dio transaktivacijske domene (8).

1.2.3. Uloga i regulacija aktivnosti proteinskih izoformi gena *TP53*

Izoforme gena *TP53* razlikuju se u strukturi, unutarstaničnoj lokalizaciji i funkciji (48). Cjelovite (TA) i skraćene (ΔN) proteinske izoforme gena *TP53* uglavnom imaju suprotne biološke funkcije: skraćene izoforme potiču diobu stanica, dok cjelovite izoforme potiču zastoj u staničnom ciklusu, stanično starenje i apoptozu. Ipak, izoforme gena *TP53* ne možemo jednoznačno okarakterizirati kao tumor-supresorske ili onkogene, jer njihova funkcija se mijenja ovisno o uvjetima unutar stanice i vrsti tkiva u kojem su eksprimirane, a ravnoteža između različitih izoformi određuje sudbinu stanice (46,47,53).

Tumor-supresorske funkcije gena *TP53* u stanici obavlja njegova najviše eksprimirana izoforme p53α, koju nazivamo i divljim tipom proteina p53, proteinom p53 pune dužine ili kanonskim proteinom p53. Ostale izoforme proteina p53 pojačavaju ili inhibiraju učinak izoforme p53α (47).

Ocjena rada u tijeku

Prema definiciji, protein p53α je transkripcijski faktor koji regulira stanični odgovor na stres i djeluje kao tumorski supresor. On regulira dijeljenje stanica onemogućavajući njihovu prebrzu i nekontroliranu diobu te tako sprječava nastanak tumora. U slučaju oštećenja DNA, zaustavlja stanični ciklus, sudjeluje u popravku DNA i, ako DNA ostaje oštećena, pokreće proces apoptoze. Protein p53α specifično prepoznaje i veže se na određene sljedove DNA više od 300 kodirajućih i nekodirajućih gena te regulira njihovu ekspresiju. Specifične sekvence na koje se veže protein p53α u obliku tetramera zovu se ciljna mjesta (engl. *p53-responsive elements,* pRE). Osim svojih tumor-supresorskih funkcija, protein p53α igra važnu ulogu u mnogim biološkim i patološkim procesima, kao što su metaboličke bolesti, starenje, ishemija, neurodegenerativna stanja, odgovor stanica na ozljedu i virusnu infekciju te u rastu i razvoju (4,54).

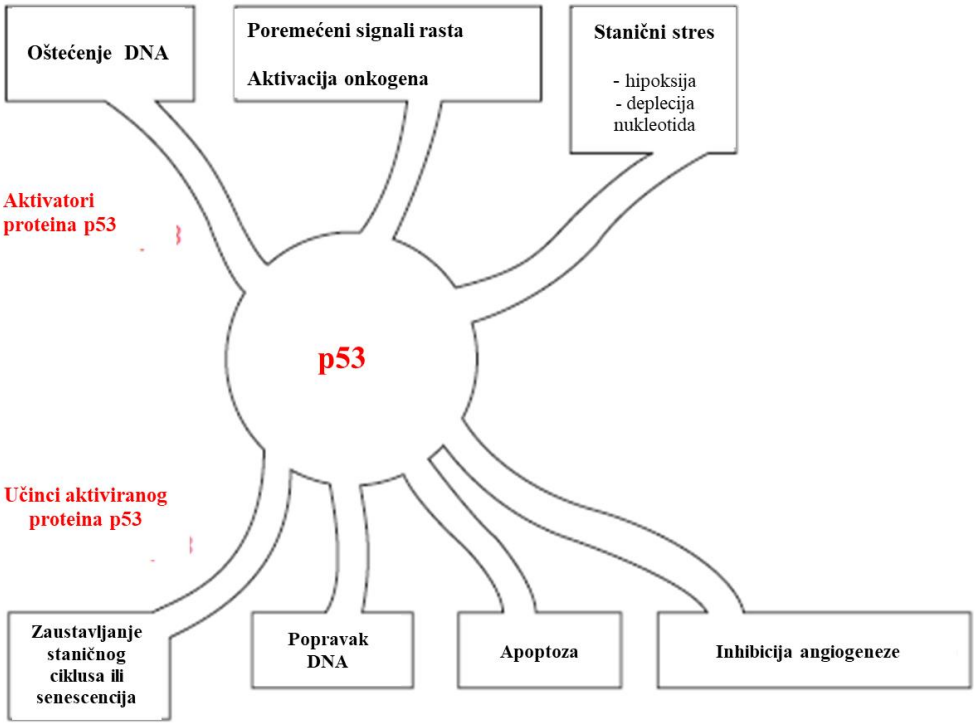
U normalnim uvjetima, protein p53α ima kratko poluvrijeme života, otprilike 5 do 20 minuta, nisku razinu ekspresije, i uglavnom se nalazi u citoplazmi. E3-ubikvitinska ligaza MDM2 je najvažniji regulator aktivnosti proteina p53α. Ona dodaje molekule ubikvitina na protein p53α i razotkriva njegovo područje za izlazak iz jezgre (NES), pri čemu protein p53α izlazi iz jezgre i degradira se na proteasomima u citoplazmi (44,52). Protein MDM2 također blokira acetilaciju proteina p53α, čime onemogućava njegovu transkripcijsku aktivnost u jezgri stanice. Povezanost između proteina p53 i MDM2 mehanizmom negativne povratne sprege važna je za održavanje stabilne razine proteina p53 u stanicama koje nisu pod stresom. U slučaju porasta razine proteina p53α u jezgri, povećava se i razina proteina MDM2. To rezultira označavanjem proteina p53α za razgradnju, te blokiranjem njegove transkripcijske aktivnosti, što omogućava kontrolu nivoa proteina p53 u stanici (52).

Različiti stresni signali uzrokuju porast razine proteina p53α u stanici. Genotoksični stresni signali koji uzrokuju oštećenja DNA su citotoksični lijekovi, UV i x-zračenje, reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi, karcinogeni. S druge strane, negenotoksični stresni signali su hipoksija, deplecija ribonukleotida, narušena adhezija stanica, deprivacija faktora potrebnih za preživljavanje te aktivacija onkogena (slika 4) (6).

U uvjetima stresa, protein p53α i MDM2 imaju dulje vrijeme poluživota, oko 2 do 3 sata, zbog posttranslacijskih modifikacija oba proteina koje onemogućavaju njihovu interakciju. Protein MDM4 (poznat i kao MDMX) dodatni je fiziološki inhibitor proteina p53α koji nema ligaznu aktivnost, ali stvara heterodimere s proteinom MDM2 i inhibira njegovu autoubikvitinaciju (55,56). Nakon stabilizacije, protein p53α se premješta u jezgru gdje se u

Ocjena rada u tijeku

obliku homotetramera veže za DNA te inducira ekspresiju gena odgovornih za zaustavljanja staničnog ciklusa, popravak DNA, programiranu staničnu smrti (apoptozu), stanično starenje (senescenciju), diferencijaciju te zaustavljanje angiogeneze. Vrsta odgovora proteina p53 ovisi o vrsti stresa, tipu stanice i tkivnom kontekstu (slika 4) (6).

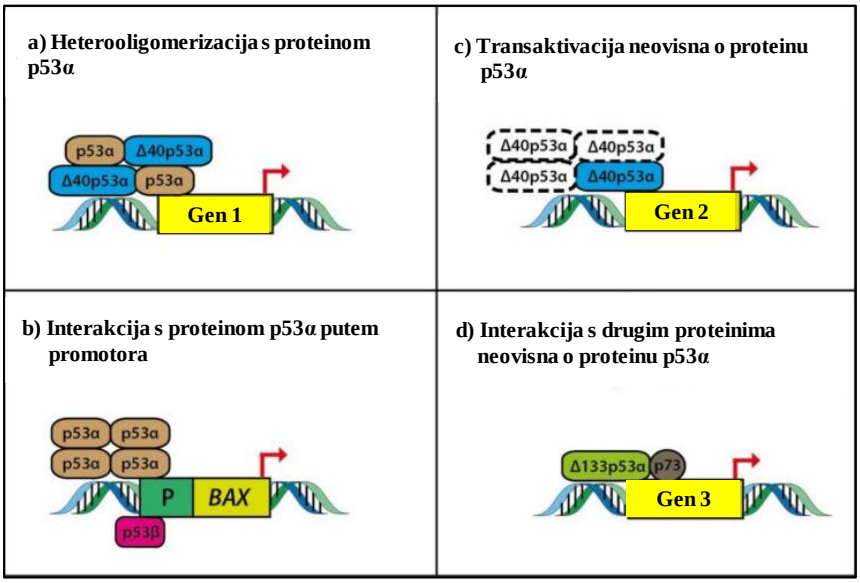


Slika 4. Aktivacija i učinci proteina p53 kao transkripcijskog faktora (preuzeto i prilagođeno prema Pecorino 2012) (6)

U tkivu bubrega, međuodnos gena *VHL* i *TP53* određuje odgovor stanice na stres (4). Produkt gena *VHL*, protein VHL, ima dvojaki učinak na protein p53. Prvo, inhibira ubikvitinaciju proteina p53 posredovanu proteinom MDM2 i time stabilizira protein p53. Drugo, potiče acetilaciju proteina p53 i povećava njegovu transkripcijsku aktivnost, što rezultira zaustavljanjem staničnog ciklusa i apoptozom (57).

Sve izoforme gena *TP53* sudjeluju u raznim biološkim procesima poput regulacije staničnog ciklusa, stanične smrti, staničnog starenja, upale, invazije, antioksidativnog odgovora, regeneracije tkiva, obnavljanja matičnih stanica i diferencijacije (44,46). Izoforme p53 aktiviraju ciljne gene u prisutnosti proteina p53α formirajući s njim heterotetramere ili

direktnim vezanjem na promotore ciljnih gena proteina p53α, ali mogu i potpuno neovisno o proteinu p53α aktivirati ciljne gene samostalno ili formirajući heterotetramere s proteinima p73 i p63 (slika 5) (44). Različiti stresori u različitim stanicama induciraju ekspresiju različitih izoformi gena *TP53*, pa tako odgovor stanice na stres ovisi o vrsti stresa, o staničnom kontekstu i o relativnoj ekspresiji različitih izoformi (44,48).



Slika 5. Prikaz interakcija izoformi p53 kroz koje ostvaruju svoje biološke funkcije. a) Izoforme p53 mogu tvoriti heterotetramere s proteinom p53α, b) izoforme p53 mogu aktivirati ciljne gene u prisutnosti izoforme p53α vezanjem direktno na promotor ciljnog gena, c) izoforme proteina p53 mogu samostalno aktivirati ciljne gene, d) izoforme proteina p53 mogu sudjelovati u aktivaciji ciljnog gena kroz interakciju s drugim proteinima obitelji p53 (preuzeto i prilagođeno prema Anbarasan i Bourdon 2019) (44)

Izoforma p53β uglavnom je smještena u jezgri i tvori proteinske oligomere s p53α. Za razliku od p53α, izoforma p53β ima veći afinitet prema promotoru proapoptotskih gena poput gena *BAX* i *CDKN1A*, ali manji prema promotoru gena *MDM2* te usmjerava sudbinu stanice prema apoptozi (47). S druge strane, izoforma p53γ može biti prisutna i u jezgri i u citoplazmi, a za razliku od p53β, veže se samo na promotor proapoptotskog gena *Bax* te ima citotoksičan učinak (47).

U odnosu na izoformu p53α, izoformi Δ40p53 nedostaje prvih 39 aminokiselina, odnosno cijela prva transaktivacijska domena (TAD I), ali zadržava drugu transaktivacijsku domenu (TAD II). Izoforma Δ40p53 može aktivirati gene neovisno o proteinu p53α te tvoriti oligomere s njim, čime mijenja aktivnost proteina p53α kao transkripcijskog čimbenika. Važno je napomenuti da izoforma Δ40p53 tvori stabilnije oligomere s afinitetom značajno većim od izoforme p53α. Male promjene u ekspresiji ove izoforme mogu značajno utjecati na odgovor stanice na stres (4,8). Budući da izoforma Δ40p53 ne može biti razgrađena s proteinom MDM2 zbog nedostatka područja TAD1, ima duže poluvrijeme života u usporedbi s izoformom p53α (58). Niska ekspresija izoforme Δ40p53 povećava transaktivacijsku sposobnost izoforme p53α, dok više razine ekspresije ove izoforme mogu inhibirati antiproliferativne učinke izoforme p53α (44,58). Izoforma Δ40p53 također negativno regulira promotor P2 gena *TP53*, smanjujući ekspresiju izoforme Δ133p53 (58).

Proteinske izoforme Δ133p53 i Δ160p53 ne sadrže prvih 132, odnosno 159 aminokiselina, nedostaju im oba transaktivacijska područja i dio DNA-veznog područja, čime je promijenjena njihova sposobnost vezanja na ciljne gene i ne podliježu razgradnji ovisnoj o proteinu MDM2 (45). Izoforma Δ133p53α smještena je u jezgri, Δ133p53β može biti prisutna i u jezgri i citoplazmi, dok se izoforma Δ133p53γ nalazi samo u citoplazmi (43). Izoforma Δ133p53α može stvarati tetramere s drugim izoformama koje imaju oligomerizacijsku domenu, a zbog nedostatka dijela DNA-vezne domene njena sposobnost vezanja za ciljne gene je smanjena. Kada se veže za izoformu Δ40p53, može smanjiti njen negativni učinak na promotoru P2 gena *TP53* i time povećati vlastitu ekspresiju (58). Istraživanja su pokazala kako izoforma Δ133p53 promovira preživljavanje stanica putem indukcije gena uključenih u popravak DNA i angiogenezu, inhibiciju apoptoze te regulaciju imunološkog odgovora na tumor (8,45,52). Izoforma Δ160p53 nema veći dio DNA-veznog područja, no još uvijek nije poznato može li sama inducirati ekspresiju gena ili je njena funkcija samo regulacija aktivnosti proteina p53α (8).

Osim međusobno, izoforme gena *TP53* mogu ulaziti u interakciju s izoforma gena *TP63/TP73* formirajući heterotetramere. Proteini p63 i 73 imaju sličnu strukturu kao i protein p53, te sadrže DNA-vezno područje, N-terminalno i C-terminalno oligomerizacijsko područje. Na C-kraju proteina p73 i 63 se nalazi sterilni alfa motiv (engl. *sterile alpha motif*, SAM), koji važan za interakcije protein-protein (58). Korištenjem dva promotora te alternativnim prekrajanjem introna nastaje 6 proteinskih izoformi gena *TP63* i 11 proteinskih izoformi gena *TP73*, koje se mogu karakterizirati kao cjelovite jer sadrže cjelovito transaktivacijsko područje

Ocjena rada u tijeku

i nose oznaku TA, te skraćene izoforme, kojima nedostaje cijeli ili dio transaktivacijskog područja i nose oznaku ΔN. Cjelovite i skraćene izoforme proteina p63/p73 imaju suprotne funkcije, pa tako TA izoforme imaju funkciju tumorskog supresora, tj. izoforma TAp73 imitira funkcije proteina p53, ali je njena sposobnost izazivanja apoptoze smanjena u odnosu na protein p53. Izoforme skraćene na amino kraju, tj. izoforme ΔN imaju onkogene funkcije, pa tako ΔNp73 inhibira apoptozu posredovanu proteinima p53 i TAp73.

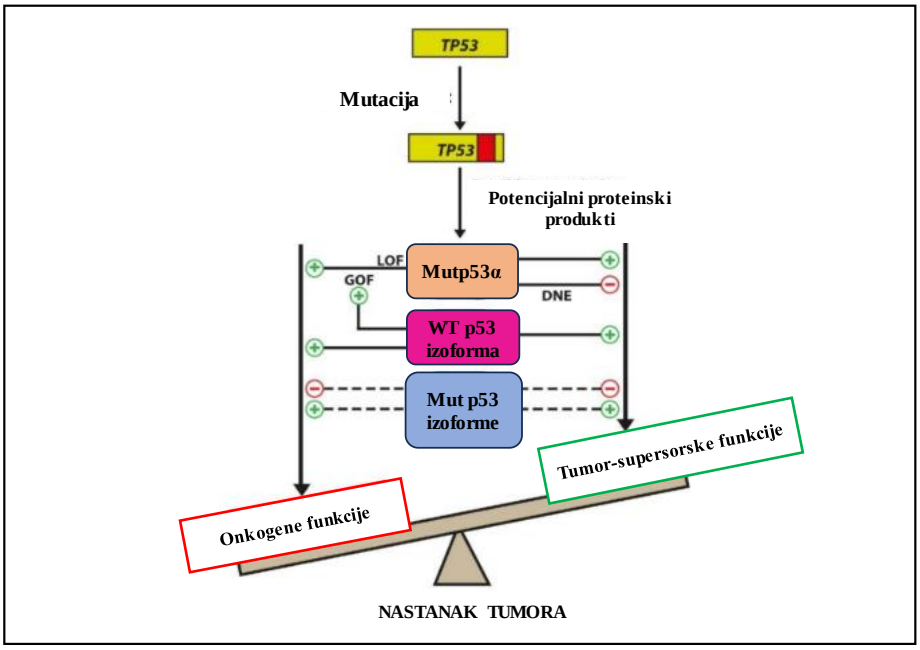
Izoforme p53α i TAp73 reguliraju razinu ekspresije pojedinih izoformi mehanizmom povratne sprege, aktivirajući unutarnji promotor gena *TP53* pri čemu dolazi do ekspresije izoforme Δ133p53, koja povratno inhibira p53α i TAp73. Osim toga, izoforme p53α i TAp73 aktiviraju unutarnji promotor gena *TP73*, što dovodi do nastanka ΔNp73 izoformi koje inhibiraju izoforme p53α i TAp73 (59). Proteini p73 i p63 također ulaze u interakciju s proteinom MDM2, ali to ne dovodi do njihove razgradnje, već do premještanja proteina p73 u citoplazmu i njegove posttranslacijske modifikacije. Značenje interakcije proteina p63 i MDM2 još uvijek nije poznato (58). Stoga, konačni odgovor stanice na stres ovisi o međusobnoj interakciji izoformi p53, p63 i p73, a omjer ekspresije članova obitelji važan je čimbenik koji određuje sudbinu stanice (60).

1.2.4. Gen *TP53* u humanim tumorima

Promjene u genu *TP53* prisutne su u više od polovice ljudskih tumora. U literaturi je opisano preko 34 000 različitih promjena u genu *TP53*, od kojih samo 35 ne dovodi do nastanka tumora (engl. *passenger mutations*). Promjene u strukturi gena *TP53* mogu rezultirati smanjenjem ili potpunim gubitkom funkcije divljeg tipa proteina p53 kao transkripcijskog faktora (engl. *loss of function*, LOF), ali također mogu dovesti i do stjecanja novih funkcija u kojima mutirani protein p53, koji je otporan na proteosomalnu degradaciju i duže se zadržava u stanicama, surađuje s onkogenima u procesu maligne transformacije stanica, što se naziva efektom stjecanja novih, onkogenih funkcija (engl. *gain of function*, GOF) (slika 6) (6,41). U heterozigotnom genotipu, mutirani protein p53 tvori oligomere s divljim tipom proteina p53, inhibirajući dominantno-negativno aktivnost divljeg tipa p53 (engl. *dominant negative effect*, DNE), te potiče staničnu proliferaciju i migraciju (slika 6) (4,6). Prema istraživanjima, otprilike 60 % mutacija gena *TP53* ne mijenja transkripcijsku aktivnost proteina p53, oko 15 % mutacija

Ocjena rada u tijeku

rezultira potpunom inaktivacijom, dok preostalih 25 % mutacija modificira transkripcijsku aktivnost proteina p53 (43).

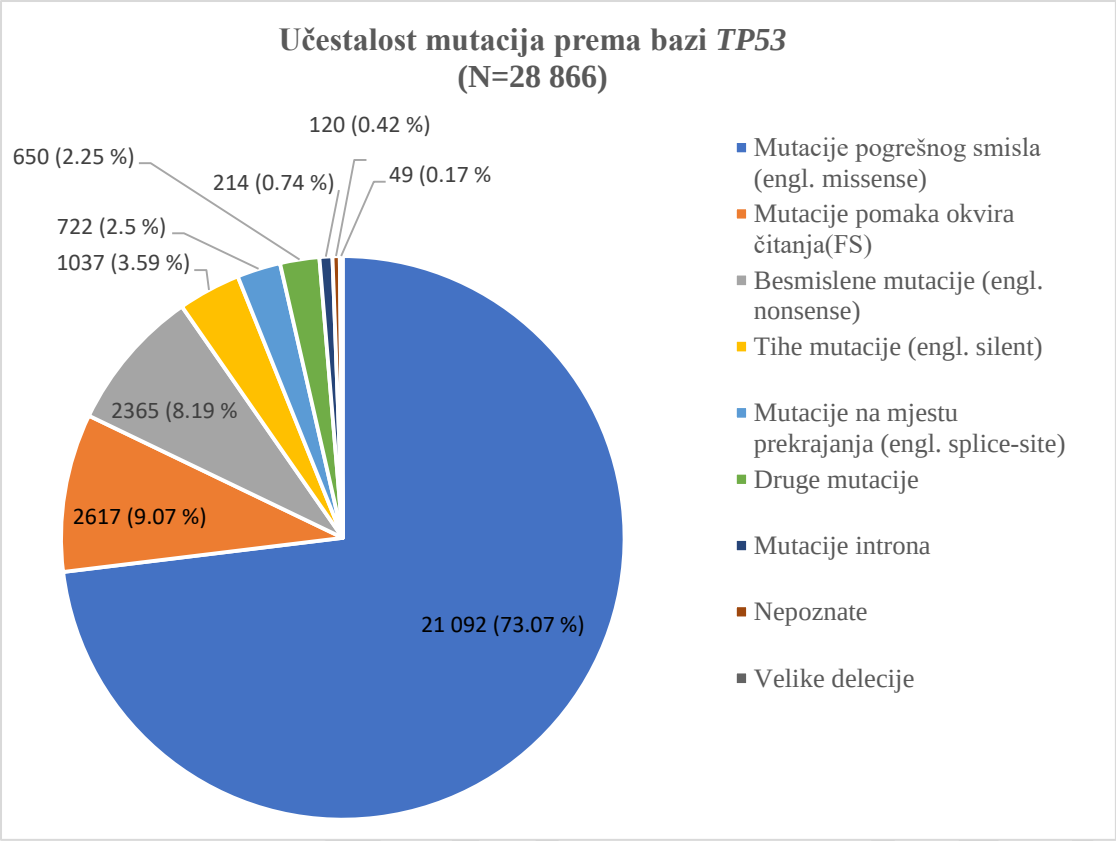


Slika 6. Nakon mutacije *TP53* može nastati mutirani p53 (Mutp53α), izoforma divljeg tipa (WTp53 izoforma) i mutirana izoforma p53 (Mutp53 izoforma). Mutp53 može uzrokovati potpuni gubitak funkcije WT p53 putem dominantno-negativne inaktivacije alela divljeg tipa ili može stjecanjem novih funkcija imati onkogeni učinak. WTp53 izoforme mogu imati funkcije tumorskih supresora ili onkogene funkcije. Funkcije Mutp53 izoformi u tumorigenezi još nisu potpuno razjašnjene (preuzeto i prilagođeno prema Anbarasan i Bourdon 2019) (44).

Mutacija gena *TP53* najčešće se događa u DNA-veznom području, između eksona 2 – 5, odnosno kodona 125 i 300 koji se smatraju „vrućim točkama“ (6,41,61). Većina mutacija u ovom području, njih 73 %, su mutacije pogrešnog smisla (slika 7) (62).

Veća delecija gena *TP53* je rijetka, osim u slučajevima multiplog mijeloma i kronične limfocitne leukemije, gdje je česta i ima prognostički značaj. Delecija kratkog kraka kromosoma 17 koja zahvaća gen *TP53* povezana je s kraćim preživljenjem bolesnika i većom stopom ponovne pojave bolesti (63,64).

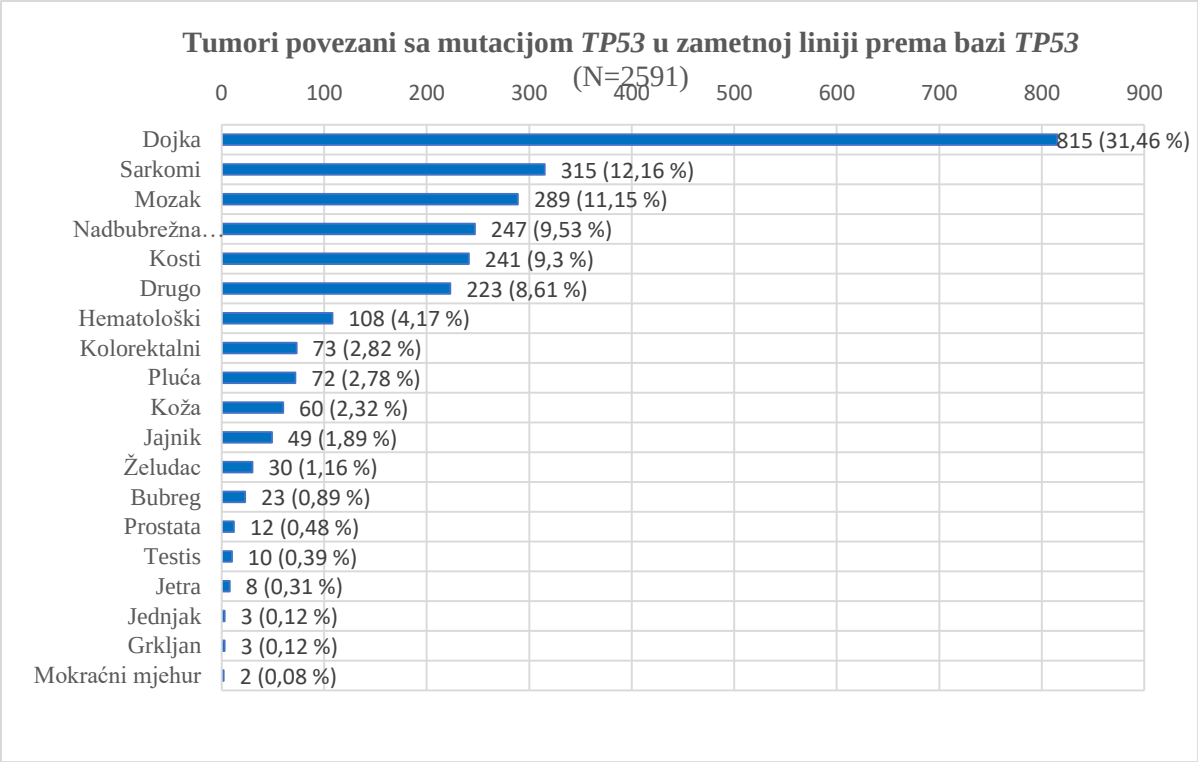
Ocjenjivanje u tijeku



Slika 7. Mutacije gena *TP53*. Prema bazi *TP53* (dostupno na https://tp53.isb-cgc.org/)

Promjene gena *TP53* mogu zahvatiti somatske i zametne stanice. Mutacije gena *TP53* u zametnoj liniji nasljeđuju se od roditelja i predstavljaju predispoziciju za razvitak tumora u okviru Li-Fraumenijevog sindroma, koji karakterizira nastanak tumora mozga, karcinoma dojke, sarkoma i drugih tumora u mlađoj životnoj dobi (slika 8). *De novo* promjene gena *TP53* u zametnoj liniji tijekom embriogeneze ili u spolnim stanicama roditelja su relativno rijetke, u prosjeku dvije od 18 promjena, a javljaju se kod 1 na 5000 do 1 na 20 000 novorođenčadi (65).

Ocjena u tijeku



Slika 8. Tumori povezani s mutacijama *TP53* u zametnoj liniji. Preuzeto iz Baze *TP53* (engl. *The TP53 Database*, dostupno na https://tp53.isb-cgc.org/)

S obzirom na učestalost somatskih mutacija gena *TP53* razlikujemo tumore s visokom (38 % do 50 %) i manjom učestalosti (oko 5 %) mutacija gena *TP53*. Primjeri tumora s višom učestalosti mutacija uključuju karcinom jajnika, jednjaka, debelog crijeva, glave i vrata, larinksa i pluća, dok tumori s manjom učestalošću mutacija obuhvaćaju primarne leukemije, sarkome, maligne melanome, karcinome cerviksa, testisa i bubrega. (41). Mutacije gena *TP53* češće se javljaju u uznapredovalim stadijima tumora i povezane su s otpornošću na kemoterapiju i lošijom prognozom (4).

Osim mutacijom, u tumorima gen *TP53* može biti inaktiviran metilacijom promotora, povećanom ekspresijom inhibitora proteina p53 MDM2, ekspresijom različitih inaktivirajućih mikroRNA (miRNA) i promjenama u ekspresiji izoformi gena *TP53/TP63/TP73* (6). Proteini p63 i p73 su esencijalni za tumor-supresorske aktivnosti proteina p53 (6). U brojnim tumorima zabilježena je povišena ekspresija skraćenih ΔN izoformi proteina p73 i p63, koje tvore heterokomplekse sa proteinima p53/TAp63/TAp73 i tako dominantno-negativno inhibiraju njihovu transaktivacijsku aktivnost, što se dovodi u vezu s lošijim ishodom bolesnika (59).

Ocjena u tijeku

Nenormalna metilacija promotora gena *TP53* smanjuje ili čak zaustavlja njegovu ekspresiju, a nađena je u karcinomu debelog crijeva, dojke, bubrega i želuca. Povišena ekspresija onkogena, poput proteina MDM2 nađena je u sarkomima, limfoblastičnoj leukemiji i bronhogenom karcinomu te u ranim stadijima svjetlostaničnog i papilarnog karcinoma bubrega (4,66). Mutacija drugih tumor-supresorskih gena, kao što je gen *VHL*, može uzrokovati inaktivaciju divljeg tipa *TP53* (4).

Mutacije gena *TP53* rijetke su u karcinomu bubrega, ali kad su prisutne tada su to najčešće mutacije pogrešnog smisla u DNA-veznom području (4,52). Prema bazi podataka COSMIC (engl. *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*), učestalost mutacija gena *TP53* u karcinomu bubrega iznosi svega 8,75 %, pri čemu su najzastupljenije u kromofobnom karcinomu bubrežnih stanica (25,62 %), dok su znatno manje zastupljene svjetlostaničnom (6,73 %) i papilarnom karcinomu bubrega (1,98 %) (52,67). Somatske mutacije gena *TP53* u karcinomu bubrega povezane su s kraćim preživljenjem vezanim uz karcinom i rezistencijom tumora na konvencionalno liječenje (68,69).

Određene kancerogene tvari mogu uzrokovati specifične promjene sljedova DNA, takozvani DNA otisak (engl. *DNA fingerprint*). Jedan od primjera takve tvari je aristolohična kiselina, koja je genotoksični mutagen prisutan u biljkama roda *Aristolochia*. Ova tvar unosi se u organizam putem hrane i može uzrokovati endemsku nefropatiju, karakteriziranu oštećenjem proksimalnih tubula bubrega, intersticijskom fibrozom te češćim urotelnim karcinomom gornjeg urinarnog sustava. Specifična mutacija gena *TP53* je izolirana u stanicama bubrega oboljelih od ove bolesti, manifestira se kao transverzija A:T-> T:A u kodonu 61 i povezana je s povišenom ekspresijom proteina p53 (59,70–72).

Kao novi dijagnostički pristup koristi se cirkulirajuća tumorska DNA (engl. *circulating tumor DNA*, ctDNA) (73). Prema istraživanju Smitha i suradnika prilikom analize panela od 74 gena koristeći ctDNA iz uzoraka plazme 220 bolesnika s metastatskim karcinomom bubrega, otkrili su genomske promjene u 79% bolesnika. Najčešće mutacije uključivale su gen *TP53* (35 %), *VHL* (23 %), *EGFR* (17 %), *NF1* (16 %) i *ARID1A* (12 %) (74).

Potrebna su dodatna istraživanja da bi se objasnio utjecaj mutacije gena *TP53* u razvoju karcinoma bubrega, uzimajući u obzir okolišne i genetske osobine bolesnika.

Ocjena rada u tijeku

1.2.5. Izoforme gena *TP53* u humanim tumorima

Dosadašnja istraživanja pokazala su da tumori i zdravo tkivo imaju različitu ekspresiju izoformi gena *TP53*. Također, profil ekspresije izoformi gena *TP53* mijenja se u prisutnosti mutacije gena *TP53*. Prekomjerna ekspresija ili gubitak ekspresije izoformi gena *TP53* povezani su s nastankom tumora i njegovom progresijom (44). Ista izoforma može imati različite funkcije u različitim tumorima (47). Tip mutacije određuje profil ekspresije izoformi gena *TP53,* pa tako mutacije u transaktivacijskoj domeni dovode do ekspresije svih izoformi osim p53α, p53β i p53γ te djelomične aktivacije ciljnih gena. Mutacije u DNA-veznom području, s druge strane, imaju lošiju prognozu u usporedbi s mutacijama u transaktivacijskoj domeni (75,76).

Izoforme p53β i p53γ potiču apoptozu u normalnim stanicama, ali mogu poticati rast stanica u staničnim linijama karcinoma dojke (52,77). Povišena ekspresija p53β povezana je s boljom prognozom bolesnika s karcinomom dojke, karcinomom bubrega, melanomom i akutnom mijeloičnom leukemijom (44,78–81). Također, zabilježeno je smanjenje ekspresije izoforme p53β i povećanje ekspresije izoforme Δ133p53 pri prijelazu adenoma debelog crijevo u adenokarcinom (82). Nadalje, bolesnici s karcinomom pluća i povišenom ekspresijom p53β pokazuju bolji odgovor na kemoterapiju (83). Što se tiče izoforme p53γ, povišena ekspresija je povezana s boljom prognozom kod bolesnika s karcinomom dojke, dok je zabilježeno kraće preživljenje kod bolesnika s karcinomom uterusa (84,85).

Povišena ekspresija Δ40p53α zabilježena je u glioblastomu i karcinomu dojke te je u karcinomu dojke povezana s trostruko negativnim agresivnim tipom (79)(86). Ovaj fenomen sugerira važnu ulogu Δ40p53α u progresiji tih vrsta tumora.. Nasuprot tome, ekspresija Δ40p53α povezana je s dužim preživljenjem bez bolesti u mucinoznom karcinomu jajnika (87). Smanjeni omjer Δ40p53/p53α također je povezan s dužim preživljenjem bez bolesti u bolesnika s karcinomom dojke (88,89). U karcinomu endometrija izoforme Δ40p53 i p53α su dominantne izoforme, dok je u zdravim stanicama eksprimirana samo Δ40p53. Izoforma Δ40p53 također se ističe kao glavna komponenta amiloidnih agregata u karcinomu endometrija (90). Ovaj fenomen predstavlja potencijalnu metu za terapiju koja bi mogla ciljati ovu specifičnu komponentu tumorskog mikrookoliša.

Povišena ekspresija izoforme Δ133p53 povezana je s lošijim ishodom bolesnika oboljelih od melanoma, karcinoma debelog crijeva, kolangiokarcinoma, karcinoma dojke, glioblastoma, karcinoma prostate i tumora pluća (81,91–96). S druge strane, povećana

Ocjena rada u tijeku

ekspresija Δ133p53 povezana je s boljim ukupnim preživljenjem kod bolesnica s karcinomom jajnika i mutiranim genom *TP53* (44,97–99).

Do danas je nekoliko istraživanja analiziralo ekspresiju izoformi gena *TP53* u karcinomu bubrega (9,10,68,78,100). Istraživači su pokušali da odgovore na pitanje da li je specifičan obrazac ekspresije izoformi gena *TP53* povezan s nastankom i progresijom karcinoma bubrega te kliničkim i patohistološkim obilježjima bolesnika i tumora.

Song i suradnici (9) su 2009. godine pokazali da je relativna genska ekspresija izoforme p53β povišena u tkivu karcinoma u odnosu na zdravo tkivo te je povezana sa stadijem tumora. S druge strane. Van den Berg i suradnici (10) su analizirali relativnu gensku ekspresiju izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 u 45 tkiva svjetlostaničnog karcinoma i 25 tkiva zdravog bubrega. Primijetili su porast ekspresije izoforma p53α, β i γ tijekom ranih stadija tumora uz smanjenu ekspresiju inhibitorne izoforme Δ133p53 u usporedbi sa zdravim tkivom. Povišenu ekspresiju izoforme Δ40p53 su detektirali u kasnijim stadijima tumora. Isti autori su istraživali ekspresiju izoformi gena *TP53*, razinu indukcije ciljnih gena proteina p53 uključenih u apoptozu, te razinu apoptoze u staničnim linijama bez mutacije i s mutacijom gena *TP53* nakon tretiranja sa kemoterapeutikom topotekanom. Njihova istraživanja su pokazala da ekspresija izoformi p53 ovisi o mutacijskom statusu gena *TP53,* te da razina indukcije ciljnih gena proteina p53 nije prediktor apoptoze u staničnim linijama (10). Autori su zaključili kako mehanizmi zaslužni za apoptozu u karcinomu bubrega ne uključuju protein p53.

Zhang i njegovi suradnici (78) analizirali su relativnu gensku ekspresiju izoformi p53α, p53β i p53γ u tkivima karcinoma bubrega, te su zaključili da je povišena ekspresija p53β zabilježena u nižim tumorskim stadijima i povezana s boljim preživljenjem bolesnika. Druga studija provedena na 55 bolesnika nije pokazala povezanost ekspresije izoformi p53 sa stadijem karcinoma bubrega i kliničkim značajkama bolesnika, izuzev povezanosti ekspresije Δ133p53α i manje veličine tumora (68).

Protein p53 stvara heterokomplekse s izoformama Δ40p53 i Δ133p53, ali može ulaziti u interakciju i s drugim članovima obitelji p53, kao što su protein p63 i p73. U tumorima se opažaju mješoviti kompleksi mutiranog proteina p53 ili izoformi ΔNp63/ΔNp73 i divljeg tipa proteina p53/TAp63/TA73 što rezultira gubitkom proapoptotskih funkcija proteina p73 (59). Izoforme Δ133p53α i γ su najjači inhibitori aktivnosti TAp73, dok su p53β i γ najslabiji inhibitori (60). Mutacije gena *TP63/TP73* su rijetke u tumorima. U neuroblastomu, tumoru

Ocjena rada u tijeku

pluća, debelog crijeva, dojke, mjehura, jetre i jajnika zabilježena je povišena ekspresija proteina p73 povezana s lošijim ishodom bolesnika (101–103). Stvaranje heterokompleksa mutiranog proteina p53 i izoforme TAp73 može smanjiti apoptozu posredovanu sa TAp73 i uzrokovati smanjenje citotoksičnosti nakon davanja kemoterapije bolesnicima (59).

Budući da su rezultati ranijih istraživanja nedosljedni, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se razjasnila uloga ekspresije i statusa gena *TP53* u karcinomu bubrega. Profil ekspresije izoformi gena *TP53* mogao bi se koristiti pri individualiziranom planiranju i praćenju liječenja bolesnika s karcinomom bubrega (52). Najbolji prognostički sustav uključuje diferencijalnu ekspresiju izoformi u kombinaciji s mutacijskim statusom gena *TP53* (44,47,104)

Ocjena rada u tijeku

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1. Ciljevi istraživanja

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Utvrditi ekspresiju izoformi gena *TP*53 (apsolutnu gensku ekspresiju izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53) u tumorima i pripadajućem zdravom tkivu bubrega.

2. Utvrditi mutacijski status gena *TP53* u tumoru bubrega.

3. Utvrditi postoji li razlika u genskoj ekspresiji izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 između tumorima s divljim i mutiranim genom *TP53*.

4. Utvrditi povezanost genske ekspresije izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 i mutacijskog statusa gena *TP53* s patohistološkim značajkama tumora, kliničkim obilježjima i preživljenjem bolesnika s tumorom bubrega

2.2. Hipoteza

Hipoteza je zasnovana na pretpostavci da postoji razlika u ekspresiji gena *TP*53 između tumorskog i zdravog tkiva bubrega. Apsolutna genska ekspresija izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 razlikuje se između tumora s divljem i mutiranim genom *TP53*.

2.3. Očekivani znanstveni doprinos

Ovo istraživanje bi moglo doprinijeti boljem razumijevanju mehanizama nastanka i progresije karcinoma bubrega, posebno u kontekstu gena *TP53* i njegovih izoformi.

Ekspresija i mutacijski status gena *TP53* mogli bi kao novi molekularni biljezi doprinijeti identificiranju pojedinaca koji su pod posebnim rizikom od nastanka lokalno proširene i metastatske bolesti te na taj način omogućiti individualiziran pristup liječenju i praćenju bolesnika oboljelih od karcinoma bubrega.

Ocjena rada u tijeku

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Biološki materijal

3.1.1. Ispitanici

U istraživanje smo uključili bolesnike koji su liječeni zbog tumora bubrega u razdoblju od studenog 2010. do listopada 2013. godine u Klinici za urologiju, Kliničkog bolničkog centra Zagreb. U tablici 5 smo prikazali kriterije uključenja ispitanika. Svakom bolesniku dodijelili smo jedinstveni broj u svrhu zaštite osobnih podataka. Proveli smo istraživanje u skladu sa Helsinškom deklaracijom, imamo odobrenje etičkog odbora Kliničkog bolničkog centra Zagreb (Klasa 8.1-16/157-2, broj 02/21AG) i Bioetičkog povjerenstva Instituta Ruđer Bošković (Broj: BEP-1160/2-2024.lu).

Tablica 5. Kriteriji uključenja ispitanika u istraživanje

UKLJUČNI KRITERIJI ISPITANIKA
Bolesnik boluje od **primarnog, operabilnog, prethodno neliječenog tumora bubrežnih stanica**
Histološki potvrđen tumor bubrega (uključeni su **svi tipovi karcinoma bubrežnih stanica**)
Svi stadiji tumora prema TNM-klasifikaciji
Ispitanici s **navršenih 18 godina**
Bolesnici su potpisali **informirani pristanak**

Nakon zadovoljenja kriterija uključenja, u istraživanje smo uključili 40 bolesnika, od kojih je 36 (90 %) bolesnika podvrgnuto radikalnoj, a 4 (10 %) bolesnika parcijalnoj nefrektomiji.

Koristili smo bolnički informatički sustav Kliničkog bolničkog centra Zagreb za prikupljanje podataka o bolesnicima i karakteristikama tumora. Prikupljali smo podatke o spolu, dobi i kliničkoj slici (simptomatski/asimptomatski) bolesnika u trenutku postavljanja

dijagnoze te o prognostičkim čimbenicima karcinoma bubrega koji su sadržani u aktualnim smjernicama Europskog urološkog udruženja (engl. *European Association of Urology*, EUA) (2). U tablici 6 prikazali smo prognostičke čimbenike karcinoma bubrega koje smo analizirali u istraživanju.

Tablica 6. Prikaz analiziranih prognostičkih čimbenika tumora bubrega

PROGNOSTIČKI ČIMBENICI KOJI SU ANALIZIRANI U ISTRAŽIVANJU	
ANATOMSKI	HISTOLOŠKI
veličina tumora zahvaćenost venskog sustava tumorom zahvaćenost bubrežne kapsule tumorom zahvaćenost perirenalnog tkiva tumorom zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova tumorom prisutnost udaljenih presadnica TNM-stadij[a]	nuklearni gradus po SZO/ISUP[b] histološki tip tumora

[a] 8. izdanje TNM-klasifikacije iz 2017. godine (14)

[b] SZO/ISUP (Svjetska zdravstvena organizacija/Internacionalno udruženje uroloških patologa, engl. International Society of Uropathology) (14)

Preuzeli smo podatke o veličini tumora, zahvaćenosti venskog sustava, bubrežne kapsule, perirenalnog tkiva i regionalnih limfnih čvorova iz patološkog opisa tumora nakon nefrektomije. Također, iz povijesti bolesti bolesnika dobili smo informacije o prisutnosti udaljenih presadnica. Iz patološkog opisa nakon nefrektomije preuzeli smo detalje o nuklearnom gradusu i stadiju bolesti prema TNM-klasifikaciji, koji su prilagođeni od strane patologa prema 8. izdanju TNM-klasifikacije iz 2017. godine i prema sustavu nuklearnog gradiranja po SZO/ISUP (14).

Nakon operacije, pratili smo bolesnike putem povijesti bolesti, ambulantnih pregleda i telefonskih podatka. Prikupljali smo podatke o postoperativnoj adjuvantnoj terapiji i zdravstvenom statusu bolesnika (živ/umro).

Ocjena u tijeda

3.1.2. Uzorci tkiva bubrega

Uzorci tkiva bubrega nakon nefrektomije pregledani su od strane patologa, stavljeni su u krioepruvete te označeni kao tumorsko i zdravo tkivo bubrega s pripadajućim brojem bolesnika. Pohranili smo krioepruvete u tekući dušik pri -80 ºC u KBC Zagreb do analize koja se provodila u Zavodu za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković. Uzorci zdravog tkiva bubrega bili su dostupni za 36 bolesnika.

3.2. Izdvajanje ukupne RNA iz tkiva

U svrhu analize genske ekspresije izoformi gena *TP53* izolirali smo ukupnu RNA visoke čistoće i integriteta iz tkiva. Koristili smo metodu TRIzol-kloroform-izopropanol koja ima više faza.

U prvoj fazi, fazi homogenizacije, koristili smo reagens TRIzol (monofazna otopina fenola i gvanidinijeva izotiocijanatam Thermo Fisher Scientific, SAD) za lizu stanica i staničnih komponenti, uz istovremenu inaktivaciju RNaza kako bismo zaštitili RNA. U drugoj fazi, fazi separacije, izdvojili smo RNA od ostalih staničnih makromolekula na temelju različite topljivosti makromolekula u organskim otapalima poput kloroforma. Proteini su se ekstrahirali u donju organsku fazu, DNA se otopila na površini, a RNA je ostala u vodenoj fazi. U fazi precipitacije smo taložili RNA izopropranololom. U fazi ispiranja smo dodavali etanol radi uklanjanja nečistoća. U zadnjoj fazi smo otopili RNA u vodi bez RNaza.

Provodili smo prvu fazu izolacije RNA u digestoru zbog isparavanja fenola. Uzeli smo krioepruvete, koje su sadržavale 50 do 100 g smrznutog tkiva bubrega, odmah smo ih stavili u posudu na led, i dodali 1 ml TRIzol-a. Tkivo smo usitnili škaricama te homogenizirano tkivo i TRIzol prenijeli pipetom u mikroepruvetu od 2 mL, snažno promiješali na vorteks miješalici, zatim centrifugirali 10 min pri 12 000 × g i 4 °C.

Ostavili smo uzorke 5 min pri sobnoj temperaturi, zatim dodali 200 µL kloroforma. Ručno smo dobro promiješali sadržaj mikroepruvete i ostavili ga pri sobnoj temperaturi 3 min

Ocjena rada u tijeku

te centrifugirali 15 min pri 12 000 × g i 4 °C kako bi došlo do razdvajanja faza: gornja vodena faza s RNA, srednja interfaza s DNA i donja organska faza s kloroformom i fenolom.

Prebacili smo gornju vodenu fazu s RNA u novu mikroepruvetu i dodali 500 µL izopropanola sobne temperature. Ostavili smo suspenziju na sobnoj temperaturi 10 min te smo centrifugirali 10 min pri 12 000 × g i 4 °C kako bi se istaložila RNA. Nakon centrifugiranja uklonili smo supernatant i na talog dodali 1 mL hladnog 75 % etanola (razrijeđenog vodom tretiranom DEPC-om), kako bismo talog isprali od nečistoća. Mikroepruvetu smo kratko vorteksirali, zatim centrifugirali 5 min pri 7500 × g i 4 °C. Nakon toga uklonili smo etanol i ostavili talog da se osuši pri sobnoj temperaturi 10 min te ga otopili u 100 µL vode pročišćene od RNaza (engl. *RNase free water*).

Izdvojenu RNA pročistili smo koristeći komplet RNeasy Mini Kit (Qiagen, Njemačka) uz dodatak tretmana DNazom (Qiagen) prema uputama proizvođača. Ova metoda se temelji na principu adsorpcije RNA na silika-kolone. Tijekom pročišćavanja mijenjamo ionsku jakost različitim puferima pa se tako u uvjetima visoke ionske jakosti RNA veže na kolonu, a nečistoće se mogu isprati. U posljednjem koraku otpuštamo RNA s kolona. Ovom metodom se pročišćavaju molekule RNA duže od 200 nukleotida te se time dobiva više mRNA, jer su tako isključene molekule manje od 200 nukleotida, koje čine 15 % do 20 % ukupne RNA (5,8S rRNA, 5S rRNA). Sva tri koraka u pročišćavanju RNA (vezanje RNA, ispiranje nečistoća i otapanje RNA) odvijaju se centrifugiranjem. Zbog dodatnog pročišćavanja potencijalno zaostale DNA, na kolone smo dodali DNaza.

Komplet RNeasy Mini Kit sastoji se od kolonica i tri pufera: RLT, RW1 i RPE. Pufer RPE smo prije prve upotrebe 4 puta razrijedili etanolom (96-100%).

U 100 µL izolirane RNA dodali smo 350 µLpufera RLT te smo dobro promiješali. Pufer RLT inaktivira ribonukleaze, osigurava izolaciju netaknute RNA te poboljšava vezanje RNA na kolone. Nakon toga dodali smo 250 µL etanola (96 % do 100 %), koji stvara uvjete pri kojima dolazi do vezanja RNA na kolonice, sve smo promiješali pipetiranjem. Uzorak od 700 µL prebacili smo na kolonu, centrifugirali 15 s pri 8000 × g. Uklonili smo supernatant i dodali na kolonu 350 µL pufera RW1. Uslijedilo je centrifugiranje tijekom 15 sekundi pri 8000 × g, nakon čega smo uklonili supernatant.

Zatim smo pripremili otopinu, koja je sadržavala 10 µL DNaze i 70 µL pufera RDD, ručno promiješali i kratkotrajno centrifugirali da se sadržaj spusti na dno. Dodali smo 80 µL

Ocjena rada u tijeku

otopine DNaze na kolonu i inkubirali 15 min pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije dodali smo ponovno 350 µL pufera RW1 na kolonu te centrifugirali 15 s pri 8000 × g, kako bi uklonili DNazu. Uklonili smo supernatant, dodali 500 µL pufera RPE na kolonu i centrifugirali 15 s pri 8000 × g, nakon čega smo ponovno uklonili supernatant. Nakon toga smo ponovno dodali 500 µL pufera RPE na kolonu i centrifugirali 2 min pri 8000 × g, kako bi osigurali potpuno uklanjanje etanola. Kolonu smo stavili u novu mikroepruvetu i dodali 50 µL vode bez RNaza, te centrifugirali 1 min pri 8000 × g. Mikroepruvetu s izoliranom RNA pohranili smo pri -80 °C do postupka reverzne transkripcije.

3.3. Određivanje koncentracije, čistoće i integriteta izolirane RNA

Spektrofotometrom (BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer, Shimadzu, Japan) smo odredili čistoću i koncentraciju izolirane RNA Kao mjeru čistoće koristii koristili omjer apsorbancije izmjerene pri valnim duljinama 260 nm i 280 nm (A260/A280), a čistom RNA smo smatrali onu koja ima omjer oko 2,0.

Provjerili smo kvalitetu izolirane RNA gel elektroforezom na 1 %-tnom agaroznom gelu uz dodatak etidijevog bromida. Gel smo pripremili tako što smo otopili agarozu zagrijavanjem u puferu 1 × TAE (0,8 mM Tris-acetat; 0,02 mM EDTA, pH 8,0) i dodali etidij bromid u konačnoj koncentraciji 1 µg/mL, zatim smo otopinu izlili u elektroforetsku kadicu, stavili češalj za jažice te ostavili otopinu da se ohladi i polimerizira na ravnoj podlozi. Nakon toga smo izvadili češalj, stavili agarozni gel u kadici u uređaj za elektroforezu te dodali pufer 1 × TAE tako da prekrije agarozni gel. Pomiješali smo uzorke s izoliranom RNA i pufer za nanošenje na gel (0,25% bromfenol modrilo, 0,25% ksilen cijanol fluorofosfat, 30% glicerol) i nanijeli ih pipetom u jažice. Uređaj za elektroforezu smo spojili na protok struje s uzorcima na strani anode, kako bi se negativno nabijene molekule kretale prema katodi. Elektroforeza se odvijala pri naponu 90 V, tijekom 20 min. Za vizualizaciju RNA i fotografiranje gelova koristili smo sustav Image Master VDS (Oharmacia Amersham Biotech, Velika Britanija).

3.4. Reverzna transkripcija

Za prevođenje RNA u komplementarnu DNA (cDNA) koristili smo komplet High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific).

Ocjena rada u tijeku

U mikroepruvetu za PCR prenijeli smo 2 µg RNA te po potrebi dodali kvarcnu vodu (Q H_2O), kako bismo dobili ukupan volumen od 20 µL. Nakon toga smo pripremili 2 × smjesu za reverznu transkripciju (tablica 7).

Tablica 7. Prikaz sastava 2 × smjese za reverznu transkripciju (RT)

REVERZNA TRANSKRIPCIJA	
Komponenta	2× smjesa za RT (V/µL)
10 × pufer za reverznu transkriptazu	4,0
25 × smjese dNTP-ova	1,6
10 × nasumičnih početnica	4,0
reverzna transkriptaza	2,0
inhibitor RNaza	2,0
voda bez nukleaza	6,4
	Σ=20 µL

U mikroepruvetu s 20 µL RNA dodali smo 20 µL 2 × smjese za reverznu transkripciju, dobro promiješali pipetom te kratko centrifugirali. Nakon toga smo mikroepruvete stavili u uređaj za PCR (9800 FastThermal Cycler, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) i pokrenuli program za reverznu transkripciju. Program reverzne transkripcije prikazan je u tablici 8. Nakon završetka reverzne transkripcije razrijedili smo uzorke cDNA 2,5 puta za qPCR-reakciju te ih pohranili pri -20 °C.

Tablica 8. Program reverzne transkripcije

PROGRAM REVERZNE TRANSKRIPCIJE				
	Korak 1	Korak 2	Korak 3	Korak 4
TEMPERATURA	25ºC	37ºC	85ºC	4ºC
VRIJEME	10 min	120 min	5 min	∞

Ocjena da u tijeku

3.5. Kvantitativni PCR (qPCR)

Za analizu apsolutne genske ekspresije izoformi gena *TP53* koristili smo metodu kvantitativne lančane reakcije polimerazom, qPCR (engl. *quantitative polymerase chain reaction*).

Reakcija qPCR omogućava umnožavanje određenog fragmenta DNA kroz cikluse, a njena prednost je što možemo kontinuirano pratiti količinu nastalog produkta. Reakcija započinje denaturacijom dvolančanog kalupa DNA, nastavlja se vezanjem početnica na sekvencu DNA kalupa, a završava produljivanjem lanca DNA pomoću termostabilne DNA polimeraze (Taq-polimeraza). Ova tri koraka čine jedan ciklus koji se ponavlja do 50 puta, pri čemu se željeni fragment DNA umnožava. PCR-reakcija ima dvije faze: eksponencijalnu, u kojoj se DNA denaturirana, dolazi do vezanja početnica i elongacije lanca polimerazom Taq, i plato-fazu, u kojoj su komponente smjese potrošene (potrošeni su nukleotidi ili početnice, oslabila je aktivnost polimeraze).

Količinu produkta određujemo prema signalu koji emitira fluorescentna boja a fluorescencija se povećava s količinom produkta PCR-a. Fluorescentne boje koje se ugrađuju u novonastalu dvolančanu DNA, poput boje SYBR Green, znatno više fluoresciraju ugradnjom u DNA. Mi smo koristili hidrolizirajuće probe, tzv. TaqMan-probe, koje sadrže fluorofor na 5'-kraju (boja FAM) i prigušivač na 3'-kraju (boja TAMRA). Ova proba se veže za kalup DNA, a prilikom djelovanja DNA-polimeraze dolazi do oslobođenja fluorofora od prigušivača, što dovodi do emisije fluorescencijskog signala.

Dijagram amplifikacije ili krivulja fluorescencije prikazuje grafički PCR-reakciju (broj ciklusa naspram intenziteta fluorescencije) i ima sigmoidalni oblik. Na početku PCR-reakcije razina produkta je niska pa je razina fluorescencije niska, što se naziva osnovnom (engl. *baseline*) vrijednošću. Kako se količina PCR-produkta povećava, krivulja prvo poprima linearni, zatim logaritamski rast, nakon čega dolazi do formiranja platoa kada su iscrpljene komponente reakcije. Točka na krivulji kada se intenzitet fluorescencije naglo povećava i prijeđe prag detekcije zove se Ct-vrijednost (engl. *cycle threshold*, Ct).

Apsolutnu kvantifikaciju PCR-produkta omogućuje standard, koji je smjesa nukleotidnih sljedova poznate koncentracije i relativne molekulske mase. Standard se može dodati izravno u reakcijsku smjesu, u uzorak s kojim prolazi sve faze, ili se umnaža u posebnoj reakcijskoj epruveti. Količina PCR-produkta u uzorku određuje se s obzirom na količinu

Ocjena rada u tijeku

produkta u standardu, tj. uspoređuje se vrijednost Ct uzorka s Ct-vrijednostima serijski razrijeđenog standarda. Grafički se rezultat apsolutne kvantifikacije prikazuje standardnom krivuljom (logaritamska vrijednost poznate koncentracije standarda naspram Ct-vrijednosti). Program izračunava korelacijski koeficijent (R^2), nagib pravca (engl. *slope)* i odsječak pravca na osi Y (engl. *Y - Intercept*). Korelacijski koeficijent (R^2) nam govori o linearnosti standardne krivulje, a idealno iznosi 1. Odsječak pravca na osi Y (engl. *Y - Intercept*) odgovara vrijednosti Ct kada je u uzorku prisutna detektabilna količina ciljne molekule. Nagib pravca (engl. *slope*) pokazuje učinkovitost PCR-reakcije, teoretski bi trebao iznositi 100%, što odgovara vrijednosti nagiba krivulje od -3,32.

Za normalizaciju ekspresije izoformi gena *TP53* koristili smo kontrolni gen *TBP* (engl. *TATA-Box Binding Protein*), koji ima stabilnu ekspresiju u stanicama. Normalizacijom ekspresije gena kompenzira se potencijalna varijabilnost nastala tijekom eksperimenta. Metodom standardne krivulje odredila sam apsolutni broj kopija gena u uzorcima.

Za qPCR koristili smo slijedeće:

- **TaqMan® Universal PCR Master Mix** (Thermo Fisher Scientific), koji sadrži AmpliTaq Gold® DNA-polimerazu, dNTP - ove (deoksinukleotide) bez dUTP-a (deoksiuridintrifosfata), pasivnu referentnu boju ROX i optimizirane komponente smjese,

- **specifične početnice i probe s dvostrukim bojanjem (FAM-TAMRA)** specifične za izoforme p53, Δ133p53 i Δ40p53 te za endogenu kontrolu gen *TBP* (Metabion, Njemačka; tablica 9),

- **cDNA** sintetiziranu iz izolirane RNA metodom reverzne transkripcije,

- **standarde**, tj. plazmid s ugrađenim amplikonom poznate koncentracije, kako bismo odredili točan broj kopija izoformi gena *TP53* i gena *TBP* pomoću metode standardne krivulje. Za izradu standardne krivulje koristili smo serijska razrjeđenja standarda, pa smo tako zalihu amplikona standarda za gen *TBP* i izoforme p53, Δ133p53 i Δ40p53 razrijedili u koncentraciji 10^6 kopija/μL, a potom smo napravili seriju razrjeđenja standarda u rasponu od 10^6 do 10^1 kopija/μL.

Ocjena rada u tijeku

Tablica 9. Sljedovi parova specifičnih početnica i proba korištenih u qPCR-reakcijama

	Izoforma	Slijed nukleotida 5'-3'
Početnica (5'-3')	**p53**	TGGAAACTACTTCCTGAAAACAACG
Uzvodna	**Δ40p53**	TGTCTTTCAGACTTCCTGAAAACAAC
(engl. *forward*)	**Δ133p53**	CTTGTGCCCTGACTTTCAACTCT
Početnica (5'-3')	**p53**	ACAGCATCAAATCATCCATTGC
Nizvodna	**Δ40p53**	ACAGCATCAAATCATCCATTGC
(engl. *reverse*)	**Δ133p53**	CAGTTGGCAAAACATCTTGTTGAG
	p53	TCTGTCCCCCTTGCCGTCCCA
Proba (5'-3')	**Δ40p53**	TCTGTCCCCCTTGCCGTCCCA
	Δ133p53	TCTCCTTCCTCTTCCTACAGTACTCCCCTGC

Stavili smo uzorke cDNA i reagens TaqMan® Universal PCR Master Mix na led radi odmrzavanja. Nakon odmrzavanja smo kratkotrajno promiješali uzorke lupkanjem epruvete i centrifugirali, a reagense kratkotrajno vorteksirali i centrifugirali, kako bismo spustili sadržaj na dno i uklonili mjehurići zraka. Potom smo pripremili glavnu mješavinu za qPCR prema uputama proizvođača za svaki uzorak i standard. Sastav mješavine za qPCR je prikazan u tablici 10.

Tablica 10. Prikaz sastava reakcijske smjese za qPCR

SMJESA ZA qPCR		
sastojak	jedinična reakcija volumen (µL)	reakcija standarda volumen (µL)
TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)	12,5	12,5
Uzvodna početnica (F)	2,25	2,25
Nizvodna početnica (R)	2,25	2,25
cDNA	2,5	5
Voda bez nukleaza	4,875	2,375
Proba	0,625	0,625
	Σ=25 µL	Σ=25 µL

PCR-reakcije odvijale su se u jažicama na mikrotitarskoj pločici. Prvo smo nanijeli reakcijske smjese u duplikatu na mikrotitarsku pločicu za qPCR (Thermo Fisher Scientific)

pomoću pipete, koje su sadržavale 22,5 µL glavne mješavine u koju smo dodali 2,5 µL ispitivane cDNA. Zatim smo pipetom nanijeli po 5 µL od svakog od šest serijski razrijeđenih standarda i 20 µL glavne mješavine na mikrotitarsku pločicu. Kao negativnu kontrolu, dodavali smo kvarcnu vodu (Q H2O). Zalijepili smo optičku ljepljivu foliju (MicroAmp Optical Adhesive Film, Thermo Fisher Scientific) na pločicu, kratkotrajno je centrifugirali i stavili u uređaj za qPCR (ABI Prism 7300 Detection System, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific).

Prilikom pokretanja programa za PCR odabrali smo metodu apsolutne kvantifikacije te označili ciljnu molekulu za analizu (p53, Δ40p53, Δ133p53, TBP) i fluorofore (FAM – TAMRA). Zatim smo označili i definirali jažice u kojima se nalaze uzorci, standardi i kontrola. Nakon toga odabrali smo uvjete odvijanja PCR-reakcije (tablica 11), broj ciklusa, označili ukupni volumen uzorka i standarda (25 µL) te pokrenuli program za apsolutnu kvantifikaciju. Osnovna (engl. *baseline*) i granična (engl. *threshold*) vrijednost PCR reakcije odabrane su automatski.

Tablica 11. Uvjeti reakcije qPCR

UVJETI REAKCIJE qPCR				
	inicijacija		**PCR** (50 ciklusa)	
			denaturacija	**amplifikacija**
TEMPERATURA	50ºC	95ºC	95ºC	60ºC
VRIJEME	2 min	10 min	15 s	1 min

Uređaj za qPCR automatski je obradio podatke te je za svaki uzorak u duplikatu dao broj kopija ciljnog gena i vrijednost Ct. Vrijednost Ct je bila na početku eksponencijalnog dijela krivulje fluorescencije i iznad bilo kojeg pozadinskog signala. Ona je obrnuto proporcionalna količini gena u uzorku.

Sačuvali smo i obradili podatke u programu Microsoft Excel. Budući da smo uzorke radili u duplikatu, izračunali smo srednju vrijednost apsolutnog broja kopija ciljnih molekula (p53, Δ40p53, Δ133p53) za svaki uzorak. Nakon toga smo normalizirali srednju vrijednost broja kopija ciljnih molekula (p53, Δ40p53, Δ133p53) s obzirom na srednju vrijednost broja

kopija kontrolnog gena *TBP*. Stoga, u daljnjoj analizi pod pojmom apsolutna genska ekspresija izoforme p53, Δ40 p53 i Δ133p53 podrazumijeva se apsolutni broj kopija ciljnog gena normaliziran s obzirom na gen *TBP*.

3.6. Funkcionalna analiza odvojenih alela u kvascima (FASAY)

U ovom istraživanju ispitivali smo mutacijski status gena *TP53* u 40 bolesnika. Analiza je provedena u Laboratoriju za molekularnu genetiku raka, Sveučilište u Trentu, Italija. Koristili smo funkcionalnu analizu odvojenih alela u kvascima ili FASAY (engl. *functional analysis of separated alleles in yeast*). Ova metoda se temelji se činjenici da humani gen *TP53* može djelovati kao transkripcijski faktor u kvascu, te da kvasac koristi homolognu rekombinaciju kao mehanizam popravka. Flaman i suradnici (105) su opisali ovu semikvantitativnu metodu 1995. godine, koja razlikuje na temelju boje kolonije koje eksprimiraju funkcionalni od kolonija koje proizvode nefunkcionalni protein p53. Ova metoda može identificirati zametne i somatske mutacije te razlikuje inaktivacijske od tihih mutacija gena *TP53* i polimorfizama. Zahvaljujući analizi odvojenih alela, ova metoda može razlikovati homozigotno od heterozigotnog stanja kod mutiranog gena *TP53* (105). Međutim, metoda FASAY ne uspijeva detektirati status gena *TP53* kod velikih delecija gena. (106).

Prvo smo RNA ispitivanog tkiva preveli u cDNA i amplificirali primjenom reverzne transkripcije i PCR tehnike. Potom smo cDNA uveli u stanice kvasca s genom *ADE2* koji je pod kontrolom gena p53, kako bismo pratili aktivaciju gena *ADE2*, koji kodira enzim koji sudjeluje u biosintezi adenina. Divlji tip proteina p53 aktivira gen *ADE2* u stanicama u kojima je eksprimiran, te tako nastaju velike bijele kolonije kvasca. Mutirani gen *TP53* proizvodi mutirani protein p53 koji ne aktivira gena *ADE2*, dolazi do akumulacije prekursora adenina, koji oksidacijom postaju crveni, te su kolonije male i crvene.

Koristili smo molekulu cDNA iz tkiva tumora bubrega kao kalup u dvostupanjskom PCR-u. U prvom stupnju PCR-a koristili smo 25 µg cDNA, reagens Go-Taq G2 Green Master Mix (Promega, SAD) i specifične početnice za gen *TP53* (Eurofins Genomics, Njemačka) (tablica 12). Razrijedili smo produkte PCR-reakcije u omjeru 1:400. Reakcijska smjesa u drugom koraku PCR reakcije sadržavala je reagens Go-Taq G2 Green Master Mix i specifične početnice za gen *TP53* (tablica 12). Pozitivna kontrola bila je cDNA iz stanica MCF7 (divlji tip gena *TP53*), a negativna kontrola je bila cDNA stanica MDA-MB-231 (eksprimira mutirani alel

Ocjena rada u tijeku

R280K gena *TP53*). PCR-reakcije su se odvijale u uređaju ProFlex PCR System Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD).

Tablica 12. Početnice korištene u dvostupanjskom PCR

	Početnice	Slijed nukleotida 5'-3'
Prvi stupanj PCR-reakcije	p53-Ex2.1-Fw	GTCACTGCCATGGAGGAGCCGCA
	p53-P4	ACCCTTTTTGGACTTCAGGTGGCTGGAGTG
Drugi stupanj PCR-reakcije	p53-P3	ATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTGAAC
	p53-Ex10-Rv	CTTCCCAGCCTGGGCATCCTTG

Kako bismo osigurali homolognost sekvenci našeg inserta i plazmidnog vektora pRDI22 (CEN/ARS, LEU2) prilikom homologne rekombinacije u kvascu, proveli smo cijepanje plazmidne DNA restrikcijskim enzimima HindIII – StuI (New England Biolabs, SAD) prema uputama proizvođača. Potom smo dodali 5 µL, odnosno 100 ng cDNA u 1,5 µL pocijepanog vektora pRDI22. Unošenje plazmidnog vektora i cDNA u kvasac yIG397 proveli smo metodom litij – acetat, koji sadrži gen *ADE2*, koji je je pod kontrolom promotora gena *TP53* (107). Otopina za transformaciju kvaščevih stanica sastojala se od litij – acetata, polietilen glikola (PEG) i sterilne destilirane vode. Litij i PEG povećavaju propusnost staničnog zida, kako bi plazmidna DNA mogla ući u stanice domaćina.

Izolirali smo kolonije kvasca LEU2+ na sintetičkim podlogama s manjkom leucina i s ograničenom količinom adenina (5 mg/L). Kod ekspresije divljeg tipa proteina p53, transformirane kolonije su bile bijele, dok su u prisutnosti mutiranog tip proteina p53, kolonije bile crvene. Kolonije smo prebrojali te izračunali frekvenciju crvenih kolonija (RCF, engl. *red colony frequence*) (tablica 13).

Ocjena rada u tijeku

Tablica 13. Određivanje mutacijskog statusa *TP53* prema frekvenciji crvenih kolonija u metodi FASAY.

Frekvencija crvenih kolonija (RCF)	Mutacijski status gena *TP53*
više od 40%	homozigoti **divljeg tipa gena** *TP53*
40% do 60%	dodatne analize radi utvrđivanja statusa gena *TP53*
više od 60%	**heterozigoti**
90% do 100%	homozigoti/hemizigoti za **mutirani gen** *TP53*

Dosadašnja istraživanja pokazala su da mutirani protein p53 u heterozigotnom stanju gena *TP53* dominantno negativno inhibira djelovanje divljeg tipa proteina p53 kroz formiranje tetramera. Heterozigotno stanje gena *TP53* je prolazno jer tijekom tumorigeneze često dolazi do delecije ili mutacije preostalog alela divljeg tipa gena *TP53* (108). Stoga smo heterozigote gena *TP53*, u daljnjoj analizi, smatrali mutiranim genom *TP53*.

3.7. Statistička obrada podataka

Nakon prikupljanja podatka varijable smo podijelili na kvalitativne, numeričke i ordinalne. Kvalitativne varijable su spol (muško/žensko), klinička slika (simptomatski /asimptomatski), histološki tip (svjetlostanični i nesvjetlostanični karcinom bubrega), čimbenici proširenosti tumora (bubrežna kapsula, venski sustav, perirenalno tkivo, regionalni limfni čvorovi, udaljene presadnice) i mutacijski status gena *TP53* (divlji tip/mutacija). Čimbenike proširenosti bolesti označili smo kao negativne ako nisu zahvaćeni tumorom, ili pozitivne ako su zahvaćeni tumorom.

Ordinalne varijable su nuklearni gradus po SZO/ISUP (4 stupnja) i stadij tumora po TNM- klasifikaciji (4 stupnja). Podijelili smo bolesnike prema nuklearnom gradusu u grupu s gradusom 2 i 3 (jezgrice tumorskih stanica nisu vidljive ili su vidljive pri povećanju od 400 x ili 100 x) i grupu s nuklearnim gradusom 4 (prisutan je nuklearni pleomorfizam, divovske tumorske stanice i/ili rabdoidna i/ili sarkomatoidna komponenta). Niti jedan bolesnik s nuklearnim gradusom 1 nije obuhvaćen istraživanjem.

Ocjena rada u tijeku

Prema TNM-stadiju, podijelili smo bolesnike u dvije grupe: prva grupa obuhvaća bolesnike s tumorima ograničenim na bubreg (stadij I i II), dok drugu grupu čine bolesnici s lokalno proširenim tumorom ili prisutnim udaljenim presadnicama (stadij III i IV).

Numeričke varijable su dob (godine), veličina tumora (centimetri) i apsolutna genska ekspresija izoformi gena *TP53* (broj kopija izoforme gena *TP53*/broj kopija gena *TBP*). Za potrebu daljnje analize kategorizirali smo varijablu dob u dvije grupe s obzirom na medijan: ≤ 64.5 godina i > 64.5 godina. Varijablu veličina tumora kategorizirali smo u dvije skupine obzirom na medijan: skupina s tumorima manjim ili jednakim 7 cm i skupina s tumorima većim od 7 cm. Apsolutnu gensku ekspresiju izoformi gena *TP53* dihotomizirali smo na nisku i visoku s obzirom na medijan apsolutnog broja kopija izoforme normaliziran na kontrolni gen *TBP*.

Ispitivali smo normalnost distribucije numeričkih varijabli testovima D'Agostino i Pearson Omnibus. S obzirom na to da distribucija numeričkih varijabli nije slijedila normalnu raspodjelu, koristili smo neparametrijske testove. Za analizu razlike u apsolutnoj genskoj ekspresiji izoformi gena *TP53* između različitih grupa koristili smo test Mann – Whitney. Korelaciju između apsolutne genske ekspresije pojedinih izoformi gena *TP53* analizirali smo Spearmanovim korelacijskim koeficijentom. Povezanost dihotomizirane ekspresije izoformi i mutacijskog statusa gena *TP53* s kliničkim parametrima i patohistološkim karakteristikama tumora ispitivali smo Fischerovim egzaktnim testom.

Ukupno preživljenje smo definirali kao vrijeme od kirurškog zahvata do smrti pacijenta od bilo kojeg uzroka ili posljednjeg datuma praćenja. Procijenili smo preživljenje bolesnika iz Kaplan–Meierove krivulje, a osnovna mjera preživljenja bilo je ukupno preživljenje. Uspoređivali smo krivulje preživljenja između dvije skupine bolesnika testom log–rang, a preživljenje smo prikazali kao stopu petogodišnjeg preživljenja. Koristili smo univarijatnu Coxovu analizu za procjenu utjecaja prediktora na preživljenje, a statistički značajne prediktori iz univarijatne analize uključili smo u multivarijatnu Coxovu regresiju. Prikazali smo rezultate regresiji prikazali smo kao omjer rizika (HR od engl. *hazard ratio*) i 95-postotni interval pouzdanosti (CI od engl. *confidence interval*) te pridružena *P*-vrijednost. Omjer rizika čiji 95-postotni CI ne uključuje vrijednost jedan smatrali smo statistički značajnim. Statističku analizu proveli smo u programu Medcalc za Windowse verzija 17.6 (MedCalc Software, Belgija). Sve dvosmjerne *P*-vrijednosti testova manje od 0,05 smatrali smo statistički značajnim.

Ocjena rada u tijeku

4. REZULTATI

U istraživanje smo uključili 40 bolesnika. Svi bolesnici su imali dostupan uzorak tkiva karcinoma bubrega, dok je za 4 bolesnika nedostajao uzorak zdravog tkiva. Status gena *TP53* analizirali smo metodom FASAY, dok smo ekspresiju gena *TP53* analizirali metodom qPCR. Prvo smo izolirali ukupnu RNA metodom TRIzol-kloroform-izopropranol i pročistili korištenjem komercijalnog kompleta. Nakon toga smo proveli reverznu transkripciju izolirane RNA u cDNA te umnožavanje izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 i kontrolnog gena *TBP* qPCR-om. Rezultate ekspresije prikazali smo kao apsolutni broj kopija gena izoforme gena *TP53* normaliziran s brojem kopija gena *TBP*.

4.1. Klinička i patohistološke obilježja kohorte

Naša kohorta se sastojala od 23 muškarca (57,5 %) i 17 žena (42,5 %). Medijan dobi je iznosio 64,5 godine (raspon 31 do 82 godine). Polovica bolesnika (50 %) nije imala simptome u trenutku postavljanja dijagnoze. Od onih koji su imali simptome, 60 % (12 od 20 bolesnika) imalo je abdominalne bolove, 30 % (6 od 20 bolesnika) hematuriju, a 10 % (2 od 20 bolesnika) bolesnika je već imalo simptome metastatske bolesti.

Histološke karakteristike tumora prikazali smo u tablici 14. Većina bolesnika je imala svjetlostanični karcinom bubrežnih stanica (35 od 40, 87,5 %) i nuklearni gradus 3 i 4 po sustavu SZO/ISUP (29 od 38, 76,3 %) (tablica 14). Nuklearni gradus po SZO/ISUP nije određen za jednog bolesnika sa svjetlostaničnim i jednog bolesnika s kromofobnim karcinomom bubrežnih stanica (5 % bolesnika).

Ocjena rada u tijeku

Tablica 14. Histološke karakteristike tumora. Rezultate smo prikazali kao broj bolesnika (n) i postotak.

HISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE TUMORA BUBREGA U KOHORTI	
Varijabla	n (%)
Histološki tip	
Svjetlostanični karcinom bubrežnih stanica	35/40 (87,5)
Papilarni karcinom bubrežnih stanica	4/40 (10,0)
Kromofobni karcinom bubrežnih stanica	1/40 (2,5)
Nuklearni gradus po SZO/ISUP[a]	
1	0/38 (0)
2	9/38 (23,7)
3	17/38 (44,7)
4	12/38 (31,6)

[a] SZO/ISUP (Svjetska zdravstvena organizacija/Internacionalno udruženje uroloških patologa, engl. International Society of Uropathology) (14)

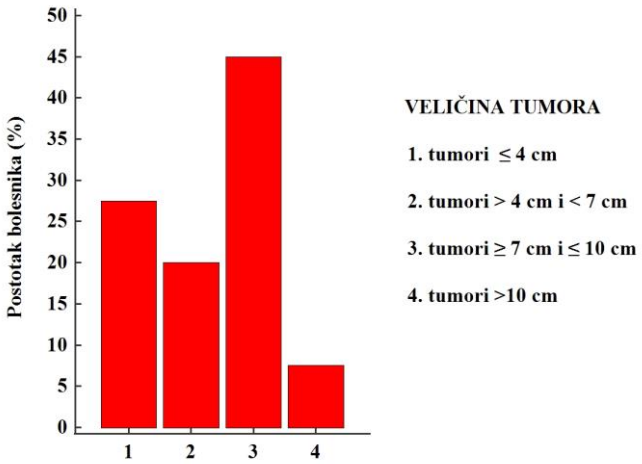
Čimbenike proširenosti karcinoma bubrežnih stanica u kohorti prikazali smo u tablici 15. Za 6 bolesnika nije poznata zahvaćenost limfnih čvorova, dok za 2 bolesnika nije poznata zahvaćenosti perirenalnog tkiva i venskog sustava tumorom. Medijan veličine tumora iznosio je 7 cm, s rasponom od 2 cm do 15 cm. Većina bolesnika nije imala prodor tumora u bubrežnu kapsulu, venski sustav, perirenalno tkivo, limfne čvorove i udaljene presadnice (tablica 15).

Tablica 15. Čimbenici proširenosti karcinoma bubrega u kohorti. Rezultate smo prikazali kao broj bolesnika (n) i postotak.

ČIMBENICI PROŠIRENOSTI TUMORA			
Varijabla	n (%)	Varijabla	n (%)
Veličina tumora (cm)		**Perirenalno tkivo**	
≤7	19/40 (47,5)	Negativno	28/38 (73,7)
>7	21/40 (52,5)	Pozitivno	10/38 (26,3)
Bubrežna kapsula		**Limfni čvorovi**	
Negativna	26/40 (65,0)	Negativni	30/34 (88,2)
Pozitivna	14/40 (35,0)	Pozitivni	4/34 (11,8)
Venski sustav		**Udaljene presadnice**	
Negativan	30/38 (78,9)	Negativne	36/40 (90,0)
Pozitivan	8/38 (21,1)	Pozitivne	4/40 (10,0)

Ocjena rada u tijeku

Iz slike 9 vidimo kako je najveći broj bolesnika imao veličinu tumora od 7 cm do 10 cm (18/40, 45 %).



Slika 9. Prikaz raspodjele postotka bolesnika s obzirom na veličinu tumora. Bolesnike smo podijelili u četiri skupine s obzirom na veličinu tumora a prema kriterijima TNM- klasifikacije.

S obzirom na veličinu tumora i prodor tumora u okolne i udaljene strukture bolesnici su najčešće imali stadij I (52,5 %) i III (30 %) prema TNM- klasifikaciji (tablica 16).

Tablica 16. Raspodjela bolesnika prema tumorskim stadijima (prema TNM-klasifikaciji). Rezultati su prikazani kao broj bolesnika (n) i postotak.

TUMORSKI STADIJ	
Stadij tumora	n (%)
Stadij I	21/40 (52,5)
Stadij II	3/40 (7,5)
Stadij III	12/40 (30,0)
Stadij IV	4/40 (10,0)

Ocjena u tijeku

Postoperativno, 29 bolesnika (72,5 %) nije primalo sustavnu terapiju, dok je 11 bolesnika (27,5%) primilo takav oblik liječenja. Tri bolesnika (27,3 %) liječena su inhibitorima mTOR-a, dok je osam bolesnika (72,7 %) liječeno inhibitorima tirozin-kinaze.

4.2. Povezanost kliničkih i patohistoloških obilježja tumora s mutacijskim statusom gena *TP53*

Status gena *TP53* u karcinomu bubrega odredili smo metodom FASAY. Ova metoda razlikuje inaktivirajuće od funkcionalno tihih mutacija. Zatim smo ispitivali povezanost mutacijskog statusa gena *TP53* s kliničkim značajkama bolesnika i aktualnim histološkim i anatomskim prognostičkim čimbenicima karcinoma bubrega. Sve varijable su kategorijske, te smo u analizi koristili Fischerov egzaktni test. Rezultate smo prikazali kao broj bolesnika (n) i postotak, uz pridruženu P-vrijednost statističkog testa.

U tablici 17 prikazali smo rezultate analize povezanosti kliničkih obilježja bolesnika i mutacijskog statusa gena *TP53*. Analiza je pokazala da 22 od ukupno 40 bolesnika (55 %) imaju mutaciju gena *TP53*, od tih je 8 heterozigota (36,36 %), a 14 homozigota (63,64 %). Osamnaest (45 %) bolesnika ima tumore s divljim tipom gena *TP53*. Spol, dob i klinička slika (simptomatski/asimptomatski) bolesnika nisu su razlikovali ovisno o mutacijskom statusu gena *TP53* (P>0,05) (tablica 17).

Ocjena rada u tijeku

Tablica 17. Kliničke karakteristike bolesnika i mutacijski status gena *TP53* (Fischerov egzaktni test). Mutacijski status gena *TP53* odredili smo metodom FASAY. Rezultate smo prikazali kao broj bolesnika i postotak, uz pridruženu *P*-vrijednost statističkog testa.

Varijable	**Divlji tip *TP53***	**Mutacija *TP53***	*P*-vrijednost
Spol			1,000
Muškarci	10/18 (55,6)	13/22 (59,1)	
Žene	8/18 (44,4)	9/22 (40,9)	
Dob (godine)			0,226
≤ 64,5	7/18 (38,9)	13/22 (59,1)	
> 64,5	11/18 (61,1)	9/22 (40,9)	
Klinička slika			0,750
Asimptomatski	10/18 (55,6)	10/22 (45,5)	
Simptomatski	8/18 (44,4)	12/22 (54,5)	

Nadalje, istraživali smo povezanost mutacijskog statusa gena *TP53* i histoloških karakteristika tumora. Bolesnici s divljim i mutiranim genom *TP53* nisu pokazivali razlike u histološkom tipu tumora i nuklearnom gradusu po SZO/ISUP (*P*>0,05) (tablica 18).

Tablica 18. Histološke karakteristike i mutacijski status gena *TP53* (Fischerov egzaktni testom). Mutacijski status gena *TP53* odredili smo metodom FASAY. Rezultate smo prikazali kao broj bolesnika i postotak, uz pridruženu *P*-vrijednost statističkog testa.

Varijable	**Divlji tip *TP53***	**Mutacija *TP53***	*P*-vrijednost
Histološki tip			1,000
Svjetlostanični karcinom	16/18 (88,9)	19/22 (86,4)	
Ne-svjetlostanični karcinom	2/18 (11,1)	3/22 (13,6)	
Nuklearni gradus po SZO/ISUP[a]			0,725
Gradus 2 +3	10/16 (62,5)	16/22 (72,7)	
Gradus 4	6/16 (37,5)	6/22 (27,3)	

[a] SZO/ISUP (Svjetska zdravstvena organizacija/Internacionalno udruženje uroloških patologa, engl. International Society of Uropathology) (14)

Zatim smo ispitivali povezanost čimbenika proširenosti tumora s mutacijom gena *TP53*. Suprotno očekivanom, nismo ustanovili razliku između bolesnika s mutacijom i onih s divljim

Ocjena u tijeku

tipom gena *TP53* u veličini tumora, zahvaćenosti bubrežne kapsule, venskog sustava, perirenalnog tkiva i limfnih čvorova tumorom te prisutnosti udaljenih presadnica (*P*>0,05) (tablica 19).

Tablica 19. Čimbenici anatomske proširenosti tumora i mutacijski status gena *TP53* (Fischerov egzaktni testom). Mutacijski status gena *TP53* odredili smo metodom FASAY. Rezultate smo prikazali kao broj bolesnika (n) i postotak, uz pridruženu *P*-vrijednost statističkog testa. Navedene *P*-vrijednosti u crvenoj boji označavaju statistički značajne razlike u ekspresiji gena.

Varijabla	**Divlji tip *TP53*** n (%)	**Mutacija *TP53*** n (%)	*P*-vrijednost
Veličina tumora (cm)			0,525
≤7	10/18 (55,6)	9/22 (40,9)	
>7	8/18 (44,4)	13/22 (59,1)	
Bubrežna kapsula			0,510
negativna	13/18 (72,2)	13/22 (59,1)	
pozitivna	5/18 (27,8)	9/22 (40,9)	
Venski sustav			0,054
negativan	16/17 (94,1)	14/21 (66,7)	
Pozitivan	1/17 (5,9)	7/21 (33,3)	
Perirenalno tkivo			1,000
negativno	13/17 (76,5)	15/21 (71,4)	
pozitivno	4/17 (23,5)	6/21 (28,6)	
Limfni čvorovi			0,283
Negativni	11/14 (78,6)	19/20 (95,0)	
Pozitivni	3/14 (21,4)	1/20 (5,0)	
Udaljene presadnice			1,000
Negativne	16/18 (88,9)	20/22 (90,9)	
Pozitivne	2/18 (11,1)	2/22 (9,1)	

Za potrebe analize smo podijeli bolesnike u grupu s tumorom ograničenim na bubreg (stadij I i II) i grupu s lokalno proširenim tumorom ili prisutnim udaljenim presadnicama (stadij III i IV). Nismo ustanovili razliku između bolesnika s mutacijom i onih s divljim tipom gena *TP53* u kliničkom stadiju bolesti prema TNM-klasifikaciji (*P* >0,05) (tablica 20).

Tablica 20. Tumorski stadij prema TNM-klasifikaciji i mutacijski status gena *TP53* (Fischerov egzaktni testom). Mutacijski status gena *TP53* odredili smo metodom FASAY. Rezultate smo prikazali kao broj bolesnika i postotak te pridružena *P*-vrijednost statističkog testa.

Varijabla	**Divlji tip *TP53*** n (%)	**Mutacija *TP53*** n (%)	*P*-vrijednost
Tumorski stadij			1,000
stadij I+II	11/18 (61,1)	13/22 (59,1)	
stadij III+IV	7/18 (38,9)	9/22 (40,9)	

4.3. Genska ekspresija izoformi gena *TP53*

Izolirali smo ukupnu RNA metodom TRIzol–kloroform–izopropranol, te smo je pročistili komercijalnim kompletom uz dodatak DNaza. Potom smo odredili čistoću i koncentraciju ukupne RNA spektrofotometrom korištenjem omjera A260/A280 (>2,0). U ovom istraživanju koncentracija i čistoća izolirane RNA bile su zadovoljavajuće u svim uzorcima.

Provjerili smo kvalitetu izolirane RNA i gel elektroforezom na 1% - tnom agaroznom gelu uz dodatak etidijevog bromida. Rezultati elektroforeze RNA prikazivali su tri elektroforetske pruge (označene kao 28 S, 18 S i 5 S), koje potječu od ribosomske RNA (rRNA, engl. *ribosomal RNA*), koje označavaju visokokvalitetnu izoliranu RNA.

Odredili smo gensku ekspresija izoformi gena *TP53* metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qPCR), koristeći specifične početnice i probe za izoforme p53, Δ40p53 i Δ133p53. Koristili smo apsolutnu kvantifikaciju produkata qPCR-a primjenom metode standardne krivulje.

U reakcijama smo koristili negativnu kontrolu bez predloška (engl. *No Template Control*, NTC), koja je bila kvarcna voda (Q H_2O). NTC nije pokazivala fluorescenciju, što ukazuje na odsustvo kontaminacije uzorka i reagensa.

Gen *TBP* smo koristili kao kontrolni gen (engl. *housekeeping gene*). Svi uzorci su pokazivali pozitivne fluorescencijske signale za *TBP* i za izoforme p53, Δ40p53 i Δ133p53 unutar 50 ciklusa reakcije. Kao referentnu vrijednost za normalizaciju ekspresije pojedinih izoformi koristili smo broj kopija *TBP* u uzorku. Vrijednosti apsolutne genske ekspresije

Ocjena rada u tijeku

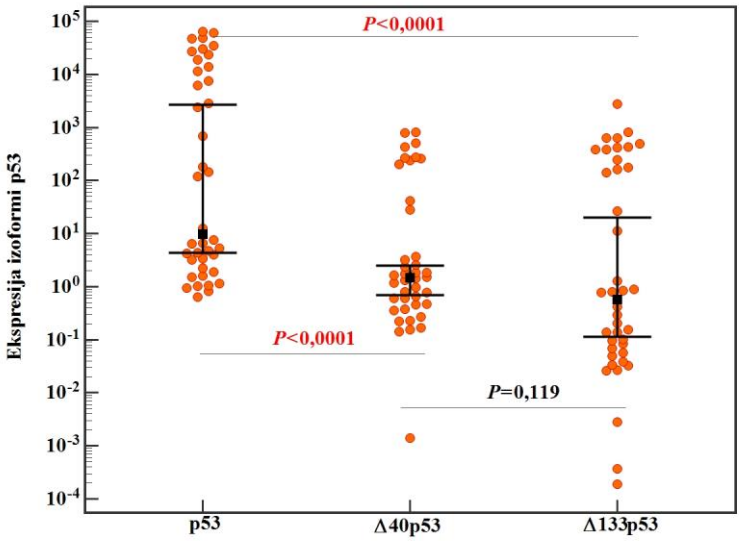
izoformi gena *TP53* za 40 tumora i 36 pripadajućih zdravih tkiva bubrega prikazali smo u tablici 21.

Tablica 21. Apsolutna genska ekspresija izoformi gena *TP53* u tumorima i pripadajućem zdravom tkivu bubrega**.** Ekspresiju izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 odredili smo qPCR-om. Rezultate smo prikazali kao medijan i interkvartilni raspon apsolutnog broja kopija gena određene izoforme normaliziran s brojem kopija kontrolnog gena *TBP*.

Izoforme		**Tumor bubrega**	**Zdravo tkivo**
p53	Medijan	10,05	29,22
	Interkvartilni raspon	2,73 – 12551,64	2,18 – 9438,51
Δ40p53	Medijan	1,47	0,96
	Interkvartilni raspon	0,46-35,05	0,43-2,42
Δ133p53	Medijan	0,60	1,01
	Interkvartilni raspon	0,06-211,38	0,302-383,76

Kako raspodjela podataka nije slijedila normalnu distribuciju, testirali smo razliku u apsolutnoj genskoj ekspresiji između izoformi gena *TP53* neparametrijskim testom Mann-Whitney. Rezultati su pokazali da je izoforma p53 najjače eksprimirana u karcinomu bubrega, dok su izoforme Δ40p53 i Δ133p53 slabije eksprimirane (slika 10). Nema statistički značajne razlike u ekspresiji izoformi Δ40p53 i Δ133p53 (P=0,119) (slika 10).

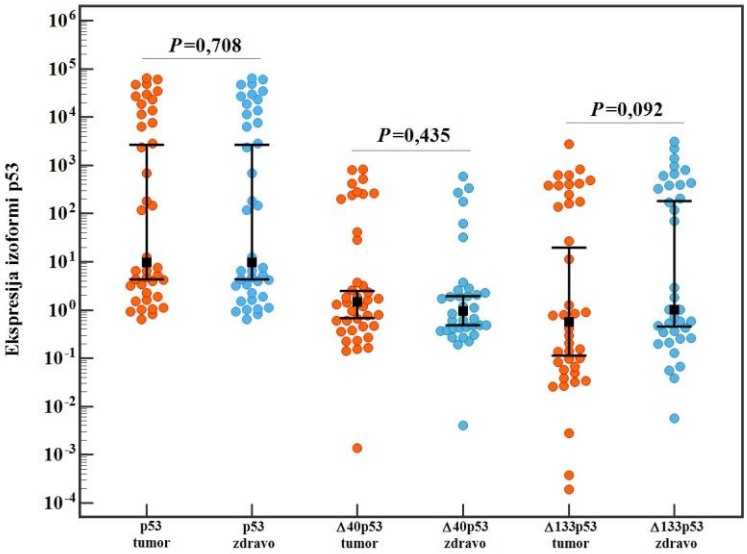
Ocjena rada u tijeku



Slika 10. Apsolutna genska ekspresija izoformi gena *TP53* u karcinomu bubrega (testom Mann-Whitney). Ekspresiju izoformi analizirali smo je qPCR-om. Rezultate smo prikazali u logaritamskoj skali kao medijan i interkvartilni raspon apsolutne genske ekspresije pojedine izoforme normalizirane prema ekspresiji referentnog gena *TBP*. Navedene *P*-vrijednosti u crvenoj boji označavaju statistički značajnu razliku u ekspresiji gena.

Pri usporedbi ekspresije izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 u tumorskom i zdravom tkivu bubrega, nismo uočili statistički značajnu razlike u ekspresiji pojedinih izoformi (P>0,05) (slika 11).

Ocjena rada u tijeku



Slika 11. Apsolutna genska ekspresija izoformi gena *TP53* u tumorima i pripadajućem zdravom tkivu bubrega (test Mann Whitney). Ekspresiju izoformi analizirali smo qPCR-om. Rezultate smo prikazali u logaritamskoj skali kao medijan i interkvartilni raspon apsolutne genske ekspresije pojedine izoforme normalizirane prema ekspresiji referentnog gena *TBP*.

Spearmanovi korelacijski koeficijenti ukazuju na pozitivnu korelaciju svih izoformi gena *TP53* u uzorcima tumora i zdravog tkiva (koeficijente Spearmanove korelacije i pripadajuće *P*-vrijednosti prikazali smo u tablici 22).

Tablica 22. Koeficijenti korelacije ekspresije izoformi gena *TP53***.** Ekspresiju izoformi analizirali smo qPCR-om. Rezultate smo prikazali kao Spearmanov korelacijski koeficijent (ρ), pridružena *P*-vrijednost testa (*P*) i broj uzoraka (N). Crveno obojane *P*-vrijednosti označavaju statistički značajne Spearmanove korelacijske koeficijente.

		Tumor			**Zdravo tkivo**		
		p53	**Δ40p53**	**Δ133p53**	**p53**	**Δ40p53**	**Δ133p53**
p53	ρ		0,901	0,88		0,767	0,814
	P		**<0,0001**	**<0,0001**		**<0,0001**	**<0,0001**
	N		40	40		36	36
Δ40p53	ρ	0,901		0,865	0,767		0,694
	P	**<0,0001**		**<0,0001**	**<0,0001**		**<0,0001**
	N	40		40	36		36
Δ133p53	ρ	0,88	0,865		0,814	0,694	
	P	**<0,0001**	**<0,0001**		**<0,0001**	**<0,0001**	
	N	40	40		36	36	

Ocjena rada u tijeku

4.4. Ekspresije izoformi i mutacijski status gena *TP53* u karcinomu bubrega

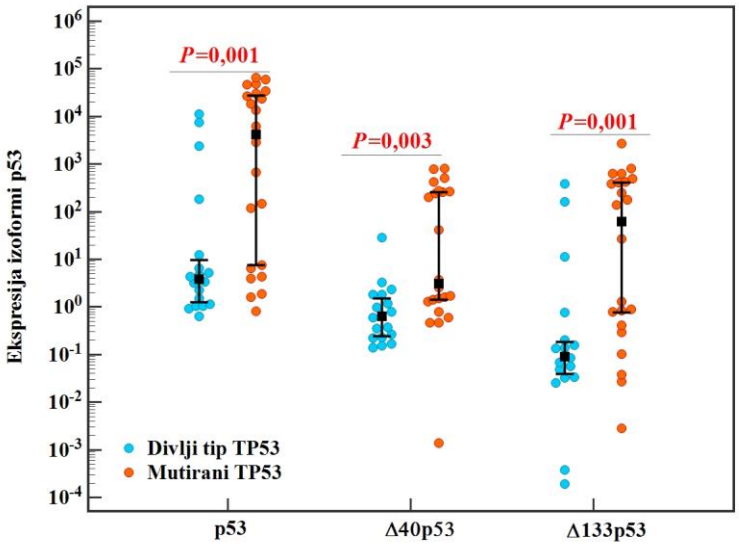
U ovom dijelu smo prikazali rezultate analize ekspresije izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 ovisno o statusu gena *TP53* u tumorima i zdravom tkivu bubrega (tablica 23).

Tablica 23. Apsolutna genska ekspresija izoformi gena *TP53* u tumoru i pripadajućem zdravom tkivu bubrega ovisno o statusu gena *TP53*. Gensku ekspresiju izoformi odredili smo qPCR-om. Rezultate smo prikazali kao medijan i interkvartilni raspon apsolutne genske ekspresije pojedine izoforme normalizirane prema ekspresiji referentnog gena *TBP*.

Izoforme		**Divlji tip *TP53***		**Mutacija *TP53***	
		Tumor	Zdravo	Tumor	Zdravo
p53	Medijan	3,87	2,99	4544,35	6849,61
	Interkvartilni raspon	1,14-12,57	1,63-29,03	6,40-29883,09	13,40-25739,74
Δ40p53	Medijan	0,63	0,48	3,14	1,90
	Interkvartilni raspon	0,23-1,84	0,38-1,38	1,31-266,15	0,62-55,00
Δ133p53	Medijan	0,09	0,47	83,11	203,05
	Interkvartilni raspon	0,03-0,20	0,21-1,00	0,42-424,70	1,17-562,07

Rezultati pokazuju kako mutacijski statusu gena *TP53* utječe na ekspresiju analiziranih izoformi. Našli smo veću gensku ekspresiju izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 u tumorima s mutacijom gena *TP53* u usporedbi s tumorima koji nose divlji tip tog gena. Razlika je statistički značajna za sve tri izoforme ($P<0,05$) (vidi sliku 12).

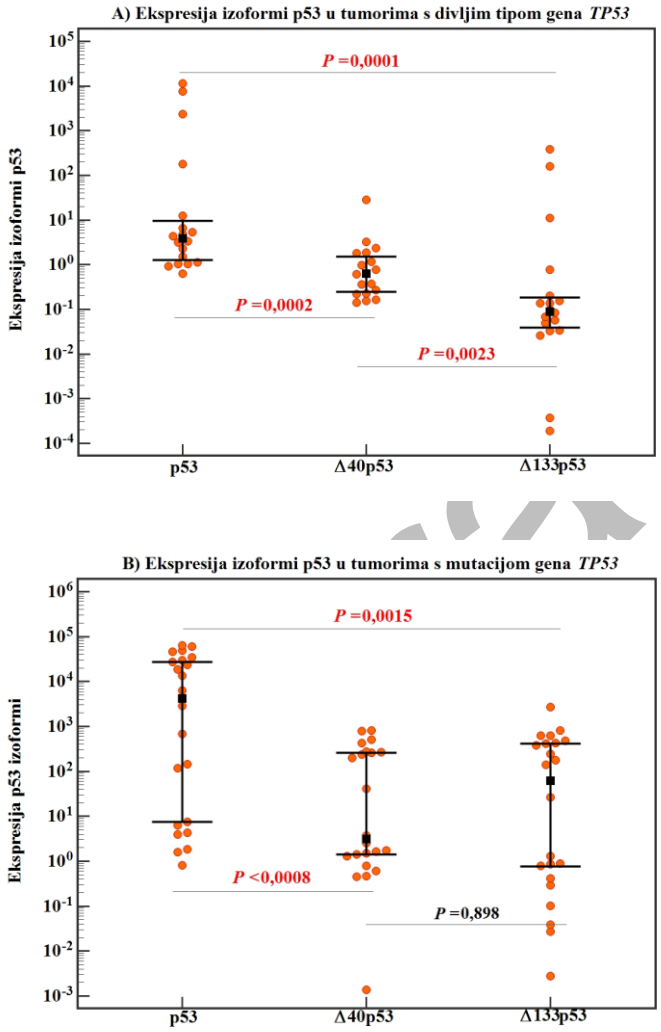
Ocjena rada u tijeku



Slika 12. Apsolutna genska ekspresija izoformi gena *TP53* u tumorima i status gena *TP53* (test Mann-Whitney). Ekspresiju izoformi odredili smo metodom qPCR, a status gena *TP53* metodom FASAY. Rezultate smo prikazali u logaritamskoj skali kao medijan i interkvartilni raspon apsolutne ekspresije pojedine izoforme normalizirane prema ekspresiji referentnog gena *TBP*. Crveno obojane *P*-vrijednosti označavaju statistički značajnu razliku u ekspresiji gena. Uzorci s divljim tipom gena *TP53* označeni su plavom bojom, a uzorci s mutiranim tipom narančastom bojom.

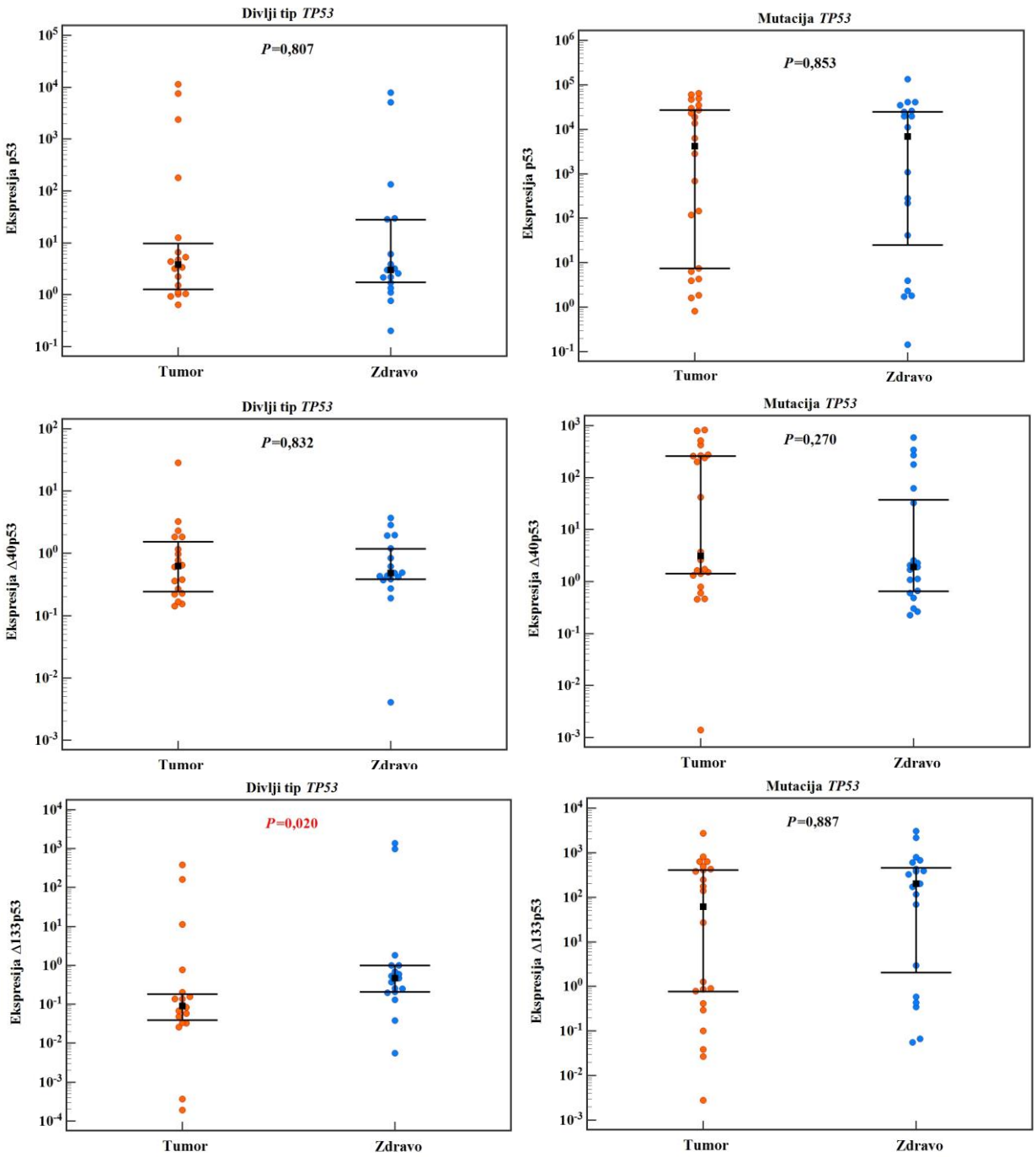
U analizi koekspresijskog profila izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 u tumorskim uzorcima s divljim tipom i mutiranim genom *TP53*, uočili smo da se ekspresijski profil mijenja ovisno o statusu gena *TP53* (vidi sliku 13). U svim uzorcima dominantno je eksprimirana izoforma p53, dok su izoforme Δ40p53 i Δ133p53 smanjeno eksprimirane. Zanimljivo, u tumorima s divljim tipom gena *TP53* zabilježili smo smanjenu ekspresija izoforme Δ133p53 (vidi sliku 13A).

Ocjena rada u tijeku



Slika 13. Usporedba koekspresije izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 u tumorima bubrega s divljim tipom (A) i mutiranim genom *TP53* (B) (test Mann-Whitney). Ekspresiju izoformi odredili smo metodom qPCR, a status gena *TP53* metodom FASAY. Rezultate smo prikazali u logaritamskoj skali kao medijan i interkvartilni raspon apsolutne ekspresije pojedine izoforme normalizirane prema ekspresiji referentnog gena *TBP*. Crveno obojene *P*-vrijednosti označavaju statistički značajnu razliku u ekspresiji gena. Uzorke s divljim tipom gena *TP53* označili smo plavom bojom, a uzorke s mutiranim tipom narančastom bojom.

Zatim smo analizirali gensku ekspresiju izoformi p53 u tumorskom i zdravom tkivu bubrega ovisno o statusu gena *TP53*. Nismo detektirali razliku u ekspresiji izoforme p53 i Δ40p53 između tumorskog i zdravog tkiva niti u uzorcima s divljim tipom niti u onih s mutacijom gena *TP53* ($P>0,05$) (slika 14). Međutim, izoforma Δ133p53 je bila slabije eksprimirana u tumorima u odnosu na zdravo tkivo samo u uzorcima s divljim tipom gena *TP53* ($P=0,020$) (slika 14).



Slika 14. Genska ekspresija izoformi *TP53* u tumorima i zdravom tkivu bubrega ovisno o statusu gena *TP53* (test Mann-Whitney). Ekspresiju izoformi odredili smo metodom qPCR, a status gena *TP53* metodom FASAY. Rezultate smo prikazali u logaritamskoj skali kao medijan i interkvartilni raspon apsolutne ekspresije pojedine izoforme normalizirane prema ekspresiji referentnog gena *TBP*. Crveno obojane *P*-vrijednosti označavaju statistički značajne razlike u ekspresiji gena. Uzorci s divljim tipom gena *TP53* označeni su plavom bojom, a uzorci s mutiranim tipom narančastom bojom.

4.5. Povezanost ekspresije izoformi *TP53* s kliničkim i patohistološkim obilježjima bolesti

Za potrebe analize povezanosti apsolutne genske ekspresije izoformi *TP53* s kliničkim obilježjima bolesnika i patohistološkim značajkama tumora bubrega, podijelili smo ekspresiju određene izoforme gena *TP53* na visoku i nisku ekspresiju na temelju medijana ekspresije pojedine izoforme. Budući da su sve varijable bile kvalitativne, analizu smo proveli Fischerovim egzaktnim testom. Ekspresija izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 nije se razlikovala ovisno o spolu, dobi i kliničkoj slici bolesnika (*P*>0,05; tablica 24).

Tablica 24. Ekspresija gena *TP53* i klinička obilježja bolesnika (Fischerov egzaktni test)**.** Ekspresiju izoformi *TP53* određenu metodom qPCR dihotomizirali smo na nisku i visoku s obzirom na medijan apsolutne ekspresije pojedine izoforme normalizirane prema ekspresiji referentnog gena *TBP*. Rezultate smo prikazali kao broj bolesnika (n) i postotak te je pridružena *P*-vrijednost statističkog testa.

Varijabla	**Ekspresija p53**			**Ekspresija Δ40p53**			**Ekspresija Δ133p53**		
	niska n (%)	visoka n (%)	*P*	niska n (%)	visoka n (%)	*P*	niska n (%)	visoka n (%)	*P*
Spol			0,750			1,000			0,749
Muškarci	13/21 (61,9)	10/19 (52,6)		11/19 (57,9)	12/21 (57,1)		13/21 (61,9)	10/19 (52,6)	
Žene	8/21 (38,1)	9/19 (47,4)		8/19 (42,1)	9/21 (42,9)		8/21 (38,1)	9/19 (47,4)	
Dob (godine)			0,527			1,000			0,527
≤ 64.5	9/21 (42,9)	11/19 (57,9)		9/19 (47,4)	11/21 (52,4)		9/21 (42,9)	11 (57,9)	
> 64.5	12/21 (57,1)	8/19 (42,1)		10/19 (52,6)	10/21 (47,6)		12/21 (57,1)	8/19 (42,1)	
Klinička slika			0,359			0,526			0,359
Asimptomatski	11/21 (61,9)	7/19 (36,8)		10/19 (63,2)	8/21 (38,1)		11/21 (52,4)	7/19 (36,8)	
Simptomatski	10/21 (38,1)	12/19 (63,2)		9 /19 (36,8)	13/21 (61,9)		10/21 (47,6)	12/19 (63,2)	

U ovom istraživanju ekspresija izoformi gena *TP53* nije se razlikovala ovisno o histološkim tipu i nuklearnom gradusu tumora (*P*>0,05) (tablica 25).

Tablica 25. Ekspresija izoformi gena *TP53* i histološke karakteristike tumora (Fischerov egzaktni test)**.** Odredili smo ekspresiju izoformi *TP53* metodom qPCR-a i dihotomizirali na nisku i visoku s obzirom na medijan apsolutne ekspresije pojedine izoforme. Rezultate smo prikazali kao broj bolesnika (n) i postotak te je pridružena *P*-vrijednost statističkog testa.

Varijabla	**Ekspresija p53**			**Ekspresija Δ40p53**			**Ekspresija Δ133p53**		
	niska n (%)	visoka n (%)	*P*	niska n (%)	visoka n (%)	*P*	niska n (%)	visoka n (%)	*P*
Histološki tip			1,000			0,654			0,654
Svjetlostanični	18/21 (85,7)	17/19 (89,5)		16/19 (84,2)	19/21 (90,5)		19/21 (90,5)	16/19 (84,2)	
Ne-svjetlostanični	3/21 (14,3)	2/19 (10,5)		3/19 (15,8)	2/21 (9,5)		2/21 (9,5)	3/19 (15,8)	
Nuklearni gradus po SZO/ISUP[a]			0,728			0,161			0,728
2+3	15/19 (78,9)	11/19 (57,9)		14/17 (82,4)	12/21 (57,1)		14/19 (73,7)	12/19 (63,2)	
4	4/19 (21,1)	8/19 (42,1)		3/17 (17,6)	9/21 (42,9)		5/19 (26,3)	7/19 (36,8)	

[a] SZO/ISUP (Svjetska zdravstvena organizacija/Internacionalno udruženje urloških patologa, engl. International Society of Uropathology) (14)

U nastavku smo analizirali povezanost ekspresije izoformi gena *TP53* s čimbenicima proširenosti tumora. Bolesnici s viskom ekspresijom izoforme Δ40p53 imali su češće tumore veće od 7 cm (*P*=0,025) i zahvaćenu bubrežnu kapsulu (*P*=0,022). Bolesnici s visokom ekspresijom kanonske izoforme p53 češće su imali bubrežnu kapsulu zahvaćenu tumorom (*P*=0,045) (tablica 26). Ostali čimbenici proširenosti tumora nisu utjecali na ekspresiju izoformi *TP53* (*P*>0,05).

Ocjena u tijeku

Tablica 26. Ekspresije izoformi gena *TP53* i čimbenici proširenosti tumora (Fischerov egzaktni test)**.** Odredili smo ekspresiju izoformi *TP53* metodom qPCR-a i dihotomizirali na nisku i visoku s obzirom na medijan apsolutne ekspresije pojedine izoforme. Rezultate smo prikazali kao broj bolesnika (n) i postotak te je pridružena *P*-vrijednost statističkog testa. Crveno obojana *P*-vrijednost označava statistički značajnu povezanost između varijabli.

Varijabla	Ekspresija p53			Ekspresija Δ40p53			EkspresijaΔ133p53		
	niska n (%)	visoka n (%)	*P*	niska n (%)	visoka n (%)	*P*	niska n (%)	visoka n (%)	*P*
Veličina tumora (cm)			0,067			**0,025**			0,225
≤7	13/21 (61,9)	6/19 (31,6)		13/19 (68,4)	6/21 (28,6)		12/21 (57,1)	7/19 (36,8)	
>7	8/21 (38,1)	13/19 (68,4)		6/19 (31,6)	15/21 (71,4)		9/21 (42,9)	12/19 (63,2)	
Bubrežna kapsula			**0,045**			**0,022**			0,185
Negativna	17/21 (81,0)	9/19 (47,4)		16/19 (84,2)	10/21 (47,6)		16/21 (76,2)	10/19 (52,6)	
Pozitivna	4/21 (19,0)	10/19 (52,6)		3/19 (15,8)	11/21 (52,4)		5/21 (23,8)	9/19 (47,4)	
Venski sustav			1,000			0,709			1,000
Negativna	15/19 (78,9)	15/19 (78,9)		14/17 (82,4)	16/21 (76,2)		15/19 (78,9)	15/19 (78,9)	
Pozitivna	4/19 (21,1)	4/19 (21,1)		3/17 (17,6)	5/21 (23,8)		4/19 (21,1)	4/19 (21,1)	
Perirenalno tkivo			0,269			0,136			0,714
Negativna	16/19 (84,2)	12/19 (63,2)		15/17 (88,2)	13/21 (61,9)		15/19 (78,9)	13/19 (68,4)	
Pozitivna	3/19 (15,8)	7/19 (36,8)		2/17 (11,8)	8/21 (38,1)		4/19 (21,1)	6/19 (31,6)	
Limfni čvorovi			0,352			1,000			0,352
Negativna	14/17 (82,4)	16/17 (94,1)		13/15 (86,7)	17/19 (89,5)		14/17 (82,4)	16/17 (94,1)	
Pozitivna	3/17 (17,6)	1/17 (5,9)		2/15 (13,3)	2/19 (10,5)		3/17 (17,6)	1/17 (5,9)	
Udaljene presadnice			0,330			0,607			0,330
Negativna	20/21 (95,2)	16/19 (84,2)		18/19(94,7)	18/21 (85,7)		20/21 (95,2)	16/19 (84,2)	
Pozitivna	1/21 (4,8)	3/19 (15,8)		1/19 (5,3)	3/21 (14,3)		1/21 (4,8)	3/19 (15,8)	

Ekspresija pojedinih izoformi gena *TP53* ne utječe na klinički stadij bolesti (*P*>0,05) (tablica 27).

Tablica 27. Ekspresija izoformi gena *TP53* i klinički stadij bolesti po TNM-klasifikaciji (Fischerov egzaktni test)**.** Odredili smo ekspresiju izoformi *TP53* metodom qPCR i dihotomizirali na nisku i visoku s obzirom na medijan apsolutne ekspresije pojedine izoforme. Rezultate smo prikazali kao broj bolesnika (n) i postotak te je pridružena *P*-vrijednost statističkog testa.

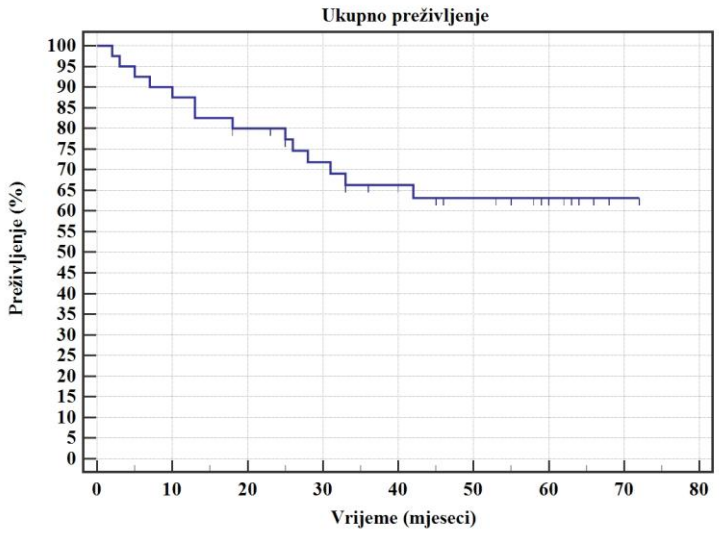
Varijabla	**Ekspresija p53**			**Ekspresija Δ40p53**			**EkspresijaΔ133p53**		
	niska n (%)	visoka n (%)	*P*	niska n (%)	visoka n (%)	*P*	niska n (%)	visoka n (%)	*P*
Tumorski stadij			1,000			0,349			0,755
stadij I + II	13/21 (61,9)	11/19 (57,9)		13/19 (68,4)	11/21 (52,4)		12/21 (57,1)	12/19 (63,2)	
stadij III + IV	8/21 (38,1)	8/19 (42,1)		6/19 (31,6)	10/21 (47,6)		9/21 (42,9)	7/19 (36,8)	

4.6. Analiza preživljenja

U analizi ukupnog preživljenja kao početak praćenja uzeli smo dan operativnog zahvata, a dan smrti bolesnika od bilo kojeg uzroka ili dan posljednjeg ambulantnog pregleda/telefonskog kontakta s bolesnikom smo označili kao kraj praćenja. Kao mjeru preživljenja uzeli smo ukupno preživljenje koje smo procijenili Kaplan-Meierovom metodom, i prikazali smo ga kao stopu petogodišnjeg preživljenja. Fischerovim egzaktnim testom smo testirali razliku između obilježja živih i umrlih bolesnika. Za procjenu utjecaja određenih pokazatelja na preživljenje (razlike u krivuljama preživljenja) koristili smo test log - rang, a za multivarijatnu analizu koristili smo Coxovu regresijsku analizu.

Medijan praćenja bolesnika bio je 43,5 mjeseca, raspon 2 do 72 mjeseca. U ovom istraživanju, od 40 bolesnika koji su bili obuhvaćeni, 14 bolesnika (35%) je umrlo, a 26 bolesnika (65%) doživjelo kraj praćenja. Slika 15 prikazuje Kaplan-Meierovu krivulju ukupne stope preživljenja kohorte. Stopa petogodišnjeg preživljenja u kohorti iznosi 63,1%.

Ocjena i u tijeku



Slika 15. Stopa ukupnog preživljenja svih bolesnika s tumorom bubrega koji su uključeni u studiju (N=40) (Kaplan-Meierova krivulja). Vrijeme preživljenja je prikazano u mjesecima.

Analizirali smo klinička i patohistološka obilježja bolesti u grupi živih i umrlih bolesnika. Svi čimbenici bili su kvalitativne varijable te smo analizu proveli Fischerovim egzaktnim testom. Rezultate smo prikazali kao broj bolesnika i postotak, uz pridruženu *P*-vrijednost statističke značajnosti.

Živi i umrli bolesnici nisu se razlikovali po spolu, dobi u trenutku postavljanja dijagnoze i kliničkoj slici (*P*>0,05) (tablica 28). Jedanaest (27,5 %) bolesnika primalo je postoperativnu sustavnu terapiju, od kojih je sedam bolesnika umrlo (63,7 %). Većina bolesnika koja je doživjela kraj praćenja nije dobivala sustavno liječenje (*P*=0,029).

Ocjena rada u tijeku

Tablica 28. Prikaz analize razlike u kliničkim obilježjima između živih i umrlih bolesnika (Fischerov egzaktni test). Rezultate smo prikazali kao broj bolesnika i postotak te je pridružena *P*-vrijednost statističkog testa. Statistički značajne *P*-vrijednosti su označene podebljano i crvenom bojom.

Varijable	**Živi**	**Umrli**	*P*-vrijednost
	n (%)	n (%)	
Spol			
Muškarci	13/26 (50,0)	10/14 (71,4)	0,315
Žene	13/26 (50,0)	4/14 (28,6)	
Dob (godine)			
≤ 64,5	15/26 (57,7)	5/14 (35,7)	0,208
> 64,5	11/26 (42,3)	9/14 (64,3)	
Klinička slika			
Asimptomatski	13/26 (50,0)	5/14 (35,7)	0,510
Simptomatski	13/26 (50,0)	9/14 (64,3)	
Postoperativna sustavna terapija			
Nisu liječeni	22/26 (84,6)	7/14 (50,0)	**0,029**
Liječeni	4/26 (15,4)	7/14 (50,0)	

Bolesnici koji su umrli ili doživjeli kraj praćenja nisu se razlikovali obzirom na histološki tip tumora (*P*>0,05). Bolesnici koji su doživjeli kraj praćenja su imali bolje diferencirane tumore, tj. 20 od ukupno 24 bolesnika (83,3 %) su imala tumore s nuklearnim gradusom 2 i 3, dok su samo 4 bolesnika (16,7 %) imala tumor s nuklearnim gradusom 4, razlika je statistički značajna (*P*=0,014) (tablica 29).

Ocjena u tijeku

Tablica 29. Prikaz analize razlike histoloških obilježja tumora bubrega između živih i umrlih bolesnika (Fischerov egzaktni test). Rezultate smo prikazali kao broj bolesnika i postotak, uz pridruženu *P*-vrijednost statističkog testa. Statistički značajne *P*-vrijednosti su označene podebljano i crvenom bojom.

Varijable	**Živi**	**Umrli**	*P*-vrijednost
	n (%)	n (%)	
Histološki tip			
Svjetlostanični karcinomi	23/26 (88,5)	12/14 (85,7)	1,000
Ne-svjetlostanični	3/26 (11,5)	2/14 (14,3)	
Nuklearni gradus po SZO/ISUP[a]			
gradus 2+3	20/24 (83,3)	6/14 (42,9)	**0,014**
gradus 4	4/24 (16,7)	8/14 (57,1)	

[a] SZO/ISUP (Svjetska zdravstvena organizacija/Internacionalno udruženje uroloških patologa, engl. International Society of Uropathology) (14)

Analiza čimbenika proširenosti tumora pokazala je da bolesnici koji su doživjeli kraj praćenja u odnosu na umrle imaju manje tumore, nižeg kliničkog stadija bolesti i nemaju pozitivne limfne čvorove ($P<0,05$) (tablica 30).

Ocjena u tijeku

Tablica 30. Prikaz analize razlike proširenosti tumora bubrega između živih i umrlih bolesnika (Fischerov egzaktni test). Rezultate smo prikazali kao broj bolesnika i postotak, uz pridruženu *P*-vrijednost statističkog testa. Statistički značajne *P*-vrijednosti su označene podebljano i crvenom bojom.

Varijable	**Živi**	**Umrli**	*P*-vrijednosti
	n (%)	n (%)	
Veličina tumora			
≤7	16/26 (61,5)	3/14 (21,4)	**0,022**
>7	10/26 (38,5)	11/14 (78,6)	
Bubrežna kapsula			
negativna	19/26 (73,1)	7/14 (50,0)	0,178
pozitivna	7/26 (26,9)	7/14 (50,0)	
Venski sustav			
negativan	19/24 (73,1)	11/14 (78,6)	1,000
pozitivan	5/24 (19,2)	3/14 (21,4)	
Perirenalno tkivo			
negativno	19/24 (79,2)	9/14 (64,3)	0,448
pozitivno	5/24 (20,8)	5/14 (35,7)	
Limfni čvorovi			
negativna	22/22 (100,0)	8/12 (66,7)	**0,010**
pozitivna	0/22 (0)	4/12 (33,3)	
Udaljene presadnice			
negativne	25/26 (96,2)	11/14 (78,6)	0,114
pozitivne	1/26 (3,8)	3/14 (21,4)	
Tumorski stadij			
stadij I + II	20/26 (76,9)	4/14 (28,6)	**0,006**
stadij III + IV	6/26 (23,1)	10/14 (71,4)	

Proveli smo statističku analizu utjecaja povezanosti genske ekspresije i statusa gena *TP53* s ukupnim preživljenjem bolesnika. Podijelili smo gensku ekspresiju izoformi gena *TP53* na nisku i visoku s obzirom na medijan apsolutnog broja kopija gena određene izoforme normaliziranog s brojem kopija gena *TBP*. Interesantno, bolesnici koji su doživjeli kraj postoperativnog praćenja u ovom istraživanju češće su imali mutaciju gena *TP53* (*P*=0,021) (tablica 31). Ekspresija izoformi gena *TP53* nije se razlikovala između živih i umrlih bolesnika (*P*>0,05).

Ocjenjivanje u tijeku

Tablica 31. Utjecaj genske ekspresije i mutacije gena *TP53* na preživljenje bolesnika (Fischerov egzaktni test). Ekspresiju izoformi gena *TP53*, određenu metodom qPCR-a, dihotomizirali smo na nisku i visoku s obzirom na medijan apsolutne ekspresije pojedine izoforme. Mutacijski status odredili smo metodom FASAY. Rezultate smo prikazali kao broj bolesnika i postotak, uz pridruženu *P*-vrijednost statističkog testa. Statistički značajne *P*-vrijednosti su označene podebljano i crvenom bojom.

Varijable	**Živi**	**Umrli**	*P*-vrijednosti
***TP53* status**			
divlji tip	8/26 (30,8)	10/14 (71,4)	**0,021**
mutirani tip	18/26 (69,2)	4/14 (28,6)	
p53			
Niska ekspresija	13/26 (50,0)	8/14 (57,1)	0,747
Visoka ekspresija	13/26 (50,0)	6/14 (42,9)	
Δ40p53			
Niska ekspresija	12/26 (46,2)	7/14 (50,0)	1,000
Visoka ekspresija	14/26 (53,8)	7/14 (50,0)	
Δ133p53			
Niska ekspresija	12/26 (46,2)	9/14 (64,3)	0,333
Visoka ekspresija	14/26 (53,8)	5/14 (35,7)	

Koristili smo test log-rang koristili smo za analizu utjecaja obilježja tumora i bolesnika (tablica 32) te ekspresije i statusa gena *TP53* na preživljenje (tablica 33). Procjenu smo obavili Kaplan-Meierovom metodom, prikazali smo rezultate kao stopu petogodišnjeg preživljenja i pridruženu *P*-vrijednost statističke značajnosti. Varijable zahvaćenosti limfnih čvorova tumorom i prisutnost udaljenih presadnica isključili smo iz analize. Ustanovili smo da su nuklearni gradus 4 (*P*=0,0006), tumori veći od 7 cm (*P*=0,009), tumorski stadij III i IV prema TNM-klasifikaciji (*P*=0,0003) i postoperativna sustavna terapija (*P*=0,003) (tablica 32) čimbenici koji su povezani sa smanjenom petogodišnjom stopom preživljenja.

Ocjena u tijeku

Tablica 32. Utjecaj kliničkih i patohistoloških obilježja na preživljenje. Procjenu smo obavili Kaplan-Meierovom metodom, test log-rang. Rezultate smo prikazali kao stopu petogodišnjeg preživljenja i pridruženu *P*-vrijednost statističkog testa. Statistički značajne *P*-vrijednosti su označene podebljano i crvenom bojom.

Varijabla	**Stopa petogodišnjeg preživljenja (%)**	*P*-vrijednost
Spol		
Muškarci	53,8	0,220
Žene	74,1	
Dob (godine)		
≤ 64.5	71,7	0,140
> 64.5	54,5	
Klinička slika		
Asimptomatski	72,2	0,297
Simptomatski	54,9	
Histološki tip		
Svjetlostanični	63,5	0,637
Ne-svjetlostanični	60,0	
Nuklearni gradus po SZO/ISUP[a]		
2 + 3	75,7	**0,0006**
4	24,3	
Veličina tumora (cm)		
≤7	83,5	**0,009**
>7	44,2	
Zahvaćenost bubrežne kapsule		
Negativna	71,9	0,053
Pozitivna	46,9	
Zahvaćenost venskog sustava		
Negativna	62,1	0,607
Pozitivna	54,7	
Zahvaćenost perirenalnog tkiva		
Negativna	65,7	0,288
Pozitivna	48,0	
Tumorski stadij		
stadij I + II	82,0	**0,0003**
stadij III + IV	32,8	
Postoperativna ciljna terapija		
Nisu liječeni	74,9	**0,003**
Liječeni	26,5	

[a] SZO/ISUP (Svjetska zdravstvena organizacija/Internacionalno udruženje urloških patologa, engl. International Society of Uropathology) (14)

Testom log - rang smo analizirali utjecaj ekspresije i mutacijskog statusa gena *TP53* na ukupno preživljenje. Bolesnike smo podijelili u skupine s niskom i visokom ekspresijom izoforme p53, Δ40p53, odnosno Δ133p53 na osnovi medijana ekspresije u tkivu tumora.

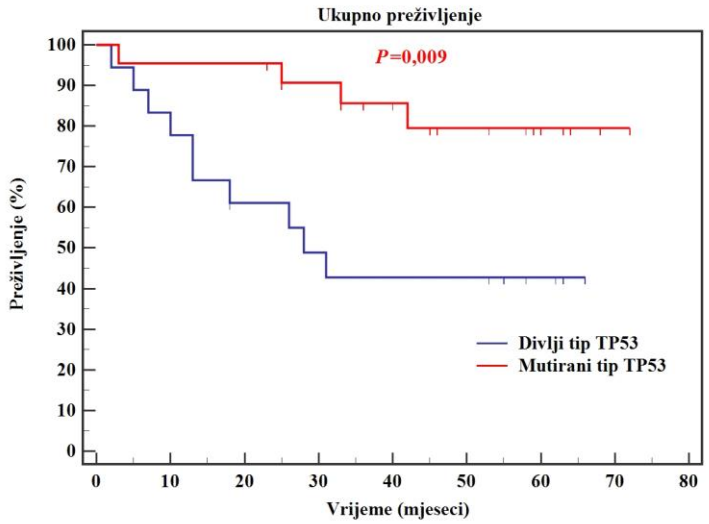
Rezultate smo prikazali tablično (tablica 33) kao stopu petogodišnjeg preživljenja i *P*-vrijednost statističkog testa, a grafički smo prikazali Kaplan–Meierovim krivuljama.

Tablica 33. Utjecaj genske ekspresije i mutacijskog statusa gena *TP53* na preživljenje (Kaplan-Meierova metoda, test log-rang)**.** Ekspresiju izoformi *TP53*, određenu metodom qPCR, dihotomizirali smo na nisku i visoku s obzirom na medijan apsolutne genske ekspresije pojedine izoforme. Odredili smo mutacijski status metodom FASAY. Prikazali smo rezultate kao stopu petogodišnjeg preživljenja i pridružena je *P*-vrijednost statističkog testa. Označili smo statistički značajne *P*-vrijednosti podebljano i crvenom bojom.

Varijabla	**Stopa petogodišnjeg preživljenja (%)**	*P*-vrijednost
***TP53* status**		
divlji tip	42,8	**0,009**
mutirani tip	79,5	
p53		
Niska ekspresija	61,9	0,754
Visoka ekspresija	61,8	
Δ40p53		
Niska ekspresija	63,2	0,904
Visoka ekspresija	61,2	
Δ133p53		
Niska ekspresija	57,1	0,359
Visoka ekspresija	68,5	

Neočekivani rezultat ovog istraživanja pokazuje utjecaj statusa gena *TP53* na preživljenje bolesnika s karcinomom bubrega. Naime, utvrdili smo da bolesnici s mutacijom gena *TP53* imaju veće petogodišnje preživljenje u usporedbi s onima koji imaju tumor s divljim tipom (tablica 33, slika 16). Razlika u preživljenju je statistički značajna (*P*=0,009), što sugerira da mutacija gena *TP53* može biti važan prognostički faktor u bolesnika s karcinomom bubrega.

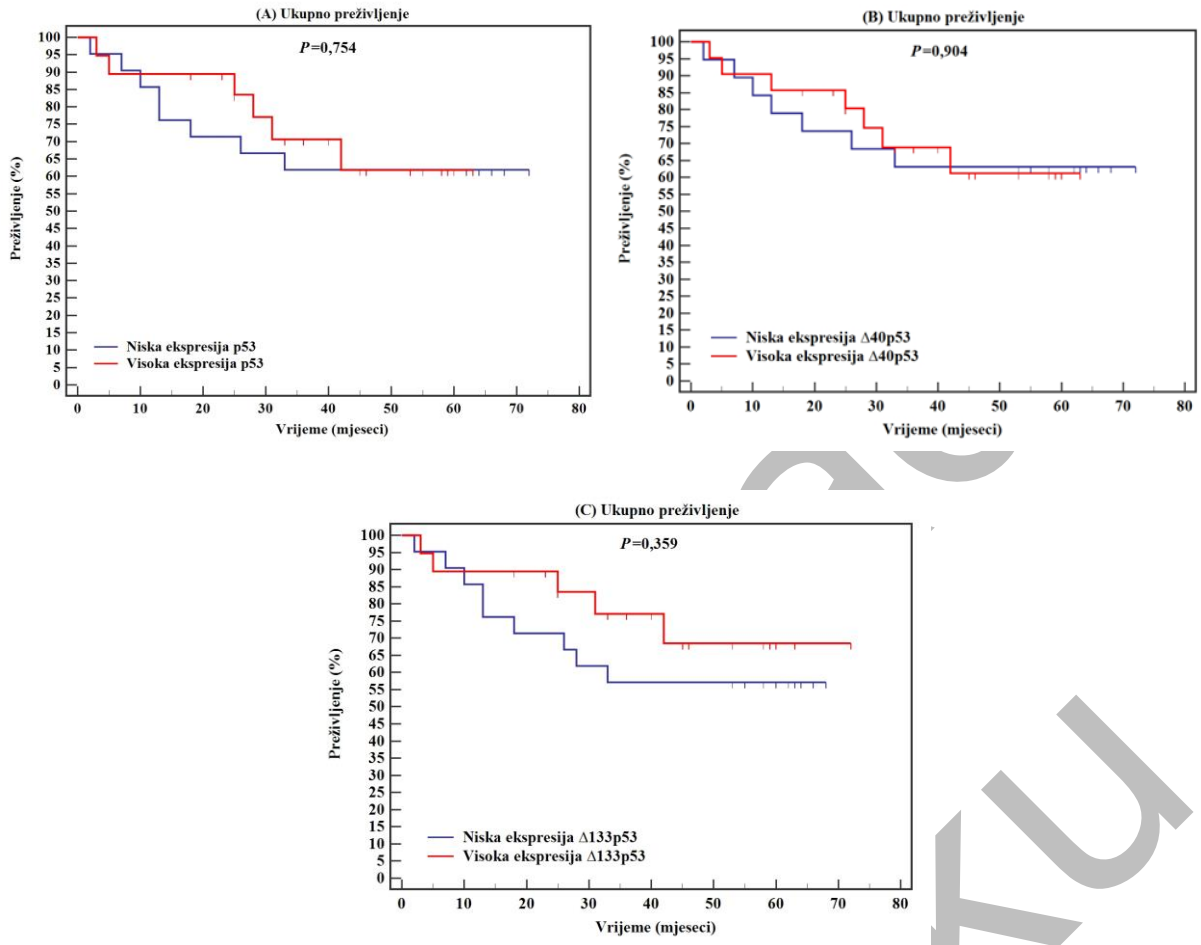
Ocjena rada u tijeku



Slika 16. Ukupno preživljenje bolesnika s tumorom bubrega (N=40) ovisno o mutacijskom statusu gena *TP53* (krivulja Kaplan-Meier, log-rang test). Okomite crtice označavaju cenzurirane pacijente.

U ovom istraživanju ekspresija izoformi gena *TP53* ne utječe na ukupno preživljenje bolesnika (*P*>0,05) (tablica 33). Na slici 17 prikazujemo Kaplan-Meierove krivulje ukupnog preživljenja bolesnika ovisno o ekspresiji pojedine izoforme gena *TP53*.

Ocjena rada u tijeku



Slika 17. Kaplan-Meierove krivulje ukupnog preživljenja bolesnika s tumorom bubrega (N=40) obzirom na ekspresiju izoforme p53 (A), izoforme Δ40p53 (B) i Δ133p53 (C) (krivulja Kaplan-Meier, log-rang test). Okomite crtice označavaju cenzurirane pacijente.

Analizirali smo ukupno preživljenje bolesnika univarijatno, uspoređujući krivulje preživljenja bolesnika ovisno o kliničkim i patohistološkim čimbenicima te statusu i ekspresiji gena *TP53*. Analiza ne uključuje čimbenike zahvaćenost limfnih čvorova i prisutnost udaljenih metastaza. Statistički značajne prediktore preživljenja utvrđene univarijatnom analizom uvrstili smo u multivarijatni Coxov regresijski model, a to su nuklearni gradus prema SZO/ISUP, veličinu tumora, tumorski stadij, postoperativna sustavna terapiji i mutacijski status gena *TP53* (tablica 34).

U multivarijatnoj analizi pokazali smo da nuklearni gradus po SZO/ISUP, veličina tumora te postoperativna sustavna terapija ne utječu na preživljenje bolesnika (P>0,05) (tablica 34). Stadij tumora prema TNM-klasifikaciji i status gena *TP53* su nezavisni prediktori

Ocjena u tijeku

preživljenja bolesnika s karcinomom bubrega. Bolesnici koji imaju viši tumorski stadij (stadij III i IV) i divlji tip gena *TP53* imaju manju stopu petogodišnjeg preživljenja (tablica 34).

Tablica 34. Utjecaj obilježja bolesti na preživljenje, univarijatna i multivarijatna Coxova regresija. Rezultate smo prikazali kao omjer rizika (HR od engl. *hazard ratio*), 95%-tni interval pouzdanosti (CI od engl. *confidence interval*) i pridružena *P*-vrijednost statističke značajnosti. Označili smo statistički značajne *P*-vrijednosti su označene podebljano i crvenom bojom. SZO/ISUP, Svjetska zdravstvena organizacija/ Internacionalno udruženje uroloških patologa (engl. International Society of Uropathology)

Prediktor	**Kategorije**	**Univarijatna**		**Multivarijatna**	
		HR (95%-tni CI)	***P***	**HR (95%-tni CI)**	***P***
Spol	muškarac / žena	0,49 (0,15 -1,57)	0,230	- (-)	-
Dob (godine)	≤ 64.5 / > 64.5	2,22 (0,75-6,66)	0,152	- (-)	-
Klinička slika	asimptomatski / simptomatski	2,31 (0,77-6,92)	0,135	- (-)	-
Histološki tip	svjetlostanični / ne-svjetlostanični	1,43 (0,32-6,41)	0,639	- (-)	-
Nuklearni gradus po SZO/ISUP[a]	2 + 3 / 4	5,54 (1,87-16,41)	**0,002**	- (-)	-
Veličina tumora (cm)	≤7 / >7	4,73 (1,30-17,11)	**0,018**	- (-)	-
Bubrežna kapsula	negativno / pozitivno	2.72 (0,95-7,86)	0,063	- (-)	-
Venski sustav	negativno / pozitivno	1,11 (0,31-3,99)	0,872	- (-)	-
Perirenalno tkivo	negativno / pozitivno	1,93 (0,64-5,77)	0,242	- (-)	-
Tumorski stadij	I + II / III + IV	6,54 (2,02-21,20)	**0,002**	5,80 (1,06-31,83)	**0,043**
Postoperativna. ciljana terapija	nisu liječeni / liječeni	4,43 (1,52-12,88)	**0,006**	- (-)	-
TP53 status	divlji tip / mutacija	0,23 (0,07-0,76)	**0,016**	0,001 (0,03-0,44)	**0,002**
Ekspresija p53	niska / visoka	0,84 (0,29-2,43)	0,755	- (-)	-
Ekspresija Δ40p53	niska / visoka	0,94 (0,33-2,68)	0,905	- (-)	-
Ekspresija Δ133p53	niska / visoka	0,60 (0,20-1,80)	0,365	- (-)	-

[a] SZO/ISUP (Svjetska zdravstvena organizacija/Internacionalno udruženje uroloških patologa, engl. International Society of Uropathology) (14)

Ocjena rada

5. RASPRAVA

Karcinom bubrega jedan je značajnijih tumora urogenitalnog trakta zbog visokog mortaliteta i sve veće učestalosti. Ubrajamo ga među deset najčešćih karcinoma u muškaraca i žena. Petogodišnje preživljenje iznosi 76 %, no značajno varira ovisno o stadiju bolesti, pa tako za prvi stadij iznosi 93 %, a za metastatsku bolest iznosi 12 % (11). U trenutku postavljanja dijagnoze oko dvije trećine bolesnika ima lokaliziranu bolest, ali 30 % njih naknadno razvija presadnice i zahtijeva sustavno liječenje (20). Bolesnici s tumorima veličine do 4 cm obično imaju povoljnu prognozu, ali između 4,2 % do 7,1 % bolesnika s takvim tumorom već ima prisutne udaljene presadnice u trenutku dijagnosticiranja (109). Međutim, 40 % bolesnika koji imaju presadnice u limfne čvorove prežive 5 godina nakon nefrektomije (109). Sve navedeno ukazuje na to da trenutni anatomski, histološki i klinički prognostički faktori nisu uvijek pouzdani za predviđanje tijeka bolesti i prognoze ishoda liječenja te su potrebna daljnja istraživanja da bi se produbilo razumijevanje ove bolesti i razvili novi dijagnostički i prognostički biljezi.

Protein p53, produkt gena *TP53,* kontrolira stanični odgovor na stres i čuva integritet stanice tako što regulira procese popravka DNA, zaustavljanja staničnog ciklusa, proliferacije, senescencije, diferencijacije, migracije stanica i programirane stanične smrti. S obzirom na funkcije koje protein p53 obavlja u stanicama, nije neobično da su mutacije gena *TP53* najčešća genetska promjena u tumorima ljudi te su često povezane s lošijim ishodom bolesti. Do danas je poznato 12 različitih proteinskih izoformi gena *TP53*, koje nastaju korištenjem dva različita promotora, alternativnim prekrajanjem mRNA i alternativnim mjestima početka translacije. Izoforme gena *TP53* imaju različitu unutarstaničnu lokalizaciju te različite tkivno specifične funkcije. S obzirom na to da je mutacija gena *TP53* relativno rijedak događaj u karcinogenezi bubrega, možemo zaključiti da drugi mehanizmi inaktiviraju gen *TP53*. Brojna istraživanja su pokazala da promijenjena ekspresija izoformi gena *TP53* u tumorima bubrega, dojke, pluća, prostate, jajnika, melanomu, kolangiokarcinomu i drugima u odnosu na zdravo tkivo potencijalno doprinosi nastanku karcinoma i njegovoj progresiji (44,52). S obzirom na to da dosadašnja istraživanja nisu u potpunosti razjasnila ulogu gena *TP53* i njegovih izoformi u nastanku i progresiji karcinoma bubrega, u ovoj disertaciji analizirali smo mutacijski status gena *TP53,* apsolutnu gensku ekspresiju njegovih izoformi te njihovu povezanost s kliničkim

Ocjena rada u tijeku

obilježjima bolesti, patohistološkim značajkama tumora i ishodom liječenja. Pokušali smo odgovoriti na slijedeća pitanja: Koja je učestalost mutacija gena *TP53* u karcinomu bubrega? Postoji li razlika u ekspresijskom profilu gena *TP53* između karcinoma i pripadajućeg zdravog tkiva bubrega? Kako se ekspresija izoformi gena *TP53* u tumoru bubrega mijenja ovisno o njegovom mutacijskom statusu? Imaju li mutacijski status i ekspresijski profil gena *TP53* prognostičko značenje u karcinomu bubrega?

U istraživanje smo uključili 40 bolesnika s karcinomom bubrežnih stanica. Očekivano, zabilježili smo nešto veći udio muškaraca (omjer muškaraca i žena je iznosio 1,35:1). Prema drugim autorima patogenezu češćeg pobolijevanja muškaraca potrebno je razjasniti, iako kao potencijalni čimbenici razmatraju se povećana učestalost rizičnih čimbenika u muškaraca kao što su pušenje, pretilost, arterijska hipertenzija i utjecaj spolnih hormona (110–112). Medijan dobi naše kohorte iznosio je 64,5 godina, što je u skladu s rezultatima baze podataka Nacionalnog instituta za rak Sjedinjenih Američkih Država o nadzoru, epidemiologiji i krajnjim rezultatima (SEER od engl. *Surveillance, Epidemiology, and End Results*) (113). Zabilježili smo nešto manji broj asimptomatskih bolesnika u odnosu na druga istraživanja, što je vjerojatno posljedica smanjene dostupnosti i manje liberalnog pristupa u korištenju radioloških metoda (2,114,115).

U ovom istraživanju očekivano najčešći je svjetlostanični karcinom bubrega (87,5 % uzoraka). Međutim, u odnosu na druga istraživanja naši bolesnici su imali agresivnije tumore karakterizirane višim nuklearnim gradusom i većom veličinom te su češće imali klinički stadij III (112,116–118). Prilikom tumačenja ovih rezultata potrebno je uzeti u obzir nekoliko čimbenika. Veći udio bolesnika s visokim nuklearnim gradusom u odnosu na druga istraživanja može biti posljedica subjektivnosti u određivanju nuklearnog gradusa od strane patologa (112,116–118). Također, istraživanje je provedeno u tercijarnom bolničkom centru, gdje je inače veći udio bolesnika koji imaju više tumorske stadije i histološki nepovoljnije karakteristike tumora zbog kompleksnosti njihovog operativnog i drugog liječenja. Niža zastupljenost asimptomatskih bolesnika uz fenotipski agresivnije tumore u ovom istraživanju ukazuju na potrebu za prevencijom u vidu obuhvaćanja većeg udjela populacije sistematskim pregledima s radiološkim pretragama, edukaciju bolesnika o simptomima bolesti, čimbenicima rizika i zdravom načinu života, kako bi se poboljšala prognoza oboljelih od karcinoma bubrega.

Ocjena rada u tijeku

Tijekom studije umrlo je 14 bolesnika (35%), dok je 26 bolesnika (65%) doživjelo kraj praćenja. Stopa petogodišnjeg preživljenja iznosi 63,1% (slika 15), i smanjena je u odnosu na druga istraživanja (112,113,116). Jedanaest bolesnika je dobivalo postoperativnu sustavnu terapiju, od kojih je 7 bolesnika (63,63 %) umrlo, a četiri bolesnika (36,36 %) % su doživjela kraj praćenja.

U ovom istraživanju analizirali smo utjecaj dobi, spola, kliničke slike, anatomskih i histoloških čimbenika karcinoma bubrega na preživljenje bolesnika. Naši rezultati sugeriraju da spol, dob i prisutnost simptoma bolesti ne igraju značajnu ulogu u preživljavanju bolesnika s karcinomom bubrega (tablica 32). Suprotno našim rezultatima, Aron i suradnici su pokazali da muškarci imaju veće tumore, višeg nuklearnog gradusa i stadija prema TNM-klasifikaciji te kraće ukupno preživljenje u odnosu na žene (119). Autor Ali i suradnici (112) nisu našli povezanost spola s veličinom tumora, nuklearnim gradusom i preživljenjem, te zaključuju kako su potrebna dodatna istraživanja. Za razliku od našeg istraživanja, druga su pokazala da asimptomatski bolesnici imaju bolju prognozu u odnosu na simptomatske (2,114,115).

Od histoloških čimbenika analizirali smo utjecaj histološkog tipa tj. svjetlostaničnog i nesvjetlostaničnog karcinoma bubrega, i nuklearnog gradusa na preživljenje bolesnika (tablica 32). S obzirom na to da smo istraživanjem obuhvatili samo pet bolesnika s nesvjetlostaničnim karcinomom, nismo dokazali povezanost histološkog tipa i preživljenja bolesnika. Patard i suradnici su pokazali prognostičko značenje histološkog tipa samo u univarijatnoj analizi, dok druga grupa autora nije dokazala razliku u preživljenju između bolesnika s svjetlostaničnim i papilarnim karcinomom (112,120). Prema aktualnim smjernicama u univarijatnoj analizi kromofobni u odnosu na papilarni i svjetlostanični karcinom ima bolju prognozu, no ovo prognostičko značenje se gubi kada se uzme u obzir stadij bolesti prema TNM-klasifikaciji (2).

Pokazali smo da je nuklearni gradus prema SZO/ISUP prediktor smanjene stope petogodišnjeg preživljenja bolesnika s karcinomom bubrežnih stanica u univarijatnoj analizi, dok isto nije dokazano u multivarijatnoj analizi. Bolesnici s nuklearnim gradusom 4 su imali smanjenu stopu preživljenja u odnosu na bolesnike s gradusom 2 i 3. Drugi istraživači su dobili slične rezultate, pri čemu je nuklearni gradus bio značajan prediktor preživljenja samo kada su bolesnici bili podijeljeni u grupi s niskim nuklearnim gradusom (gradus 1 i 2) i grupu s visokim (gradus 3 i 4) (112). Također, u studiji u kojoj su uključena 842 bolesnika sa svjetlostaničnim karcinom bubrežnih stanica, grupa s gradusom 4 značajno se razlikovala u preživljenju u odnosu na grupu s nuklearnim gradusom 1, 2 i 3 (121).

Ocjena rada u tijeku

Dosadašnje studije su pokazale da veličina tumora, prodor tumora u bubrežnu kapsulu, venski sustav, perirenalno tkivo i limfne čvorove te prisutnost udaljenih presadnica utječu na preživljenje bolesnika oboljelih od karcinoma bubrega (112,120). U ovom istraživanju smo ispitivali utjecaj navedenih čimbenika na smanjenje stope petogodišnjeg preživljenja bolesnika. Bolesnici koji su doživjeli kraj praćenja su imali tumore manje veličine, nijedan nije imao zahvaćene limfne čvorove, a tri četvrtine ih je imalo klinički stadij I prema TNM-klasifikaciji. Analiza je pokazala da su veličina tumora, nuklearni gradus, klinički stadij bolesti prema TNM-klasifikaciji, status gena *TP53* te postoperativno sustavno liječenje statistički značajni prediktori ishoda bolesnika. U multivarijatnoj analizi je dokazano da su klinički stadij bolesti i status gena *T53* nezavisni prediktori preživljenja bolesnika s tumorom bubrega.

Naši rezultati poklapaju se s drugim istraživanjima koja su pokazala da veličina tumora predviđa daljnju progresiju tumora u okolne strukture i preživljenja bolesnika (14,122,123). Za razliku od naših rezultata, drugi istraživači su pokazali da prodor tumora u bubrežnu kapsulu, venski sustav i perirenalno tkivo označava agresivnije tumore i povezan je s lošijim ishodom bolesnika (14,124–127). Međutim, Süer i njegovi suradnici nisu potvrdili prognostičku važnost prodora tumora u bubrežnu kapsulu (128). Shah i suradnici (129) su pokazali da prodor tumora u perirenalno tkivo ili tkivo bubrežnog sinusa ili venski sustav sami po sebi nisu prediktori preživljenja, ali u kombinaciji su pokazatelji agresivnije bolesti i prediktori kraćeg preživljenja bolesnika. Prema literaturi 7-17% bolesnika s karcinomom bubrega ima zahvaćene limfne čvorove tumorom (14). U ovom istraživanju četiri (11,8 %) bolesnika imala su pozitivne limfne čvorova, a četiri bolesnika (10,0 %) udaljene presadnice.

Kao i neki drugi autori, u našem istraživanju smo potvrdili da je klinički stadij bolesti prema TNM-klasifikaciji značajan prediktor preživljena u univarijatnoj i multivarijatnoj analizi (115,116,118,130). Međutim, neka istraživanja nisu dokazala prognostički značaj stadija bolesti u multivarijatnoj analizi (112,123). Rezultati ovog i drugih istraživanja ukazuju na potrebu razvoja novih prognostičkih čimbenika kako bi se izdvojili pojedinci koji su u riziku od lošijeg kliničkog ishoda (112,123).

U ovom istraživanju smo pokazali da ekspresija gena *TP53* ne utječe na preživljenje bolesnika. Zanimljivo je da je divlji tip gena *TP53* povezan sa smanjenjem petogodišnje stope preživljenja. Pa tako, petogodišnje preživljenje za divlji tip iznosi 42,8 %, dok za mutaciju gena *TP53* iznosi 79,5 %. U poglavlju 5.3. detaljno smo opisali rezultate istraživanja utjecaja statusa i ekspresije gena *TP53* na preživljenje bolesnika.

Ocjena rada u tijeku

5.1. Učestalost mutacija gena *TP53* u karcinomu bubrežnih stanica

Ispitali smo mutacijski status gena *TP53* u 40 tkiva karcinoma bubrežnih stanica metodom FASAY (engl. *Functional Analysis of Separated Allele in Yeast*), koja razlikuje inaktivirajuće mutacije gena *TP53* od tihih mutacija. To je semikvantitativna metoda koja ispituje funkciju proteina p53 kao transkripcijskog faktora u kvascu te na osnovi formiranja kolonija različite boje utvrđuje postojanje mutacije gena *TP53*. U ovom istraživanju dvadeset i dva bolesnika (55%) je imalo mutaciju gena *TP53*, od čega je bilo 14 (35%) homozigota i 8 (20%) heterozigota. U daljnjoj analizi homozigote i heterozigote za mutaciju gena *TP53* analizirali smo zajedno jer iz literature je poznato da je heterozigotno stanje prolazno i mutirani protein p53 dominantno negativno inhibira divlji tip, koji gubi mogućnost transaktivacije ciljnih gena te je zapravo „čuvar“ tumorskih stanica (4,131).

Metoda FASAY je pokazala superiornost u odnosu na druge metode analize mutacija gena *TP53*, poput metoda imunohistokemije, sekvenciranja i analize polimorfizma konformacije jednolančane DNA (SSCP, od engl. *single-stranded conformation polymorphism*) (106,132–134). Prednosti ove metode uključuju odvojenu analizu alela gena, mogućnost analize specifičnih egzona gena *TP53* te minimizira kontaminaciju tumorskog tkiva zdravim tkivom (106,132–134). Istraživači su pokazali da automatsko sekvenciranje otkriva do 25% manje mutacija gena *TP53* u odnosu na FASAY u karcinomu dojke, jer se sekvence divljeg tipa gena *TP53* uspješnije umnažaju u PCR smjesi u odnosu na sekvence mutiranog gena *TP53*. Nadalje, imunohistokemijska reakcija može pokazivati varijabilne rezultate, svi uzorci s jakom pozitivnom imunohistokemijskom reakcijom na protein p53 imali su mutaciju gena *TP53*, ali dio uzoraka s mutacijom gena *TP53* pokazao je slabu ili negativnu reakciju na protein p53 (133). Ovi rezultati pokazuju da imunohistokemijska analiza nije uvijek pouzdan pokazatelj mutacije gena *TP53* i da dodatne metode analize, poput sekvenciranja gena i metode FASAY, su potrebne za potvrdu mutacije.

Naše istraživanje pružilo je nove spoznaje o učestalosti mutacija gena *TP53* u karcinomu bubrega. Detektirali smo relativno visoku učestalost mutacija gena *TP53* u karcinomu bubrega u odnosu na druga istraživanja (4,78,132,135). Napominjemo da se protokoli istraživanja (veličina uzorka, histološki tipovi karcinoma bubrega, stadiji tumora) i metode određivanja

Ocjena rada u tijeku

statusa gena *TP53* značajno razlikuju između pojedinih grupa autora, čime je umanjena usporedivost rezultata (132).

Ranija istraživanja su koristila imunohistokemijske metode za analizu statusa gena *TP53*. Pozitivna imunohistokemijska reakcija na protein p53 se uzimala kao surogat za mutaciju gena *TP53* zbog činjenice da mutirani protein p53 ima duži poluvijek života (132). Učestalost pozitivne imunohistokemijske reakcije na protein p53 je bila veoma varijabilna, iznosila je između 2 % i 57,5% tumorskih uzoraka uslijed različitih protokola istraživanja, korištenja protutijela različite specifičnosti na protein p53 i dihotomiziranja ekspresije proteina p53 na nisku i visoku prema različitim kriterijima (132,135–141).

Autori navode da pozitivna imunohistokemijska reakcija na protein p53 ima prognostičko značenje, ali nije dovoljna za analizu mutacije gena *TP53* u tumorima bubrega, jer veliki broj tumora s pozitivnom imunohistokemijskom reakcijom na protein p53 ipak ima divlji tip proteina p53 (136,142,143). Smatraju kako neki drugi proteini mogu stabilizirati divlji tip proteina p53, pri čemu dolazi do sloma povratne sprege između proteina p53 i MDM2, pa se divlji tip proteina p53 ne razgrađuje te se nakuplja u stanicama (136,142,143). Besmislene (engl. *nonsense*) mutacije gena *TP53* u 10 % do 20 % slučajeva mogu dovesti do nastanka kraćih i manje stabilnih formi mutiranog proteina p53, koji imunohistokemijski nemaju pozitivnu ekspresiju, te se lažno proglase proteinom p53 divljeg tipa (132). Studija na uzorcima karcinoma jednjaka naglasila je kompleksnost odnosa imunohistokemijski pozitivne reakcije na protein p53 i mutacije gena *TP53* (144). Rezultati studije su pokazali da su mutacije najčešće u DNA-veznom području i često su rezultirale nefunkcionalnim proteinom p53, koji je detektiran imunohistokemijski. Međutim, u manjem postotku slučajeva mutacije gena *TP53* dovele su do nastanka funkcionalnog proteina p53, koji je imao pozitivnu ili negativnu imunohistokemijsku reakciju, ovisno o broju i vrsti mutacija (144).

Učestalost mutacija gena *TP53* iznosila je od 0% do 44% u studijama koju su koristile metodu analize polimorfizma konformacije jednolančane DNA i metodu sekvenciranja (132,142,145–149). Većina tih istraživanja analizirala je središnji dio gena *TP53* (eksone 4-8 ili 5 do 8), tj. mjesta gdje je najčešća učestalost mutacije. Ipak otprilike 15 % mutacija nastaje izvan tih eksona, tj. mutacije su locirane u eksonu 4, 9 i 10, te postoji mogućnost podcjenjivanja učestalosti mutacija gena *TP53* (132). Također, kod metode SSCP postoji mogućnost niže detekcije mutacija gena *TP53* zbog kontaminacije tumorskog tkiva zdravim tkivom (148).

Ocjena rada u tijeku

Metoda sekvenciranja se smatra pouzdanijom od metode SSCP-a u analizi mutacija gena *TP53* jer omogućuje detaljnu analizu sekvenci DNA i detekciju niskofrekventnih mutacija. Prema jednoj grupi autora učestalost mutacija u karcinomu bubrega utvrđena ovom metodom iznosila je kako slijedi: kromofobni karcinom 23,9 %, svjetlostanični karcinom 5,3 % i papilarni karcinom 1,1 % uzoraka (145).

Zhang i suradnici su detektirali 25,9 % mutiranih uzoraka svjetlostaničnih karcinoma bubrežnih stanica metodom FASAY (78). Diesing i suradnici analizirali su 290 uzoraka svjetlostaničnog karcinoma bubrežnih stanica koristeći imunohistokemijske metode i tehnike tkivnih mikročipova (engl. *tissue microarray*, TMA) te su detektirali nisku učestalost mutacija gena *TP53* (1,7%) (68). Ubrzani razvoj tehnologije sekvenciranja novih generacija (engl. *next generation sequencing*, NGS), koje omogućavaju preciznu analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenu, ustanovile su učestalost mutacija gena *TP53* u svjetlostaničnom karcinomu od 2,6 %, a u kromofobnom karcinomu bubrega 31,1 % (69).

Gerlinger i suradnici (26) su analizirali više tumorskih supresora u metastatskom karcinomu bubrega i zaključili su kako u karcinomu bubrega postoji izrazita unutartumorska heterogenost mutacija (26). Mutacije su podijelili na zajedničke (sveprisutne), dijeljene (javljaju se na nekim dijelovima tumora, ali ne svim) i privatne (javljaju se samo na jednom mjestu u tumoru). Detektirali su mutaciju gena *TP53* u samo 6 % biopsija bubrega i u 40 % uzoraka nakon što su pregledali sve regije tumora (26).

Uzimajući u obzir sve spomenuto, neophodno je provesti dodatna istraživanja koja bi obuhvatila veći broj bolesnika sa različitim histološkim tipovima karcinoma bubrega i različitim stadijima bolesti. Također je važno napraviti usporedbu različitih metoda za analizu mutacija gena *TP53* kod karcinoma bubrega.

5.2. Ekspresija gena *TP53* u karcinomu bubrega

Kao što smo prethodno naveli, osim mutacijama, do inaktivacije gena *TP53* može doći i drugim mehanizmima, kao što su povećana prisutnost negativnih regulatora proteina p53, hipermetilacija promotora gena *TP53*, prisutnost inhibitornih mikroRNA te promijenjena ekspresija izoformi p53 (150). Nekoliko studija je pokazalo da izoforme gena *TP53* pokazuju promijenjenu ekspresiju u tumorima u odnosu na zdravo tkivo, te da se profil ekspresije

Ocjena rada u tijeku

razlikuje u različitim tumorima i može biti povezan s nastankom i progresijom tumora, kliničkim odgovorom na terapiju i ishodom liječenja (44,47,52). Promjene u razini ekspresije pojedine izoforme p53 su posljedica poremećaja u transkripciji, translaciji ili razgradnji proteina. Na transkripcijskoj razini ekspresija gena *TP53* regulirana je alternativnim korištenjem promotora: vanjskog P1 promotora, s kojeg se prepisuju izoforme p53α i Δ40p53, te unutarnjeg promotora P2, s kojeg se prepisuju izoforme Δ133p53 i Δ160p53 (46).

U ovom istraživanju analizirali smo gensku ekspresiju izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 u tumorima i pripadajućem zdravom tkivu metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qPCR) koristeći apsolutnu kvantifikaciju. Analizirali smo koekspresiju izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 u tumorima, uspoređivali smo ekspresiju ovih izoformi između tumora i zdravog tkiva te ovisno o mutacijskom statusu gena *TP53*. Nismo analizirali ekspresiju izoformi koje se razlikuju i na 3' kraju (α, β i γ varijante) jer bi amplikoni u takvim reakcijama bili izrazito dugi, a i transkripti gena *TP53* imaju sklonost stvaranja sekundarnih struktura koje bi dodatno otežale molekularnu analizu (151). Najvažnije, varijante koje se razlikuju na 5' kraju (N-kraju proteina) imaju veći značaj u karcinogenezi. Povišena ekspresija izoformi gena *TP53* skraćenih na N-kraju zabilježena je u brojnim tumorima (44,47,52).

Naši rezultati potvrdili su hipotezu prema kojoj se apsolutna genska izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 razlikuje između tumora i zdravog tkiva, te se mijenja ovisno o mutacijskom statusu *TP53*. Zabilježili smo jaču ekspresiju izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 u tumorima s mutacijom u odnosu na tumore s divljim tipom gena *TP53* (slika 12). U tumorima s divljim tipom gena *TP53*, zabilježili smo smanjenu ekspresiju izoforme Δ133p53 u odnosu na tumore s mutacijom (slika 12), u odnosu na izoformu p53 i Δ40p53 (slika 13) te u odnosu na pripadajuće zdravo tkivo (slika 14). Postojala je pozitivna korelacija između ekspresije pojedinih izoformi u svim uzorcima neovisno o mutacijskom statusu gena *TP53* (tablica 22). S obzirom na stabilnu ekspresiju izoformi p53, Δ40p53 i Δ133 kroz tumorske stadije prema TNM klasifikaciji (tablica 27) evidentno je da se promijenjena ekspresija izoformi p53 događa relativno rano i ostaje neprekidno u tumorigenezi bubrega.

Prekomjerna ekspresija izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 u tumorima s mutacijom gena *TP53* (slika 12) posljedica je adaptivnih procesa tumorskih stanica u kojima mutirani protein p53 potiče vlastitu akumulaciju putem mehanizma povratne pozitivne sprege (131). Mutirani protein p53 inducira transkripciju gena čiji produkti pridonose njegovoj stabilizaciji, te mehanizme kojima osigurava preživljenje i proliferaciju tumorskih stanica, kao što su

Ocjena rada u tijeku

reprogramiranje staničnog metabolizma, mijenja odgovor stanica na oksidativni stres, inhibira apoptozu i autofagiju te stvara mikrookruženje koje omogućava širenje tumorskih stanica (131).

Postojanje pozitivne korelacije između ekspresije izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 u tumorima bubrega (tablica 22) u ovom istraživanju sugerira da postoje zajednički mehanizmi regulacije ekspresije izoformi gena *TP53*. Ovo je u skladu sa rezultatima istraživanja provedenim na uzrocima seroznog karcinoma maternice i karcinoma dojke, što daje naslutiti da mehanizmi regulacije ekspresije gena *TP53* mogu biti slični u različitim tumorima (79,85).

Naši rezultati pokazuju kako tumorske stanice bubrega dominantno eksprimiraju izoformu kanonskog p53, dok su izoforme Δ40p53 i Δ133p53 manje eksprimirane (slika 10). Prema tome u tumorskim stanicama bubrega od mRNA koja nastaje transkripcijom s promotora P1 najčešće nastaje kanonski p53, dok je alternativno prekrajanje introna 2, kojim nastaje Δ40p53 relativno rijedak događaj (jača ekspresija izoforme p53 uz smanjenu ekspresiju Δ40p53). Dvije grupe autora su potvrdile ove rezultate u tumoru bubrega (9,10). U karcinomu jajnika istraživači su također zabilježili jaču gensku ekspresiju izoforme p53 uz smanjenu ekspresije izoformi Δ40p53 i Δ133p53 uz nemogućnost detekcije ovih izoformi na razini proteina (152).

U ovom istraživanju u tumorima s divljim tipom gena *TP53* izoforma Δ133p53 je smanjeno eksprimirana u odnosu na druge dvije izoforme (slika 13A), te u odnosu na vlastitu ekspresiju u tumorima s mutacijom gena *TP53* (slika 12) i u odnosu na pripadajuće zdravo tkivo (slika 14). Izoforma Δ133p53 nastaje prepisivanjem s unutarnjeg promotora P2 koji je pod izravnom kontrolom divljeg tipa proteina p53 (i p73), stoga smanjena genska ekspresija izoforme Δ133p53 u tumorima s divljim tipom gena *TP53* mogla bi biti posljedica slabije aktivnosti divljeg tipa proteina p53 i p73 na promotoru P2 (153). Također, uzrok smanjene ekspresije Δ133p53 može biti povećana inhibicija promotora P2 od strane izoforme Δ40p53, jer je ona negativni regulator aktivnosti promotora P2 (58). Promijenjeni omjer izoforme p53 (pozitivni regulator promotora P2) i Δ40p53 (negativni regulator aktivnosti promotora P2) u tumorima s divljim tipom gena *TP53* može objasniti smanjenu ekspresiju izoforme Δ133p53. Hafsi i suradnici (58) su pokazali dvojaki učinak izoforme Δ40p53 na izoformu p53, pri čemu Δ40p53 može aktivirati ili inhibirati transkripcijsku aktivnost proteina p53 ovisno o omjeru ekspresije izoformi Δ40p53/p53 i ovisno o staničnom kontekstu. Tumori s mutacijom gena *TP53* ne pokazuju razliku u ekspresiji izoforme Δ133p53 između tumorskog i pripadajućeg zdravog tkiva (slika 14), ali je ekspresija ove izoforme značajno jača nego u tumorima s divljim

Ocjena rada u tijeku

tipom gena *TP53* (slika 12). S obzirom na to da mutirani protein p53 ne može aktivirati unutarnji promotor P2, jača ekspresija izoforme Δ133p53 u tumorima s mutacijom *TP53* moguća je posljedica djelovanja izoformi p63/p73, koje također aktiviraju promotor P2 i doprinose povišenoj ekspresiji izoforme Δ133p53 (8,48,153–155).

Zbog potencijalnih onkogenih funkcija brojna istraživanja su analizirala ekspresiju izoforme Δ133p53 u tumorima. Van den Berg i suradnici (10) zabilježili su smanjenu ekspresiju izoforme Δ133p53 u ranim stadijima karcinoma bubrega. Smanjena ekspresija ove izoforme je zabilježena i u adenomima debelog crijeva (82). Suprotno tome, prekomjerna ekspresija izoforme Δ133p53 zabilježena je pri progresiji adenoma u karcinom debelog crijeva, u kolangiokarcinomu, karcinomu pluća, karcinomu dojke i prostate, glioblastomu, te karcinomu želuca (82,91,93–96,156).

U našem istraživanju izoforma Δ40p53 je jače eksprimirana u odnosu na izoformu Δ133p53 u tumorima s divljim tipom gena *TP53* (slika 13A), dok takva razlika u ekspresiji između ove dvije izoforme nije potvrđena u tumorima s mutacijom gena *TP53* (slika 13B). U tumorima s mutacijom gena *TP53* izoforma Δ40p53 je jače eksprimirana nego u tumorima s divljim tipom gena *TP53* (slika 12). Istraživači su pronašli povišenu ekspresija Δ40p53 u tumorskom u odnosu na normalno tkivo u različitim tipovima tumora, uključujući serozni karcinom jajnika, akutnu limfoblastičnu leukemiju, glioblastom, melanom, karcinom bubrega i dojke (10,79,86,87,157–159). Suprotno tome, Bischof i suradnici nisu detektirali ekspresiju Δ40p53 u seroznom karcinomu maternice (85). Hoffsteter i suradnici su detektirali jaču ekspresiju izoforme Δ40p53 u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo samo u mucinoznom, dok u ostalim histološkim tipovima nisu, te su zaključili kako histološki podtipovi predstavljaju različite entitete bolesti s različitom biologijom tumora (87). Izoforma Δ40p53 je bila jače eksprimirana u uzorcima koštane srži u odnosu na zdrave donore u relapsu akutne limfoblastične leukemije, ali ne i u primarnoj bolesti, dok je izoforma Δ133p53 jače eksprimirana u uzorcima koštane srži i kod primarne bolesti i kod relapsa u odnosu na zdrave donore (157). Avery-Kiejda i suradnici detektirali su izoformu Δ40p53 praktički u svim staničnim linijama melanoma za razliku od melanocita i fibroblasta, dok izoforma Δ133p53 nije detektirana niti u jednoj staničnoj liniji melanoma (158). U staničnim linijama karcinoma endometrija najjače su eksprimirane izoforme Δ40p53 i kanonski p53, a izoforma Δ40p53 je ostala i najjače eksprimirana izoforma u zdravom tkivu (90). U tumorima dojke, izoforma Δ40p53 je jače eksprimirana u odnosu na izoforme Δ133p53, p53β i p53γ te vlastitu ekspresiju u zdravom tkivu, a ekspresija svih analiziranih izoformi se nije mijenjala ovisno o mutacijskom

Ocjena rada u tijeku

statusu gena *TP53* (79). Autori navedeno objašnjavaju polimorfizmom introna 3 u većini analiziranih tumora, koji sadrži G-kvadripleksnu strukturu koji regulira alternativno prekrajanja introna 2. Tvrde da takav polimorfizma može favorizirati nastajanje transkripata koji zadržavaju intron 2 i dovode do jače ekspresije Δ40p53 (79). Isti autori tvrde da je razina ekspresije Δ40p53 na RNA i proteinskoj razini usporediva te zaključuju kako je alternativno prekrajanje glavni mehanizam nastajanja Δ40p53 u karcinomu dojke (79). Van den Berg i suradnici su pokazali jaču ekspresiju izoforme Δ40p53 u višim stadijima tumora bubrega u odnosu na zdravo tkivo, dok u najnižem stadiju tumora nema razlike (10).

Navedena istraživanja pokazuju da se ekspresija izoformi mijenja ovisno o tkivnom kontekstu, histološkom podtipu tumora, mutacijskom statusu gena *TP53* te prisutnošću polimorfizama.

5.3. Prognostičko značenje ekspresije i mutacijskog statusa gena *TP53* u karcinomu bubrega

Brojna istraživanja pokušala su odgovoriti na pitanje povezanosti profila ekspresije i statusa gena *TP53* s nastankom i progresijom tumora te preživljenjem bolesnika (9,48,52,78,79,84,99,160). Autori su zaključili da bi najbolji prognostički model uključivao istodobnu analizu profila ekspresije izoformi i mutacijskog statusa gena *TP53* (87,97,99,100,161).

Na temelju navedenih istraživanja, proveli smo analizu povezanosti mutacijskog statusa i ekspresije gena *TP53* s patohistološkim značajkama karcinoma bubrega, kliničkim obilježjima i ukupnim preživljenjem bolesnika. U svrhu statističke analize podijelili smo ekspresiju izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 na visoku i nisku s obzirom na medijan genske ekspresije pojedine izoforme.

Iako je većina studija pokazala da su mutacija gena *TP53* i promijenjen profila ekspresije njegovih izoformi povezani s agresivnijim obilježjima tumora, progresijom bolesti i preživljenjem bolesnika (8,9,52,84,93,160), postoje i studije koje nisu potvrdile tu povezanost (68,152). U našem istraživanju mutacija gena *TP53* nije bila povezana s kliničkim i patohistološkim značajkama tumora. Heterogenost mutacija gena *TP53* i njihov učinak na funkciju proteina p53 dodatno otežavaju analizu povezanosti mutacije gena *TP53* s

Ocjena rada u tijeku

čimbenicima progresije tumora i preživljenjem bolesnika (144). Za razliku od drugih tumorskih supresora, mutacije gena *TP53* uglavnom su mutacije pogrešnog smisla koje dovode do nestanka i smanjenja funkcija proteina p53, ali i do stjecanja novih, onkogenih funkcija mutiranog proteina p53, pa se u stanicama stvaraju novi uvjeti koji promiču proliferaciju, migraciju, nastanak presadnica i rezistenciju na kemoterapiju (52). Također, mutacije gena *TP53* u nekodirajućim područjima dovode do nastanka divljeg tipa proteina p53, ali istodobno mogu dovesti i do neuravnotežene ekspresije izoformi p53 u tumorima (4). Osim navedenog, usporedivost rezultata između pojedinih istraživanja umanjuje i činjenica kako su korištene različite metode za detekciju mutacije, pri čemu je većina ranijih istraživanja koristila imunohistokemijske metode te je pozitivna reakcija na protein p53 korelirala s progresijom tumora i kraćim preživljenjem bolesnika (162). Kako je već ranije navedeno imunohistokemijski pozitivna ekspresija proteina p53 nije adekvatna za procjenu mutacijskog statusa gena *TP53*.

Možda i klinički najzanimljiviji rezultat ovog istraživanja je povezanost mutacijskog statusa gena *TP53* s ukupnim preživljenjem. Neočekivano, bolesnici s mutacijom gena *TP53* imali su veću stopu petogodišnjeg preživljenja u odnosu na one s divljim tipom gena *TP53*. Pa tako petogodišnje preživljenja za bolesnike s mutacijom iznosi 79,5 % naspram 42,8 % za bolesnike s divljim tipom *TP53*.

Brojna istraživanja su analizirala povezanost mutacijskog statusa gena *TP53* i preživljenja bolesnika, ali rezultati nisu dosljedni (4,7,20,68,78). Zhang i suradnici nisu dokazali povezanost mutacijskog statusa gena *TP53* s preživljenjem bolesnika oboljelih od karcinoma bubrega (78). Suprotno, Diesing i suradnici su povezali mutaciju gena *TP53* s kraćim specifičnim preživljenjem od karcinoma bubrega (engl. *cancer specific survival*, CSS) (68). Studije COMPRAZ i RECORD3 su analizirale mutacije gena *BAP1, TP53 i PBRM1* kod bolesnika s karcinomom bubrega liječenih sunitinibom i pazopanibom. Rezultati su pokazali kako je prisutnost ovih mutacija nezavisni prediktor preživljenja bolesnika (20). Bolesnici s mutacijom gena PBRM1 liječeni everolimusom su imali bolje preživljenje od bolesnika s divljim tipom gena *TP53,* dok su u prisutnosti mutacije *BAP1* imali kraće preživljenje u odnosu na one s divlji tipom gena *TP53* (20). U grupi bolesnika liječenih sunitinibom, mutacijski status gena *PBRM1* i *BAP1* nije imao utjecaja na preživljenje (20). Autor Li i suradnici su analizirali prognostičko značenje mutacija *TP53* gena u različitim karcinomima analizom podataka iz Baze gena *TP53* (engl. *TP53* Database) od Internacionalne agencije za istraživanje raka

Ocjena rada u tijeku

(IARC), rezultati su pokazali da 2,1 % bolesnika s karcinomom bubrega ima mutaciju gena *TP53* i ona je prediktor kraćeg preživljenja bolesnika (7).

U ovom istraživanju smo analizirali povezanost između ekspresije izoformi gena *TP53* s čimbenicima progresije tumora i preživljenjem bolesnika. Iz literature je poznato da izoforme proteina p53 moduliraju aktivnost kanonskog proteina p53 pune dužene, ali imaju i aktivnosti neovisne o njemu. Stoga konačni stanični odgovor na stres ovisi o ravnoteži ekspresije izoformi i staničnom kontekstu, a ista izoforma može se ponašati kao tumorski supresor ili onkogen (47,48,84,99,161).

Izoforme p53β i p53γ imaju dvostruku ulogu, potiču proliferaciju ili smrt stanica ovisno o staničnom kontekstu (163). Protektivni učinak povišene ekspresije p53β u tumorima pokazan je u karcinomu dojke, kolona i bubrega te akutnoj mijeloičnoj leukemiji (78–80,82). Smanjen omjer ekspresije izoformi p53β/Δ133p53α povezan je s progresijom adenoma debelog crijeva u karcinom (82). U karcinomu dojke jača ekspresija p53β povezana je s manjom veličinom tumora (79). U karcinomu bubrega, zabilježena je povišena ekspresija p53β u nižim stadijem tumora prema TNM-klasifikaciji (10,78). Protektivni učinak izoforma p53β ostvaruje putem aktivacije promotora Bax izravno ili putem formiranja tetramera s proteinom p53, koji potom potiče apoptozu i senescenciju. Ova izoforma sprječava razgradnju proteina p53α posredovanu s MDM2 putem formiranja tetramera sprječava (78). Suprotno tim istraživanjima, nekoliko grupa autora je pokazalo da je jača ekspresija p53β povezana s progresijom tumora (9,160). Hofstetter i suradnici su povezali jaču ekspresiju p53β s agresivnijim fenotipom i slabije diferenciranim karcinomom jajnika (160). U našem istraživanju smo uočili da je povišena ekspresija p53 povezana s prodorom tumora u bubrežnu kapsulu, dok nismo dokazali povezanost s ostalim prognostičkim čimbenicima

Izoforma Δ40p53, također ima dvojaku ulogu, u okviru staničnog konteksta može pojačati ili inhibirati aktivnost proteina p53α ovisno o razini vlastite ekspresije, razini ekspresije drugih izoformi gena *TP53* te interakciji izoformi s regulatorima kao što je protein MDM2 (164). Povišena ekspresija izoforme Δ40p53 povezana je s jačom ekspresijom p53α, sugerirajući da utječe na stabilizaciju izoforme p53α kroz formiranje heterotetramera i inhibiciju razgradnje izoforme p53α putem proteina MDM2 (89). Uz stabilizaciju proteina p53α, izoforma Δ40p53 mijenja njegovu transkripcijsku funkciju zbog smanjene stabilnosti heterotetramera sastavljenih od Δ40p53 i p53α pri vezanju za ciljne sljedove DNA. Dodatno, različite posttranslacijske modifikacije izoforme Δ40p53 dovode do interakcije s drugim

Ocjena rada u tijeku

proteinima i poremećaja u nizvodnom signaliziranju (159). Također, izoforma Δ40p53 prilikom vezanja za ciljne sljedove DNA proteina p53α zauzima njegovo mjesto i onemogućava njegovo vezanje (159). Prognostičko značenje izoforme Δ40p53 u tumorima je, unatoč brojnim istraživanjima i dalje nejasno. Reinhardt i njegovi suradnici (159) su pokazali da povišena ekspresija izoforme Δ40p53 u stanicama karcinoma dojke nakon kemoterapije potiče popravak DNA, a ne apoptozu koju bi potaknuo kanonski p53α kao odgovor na kemoterapiju. U tumorima jajnika nije dokazana povezanost povišene ekspresije izoforme Δ40p53 s progresijom tumora (152). U hepatocelularnom karcinomu, jača ekspresije izoforme Δ40p53 pokazuje protektivni učinak u vezi s progresijom tumora, dok je u karcinomu dojke povišena ekspresije izoforme Δ40p53 marker agresivnog trostruko negativnog fenotipa i progresije tumora (79,165). Visoka ekspresija izoforme Δ40p53 povezana je s kraćim preživljenjem u karcinomu dojke, dok je bolje preživljenje zabilježeno kod bolesnica s mucinoznim karcinomom jajnika (87–89). U našem istraživanju jača ekspresija izoforme Δ40p53 povezana je s većim tumorima i češćim prodorom tumora u bubrežnu kapsulu, ali nije imala utjecaja na preživljenje bolesnika. Diesing i suradnici (68) su pokazali da ekspresija Δ40p53 nije povezana s progresijom karcinoma bubrega, dok su van den Berg i suradnici (10) detektirali jaču ekspresiju Δ40p53 u kasnijim stadijima bolesti.

Izoforma Δ133p53, koja nema oba transaktivacijska te dio DNA-veznog područja, u zdravim stanicama potiče proliferaciju i sprječava starenje stanica, potiče pluripotentnost matičnih stanica, migraciju stanica i angiogenezu, aktivira popravak dvostrukih loma molekule DNA, regulira imunološki sustav i ne inhibira apoptozu ovisnu o proteinu p53α (161). Sve te funkcije Δ133p53 potiču rast tumora, invaziju, nastanak presadnica i rezistenciju na kemoterapiju (92,161). Izoforma Δ133p53 dominantno-negativno utječe na aktivnost proteina p53 i p73 jer tvori s njima heterotetramere te tako onemogućava njihovo vezivanje na promotore ciljnih gena i smanjuje njihovu aktivnost kao transkripcijskih faktora (60,153). U našem istraživanju izoforma Δ133p53 nije pokazala povezanost s kliničkim, patohistološkim obilježjima tumora i preživljenjem bolesnika. Drugi autori su pokazali da je jača ekspresija izoforme Δ133p53 povezana s progresijom tumora debelog crijeva, dojke, melanoma, prostate, glioblastoma i karcinoma pluća (81,82,91,92,94–96). Također, jača ekspresija izoforme Δ133p53 je povezana s kraćim preživljenjem bolesnika s kolangiokarcinom, karcinomom debelog crijeva, jednjaka, dojke, prostate i melanomom (81,92–95,166). S druge strane, jača ekspresija Δ133p53 može biti povezana s duljim preživljenjem bolesnica s karcinomom jajnika (85,97).

Ocjena rada u tijeku

U ovom istraživanju bolesnici sa smanjenim petogodišnjim preživljenjem imali su divlji tip gena *TP53* i smanjenu ekspresiju izoforme Δ133p53 u odnosu na izoforme p53 i Δ40p53, u odnosu na vlastitu ekspresiju u tumorima s mutacijom gena *TP53* te pripadajućem zdravom tkivu. Budući da stanični odgovor na stres ovisi o razini ekspresije izoformi gena *TP53* i njegovih homologa, gena *TP63* i *TP73* te njihovih međusobnih proteinskih interakcija, moguće je da promijenjena ekspresija izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 u karcinomu bubrega s divljim tipom gena *TP53* dovodi do promjene u staničnom odgovoru koji pogoduje nastanku i progresiji tumora te lošijem ishodu bolesnika.

Osim toga, u ovom istraživanju bolesnici s mutacijom gena *TP53* imaju prekomjernu ekspresiju izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 i bolju prognozu od onih koji imaju divlji tip gena *TP53*. U literaturi se nalaze istraživanja koja su pokazala kako određeni tkivno-specifični obrazac ekspresije izoformi može nadjačati negativan učinak mutiranog proteina p53, pa bolesnici unatoč mutaciji gena *TP53* imaju bolji klinički ishod nego oni koji imaju divlji tip gena *TP53* (48,87,99). Bolesnice s karcinomom jajnika i divljim tipom gena *TP53* imale su bolju prognozu ako su imale povišenu ekspresiju Δ40p53α, dok su bolesnice s mutacijom gena *TP53* imale bolju prognozu ako su eksprimirale izoformu Δ133p53α (87,97,99). Kod bolesnica oboljelih od karcinoma dojke s mutacijom gena *TP53*, ekspresija izoforme p53β povezana je s manjom veličinom tumora i dužim preživljenjem bez bolesti, dok je ekspresija Δ40p53 povezana s agresivnim trostruko negativnim fenotipom (79). Drugi istraživači su pokazali da bolesnice oboljele od karcinoma dojke s mutacijom gena *TP53* i jačom ekspresijom p53γ imaju jednako dobru prognozu kao i bolesnice koje imaju tumore divljeg tipa *TP53* (84). Iz literature je poznato kako izoforme p53, Δ40p53 i Δ133p53 stvaraju heterokomplekse s izoformom TAp73 koja ima proapoptotsku funkciju sličnu divljem tipu proteina p53, pa na taj način stanice tumora mogu prevladati negativni učinak mutacije gena *TP53* (59).

Zaključno, ovo istraživanje je potvrdilo hipotezu prema kojoj se ekspresija izoformi gena *TP53* razlikuje između tumora i zdravog tkiva bubrega te se mijenja u prisutnosti mutacije gena *TP53*. U tumorima s divljim tipom gena *TP53*, izoforma Δ133p53 pokazuje smanjenu ekspresiju u usporedbi sa Δ40p53 i p53 izoformom, kao i u usporedbi sa vlastitom ekspresijom u tumorima sa mutacijom gena *TP53* i u pripadajućem zdravom tkivu bubrega. Tumori s mutacijom imaju povećanu ekspresiju izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 u usporedbi s tumorima s divljim tipom gena *TP53*. Povišena ekspresija izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 u prisutnosti mutacije gena *TP53* čini se kao zaštitni faktor jer bolesnici s mutacijom gena *TP53* žive duže u odnosu na one s divljim tipom gena *TP53*. Vrijednost ovog istraživanja je u činjenici što smo

Ocjena rada u tijeku

istodobno analizirali kliničke, patohistološke čimbenike, preživljenje bolesnika te ekspresiju izoformi i mutacijski status gena *TP53* u karcinomu bubrega.

U buduća istraživanja potrebno je uključiti veći broj bolesnika kako bi se dodatno razjasnila uloga ekspresije i mutacijskog statusa gena *TP53* kao prognostičkih biljega u karcinomu bubrega. Istraživači bi trebali analizirati ekspresiju gena *TP53* na proteinskoj razini, uključujući različite izoforme koje se razlikuju na C-kraju proteina (α, β, γ varijante). U istraživanja je potrebno uključiti i ostale članove obitelji p53, kao što su izoforme proteina p63 i p73, posebno one skraćene na N-kraju jer bi mogle sudjelovati u inaktivaciji proteina p53. Analizu mutacijskog statusa gena *TP53* trebalo bi produbiti metodom sekvenciranja gena *TP53*. Također, treba uključiti i druge tumorske supresore u analizu, jer pokretač karcinogeneze u bubregu nije jedino gen *TP53*, već su u to uključeni i brojni drugi geni kao što su geni *VHL, PBRM1, BAP1, SETD2 i PIK3CA.*

Ocjena rada u tijeku

6. ZAKLJUČCI

1. Od 40 uzoraka karcinoma bubrega, u 22 (55 %) uzorka smo detektirali mutaciju gena *TP53*, dok je 18 (45 %) uzoraka imalo divlji tip gena *TP53*. Mutacija gena nije povezana s kliničkim i patohistološkim obilježjima tumora.

2. Detektirali smo ekspresiju izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 na razini RNA u svim uzorcima karcinoma bubrega i u pripadajućem zdravom tkivu. U ispitivanim uzorcima postoji pozitivna korelacija između ekspresije svih izoformi. Ekspresija izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 na razini RNA ovisi o prisutnosti mutacije gena *TP53*.

3. Profil ekspresije izoformi u tumorima s divljim tipom gena *TP53* pokazuje da je izoforma p53 najjače eksprimirana, dok su izoforme Δ40p53 i Δ133p53 smanjeno eksprimirane. Također, izoforma Δ133p53 pokazuje manju ekspresiju u odnosu na izoforme p53 i Δ40p53 te pripadajuće zdravo tkivo.

4. Istraživanje je pokazalo jaču ekspresiju p53, Δ40p53 i Δ133p53 u tumorima s mutacijom genom *TP53* u usporedbi s tumorima s divljim tipom gena *TP53*. Najjače je eksprimirana izoforma p53. Izoforme Δ40p53 i Δ133p53 su eksprimirane na podjednakoj razini, smanjeno su eksprimirane u odnosu na izoformu p53, te nema razlike u njihovoj ekspresiji u odnosu na pripadajuće zdravo tkivo.

5. Jača ekspresija izoformi p53 i Δ40p53 povezana je s prodorom tumora u bubrežnu kapsulu, dok je jača ekspresija izoforme Δ40p53 dodatno povezana s porastom veličine tumora.

6. Genska ekspresija izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 ne utječe na preživljenje bolesnika. Bolesnici s mutacijom gena *TP53* su imali veću stopu petogodišnjeg preživljenja u odnosu na one s divljim tipom gena *TP53*.

7. U univarijatnoj analizi značajni prediktori preživljenja su nuklearni gradus po SZO/ISUP, veličina tumora, tumorski stadij, postoperativna sustavna terapija i mutacijski status gena *TP53*, dok su u multivarijatnoj analizi statistički značajni prediktori tumorski stadij i mutacijski status gena *TP53*.

Ocjena rada u tijeku

LITERATURA

1. Fučkar Ž, Španjol J. Urologija II : specijalni dio. Rijeka: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci; 2013. 78–100 str.

2. Ljungberg B, Albiges L, Bedke J, Bex A, Capitanio U, Giles RH, et al. EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma [Internet]. Arnhem, The Netherlands: EAU Guidelines Office; March2023 (cited Dec 2023). Available from: http://uroweb.org/guidelines/compilations-of-all-guidelines/

3. Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW, editors. World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2020. 611str.

4. Amendolare A, Marzano F, Petruzzella V, Vacca RA, Guerrini L, Pesole G, et al. The Underestimated Role of the p53 Pathway in Renal Cancer. Cancers. 2022; 14(23):5733.

5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell. 2011;144(5):646–74.

6. Pecorino L. Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics. Editor: Crowe J, editor. 3rd ed. London: Oxford University Press; 2012. Chapter 6, Growth inhibition and tumor suppressor genes; p.123-141.

7. Li VD, Li KH, Li JT. *TP53* mutations as potential prognostic markers for specific cancers: analysis of data from The Cancer Genome Atlas and the International Agency for Research on Cancer *TP53* Database. J Cancer Res Clin Oncol. 2019 Mar;145(3):625-636.

8. Vieler M, Sanyal S. p53 Isoforms and Their Implications in Cancer. Cancers (Basel). 2018 Aug 25;10(9):288.

9. Song W, Huo S, Lü J, Liu Z, Fang X, Jin X, et al. Expression of p53 isoforms in renal cell carcinoma. Chin Med J (Engl). 2009;122(8):921–6.

10. van den Berg L, Segun AD, Mersch S, Blasberg N, Grinstein E, Wai D, et al. Regulation of p53 isoform expression in renal cell carcinoma. 2010;2(3):1042-53.

Ocjena rada u tijeku

11. Padala SA, Barsouk A, Thandra KC, Saginala K, Mohammed A, Vakiti A, et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. World J Oncol. 2020;11(3):79–87.

12. Erceg M, Miler Knežević A. Izvješće o smrtnosti prema listi odabranih uzroka smrti u 2019. Hrvat zavod za javno Zdr. 2020.;

13. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2020. Bilten. Zagreb; 2022.

14. Taneja K, Williamson SR. Updates in Pathologic Staging and Histologic Grading of Renal Cell Carcinoma. Surg Pathol Clin. prosinac 2018.;11(4):797–812.

15. Kim SP, Alt AL, Weight CJ, Costello BA, Cheville JC, Lohse C, Allmer C, Leibovich BC. Independent validation of the 2010 American Joint Committee on Cancer TNM classification for renal cell carcinoma: results from a large, single institution cohort. J Urol. 2011;185(6):2035-9.

16. Novara G, Ficarra V, Antonelli A, Artibani W, Bertini R, Carini M, et al. Validation of the 2009 TNM version in a large multi-institutional cohort of patients treated for renal cell carcinoma: are further improvements needed? Eur Urol. 2010;58(4):588-95.

17. Xiao Q, Yi X, Guan X, Yin H, Wang C, Zhang L, et al. Validation of the World Health Organization/International Society of Urological Pathology grading for Chinese patients with clear cell renal cell carcinoma. Transl Androl Urol. 2020;9(6):2665-2674.

18. Moch H, Amin MB, Berney DM, Compérat EM, Gill AJ, Hartmann A, et al. The 2022 World Health Organization Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. Eur Urol. 2022;82(5):458-468.

19. Weaver C, Bin Satter K, Richardson KP, Tran LKH, Tran PMH, Purohit S. Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Renal Clear Cell Carcinoma. Biomedicines. 2022;10(11):2953.

20. D'Avella C, Abbosh P, Pal SK, Geynisman DM. Mutations in renal cell carcinoma. Urol Oncol. 2020 Oct;38(10):763-773.

21. Dizman N, Philip EJ, Pal SK. Genomic profiling in renal cell carcinoma. Nat Rev Nephrol. 2020.;16(8):435–51.

Ocjena rada u tijeku

22. Alaghehbandan R, Perez Montiel D, Luis AS, Hes O. Molecular Genetics of Renal Cell Tumors: A Practical Diagnostic Approach. Cancers (Basel). 2019;12(1):85.

23. Ujfaludi Z, Kuthi L, Pankotai-Bodó G, Bankó S, Sükösd F, Pankotai T. Novel Diagnostic Value of Driver Gene Transcription Signatures to Characterize Clear Cell Renal Cell Carcinoma, ccRCC. Pathol Oncol Res. 2022; 28:1610345.

24. Rini BI, Huseni M, Atkins MB, McDermott DF, Powles TB, Escudier B, et al. Molecular correlates differentiate response to atezolizumab (atezo) + bevacizumab (bev) vs sunitinib (sun): Results from a phase III study (IMmotion151) in untreated metastatic renal cell carcinoma (mRCC). Ann Oncol. 2018.;29(8): viii724–5.

25. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. N Engl J Med. 2012 Mar 8;366(10):883-892.

26. Gerlinger M, Horswell S, Larkin J, Rowan AJ, Salm MP, Varela I, et al. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. Nat Genet. 2014 Mar;46(3):225-233.

27. Omrčen T, Boraska Jelavić T, Šitum M, Vilović K, Dolić K, Zahirović D, at al. Smjernice za dijagnosticiranje, liječenje i praćenje bolesnika s rakom bubrega. Liječnički Vjesn. 2019;141(11–12):336–42.

28. Zovko D. Uloga imunoterapije u liječenju bolesnika s metastatskim rakom bubrega (diplomski rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet;2022. 30 str.

29. Choueiri TK, Motzer RJ. Systemic Therapy for Metastatic Renal-Cell Carcinoma. N Engl J Med. 2017;376(4):354-366.

30. DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. Proc Natl Acad Sci. 1979.;76(5):2420–4.

31. Soussi T. The history of p53. A perfect example of the drawbacks of scientific paradigms. EMBO Rep. 2010;11(11):822-6.

32. Milner J. Different forms of p53 detected by monoclonal antibodies in non-dividing and dividing lymphocytes. Nature. 1984;310(5973):143–5.

Ocjena rada u tijeku

33. Maltzman W, Czyzyk L. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. Mol Cell Biol. 1984;4(9):1689–94.

34. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, et al. Chromosome 17 Deletions and p53 Gene Mutations in Colorectal Carcinomas. Science. 1989;244(4901):217–21.

35. Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, Oren M. Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. Nature. 1984;312(5995):646–9.

36. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. Cell. 1989;57(7):1083–93.

37. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris C. p53 mutations in human cancers. Science. 1991;253(5015):49–53.

38. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, at al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. Science. 1990;250(4985):1233–8.

39. Oren M. p53: the ultimate tumor suppressor gene? FASEB J. 1992;6(13):3169–76.

40. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. Nature. 1992 Jul 2;358(6381):15-6.

41. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. *TP53* mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010;2(1): a001008.

42. Osterburg C, Dötsch V. Structural diversity of p63 and p73 isoforms. Cell Death Differ. 2022;29(5):921–37.

43. Bourdon JC. p53 and its isoforms in cancer. Br J Cancer. 2007;97(3):277–82.

44. Anbarasan T, Bourdon JC. The Emerging Landscape of p53 Isoforms in Physiology, Cancer and Degenerative Diseases. Int J Mol Sci. 2019;20(24):6257.

45. Bourdon J, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, at al. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. Genes Dev. 2005;19(18):2122–37.

46. Zhao L, Sanyal S. p53 Isoforms as Cancer Biomarkers and Therapeutic Targets. Cancers (Basel). 2022;14(13):3145.

Ocjena rada u tijeku

47. Surget S, Khoury MP, Bourdon JC. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: A clinical perspective. Onco Targets Ther. 2013; 7:57–67.

48. Joruiz SM, Bourdon JC. p53 Isoforms: Key Regulators of the Cell Fate Decision. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016;6(8):a026039.

49. Hayman L, Chaudhry WR, Revin V V., Zhelev N, Bourdon JC. What is the potential of p53 isoforms as a predictive biomarker in the treatment of cancer? Expert Rev Mol Diagn. 2019;19(2):149–59.

50. George P. P53 how crucial is its role in cancer? Int J Curr Pharm Res.2011;3(2):19-25.

51. Scoumanne A, Harms KL, Chen X. Structural basis for gene activation by p53 family members. Cancer Biol Ther. 2005;4(11):1178–85.

52. Swiatkowska A. p53 and Its Isoforms in Renal Cell Carcinoma—Do They Matter? Biomedicines. 2022;10(6):1330..

53. Collavin L, Lunardi A, Del Sal G. p53-family proteins and their regulators: hubs and spokes in tumor suppression. Cell Death Differ. 2010;17(6):901–11.

54. Mehta S, Campbell H, Drummond CJ, Li K, Murray K, Slatter T, at al. Adaptive homeostasis and the p53 isoform network. EMBO Rep. 2021;22(12): e53085.

55. Joerger AC, Fersht AR. The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. Annu Rev Biochem. 2016;85:375–404.

56. Hassin O, Oren M. Drugging p53 in cancer: one protein, many targets. Nat Rev Drug Discov. 2023;22(2):127-144.

57. Roe J-S, Kim H, Lee S-M, Kim S-T, Cho E-J, Youn H-D. p53 Stabilization and Transactivation by a von Hippel-Lindau Protein. Mol Cell. svibanj 2006.;22(3):395–405.

58. Hafsi H. N-terminal isoforms of the p53 tumour suppressor protein : effects on p53 transcriptional activity and expression in cutaneous melanoma. Human health and pathology. Universit´e Claude Bernard - Lyon I; 2012.

59. Slade N, Zorić A, Horvat A. The p53/p63/p73 family of proteins – the focus on isoforms and mutants in cancer. Period Biol. 2010.;112(4):425–32.

60. Zorić A, Horvat A, Slade N. Differential effects of diverse p53 isoforms on TAp73 transcriptional activity and apoptosis. Carcinogenesis. 2013.;34(3):522–9.

Ocjena rada u tijeku

61. Zorić A, Horvat A, Slade N. Obitelj gena p53 – uloga u razvoju organizma i tumorigenezi. Med fl uminensis 2010. 2010.;46(2):135–43.

62. Petitjean A, Achatz MIW, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. *TP53* mutations in human cancers: Functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. Oncogene. 2007;26(15):2157–65.

63. Drach J, Ackermann J, Fritz E, Krömer E, Schuster R, Gisslinger H, at al. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. Blood. 1998;92(3):802–9.

64. Chang H, Jiang AM, Qi CXY. Aberrant nuclear p53 expression predicts hemizygous 17p (*TP53*) deletion in chronic lymphocytic leukemia. Am J Clin Pathol. 2010;133(1):70–4.

65. Avigad S, Barel D, Blau O, Malka A, Zoldan M, Mor C, at al. A novel germ line p53 mutation in intron 6 in diverse childhood malignancies. Oncogene. 1997;14(13):1541–5.

66. Slee EA, O'Connor DJ, Lu X. To die or not to die: how does p53 decide? Oncogene. 2004.23(16):2809–18.

67. Li F, Aljahdali IAM, Zhang R, Nastiuk KL, Krolewski JJ, Ling X. Kidney cancer biomarkers and targets for therapeutics: survivin (BIRC5), XIAP, MCL-1, HIF1α, HIF2α, NRF2, MDM2, MDM4, p53, KRAS and AKT in renal cell carcinoma. J Exp Clin Cancer Res. 2021;40(1):254.

68. Diesing K, Ribback S, Winter S, Gellert M, Oster AM, Stühler V, at al. p53 is functionally inhibited in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC): a mechanistic and correlative investigation into genetic and molecular characteristics. J Cancer Res Clin Oncol. 2021;147(12):3565–76.

69. Elias R, Sharma A, Singla N, Brugarolas J. Next Generation Sequencing in Renal Cell Carcinoma: Towards Precision Medicine. Kidney cancer J. 2019;17(4):94–104.

70. Slade N, Moll UM, Brdar B, Zorić A, Jelaković B. p53 mutations as fingerprints for aristolochic acid: an environmental carcinogen in endemic (Balkan) nephropathy. Mutat Res. 2009;663(1-2):1-6.

71. Moriya M, Slade N, Brdar B, Medverec Z, Tomic K, Jelaković B, at al. *TP53* Mutational signature for aristolochic acid: An environmental carcinogen. Int J Cancer. 2011;129(6):1532–6.

Ocjena rada u tijeku

72. Grollman AP, Shibutani S, Moriya M, Miller F, Wu L, Moll U, i ostali. Aristolochic acid and the etiology of endemic (Balkan) nephropathy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007.;104(29):12129–34.

73. Mattila KE, Vainio P, Jaakkola PM. Prognostic Factors for Localized Clear Cell Renal Cell Carcinoma and Their Application in Adjuvant Therapy. Cancers (Basel). 2022;14(1):239.

74. Smith CG, Moser T, Mouliere F, Field-Rayner J, Eldridge M, Riediger AL, at al. Comprehensive characterization of cell-free tumor DNA in plasma and urine of patients with renal tumors. Genome Med. 2020;12(1):23.

75. Sabapathy K, Lane DP. Therapeutic targeting of p53: All mutants are equal, but some mutants are more equal than others. Nat Rev Clin Oncol. 2018;15(1):13–30.

76. Phang BH, Othman R, Bougeard G, Chia RH, Frebourg T, Tang CL, at al. Amino-terminal p53 mutations lead to expression of apoptosis proficient p47 and prognosticate better survival, but predispose to tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(46):E6349–58.

77. Marcel V, Fernandes K, Terrier O, Lane DP, Bourdon JC. Modulation of p53β and p53γ expression by regulating the alternative splicing of *TP53* gene modifies cellular response. Cell Death Differ. 2014;21(9):1377-87.

78. Zhang H, Zhao Y, Sun P, Zhao M, Su Z, Jin X, at al. p53β: a new prognostic marker for patients with clear-cell renal cell carcinoma from 5.3 years of median follow-up. Carcinogenesis. 2018;39(3):368–74.

79. Avery-Kiejda KA, Morten B, Wong-Brown MW, Mathe A, Scott RJ. The relative mRNA expression of p53 isoforms in breast cancer is associated with clinical features and outcome. Carcinogenesis. 2014;35(3):586–96.

80. Ånensen N, Hjelle SM, Van Belle W, Haaland I, Silden E, Bourdon J-C, at al. Correlation analysis of p53 protein isoforms with NPM1/FLT3 mutations and therapy response in acute myeloid leukemia. Oncogene. 2012;31(12):1533–45.

81. Ozretić P, Hanžić N, Proust B, Sabol M, Trnski D, Radić M, at al. Expression profiles of p53/p73, NME and GLI families in metastatic melanoma tissue and cell lines. Sci Rep. 28. kolovoz 2019;9(1):12470.

Ocjena rada u tijeku

82. Fujita K, Mondal AM, Horikawa I, Nguyen GH, Kumamoto K, Sohn JJ, at al. p53 isoforms Δ133p53 and p53β are endogenous regulators of replicative cellular senescence. Nat Cell Biol. 2009;11(9):1135–42.

83. Silden E, Hjelle SM, Wergeland L, Sulen A, Andresen V, Bourdon JC, at al. Expression of *TP53* Isoforms p53β or p53γ Enhances Chemosensitivity in *TP53*null Cell Lines. PLoS One. 2013;8(2):e56276.

84. Bourdon JC, Khoury MP, Diot A, Baker L, Fernandes K, Aoubala M, at al. p53 mutant breast cancer patients expressing p53γ have as good a prognosis as wild-type p53 breast cancer patients. Breast Cancer Res. 2011;13(1):R7.

85. Bischof K, Knappskog S, Stefansson I, McCormack EM, Trovik J, Werner HMJ, at al. High expression of the p53 isoform γ is associated with reduced progression-free survival in uterine serous carcinoma. BMC Cancer. 2018;18(1):684.

86. Takahashi R, Giannini C, Sarkaria J, Schroeder M, Rogers J, Mastroeni D, at al. p53 isoform profiling in glioblastoma and injured brain. Oncogene. 2013;32(26):3165–74.

87. Hofstetter G, Berger A, Berger R, Zorić A, Braicu EI, Reimer D, at al. The N-terminally truncated p53 isoform Δ40p53 influences prognosis in mucinous ovarian cancer. Int J Gynecol Cancer. 2012;22(3):372–9.

88. Morten BC, Wong-Brown MW, Scott RJ, Avery-Kiejda KA. The presence of the intron 3 16 bp duplication polymorphism of p53 (rs17878362) in breast cancer is associated with a low Δ40p53:p53 ratio and better outcome. Carcinogenesis. 2016;37(1):81–6.

89. Zhang X, Groen K, Morten BC, Steffens Reinhardt L, Campbell HG, Braithwaite AW, at al. Effect of p53 and its N-terminally truncated isoform, Δ40p53, on breast cancer migration and invasion. Mol Oncol. 2022;16(2):447–65.

90. Dos Santos NM, De Oliveira GAP, Rocha MR, Pedrote MM, Da Silva Ferretti GD, Rangel LP, at al. Loss of the p53 transactivation domain results in high amyloid aggregation of the δ40p53 isoform in endometrial carcinoma cells. J Biol Chem. 2019;294(24):9430–9.

91. Fragou A, Tzimagiorgis G, Karageorgopoulos C, Barbetakis N, Lazopoulos A, Papaioannou M, at al. Increased Δ 133p53 mRNA in lung carcinoma corresponds with reduction of p21 expression. 2017;15(4):1455–60.

Ocjena rada u tijeku

92. Campbell H, Fleming N, Roth I, Mehta S, Wiles A, Williams G, i ostali. Δ133p53 isoform promotes tumour invasion and metastasis via interleukin-6 activation of JAK-STAT and RhoA-ROCK signalling. Nat Commun. 2018.;9(1):254.

93. Nutthasirikul N, Limpaiboon T, Leelayuwat C, Patrakitkomjor S, Jearanaikoon P. Ratio disruption of the Δ133p53 and TAp53 isoform equilibrium correlates with poor clinical outcome in intrahepatic cholangiocarcinoma. Int J Oncol. 2013;42(4):1181–8.

94. Gadea G, Arsic N, Fernandes K, Diot A, Joruiz SM, Abdallah S, i ostali. *TP53* drives invasion through expression of its Δ133p53β variant. Elife. 15. rujan 2016.;5(September2016):1–26. Gadea G, Arsic N, Fernandes K, Diot A, Joruiz SM, Abdallah S, at al. *TP53* drives invasion through expression of its Δ133p53β variant. Elife. 2016; 5:e14734.

95. Kazantseva M, Eiholzer RA, Mehta S, Taha A, Bowie S, Roth I, at al. Elevation of the *TP53* isoform Δ133p53β in glioblastomas: an alternative to mutant p53 in promoting tumor development. J Pathol. 2018;246(1):77–88.

96. Kazantseva M, Mehta S, Eiholzer RA, Gimenez G, Bowie S, Campbell H, at al. The Δ133p53β isoform promotes an immunosuppressive environment leading to aggressive prostate cancer. Cell Death Dis. 2019;10(9):1–17.

97. Chambers SK, Martinez JD. The significance of p53 isoform expression in serous ovarian cancer. Futur Oncol. 2012;8(6):683–6.

98. Bischof K, Knappskog S, Hjelle SM, Stefansson I, Woie K, Salvesen HB, at al. Influence of p53 Isoform Expression on Survival in High-Grade Serous Ovarian Cancers. Sci Rep. 2019;9(1):5244.

99. Hofstetter G, Berger A, Schuster E, Wolf A, Hager G, Vergote I, at al. Δ133p53 is an independent prognostic marker in p53 mutant advanced serous ovarian cancer. Br J Cancer. 2011;105(10):1593-9.

100. Knezović Florijan M, Ozretić P, Bujak M, Pezzè L, Ciribilli Y, Kaštelan Ž, Slade N, Hudolin T. The role of p53 isoforms' expression and p53 mutation status in renal cell cancer prognosis. Urol Oncol. 2019;37(9):578.e1-578.e10.

Ocjena rada u tijeku

101. Horvat A, Tadijan A, Vlašić I, Slade N. p53/p73 Protein Network in Colorectal Cancer and Other Human Malignancies. Drahovsky D, Kornhuber B, urednici. Cancers (Basel). 2021;13(12):2885.

102. Zaika AI, Slade N, Erster SH, Sansome C, Joseph TW, Pearl M, Chalas E, Moll UM. DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. J Exp Med. 2002;196(6):765-80.

103. Rufini A, Agostini M, Grespi F, Tomasini R, Sayan BS, Niklison-Chirou MV, at al. p73 in Cancer. Genes Cancer. 2011;2(4):491–502.

104. Leroy B, Ballinger ML, Baran-Marszak F, Bond GL, Braithwaite A, Concin N, at al. Recommended guidelines for validation, quality control, and reporting of *TP53* variants in clinical practice. Cancer Res. 2017;77(6):1250–60.

105. Flaman JM, Frebourg T, Moreau V, Charbonnier F, Martin C, Chappuis P, at al. A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors. Proc Natl Acad Sci. 1995;92(9):3963–7.

106. Smardová J, Pavlová S, Svitáková M, Grochová D, Ravcuková B. Analysis of p53 status in human cell lines using a functional assay in yeast: detection of new non-sense p53 mutation in codon 124. Oncol Rep. 2005;14(4):901–7.

107. Andreotti V, Ciribilli Y, Monti P, Bisio A, Lion M, Jordan J, Fronza G, Menichini P, Resnick MA, Inga A. p53 transactivation and the impact of mutations, cofactors and small molecules using a simplified yeast-based screening system. PLoS One. 2011;6(6):e20643.

108. Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Important milestones at the various steps of tumorigenesis. Genes and Cancer. 2011;2(4):466–74.

109. Sun M, Shariat SF, Cheng C, Ficarra V, Murai M, Oudard S, at al. Prognostic factors and predictive models in renal cell carcinoma: a contemporary review. Eur Urol. 2011;60(4):644-61.

110. Scelo G, Li P, Chanudet E, Muller DC. Variability of Sex Disparities in Cancer Incidence over 30 Years: The Striking Case of Kidney Cancer. Eur Urol Focus. 2018;4(4):586–90.

Ocjena rada u tijeku

111. Gelfond J, Al-Bayati O, Kabra A, Iffrig K, Kaushik D, Liss MA. Modifiable risk factors to reduce renal cell carcinoma incidence: Insight from the PLCO trial. Urol Oncol Semin Orig Investig. 2018;36(7):340.e1-340.e6.

112. Ali R, Muhealdeen D, Fakhralddin S, Bapir R, Tahir S, Rashid R, i ostali. Prognostic factors in renal cell carcinoma: A single-center study. Mol Clin Oncol. 2023.;19(3):66.

113. SEER Cancer Stat Facts: Kidney and Renal Pelvis Cancer [Internet]. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Bethesda, MD. 2024. Available at: https://seer.cancer.gov/statfacts/html/kidrp.html

114. Lee CT, Katz J, Fearn PA, Russo P. Mode of presentation of renal cell carcinoma provides prognostic information. Urol Oncol. 2002;7(4):135–40.

115. Bretheau D, Lechevallier E, Eghazarian C, Grisoni V, Coulange C. Prognostic significance of incidental renal cell carcinoma. Eur Urol. 1995;27(4):319–23.

116. Ebru T, Fulya OP, Hakan A, Vuslat YC, Necdet S, Nuray C, at al. Analysis of various potential prognostic markers and survival data in clear cell renal cell carcinoma. Int Braz J Urol. 2017;43(3):440–54.

117. Bui MH, Zisman a, Pantuck a J, Han KR, Wieder J, Belldegrun a S. Prognostic factors and molecular markers for renal cell carcinoma. Expert Rev Anticancer Ther. 2001;1(4):565–75.

118. Jiang T, Wu YP, Chen SH, Ke Z Bin, Liang YC, Xu N. Prognosis and clinicopathological characteristics of renal cell carcinoma: Does bilateral occurrence influence overall and cancer-specific survival? Transl Cancer Res. 2020;9(2):432–40.

119. Aron M, Nguyen MM, Stein RJ, Gill IS. Impact of Gender in Renal Cell Carcinoma: An Analysis of the SEER Database. Eur Urol. 2008;54(1):133–42.

120. Patard JJ, Leray E, Rioux-Leclercq N, Cindolo L, Ficarra V, Zisman A, at al. Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: A multicenter experience. J Clin Oncol. 2005;23(12):2763–71.

121. Khor LY, Dhakal HP, Jia X, Reynolds JP, McKenney JK, Rini BI, at al. Tumor Necrosis Adds Prognostically Significant Information to Grade in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: A Study of 842 Consecutive Cases From a Single Institution. Am J Surg Pathol. 2016 ;40(9):1224-31.

Ocjena rada u tijeku

122. Zisman A, Pantuck AJ, Chao D, Dorey F, Said JW, Gitlitz BJ, at al. Reevaluation of the 1997 TNM classification for renal cell carcinoma: T1 and T2 cutoff point at 4.5 rather than 7 cm. better correlates with clinical outcome. J Urol. 2001;166(1):54-8.

123. Tsui KH, Shvarts O, Smith RB, Figlin RA, Dekernion JB, Belldegrun A. Prognostic indicators for renal cell carcinoma: A multivariate analysis of 643 patients using the revised 1997 TNM staging criteria. J Urol. 2000;163(4):1090–5.

124. Cho HJ, Kim SJ, Ha US, Hong SH, Kim JC, Choi YJ, at al. Prognostic Value of Capsular Invasion for Localized Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. Eur Urol. 2009;56(6):1006–12.

125. Ha US, Lee KW, Jung J, Byun S-S, Kwak C, Chung J, at al. Renal capsular invasion is a prognostic biomarker in localized clear cell renal cell carcinoma. Sci Rep. 2018;8(1):202.

126. Ball MW, Gorin MA, Harris KT, Curtiss KM, Netto GJ, Pavlovich CP, at al. Extent of renal vein invasion influences prognosis in patients with renal cell carcinoma. BJU Int. 2016;118(1):112–7.

127. Jeon HG, Jeong IG, Kwak C, Kim HH, Lee SE, Lee E. Reevaluation of Renal Cell Carcinoma and Perirenal Fat Invasion Only. J Urol. 2009;182(5):2137–43.

128. Süer E, Ergün G, Baltaci S, Bedük Y. Does Renal Capsular Invasion Have Any Prognostic Value in Localized Renal Cell Carcinoma? J Urol. 2008;180(1):68–71.

129. Shah PH, Lyon TD, Lohse CM, Cheville JC, Leibovich BC, Boorjian SA, at al. Prognostic evaluation of perinephric fat, renal sinus fat, and renal vein invasion for patients with pathological stage T3a clear-cell renal cell carcinoma. BJU Int. 2019;123(2):270–6.

130. Volpe A, Patard JJ. Prognostic factors in renal cell carcinoma. World J Urol. 2010;28(3):319–27.

131. Mantovani F, Collavin L, Del Sal G. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. Cell Death Differ. 2019;26(2):199–212.

132. Noon AP, Vlatković N, Polański R, Maguire M, Shawki H, Parsons K, at al. p53 and MDM2 in renal cell carcinoma. Cancer. 2010;116(4):780–90.

133. Duddy PM, Hanby AM, Barnes DM, Camplejohn RS. Improving the detection of p53 mutations in breast cancer by use of the FASAY, a functional assay. J Mol Diagnostics. 2000;2(3):139–44.

Ocjena rada u tijeku

134. Camplejohn RS, Rutherford J. p53 functional assays: detecting p53 mutations in both the germline and in sporadic tumours. Cell Prolif. 2001;34(1):1–14.

135. Girgin C, Tarhan H, Hekimgil M, Sezer A, Gürel G. P53 Mutations and Other Prognostic Factors of Renal Cell Carcinoma. Urol Int. 2001;66(2):78–83.

136. Zhang XH, Takenaka I, Sato C, Sakamoto H. p53 and HER-2 alterations in renal cell carcinoma. Urology. 1997;50(4):636–42.

137. Shvarts O, Seligson D, Lam J, Shi T, Horvath S, Figlin R, Belldegrun A, Pantuck AJ. p53 is an independent predictor of tumor recurrence and progression after nephrectomy in patients with localized renal cell carcinoma. J Urol. 2005;173(3):725-8.

138. Zigeuner R, Ratschek M, Rehak P, Schips L, Langner C. Value of p53 as a prognostic marker in histologic subtypes of renal cell carcinoma: a systematic analysis of primary and metastatic tumor tissue. Urology. 2004;63(4):651–5.

139. Sejima T, Miyagawa I. Expression of bcl-2, p53 oncoprotein, and proliferating cell nuclear antigen in renal cell carcinoma. Eur Urol. 1999;35(3):242–8.

140. Vasavada SP, Novick AC, Williams BRG. p53, bcl-2, and Bax expression in renal cell carcinoma. Urology. 1998;51(6):1057–61.

141. Sinik Z, Alkibay T, Ataoglu Ö, Biri H, Sözen S, Deniz N, at al. Nuclear p53 overexpression in bladder, prostate, and renal carcinomas. Int J Urol. 1997;4(6):546–51.

142. Chemeris G, Rempel A, Bannasch P, Loktinov A, Schwarz M. Elevated content of p53 protein in the absence of p53 gene mutations as a possible prognostic marker for human renal cell tumors. Virchows Arch. 1995;426(6):563–9.

143. Noon AP, Polański R, El-Fert AY, Kalirai H, Shawki H, Campbell F, at al. Combined p53 and MDM2 biomarker analysis shows a unique pattern of expression associated with poor prognosis in patients with renal cell carcinoma undergoing radical nephrectomy. BJU Int. 2012;109(8):1250–7.

144. Jin Y, Zhao X, Song X, Wang R, Fan Z, Wang P, at al. The High Expression of p53 Is Predictive of Poor Survival Rather *TP53* Mutation in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Izadpanah R, urednik. J Oncol. 2023;2023: 3801526.

Ocjena rada u tijeku

145. Gad S, Lefèvre SH, Khoo SK, Giraud S, Vieillefond A, Vasiliu V, at al. Mutations in BHD and *TP53* genes, but not in HNF1β gene, in a large series of sporadic chromophobe renal cell carcinoma. Br J Cancer. 2007;96(2):336–40.

146. Contractor H, Zariwala M, Bugert P, Zeisler J, Kovacs G. Mutation of the p53 tumour suppressor gene occurs preferentially in the chromophobe type of renal cell tumour. J Pathol. 1997;181(2):136–9.

147. Kuczyk MA, Serth J, Bokemeyer C, Jonassen J, Arndt H, Paeslack U, at al. Detection ofp53 gene alteration in renal-cell cancer by micropreparation techniques of tumor specimens. Int J Cancer. 1995;64(6):399–406.

148. Reiter RE, Anglard P, Liu S, Gnarra JR, Linehan WM. Chromosome 17p Deletions and p53 Mutations in Renal Cell Carcinoma 17p Deletions and p53 Mutations in Renal Cell Carcinoma. Cancer Res. 1993; 53(13):3092-7.

149. Suzuki Y, Tamura G, Satodate R, Fujioka T. Infrequent mutation of p53 gene in human renal cell carcinoma detected by polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. Jpn J Cancer Res. 1992;83(3):233-5.

150. Herrero A, Rojas E, Misiewicz-Krzeminska I, Krzeminski P, Gutiérrez N. Molecular Mechanisms of p53 Deregulation in Cancer: An Overview in Multiple Myeloma. Int J Mol Sci. 2012;8(12):683–6.

151. Lasham A, Tsai P, Fitzgerald SJ, Mehta SY, Knowlton NS, Braithwaite AW, at al. Accessing a New Dimension in *TP53* Biology: Multiplex Long Amplicon Digital PCR to Specifically Detect and Quantitate Individual *TP53* Transcripts. Cancers (Basel). 2020. 24;12(3):769.

152. Marabese M, Marchini S, Marrazzo E, Mariani P, Cattaneo D, Fossati R, at al. Expression levels of p53 and p73 isoforms in stage I and stage III ovarian cancer. Eur J Cancer. 2008;44(1):131–41.

153. Marcel V, Vijayakumar V, Fernández-Cuesta L, Hafsi H, Sagne C, Hautefeuille A, at al. p53 regulates the transcription of its Δ133p53 isoform through specific response elements contained within the *TP53* P2 internal promoter. Oncogene. 2010;29(18):2691–700.

Ocjena rada u tijeku

154. Marcel V, Petit I, Murray-Zmijewski F, Goullet De Rugy T, Fernandes K, Meuray V, at al. Diverse p63 and p73 isoforms regulate Δ133p53 expression through modulation of the internal *TP53* promoter activity. Cell Death Differ. 2012;19(5):816–26.

155. Hernández Borrero LJ, El-Deiry WS. Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. Biochim Biophys Acta - Rev Cancer. 2021;1876(1):188556.

156. Ji W, Zhang N, Zhang H, Ma J, Zhong H, Jiao J, i ostali. Expression of p53β and Δ133p53 isoforms in different gastric tissues. Int J Clin Exp Pathol. 2015.;8(9):10468–74.

157. Oh L, Hainaut P, Blanchet S, Ariffin H. Expression of p53 N-terminal isoforms in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and its correlation with clinicopathological profiles. BMC Cancer. 2020;20(1):110.

158. Avery-Kiejda KA, Zhang XD, Adams LJ, Scott RJ, Vojtesek B, Lane DP at al. Small molecular weight variants of p53 are expressed in human melanoma cells and are induced by the DNA-damaging agent cisplatin. Clin Cancer Res. 2008;14(6):1659-68.

159. Steffens Reinhardt L, Zhang X, Groen K, Morten BC, De Iuliis GN, Braithwaite AW,at al. Alterations in the p53 isoform ratio govern breast cancer cell fate in response to DNA damage. Cell Death Dis. 2022.;13(10):907.

160. Hofstetter G, Berger A, Fiegl H, Slade N, Zorić A, Holzer B at al. Alternative splicing of p53 and p73: the novel p53 splice variant p53delta is an independent prognostic marker in ovarian cancer. Oncogene. 2010;29(13):1997-2004.

161. Joruiz SM, Beck JA, Horikawa I, Harris CC. The Δ133p53 isoforms, tuners of the p53 pathway. Cancers (Basel). 2020;12(11): 3422.

162. Wang Z, Peng S, Jiang N, Wang A, Liu S, Xie H at al. Prognostic and clinicopathological value of p53 expression in renal cell carcinoma: a meta-analysis. Oncotarget. 2017;8(60):102361–70.

163. Bourdon JC. p53 isoforms change p53 paradigm. Mol Cell Oncol. 2014;1(4):e969136.

164. Hafsi H, Santos-Silva D, Courtois-Cox S, Hainaut P. Effects of Δ40p53, an isoform of p53 lacking the N-terminus, on transactivation capacity of the tumor suppressor protein p53. BMC Cancer 2013;13:134.

Ocjena rada u tijeku

165. Ota A, Nakao H, Sawada Y, Karnan S, Wahiduzzaman M, Inoue T, at al. Δ40p53α suppresses tumor cell proliferation and induces cellular senescence in hepatocellular carcinoma cells. J Cell Sci. 2017 Feb 1;130(3):614-625.

166. Tu Q, Gong H, Yuan C, Liu G, Huang J, Li Z, at al. Δ133p53/FLp53 Predicts Poor Clinical Outcome in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Cancer Manag Res. 2020; 12:7405–17.

Ocjena rada u tijeku

SAŽETAK

Karcinom bubrega najčešća je solidna novotvorina bubrega, čini oko 90% zloćudnih tumora bubrega. U zadnja dva desetljeća bilježi se kontinuirani porast pojavnosti ove bolesti u zapadnim zemljama, a tijek bolesti je nepredvidiv unatoč aktualno prihvaćenim prognostičkim čimbenicima.

Gen *TP53* ubrajamo u grupu gena za tumorske supresore, kodira više proteinskih izoformi sa sličnim ili različitim funkcijama. Njegov produkt, protein p53 djeluje kao transkripcijski faktor, koji se u obliku tetramera veže na ciljno mjesto u genomu i aktivira ciljne gene. Proteini p53 reguliraju i kontroliraju stanični ciklus, potiču programiranu staničnu smrt - apoptozu, stanično starenje -senescenciju, diferencijaciju te sudjeluju u popravku DNA. Gubitak funkcije gena *TP53* nađen je u gotovo svim tumorima ljudi, a većinom je inaktiviran mutacijom.

U usporedbi s drugim tumorima, u stanicama karcinoma bubrega gen *TP53* rijetko je mutiran, stoga pretpostavljamo da je inaktiviran drugim mehanizmima. Dosadašnja istraživanja pokazala su promijenjenu ekspresiju izoformi gena *TP53* u tumorima ljudi. Međutim, zasad se malo zna o ekspresiji izoformi gena *TP53* u karcinomu bubrega.

U ovom radu analizirali smo ekspresijski profil i mutacijski status gena *TP53* u 40 bolesnika s karcinomom bubrega, te istražili njihovu povezanost s patohistološkim značajkama tumora, kliničkim obilježjima i ukupnim preživljenjem. Za analizu ekspresije gena *TP53* koristili smo metodu kvantitativnog PCR-a, a mutacijski status odredili smo metodom FASAY (engl. *Functional Assay for the Separation of Alleles in Yeast*).

Dvadeset i dva (55%) bolesnika imala su tumore s mutacijom gena *TP53*. Genska ekspresija izoformi p53, Δ40p53 i Δ133p53 bila je značajno viša u tumorima s mutacijom gena *TP53*, ali i dalje se zadržala na razini pripadajućeg zdravog tkiva. U tumorima s divljim tipom gen *TP53* zabilježena je smanjena genska ekspresija izoforme Δ133p53 u odnosu na zdravo tkivo i u odnosu na ekspresiju izoformi p53 i Δ40p53. Jača genska ekspresija izoforme p53 povezana je s češćim zahvaćanjem bubrežne kapsule, dok je jača ekspresija izoforme Δ40p53 povezana s većim tumorima i češćim zahvaćanjem bubrežne kapsule. Bolesnici s divljim tipom gena *TP53* imali su manje petogodišnje ukupno preživljenje u odnosu na nosioce mutiranog gena *TP53*. Stoga zaključujemo da promijenjena ekspresija izoformi gena *TP53* može pridonijeti nastanku karcinoma u tumorima s divljim tipom gena *TP53* te tijek bolesti, unatoč tome što gen *TP53* nije mutiran, može imati lošiji ishod. Potrebna je analiza većeg uzorka bolesnika kako bi se potvrdila važnost profila ekspresije i mutacijskog statusa gena *TP53* kao prognostičkih biljega u karcinomu bubrega.

Ocjena rada u tijeku

SUMMARY

Renal cell cancer is the most common solid neoplasm of the kidney, and accounts for about 90% of malignant renal tumors. Over the last two decades, the incidence of this disease has steadiliy increased in Western countries, and the course of the disease is unpredictable despite currently accepted prognostic factors. The *TP53* gene belongs to the group of tumor suppressor genes and encodes several protein isoforms with similar or diverse functions. The protein p53 is a transcription factor, that is active in the form of a tetramer. It binds to the target site in the genome and activates the transcription of the target genes. p53 proteins regulate and control the cell cycle, initiate programmed cell death - apoptosis, senescence, differentiation and are involved in DNA repair. A loss of function of the *TP53* gene has been detected in more than 90% of human tumors, in half of which *TP53* is inactivated by mutation.

Compared to other tumors, the *TP53* gene is rarely mutated in renal cell cancer, so we can assume that it is inactivated by other mechanisms. Previous studies have shown that the expression of *TP53* isoforms is altered in human tumors. However, little is known about the expression profile of *TP53* in renal cancer.

In this work, we analyzed the gene expression profile and mutation status of *TP53* in 40 renal cancer patients, and the association with clinical features and outcome. We used the qPCR method to analyze the expression profile of *TP53*, while the FASAY (Functional Assay for the Separation of Alleles in Yeast) was used to analyze the mutation status.

Twenty-two patients (55%) had tumors with a mutation of *TP53*. Gene expression of p53, Δ40p53 and Δ133p53 isoforms was significantly higher in tumors with *TP53* mutation, but still at the level of healthy adjacent tissue. Lower gene expression of the Δ133p53 isoform was found in tumors compared to healthy tissue and compared to p53 and Δ40p53 expression only in wild-type *TP53* tumors. Higher gene expression of the p53 isoform is associated with more frequent renal capsule involvement, whereas high expression of the Δ40p53 isoform is associated with larger tumors and more frequent renal capsule involvement. Patients with wild-type *TP53* tumors have a lower five-year overall survival rate compared to patients with mutant *TP53*. Therefore, altered expression of *TP53* isoforms may contribute to the development of cancer in tissues with wild type *TP53*, and patients with wild-type *TP53* tumors may have a worse outcome. To confirm significance of *TP53* gene expression profile and mutation status as prognostic biomarkers in renal cancer, analysis of a larger patient sample is required.

Ocjena rada u tijeku

ŽIVOTOPIS

Marijana Knezović Florijan rođena je 13. rujna 1984. godine u Požegi. Završila je osnovnoškolsko obrazovanje i matematičku gimnaziju s izvrsnim uspjehom. Udala se i majka je jednog djeteta, sina Adama. Godine 2003. započela je studij na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te je diplomirala je 2010. godine s vrlo dobrim uspjehom. Nakon diplome stažirala je u KBC Zagreb, a potom 2012.godine započela specijalističko usavršavanje iz hitne medicine u KBC Sestre milosrdnice u Zagreb. U travnju 2014. godine upisala je doktorski studij Molekularne bioznanosti na Sveučilištu u Osijeku. Godine 2018. položila je specijalistički ispit i postala specijalist hitne medicine. Do kraja 2023. godine radila je u okviru Objedinjenog hitnog prijema u KBC Sestre milosrdnice. Od početka 2023. godine obavlja specijalističko usavršavanje iz psihijatrije u Klinici za psihijatriju Sveti Ivan, Zagreb. Sudjelovala je u izradi pet znanstvenih radova.

Publikacije:

1. Knezović Florijan M, Ozretić P, Bujak M, Pezzè L, Ciribilli Y, Kaštelan Ž, Slade N, Hudolin T. The role of p53 isoforms' expression and p53 mutation status in renal cell cancer prognosis. Urol Oncol. 2019 Sep;37(9):578.e1-578.e10.

2. Knezović M, Pintarić S, Jelavić MM, Kes VB, Nesek V, Bogović S, Cvetković B, Pintarić H. The role of weather conditions and normal level of air pollution in appearance of stroke in the region of Southeast Europe. Acta Neurol Belg.2018;118(2):267-275.

3. Knezović M, Pintarić S, Mornar Jelavić M, Nesek V, Krstačić G, Vrsalović M i sur. Correlation between Concentration of Air Pollutants and Occurrence of Cardiac Arrhythmias in a Region with Humid Continental Climate. Acta clinica Croatica.2017;56.(1.):3-9.

4. Pintarić S, Jelavić MM, Nesek V, Babić Z, Vrsalović M, Knezović M, et al. The influence of air pollutants on appearance of acute myocardial infarction in the region with humid continental climate. Am J Emerg Med. 2016;34(8):1679-82.

5. Pintarić H, Knezović Florijan M, Bridges I, Steiner R, Zaputović L, Miličić D. Management of Hyperlipidemia in Very High and Extreme Risk Patients in Croatia: an observational study of treatment patterns and lipid control. Acta Clin Croat. 2020;59(4):641-649.

Ocjena rada u tijeku