

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Jovana J. Rajić

**Uloga metilacije DNK u procesu  
epitelno-mezenhimske tranzicije  
humanih epitelnih ćelija konjunktive**

Doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Jovana J. Rajić

**The role of DNA methylation in the process of  
epithelial-mesenchymal transition of  
human conjunctival epithelial cells**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

## MENTORI

**dr Nevena Grdović**, viši naučni saradnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”  
- Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,  
Univerzitet u Beogradu

**dr Melita Vidaković**, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”  
- Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,  
Univerzitet u Beogradu

## KOMISIJA

**dr Nevena Grdović**, viši naučni saradnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”  
- Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,  
Univerzitet u Beogradu

**dr Melita Vidaković**, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”  
- Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,  
Univerzitet u Beogradu

**dr Dušanka Savić-Pavićević**, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

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



Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Odeljenju za molekularnu biologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta „Signalni molekuli u dijabetesu: identifikacija potencijalnih bioloških markera uključenih u modifikaciju i integraciju signalnih puteva u cilju predikcije i intervencije u dijabetesu”; potprojekat „Genetska predispozicija za razvoj dijabetesa tip 1 i novi pristupi u prevenciji disfunkcije  $\beta$ -ćelija u dijabetesu: izučavanje puteva prenosa signala posredovanih CXCL12” (OI173020) i Plana i programa rada Instituta za 2020. godinu (451-03-69/2020-14/200007), finansiranih od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

## Izjava zahvalnosti

*Mojoj mentorki, dr Neveni Grdović, neizmerno hvala na nesebičnom deljenju znanja, velikom strpljenju, dostupnosti, podršci, razumevanju, uvažavanju i nepresušnom izvoru motivacije, zbog čega ću se uvek sa zadovoljstvom sećati izrade i pisanja teze. Pre svega hvala na čvrstom poverenju u mene i na tome što sam u svakom trenutku znala i osećala da imam na koga da se oslonim kada mi je to bilo neophodno, a što je doprinelo da se razvijam u pravcu većeg integriteta i samostalnosti. Takođe, hvala i na mogobrojnim iskrenim naučnim i manje naučnim razgovorima tokom svih proteklih godina koji su pomogli da mnogo toga ima više smisla.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Meliti Vidaković na ukazanom poverenju i pruženim prilikama koje su mi omogućile da se usavršavam u profesionalnom smislu. Hvala na konstruktivnim sugestijama tokom izrade i pisanja teze, ali i na širenju optimizma i entuzijazma zbog kojih nijedna ideja ne deluje neostvarivo.*

*Prof. dr Dušanki Savić-Pavićević hvala na konsultacijama i ukazanoj pažnji tokom doktorskih studija, kao i na podsticajnim predavanjima tokom kojih sam prvi put jasnije sagledala bogat svet molekularne biologije.*

*Veliko hvala dr Goranu Poznanoviću, dr Mirjani Mihailović, dr Svetlani Dinić, dr Aleksandri Uskoković i dr Jeleni Arambašić Jovanović na brojnim ohrabrenjima i savetima tokom rada na tezi, a pre svega hvala što ste mi omogućili da se osećam prihvaćeno i kao deo tima. Tatjani Milićević hvala na svojoj pomoći koja je učinila da izrada eksperimenata bude brža i jednostavnija.*

*Anji, Milošu i Mari hvala na razumevanju i smehu gde god da smo se nalazili, iskreno mi je drago što sam vas upoznala i uz vas savladala ovaj izazov. Anja, posebno hvala na spremnosti i otvorenosti za suštinske razgovore na raznolike moguće i nemoguće teme, Miloše posebno hvala što si uvek raspoložen da priskočiš u pomoć i za najmanju sitnicu pa sve deluje lako rešivo, Maro, družo iz klupe, posebno hvala na poverenju i što me uvek inspirišeš da obratim pažnju na bitne detalje.*

*Dr Ilijani Grigorov, dr Desanki Bogojević, dr Svetlani Ivanović-Matić i dr Vesni Martinović hvala na lepoj saradnji u laboratoriji. Anji, Sofiji, Jeleni i Anđeliji hvala na razumevanju, druženju i prijateljskoj atmosferi u labu što je značajno ulepšalo i olakšalo eksperimentalni rad.*

*Kolegama iz Centra za okularnu inflamaciju i infekciju Medicinskog univerziteta u Beču hvala na pripremi uzoraka ćelija inficiranih bakterijom *Chlamydia trachomatis*.*

*Miri, Svetlani, Jovani, Ani, Katarini i Sofiji hvala na dugogodišnjem prijateljstvu i što znam da uvek mogu da računam na vas. Ivanu posebno hvala na primeni principa mere i pravoga trenutka, kao i na podršci i davanju prostora na svim nivoima bez kojih bi ova teza teško zadobila svoj konačni oblik.*

*Na kraju, i na početku, beskrajnu zahvalnost dugujem svojoj porodici, posebno sestri i roditeljima, jer uvek veruju u mene više nego što sam ja sama za to sposobna. Hvala!*

# Uloga metilacije DNK u procesu epitelno-mezenhimske tranzicije humanih epitelnih ćelija konjunktive

## Sažetak

Proces epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT) može predstavljati značajan faktor koji doprinosi nastanku fibroznih promena konjunktive u različitim bolestima oka, ali je njegova uloga nedovoljno ispitana. Cilj ove doktorske disertacije podrazumevao je ispitivanje sposobnosti ćelijske linije humanih epitelnih ćelija konjunktive (HCjE) da uđu u proces EMT nakon infekcije uzročnikom trahoma, bakterijom *Chlamydia trachomatis*, i identifikaciju ključnih faktora povezanih sa pokretanjem i progresijom tranzicije na modelu procesa EMT indukovanog TGF- $\beta$  proteinima. Posebna pažnja bila je usmerena na rasvetljavanje uloge metilacije DNK u regulaciji ekspresije gena uključenih u tranziciju HCjE ćelija. Praćenjem aktivacije signalnih puteva povezanih sa pokretanjem procesa EMT i ekspresije markera epitelnih/mezenhimskih ćelija pokazano je da HCjE ćelije poseduju sposobnost tranzicije nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis*, praćene promenama u metilacionim profilima gena markera epitelnog/mezenhimskog fenotipa. Praćenjem morfologije, sposobnosti migracije i nivoa ekspresije gena markera uočeno je da dugotrajan tretman TGF- $\beta$ 1 izoformom ima najveći potencijal za pokretanje procesa EMT u HCjE ćelijama, dok su tretmani DNK demetilujućim agensom pokazali da metilacija DNK predstavlja važan mehanizam koji leži u osnovi ovog procesa. Promene profila metilacije DNK, detektovane analizom kriva topljenja i bisulfitnim sekvenciranjem, istakle su ključnu ulogu članova familije miR-200 u pokretanju i reverziji procesa EMT u HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1 proteinima. Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju na mogućnost razvijanja novih selektivnih terapijskih strategija u lečenju fibroznih promena konjunktive, zasnovanim na reverzibilnosti procesa EMT i epigenetičkih mehanizama.

**Ključne reči:** Epitelno-mezenhimska tranzicija (EMT), fibroza konjunktive, humane epitelne ćelije konjunktive (HCjE), *Chlamydia trachomatis*, TGF- $\beta$ , Metilacija DNK, 5-Azacidin (5-AzaC), E-kadherin (*CDH1*), miRNK, familija miR-200

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Molekularna biologija

# The role of DNA methylation in the process of epithelial-mesenchymal transition of human conjunctival epithelial cells

## Abstract

The process of epithelial-mesenchymal transition (EMT) could be an important factor in development of fibrosis-related conjunctival eye diseases, but its precise role in these conditions has not been defined yet. The aim of this doctoral dissertation was to examine the ability of human epithelial conjunctival cell line (HCjE) to enter EMT process after infection with trachoma causative agent, bacteria *Chlamydia trachomatis*, i to identify key factors associated with the initiation i progression of transition in TGF- $\beta$ -induced EMT model. Special focus was directed to elucidating the role of DNA methylation in the regulation of expression of genes involved in the transition of HCjE cells. Activation of signaling pathways associated with the initiation of the EMT process i the expression level of epithelial/mesenchymal markers revealed that HCjE cells possess the ability to enter the transition after infection with bacteria *C. trachomatis*, which was associated with changes in the methylation profiles of epithelial/mesenchymal gene markers. Cell morphology, migration ability i expression level of marker genes indicated that long-term treatment with TGF- $\beta$ 1 isoform has the greatest potential to initiate EMT process in HCjE cells, while treatments with DNA demethylating agent suggested that DNA methylation is an important mechanism which underlies this process. Changes in DNA methylation profile, detected by melting curve analysis i bisulfite sequencing, highlighted a key role of miR-200 family members in initiating i reversing TGF- $\beta$ 1-induced EMT process in HCjE cells. The results obtained in this doctoral dissertation indicate the possibility of developing new selective therapeutic strategies in the treatment of fibrosis-related conjunctival diseases, based on the reversibility of both EMT process i epigenetic mechanisms.

**Key words:** Epithelial-mesenchymal transition (EMT), conjunctival fibrosis, human epithelial conjunctival cells (HCjE), *Chlamydia trachomatis*, TGF- $\beta$ , DNA methylation, 5-Azacytidine (5-AzaC), E-cadherin (CDH1), miRNA, miR-200 family

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Molecular biology

## Lista skraćenica:

3' UTR	3' netranslatirajući region, engl. <i>3' untranslated region</i>
5' UTR	5' netranslatirajući region, engl. <i>5' untranslated region</i>
5-AzaC	5-azacitidin; tretman HCjE ćelija 5-azacitidinom bez perioda oporavka
5-AzaC R	tretman HCjE ćelija 5-AzaC sa periodom oporavka (engl. <i>recovery</i> )
5-aza-dC	5-aza-2'-deoksicitidin
5caC	5-karboksilcitozin
5fC	5-formilcitozin
5hmC	5-hidroksimetilcitozin
5mC	5-metilcitozin
ACTA2	engl. <i>α 2-actin, smooth muscle</i>
ACTB	engl. <i>β-actin</i>
AGO	Argonaut proteini
AKC	atopijski keratokonjuktivitis, engl. <i>atopic keratoconjunctivitis</i>
AKT	engl. <i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i>
APS	amonijum-persulfat
BER	bazna eksciziona reparacija, engl. <i>base excision repair</i>
Bis-Seq	bisulfitno sekvenciranje, engl. <i>bisulfite sequencing</i>
BMP	koštani morfogenički protein, engl. <i>bone morphogenetic proteins</i>
BSA	albumin seruma govečeta, engl. <i>bovine serum albumin</i>
C	citozin
<i>C. trachomatis</i> , Ct	<i>Chlamydia trachomatis</i>
CALT	limfoidno tkivo povezano sa konjuktivom, engl. <i>conjunctival associated lymphoid tissue</i>
CCL18	hemokinski ligand 18 sa C-C motivom, engl. <i>C-C motif chemokine ligand 18</i>
CDC42	engl. <i>cell division cycle 42</i>
CDH1	kadherin 1, E-kadherin, engl. <i>cadherin 1</i>
CDH2	kadherin 2, N-kadherin, engl. <i>cadherin 2</i>
CDK	ciklin zavisne kinaze, engl. <i>cyclin-dependent kinase</i>
cGVHD	hronična bolest kalem protiv domaćina, engl. <i>chronic graft versus host disease</i>
CO	zamućenje rožnjače, engl. <i>corneal opacity</i>
CpG	citozin-fosfodiestarska veza-guanin
C <sub>t</sub>	engl. <i>cycle threshold</i>
CtBP	engl. <i>C-terminal binding protein</i>
CTGF	faktor rasta vezivnog tkiva, engl. <i>connective tissue growth factor</i>
CXCL1	hemokinski ligand 1 sa C-X-C motivom, engl. <i>C-X-C motif chemokine ligand 1</i>
CXCL5	hemokinski ligand 5 sa C-X-C motivom, engl. <i>C-X-C motif chemokine ligand 5</i>
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DGCR8	engl. <i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>
DMEM	modifikovan Dubelko medijum, engl. <i>Dubelco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	dimetil sulfoksid
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DNKaza	dezoksiribonukleaza
DNMT	DNK metiltransferaza, engl. <i>DNA methyltransferase</i>



DSP	dezmoplakin, engl. <i>desmoplakin</i>
EB	elementarno telo, engl. <i>elementary body</i>
ECM	vanćelijski matriks, engl. <i>extracellular matrix</i>
ED-A FN	varijanta fibronektina koja sadrži ekstra domen A
ED-B FN	varijanta fibronektina koja sadrži ekstra domen B
EDTA	etilen-diamino-tetrasirćetna kiselina, engl. <i>ethylene-diamine-tetraacetic acid</i>
EGF	epidermalni faktor rasta, engl. <i>epidermal growth factor</i>
eIF-4A1/2	eukariotski faktor inicijacije 4A1/2, engl. <i>eukaryotic initiation factor 4A1/2</i>
EMT	epitelno-mezenhimska tranzicija, engl. <i>epithelial-mesenchymal transition</i>
ERK1/2	kinaze regulisane vanćelijskim signalima 1/2, engl. <i>extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
FAK	tirozinska kinaza fokalnih adhezija, engl. <i>focal adhesion kinase</i>
FBS	fetalni goveđi serum, engl. <i>fetal bovine serum</i>
FC	relativni nivo promene, engl. <i>fold-change</i>
FCM	protočna citometrija, engl. <i>flow cytometry</i>
FGF2	faktor rasta fibroblasta-2, engl. <i>fibroblast growth factor 2</i>
FN1	fibronektin 1, engl. <i>fibronectin 1</i>
GAPDH	engl. <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GM-CSF	faktor stimulacije kolonija granulocita i makrofaga, engl. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GRB2	engl. <i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSK3β	kinaza glikogen sintaze 3β, engl. <i>glycogen synthase kinase 3β</i>
GTPaza	hidrolaza guanozin trifosfata
H3K27me3	trimetilacija histona 3 na poziciji lizina 27
H3K4me3	trimetilacija histona 3 na poziciji lizina 4
H3K9me2/3	di-/trimetilacija histona 3 na poziciji lizina 9
H4K20me3	trimetilacija histona 4 na poziciji lizina 20
HAT	histonska acetiltransferaza, engl. <i>histone acetyltransferase</i>
HCjE	ćelijska linija humanih epitelnih ćelija konjunktive
HDAC	histonska deacetilaza, engl. <i>histone deacetylase</i>
HDM	histonska demetilaza, engl. <i>histone demethylase</i>
HGF	faktor rasta hepatocita, engl. <i>hepatocyte growth factor</i>
HMT	histonska metiltransferaza, engl. <i>histone methyltransferase</i>
hnRNPE1	engl. <i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1</i>
HPRT1	engl. <i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
HRM	analiza krive topljenja visoke rezolucije, engl. <i>high-resolution melting analysis</i>
HRP	peroksidaza rena, engl. <i>horseradish peroxidase</i>
hTERT	humana telomeraza, engl. <i>telomerase reverse transcriptase</i>
IB	inkluziono telo, engl. <i>inclusion body</i>
IBA	imunoblot analiza, engl. <i>immunoblot analysis</i>
IC	inhibitorna koncentracija, engl. <i>inhibitory concentration</i>
ICC	imunocitohemija, engl. <i>immunocytochemistry</i>
IFN-γ	interferon-γ
IFU	infektivna jedinica, engl. <i>infectious unit</i>
Ig	imunoglobulin
IGF1	insulinu sličan faktor rasta 1, engl. <i>insulin-like growth factor 1</i>
IL	interleukin

IOP	intraokularni pritisak
iRNK	informaciona RNK
JNK	engl. <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
K-SFM	medijum za keratinocyte bez seruma, engl. <i>Keratinocyte Serum-Free Medium</i>
LAP	peptid latencije TGF- $\beta$ proteina, engl. <i>latency-associated peptide</i>
LC	lamina kribroza, lat. <i>lamina cribrosa</i>
LEF1	engl. <i>lymphoid enhancer-binding factor 1</i>
LNA	engl. <i>locked nucleic acid</i>
LTBP	latentni TGF- $\beta$ vezujući protein, engl. <i>latent TGF-<math>\beta</math>-binding protein</i>
M	prajmeri komplementarni kompletno metilovanoj DNK, engl. <i>methylated</i>
MAPK	mitogenom aktivirana protein kinaza, engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MBP	engl. <i>methyl-CpG-binding protein</i>
MeCP2	engl. <i>methyl CpG binding protein 2</i>
MEK	kinaza mitogenom aktivirane protein kinaze/kinaze regulisane vanćelijskim signalima
MET	mezenhimsko-epitelna tranzicija, engl. <i>mesenchymal-epithelial transition</i>
miRNK, miR	mikro RNK
MMP	matriksna metaloproteinaza, engl. <i>matrix metalloproteinase</i>
MOI	multiplicitet infekcije, engl. <i>multiplicity of infection</i>
MOMP	glavni protein spoljašnje membrane, engl. <i>major outer membrane protein</i>
MRE	engl. <i>miRNA response element</i>
MSP	metilaciono-specifična PCR analiza, engl. <i>methylation-specific PCR analysis</i>
mTORC	kompleks ciljnih receptora za rapamicin kod sisara, engl. <i>mammalian target of rapamycin complex</i>
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolijum bromid
nAMD	neovaskularna degeneracija makule povezana sa starenjem, engl. <i>neovascular age-related macular degeneration</i>
OCLN	okludin, engl. <i>occludin</i>
OCP	očni cikatricijalni pemfigoid, engl. <i>ocular cicatricial pemphigoid</i>
OmpA/B/C	protein spoljašnjeg membranskog kompleksa A/B/C, engl. <i>outer membrane protein A/B/C</i>
PARP-1	engl. <i>poly(ADP-ribose) polymerase-1</i>
PBS	engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
PDGF	faktor rasta poreklom iz trombocita, engl. <i>platelet-derived growth factor</i>
PDR	proliferativna dijabetična retinopatija, engl. <i>proliferative diabetic retinopathy</i>
PHD	engl. <i>plant homeodomain</i>
PI3K	fosfatidilinozitol-3 kinaza
PMN	polimorfonuklearni leukociti
PTM	post-translaciona modifikacija
PVDF	polivinilidendifluorid
PVR	proliferativna vitreoretinopatija, engl. <i>proliferative vitreoretinopathy</i>
RAC1	engl. <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RAF	proto-onkogeno serin/treoninska RAF kinaza, engl. <i>proto-oncogene RAF kinase</i>
RAS	GTPaza Ras, engl. <i>GTPase Ras</i>
RB	retikularno telo, engl. <i>reticulate body</i>
RHOA	engl. <i>Ras homolog family member A</i>

RIPA pufer	engl. <i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RISC	engl. <i>RNA-induced silencing complex</i>
RNaza	ribonukleaza
RNK	ribonukleinska kiselina
RPE	pigmentni epitel mrežnjače, engl. <i>retinal pigment epithelium</i>
R-SMAD	SMAD protein aktiviran receptorom, engl. <i>receptor-activated SMAD</i>
RTK	receptor sa tirozin kinaznom aktivnošću
RT-qPCR	kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu, engl. <i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>
S100A7	psorijazin, engl. <i>psoriasin, S100 calcium binding protein A7</i>
SAFE	akronim od engl. <i>surgery-S, antibiotic-A, facial cleanliness-F, environmental improvement-E</i>
SAM	S-adenozil-L-metionin
SBE	Smad vezujući element, engl. <i>Smad binding element</i>
SD	standardna devijacija, engl. <i>standard deviation</i>
SDS-PAGE	engl. <i>sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	standardna greška srednje vrednosti, engl. <i>standard error of the mean</i>
SIP1	Smad interagujući protein 1, engl. <i>Smad-interacting protein 1</i>
SMAD	engl. <i>small mothers against decapentaplegic</i>
SNAI1/2/3	engl. <i>snail family transcriptional repressor 1/2/3</i>
SOS	engl. <i>son of sevenless</i>
SRC	proto-onkogeni Src tirozinska kinaza, engl. <i>proto-oncogene Src kinase</i>
SZO	Svetska zdravstvena organizacija
TAK1	kinaza aktivirana TGF- $\beta$ proteinima 1, engl. <i>TGF-<math>\beta</math> activated kinase 1</i>
TCF	engl. <i>T cell factor</i>
TEMED	tetrametiletildiamin
TET	engl. <i>ten-eleven translocator</i>
TF	trahomska folikularna inflamacija, engl. <i>trachomatous inflammation follicular</i>
TGF- $\beta$	transformišući faktor rasta- $\beta$ 1, engl. <i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TI	trahomska intenzivna inflamacija, engl. <i>trachomatous inflammation intense</i>
TIMM1	tkivni inhibitor matriksne metaloproteinaze 1, engl. <i>tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1</i>
TLR	receptor sličan Tolu, engl. <i>Toll-like receptor</i>
TM	trabekularna mreža, engl. <i>trabecular meshwork</i>
TNF- $\alpha$	faktor nekroze tumora- $\alpha$ , engl. <i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
TS	trahomsko ožiljavanje, engl. <i>trachomatous scarring</i>
TSS	mesto početka transkripcije, engl. <i>transcription start site</i>
TT	trahomska trihijaza, engl. <i>trachomatous trichiasis</i>
TWIST1/2	engl. <i>twist family BHLH transcription factor 1/2</i>
T $\beta$ R-I	TGF- $\beta$ receptor tipa I
T $\beta$ R-II	TGF- $\beta$ receptor tipa II
U	prajmeri komplementarni kompletno nemetilovanoj DNK, engl. <i>unmethylated</i>
VEGF	faktor rasta vaskularnog endotela, engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>
VIM	vimentin
VKC	vernalni keratokonjuktivitis, engl. <i>vernal keratoconjunctivitis</i>
WNT	engl. <i>wingless-related integration site</i>

ZEB1/2  
 $\alpha$ -SMA

engl. *zinc finger E-box binding homeobox 1/2*  
 $\alpha$ -aktin glatkih mišića, engl.  *$\alpha$ -smooth muscle actin*

# Sadržaj

1. UVOD.....	1
<b>1.1. Fibroza i bolesti oka.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Opšti mehanizmi nastanka fibroznih promena.....</b>	<b>1</b>
1.1.1.1.  Inflamatorna faza zarastanja rana.....	2
1.1.1.2.  Proliferativna ili migratorna faza zarastanja rana.....	2
1.1.1.3.  Faza sazrevanja ili remodelovanja rane.....	3
<b>1.1.2.  Fibrozne bolesti oka.....</b>	<b>4</b>
1.1.2.1.  Fibrozne promene konjunktive.....	4
1.1.2.1.1.  Građa konjunktive.....	4
1.1.2.1.2.  Funkcija konjunktive.....	5
1.1.2.1.3.  Bolesti povezane sa fibroznim promenama konjunktive.....	6
<b>1.2.  Trahom.....</b>	<b>8</b>
1.2.1.  Epidemiologija trahoma.....	8
1.2.2.  Tretman trahoma.....	8
1.2.3.  Kliničke manifestacije trahoma.....	9
1.2.4.  Patogeneza trahoma.....	9
1.2.5.  Imunopatologija trahoma.....	10
<b>1.3.  Proces epitelno-mezenhimske tranzicije.....</b>	<b>13</b>
1.3.1.  Opšte odlike procesa EMT.....	13
1.3.2.  Klasifikacija procesa EMT.....	14
1.3.3.  Biomarkeri procesa EMT.....	15
1.3.4.  Signalni putevi uključeni u pokretanje i regulaciju procesa EMT.....	18
1.3.4.1.  Signalni putevi pokrenuti TGF- $\beta$ proteinima.....	18
1.3.4.1.1.  TGF- $\beta$ kanonski signalni put.....	19
1.3.4.1.2.  TGF- $\beta$ nekanonski signalni putevi.....	20
1.3.4.2.  Ostali signalni putevi uključeni u pokretanje i regulaciju procesa EMT.....	20
<b>1.4.  Regulacija procesa EMT.....</b>	<b>21</b>
1.4.1.  Transkripcioni faktori uključeni u regulaciju procesa EMT.....	21
1.4.2.  Epigenetička regulacija procesa EMT.....	24
1.4.2.1.  Histonske modifikacije uključene u regulaciju procesa EMT.....	25
1.4.2.2.  Metilacija DNK uključena u regulaciju procesa EMT.....	26
1.4.2.3.  miRNK u regulaciji procesa EMT.....	28
2.  CILJEVI.....	32
3.  MATERIJAL I METODE.....	34
<b>3.1.  Ćelijska kultura.....</b>	<b>34</b>
3.1.1.  Infekcija HCjE ćelija bakterijom <i>C. trachomatis</i> .....	34
3.1.2.  Tretmani HCjE ćelija.....	35

3.1.3.	Test vijabilnosti ćelija (MTT esej) .....	35
3.1.4.	Test zarastanja povrede.....	35
3.2.	<b>Metode za manipulaciju nukleinskim kiselinama .....</b>	<b>36</b>
3.2.1.	Izolacija genomske DNK i ukupne RNK.....	36
3.2.2.	Izolacija miRNK.....	36
3.2.3.	Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (RT-qPCR)...	37
3.2.4.	Paneli bazirani na metodi kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu.....	38
3.2.4.1.	Humani panel za ispitivanje ekspresije gena povezanih sa procesom EMT .....	38
3.2.4.2.	Humani panel za ispitivanje ekspresije miRNK uključenih u proces EMT.....	39
3.2.5.	<b>Metode za analizu metilacije DNK bazirane na tehnici lančane reakcije polimeraze .....</b>	<b>40</b>
3.2.5.1.	<i>In vitro</i> metilacija DNK .....	40
3.2.5.2.	Bisulfitna konverzija DNK .....	40
3.2.5.3.	Dizajniranje prajmera specifičnih za bisulfitno konvertovanu DNK .....	41
3.2.5.4.	Metilaciono-specifična PCR analiza (MSP).....	41
3.2.5.5.	Analiza kriva topljenja visoke rezolucije (HRM).....	42
3.2.5.6.	Bisulfitno sekvenciranje (Bis-Seq) .....	43
3.3.	<b>Metode za manipulaciju proteinima .....</b>	<b>43</b>
3.3.1.	Priprema ukupnih ćelijskih lizata.....	43
3.3.2.	Određivanje koncentracije proteina .....	44
3.3.3.	Imunoblot analiza proteina (IBA) .....	44
3.3.4.	Imunocitohemija (ICC).....	46
3.3.5.	Protočna citometrija (FCM).....	47
3.4.	<b>Bioinformatička predikcija vezivnih mesta za regulatorne proteine u promotorima gena .....</b>	<b>47</b>
3.5.	<b>Statistička obrada podataka.....</b>	<b>47</b>
4.	<b>REZULTATI.....</b>	<b>49</b>
4.1.	<b>Potencijal infekcije HCjE ćelija bakterijom <i>C. trachomatis</i> za pokretanje procesa EMT .....</b>	<b>49</b>
4.1.1.	<b>Određivanje vijabilnosti HCjE ćelija nakon infekcije bakterijom <i>C. trachomatis</i>.....</b>	<b>49</b>
4.1.2.	<b>Određivanje adekvatnog referentnog gena za RT-qPCR analizu .....</b>	<b>50</b>
4.1.3.	<b>Pokretanje signalnih puteva uključenih u proces EMT u odgovoru na infekciju HCjE ćelija bakterijom <i>C. trachomatis</i> .....</b>	<b>50</b>
4.1.4.	<b>Markeri procesa EMT u HCjE ćelijama inficiranim bakterijom <i>C. trachomatis</i> 53</b>	
4.1.4.1.	Profil ekspresije markera procesa EMT nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom <i>C. trachomatis</i> .....	53
4.1.4.1.1.	<i>Profil ekspresije markera epitelnih ćelija E-kadherina nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom C. trachomatis</i> .....	53
4.1.4.1.2.	<i>Profili ekspresije markera mezenhimskih ćelija fibronektina i <math>\alpha</math>-SMA nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom C. trachomatis</i> .....	54

4.1.4.2.	Metilacioni status gena markera procesa EMT nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom <i>C. trachomatis</i> .....	55
4.1.4.2.1.	Metilacioni status markera epitelnih ćelija <i>CDH1</i> nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom <i>C. trachomatis</i> .....	56
4.1.4.2.2.	Metilacioni status markera mezenhimskih ćelija <i>FN1</i> i <i>ACTA2</i> nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom <i>C. trachomatis</i> .....	58
<b>4.2.</b>	<b>Karakterizacija procesa EMT i identifikacija ključnih molekula odgovornih za pokretanje tranzicije HCjE ćelija .....</b>	<b>62</b>
4.2.1.	Sposobnost različitih izoformi TGF- $\beta$ proteina za pokretanje procesa EMT u HCjE ćelijama.....	62
4.2.2.	Potencijal DNK demetilujućeg agensa 5-AzaC za zaustavljanje i/ili reverziju procesa EMT u HCjE ćelijama.....	69
4.2.3.	Promene metilacionih obrazaca u promotoru <i>CDH1</i> tokom procesa EMT i nakon tretmana 5-AzaC.....	73
4.2.4.	Diferencijalna ekspresija gena uključenih u proces EMT nakon tretmana HCjE ćelija 5-AzaC.....	75
<b>4.3.</b>	<b>Uloga miRNA u procesu EMT u HCjE ćelijama.....</b>	<b>78</b>
4.3.1.	Uticaj procesa EMT i tretmana 5-AzaC na profil ekspresije miRNA u HCjE ćelijama.....	78
4.3.2.	Promene u metilacionom statusu miR-200 klastera tokom procesa EMT i nakon 5-AzaC tretmana sa periodom oporavka .....	80
<b>5.</b>	<b>DISKUSIJA .....</b>	<b>85</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI .....</b>	<b>103</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>105</b>

---

# 1. UVOD

---

## 1.1. Fibroza i bolesti oka

Fibroza se definiše kao prekomerno taloženje komponenti vezivnog tkiva koje narušava normalnu arhitekturu tkiva i dovodi do progresivnog gubitka funkcije organa (Distler i sar., 2019). Bez obzira na etiologiju koja leži u osnovi povrede, fibroza se uobičajeno razvija prilikom odgovora tkiva na ponovljeno ili hronično oštećenje tokom koga dolazi do narušavanja regulacije normalnih fizioloških procesa neophodnih za zalečenje tkiva. Fibrozne promene mogu nastati u gotovo bilo kom solidnom organu uključujući pluća, bubrege, jetru, kožu i oko, i predstavljaju sve veći uzrok morbiditeta i mortaliteta širom sveta. S' obzirom da fibroza predstavlja značajan deo patologije širokog spektra hroničnih bolesti kao što su astma, hronična opstruktivna bolest pluća, ateroskleroza, srčani zastoj, sistemska skleroza i zapaljenska bolest creva, ne iznenađuje procena da su kod 45% od ukupnog broja smrtnih slučajeva u Sjedinjenim Američkim Državama prisutni fibrozni poremećaji (Wynn, 2004).

Narušavanje homeostaze oka fizičkom traumom, infekcijom, ishemijom ili autoimunskim, alergijskim i degenerativnim oboljenjima često dovodi do fibroznih promena u različitim delovima oka, čime funkcija vida postaje ugrožena (Friedlander, 2007). Epidemiološki podaci ukazuju da okularna fibroza dovodi do značajnog oštećenja vida i slepila miliona ljudi širom sveta. Opsežna meta-analiza urađena 2017. godine sumirala je 288 studija iz 98 zemalja i pokazala da, osim nekorigovanih refraktivnih greški, fibrozne bolesti oka preovlađuju kao globalni uzrok slepila i pogoršanja vida u svetskoj populaciji. Tako su 2015. godine katarakta (52,6 miliona), makularna degeneracija povezana sa starenjem (8,4 miliona), glaukom (4,0 miliona) i dijabetična retinopatija (2,6 miliona) bile dominantne bolesti prisutne u globalnoj populaciji sa umerenim do ozbiljnim oštećenjem vida, dok su katarakta (12,6 miliona) i glaukom (2,9 miliona) prepoznate kao bolesti koje su se pokazale kao vodeći uzrok slepila. Pretežno zbog rasta populacije i produženja životnog veka, procenjeno je da će do 2020. godine broj osoba oslepelih zbog katarakte porasti na 13,4 miliona, a zbog glaukoma na 3,2 miliona (Flaxman i sar., 2017). Odlika fibroze je da se razvija tokom mnogo godina i u trenutku njene detekcije kod pacijenata, zbog retkih biomarkera koji bi ukazali na rane fibrozne promene, funkcija organa, uključujući i oko je već značajno oštećena. Takođe, fibroza najčešće predstavlja ireverzibilan proces i u kasnim fazama bolesti u fibroznom tkivu preostaje malo ćelija na koje bi se terapija zapravo usmerila (Nanchahal i Hinz, 2016). Zbog svega navedenog, terapijske strategije za lečenje fibroze još uvek ne daju zadovoljavajuće rezultate.

### 1.1.1. Opšti mehanizmi nastanka fibroznih promena

Fiziološki procesi koji za cilj imaju ponovno uspostavljanje integriteta, strukture i funkcije organa nakon povrede i patofiziološki mehanizmi aktivirani u fibroznim bolestima imaju mnogo toga zajedničkog, pa se zbog toga nastanak fibroze može objasniti i kao preteran i produžen (abnormalan) odgovor tkiva na zarastanje rane (Distler i sar., 2019). Zarastanje rana predstavlja složen, dinamičan proces koji može biti podeljen u tri vremenski i prostorno preklapajuće faze: inflamatornu, proliferativnu ili migratornu i fazu sazrevanja ili remodelovanja (Cañedo-Dorantes i Cañedo-Ayala, 2019).



#### 1.1.1.1. Inflamatorna faza zarastanja rana

Reparacija tkiva u svim organima započinje inflamacijom koja predstavlja definisan biološki odgovor na povredu (Enoch i Leaper, 2008; Distler i sar., 2019). Najbrojnije ćelije u ranoj fazi inflamacije predstavljaju neutrofili (Kim i sar., 2008) koji fagocitozom uklanjaju invazivne mikroorganizme i ćelijske ostatke na mestu povrede (Guo i DiPietro, 2010), dok sa druge strane, preko produkcije različitih citokina, hemokina i faktora angiogeneze, učestvuju u modulisanju urođenog i adaptivnog imunskog odgovora (Mantovani i sar., 2011). Osim toga, neutrofili promovišu ekstravazaciju inflamatornih monocita u tkivo koji sazrevaju u makrofage i postaju dominantna populacija ćelija u kasnim fazama inflamacije (Soehnlein i Lindbom, 2010). Zreli makrofagi nakon aktivacije zadobijaju proinflamatorni M1 fenotip i sintetišu proinflamatorne citokine kao što su faktor nekroze tumora- $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor- $\alpha$*  - TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-12, IL-18 i IL-23, kao i proteaze i reaktivne kiseonične i azotne vrste neophodne za eliminaciju patogenih mikroorganizama u fagozomima (Sindrilaru i sar., 2011; Weiss i Schaible, 2015). Nakon fagocitoze i eferocitoze nepotrebnih neutrofila (Soehnlein i Lindbom, 2010; Bratton i Henson, 2011) makrofagi prelaze u antiinflamatorni M2 fenotip (Lech i Anders, 2013; Distler i sar., 2019). Makrofagi sa ovim fenotipom dovode do rezolucije inflamacije preko sinteze medijatora kao što je IL-10, dok putem produkcije faktora rasta kao što je transformišući faktor rasta- $\beta$ 1 (engl. *transforming growth factor- $\beta$*  - TGF- $\beta$ 1) obezbeđuju osnovu za formiranje novog tkiva čime promovišu tranziciju ka sledećim fazama zarastanja (Enoch i Leaper, 2008; Sindrilaru i Scharffetter-Kochanek, 2013).

#### 1.1.1.2. Proliferativna ili migratorna faza zarastanja rana

Proliferativna faza zarastanja rane započinje 3 dana nakon povrede tkiva i traje 2 do 4 nedelje (Enoch i Leaper, 2008). Proliferativnu fazu karakterišu dva glavna procesa: (i) **angiogeneza** koja uključuje proliferaciju endotelnih ćelija i formiranje novih krvnih sudova i (ii) **fibroplazija** koja uključuje proliferaciju fibroblasta, njihovu diferencijaciju u miofibroblaste, depoziciju vanćelijskog matriksa (engl. *extracellular matrix* - ECM) i kontrakciju rane (Cañedo-Dorantes i Cañedo-Ayala, 2019). Sa napredovanjem ove faze dolazi do zamene provizornog fibrinskog matriksa novoformiranim hipercelularnim granulacionim tkivom i na kraju do reepitelizacije (Enoch i Leaper, 2008).

Prva fenotipska promena fibroblasta se dešava u odgovoru na promene u sastavu, organizaciji i mehaničkim svojstvima ECM (Hinz i Gabbiani, 2003), kao i u odgovoru na lokalno produkovane citokine kao što su IL-1, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, faktor rasta poreklom iz trombocita (engl. *platelet-derived growth factor* - PDGF), epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor* - EGF) i faktor rasta fibroblasta 2 (engl. *fibroblast growth factor 2* - FGF2) oslobođene od strane inflamatornih i rezidentnih ćelija (Werner i Grose, 2003). Ovi citokini i faktori rasta aktiviraju proliferaciju fibroblasta i modulišu produkciju enzima matriksnih metaloproteinaza (engl. *matrix metalloproteinases* - MMPs) i tkivnih inhibitora matriksnih metaloproteinaza (engl. *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases* - TIMMs), čime dolazi do degradacije ECM i otvaranja puta za migraciju fibroblasta kroz fibrinski matriks (Seibold i sar., 2012). Na početku, da bi došlo do repopulacije povređenog tkiva, fibroblasti zadobijaju migratorni fenotip tako što *de novo* razvijaju kontraktilne snopove vlakana (stres vlakna) (Hinz i sar., 2001b; Darby i Hewitson, 2007) koja formiraju specijalizovane veze između ćelije i ECM nazvane fokalne adhezije (Hinz i sar., 2007). Za ovakav tip ćelija je predložen naziv proto-miofibroblasti da bi se takvi fibroblasti razlikovali od neaktivnih fibroblasta koji u većini intaktnih tkiva ne poseduju nikakvu vrstu kontraktilnog aparata (Tomasek i sar., 2002). Sa napredovanjem proliferativne faze dolazi do dalje diferencijacije

proto-miofibroblasta u miofibroblaste koji počinju da eksprimiraju  $\alpha$ -aktin glatkih mišića (engl.  *$\alpha$ -smooth muscle actin* -  $\alpha$ -SMA), najšire korišćen marker miofibroblasta (Tomasek i sar., 2002; Hinz, 2007). Ekspresija  $\alpha$ -SMA je precizno kontrolisana TGF- $\beta$  proteinima i njihovom udruženom aktivnošću sa specijalizovanim proteinima ECM kao što je varijanta ED-A fibronektina i mehaničkim mikrokruženjem (Tomasek i sar., 2002). Inkorporacija  $\alpha$ -SMA u stres vlakna značajno pojačava kontraktilnu aktivnost miofibroblasta (Hinz i sar., 2001a). Kontrakcija stres vlakana lokalno kondenzuje ECM ostavljajući slobodan prostor koji se popunjava novosintetisanim kolagenom. Ovaj proces se ponavlja od strane drugih lokalnih miofibroblasta i remodelovanje malih delova ECM dovodi do kontrakcije povređenog mesta (Tomasek i sar., 2002; Darby i sar., 2014). Velika mehanička sila proizvedena kontrakcijom dovodi i do oslobađanja TGF- $\beta$  iz velikih latentnih kompleksa omogućavajući napregnutom ECM da održi pozitivnu povratnu spregu koja dozvoljava neprekidnu profibrotičnu aktivnost miofibroblasta (Darby i sar., 2014; Hinz, 2015b). Lokalnom povećanju koncentracije TGF- $\beta$  doprinosi i aktivnost makrofaga, pre svega profibrotične M2 subpopulacije (Novak i Koh, 2013; Sindrilaru i Scharffetter-Kochanek, 2013; Wynn i Vannella, 2016), koju aktiviraju IL-4 ili IL-13 oslobođeni od strane Th2 T-limfocita adaptivnog imunskog odgovora (Wynn i Ramalingam, 2012; Wynn i Vannella, 2016) čiji se pik brojnosti na mestu povrede uočava tokom kasne proliferativne/rane remodelujuće faze zarastanja (Guo i DiPietro, 2010).

Smatra se da miofibroblasti predstavljaju ključne faktore koji doprinose fiziološkoj rekonstrukciji vezivnog tkiva nakon povrede, ali i stvaranju patoloških promena tkiva koje karakterišu fibrozu (Gabbiani, 2003; Desmoulière i sar., 2005a). Iako su miofibroblasti uključeni u nastanak ožiljačnog tkiva najčešće poreklom od lokalne populacije fibroblasta, mezenhimskih stem ćelija ili mezenhimskih stem ćelija poreklom iz koštane srži, pokazano je da mogu poteći i od transdiferenciranih endotelnih ili epitelnih ćelija nastalih procesom endotelno-mezenhimske tranzicije ili epitelno-mezenhimske tranzicije (engl. *epithelial-mesenchymal transition* - EMT) o kojoj će više reči biti kasnije (Micallef i sar., 2012).

#### 1.1.1.3. Faza sazrevanja ili remodelovanja rane

Treća faza zarastanja sastoji se od remodelovanja tkiva koje počinje 2 do 3 nedelje od trenutka nastanka povrede i može trajati još nekoliko meseci ili godina (Gonzalez i sar., 2016). Tokom ove finalne faze dolazi do zaustavljanja proliferacije ćelija, do apoptoze ili odlaska sa mesta povrede onih ćelija koje su svoje uloge završile u prethodnim fazama zarastanja, i do depozicije kolagena i proteina ECM na mestu povrede (Ridiandries i sar., 2018). Osnovni cilj faze remodelovanja predstavlja postizanje maksimalne zatezne čvrstoće tkiva putem reorganizacije, degradacije i resinteze ECM i podrazumeva sazrevanje fibrovaskularnog tkiva u zreli, dehidratiran i hipocelularan ožiljak (Gonzalez i sar., 2016; Zada i sar., 2018).

Nakon reepitelizacije miofibroblasti u granulacionom tkivu nastavljaju da sintetišu MMP i TIMM, degradujući specifične komponente ECM što predstavlja važan korak faze remodelovanja (Caley i sar., 2015). Takođe, makrofagi pod uticajem IL-10 i TGF- $\beta$ 1 fagocituju prekomerne ćelije i višak ECM, dok putem produkcije MMP i TIMM promovišu remodelovanje tkiva (Lech i Anders, 2013; Sindrilaru i Scharffetter-Kochanek, 2013). Kada je integritet tkiva dovoljno obnovljen, pod normalnim fiziološkim uslovima, miofibroblasti unutar matriksa prestaju sa sintezom i ulaze u apoptozu (Hinz, 2015a). Produženo preživljavanje i aktivnost miofibroblasta dovode do hronične kontraktilne aktivnosti i posledičnog stvaranja hipertrofičnog ožiljka i kontrakture tkiva, i stoga predstavljaju ključan faktor koji doprinosu nastanku fibroznih promena u različitim organima (Darby i sar., 2014; Zada i sar., 2018).

### 1.1.2. Fibrozne bolesti oka

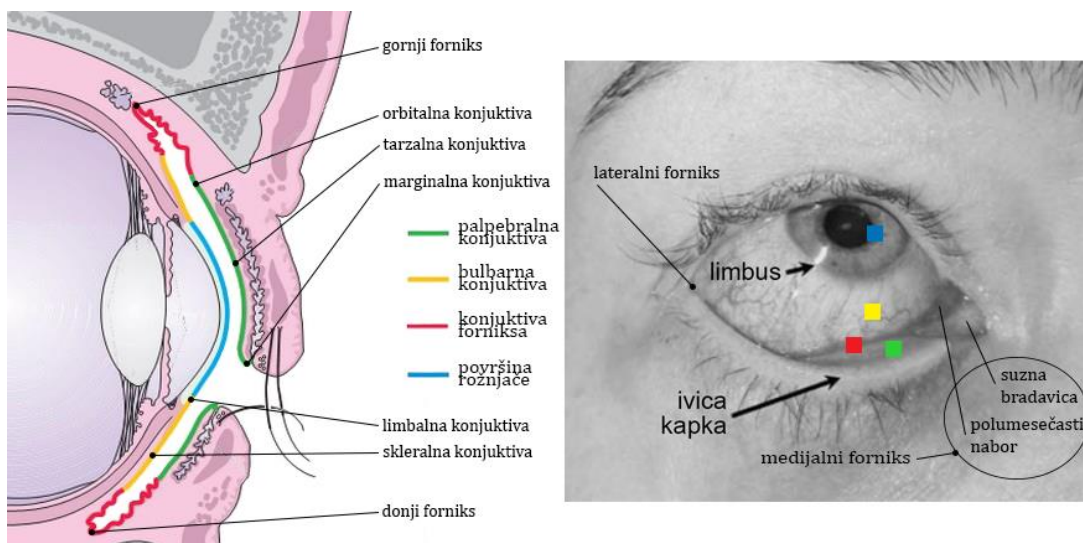
Oko predstavlja jedinstven organ sačinjen od tkiva koje potiče i od neuroektoderma i od površinskog ektoderma (Graw, 2010). U prvu grupu tkiva spada mrežnjača (lat. *retina*) u kojoj se proces fibroze odvija slično kao i u drugim delovima centralnog nervnog sistema, pa se zbog toga često označava kao glijoza, dok u drugu grupu spadaju većim delom rožnjača (lat. *cornea*), sočivo (lat. *lens*) i konjuktiva (vežnjača) kod kojih nastanak fibroznih promena prati isti sled događaja kao i u koži (Friedlander, 2007; Saika i sar., 2009). Fibrozne promene oka mogu se javiti i u njegovom posteriornom i u anteriornom delu. Patologija zajednička za sve fibrozne bolesti oka uključuje pojavu miofibroblasta u tkivu u asocijaciji sa inflamatornim ćelijama i posledično prekomernu akumulaciju ECM koja dovodi do narušavanja njegove funkcije (Saika i sar., 2009). Tako, među bolestima tokom kojih dolazi do fibrotičnih promena mrežnjače spadaju **proliferativna vitreoretinopatija** (engl. *proliferative vitreoretinopathy* - PVR), **neovaskularna degeneracija makule povezana sa starenjem** (engl. *neovascular age-related macular degeneration* - nAMD) i **proliferativna dijabetična retinopatija** (engl. *proliferative diabetic retinopathy* - PDR) (Shu i Lovicu, 2017). Tokom etiologije ovih bolesti fibrovaskularna proliferacija i kontrakcija fibroznih membrana formiranih na epiretinalnoj ili subretinalnoj strani, uzrokuju distorziju i ablaciju mrežnjače (Tremolada i sar., 2012; Tamiya i Kaplan, 2016; Little i sar., 2018). Fibrotične promene povezane sa **glaukomom** se mogu javiti i u anteriornom i u posteriornom delu oka. U anteriornom delu oka fibrozne promene u trabekularnoj mreži (engl. *trabecular meshwork* - TM) dovode do povećanog otpora izlivanju očne vodice u Šlemov kanal i dalje van oka, što uzrokuje povećanje intraokularnog pritiska (IOP) (Johnson, 2006; Prendes i sar., 2013). Sa druge strane, u posteriornom delu oka, povišen IOP uzrokuje kompresiju, deformaciju, remodelovanje i fibrozu lamine kribroze (lat. *lamina cribrosa* - LC) (Weinreb i sar., 2014; Schneider i Fuchshofer, 2015; Wallace i O'Brien, 2016), što za posledicu dovodi do razvijanja biomehaničkog stresa i odumiranje aksona optičkog nerva (Quigley, 2011). **Katarakta** predstavlja grupu bolesti anteriornog dela oka tokom koje dolazi do gubitka transparentnosti tkiva očnog sočiva bilo zbog procesa starenja, bilo zbog različitih sistemskih ili lokalnih poremećaja (Saika, 2006). Ako zbog povrede, inflamacije ili iritacije dođe do povećanja nivoa različitih citokina i faktora rasta u očnoj vodici, epitelne ćelije sočiva bivaju stimulisane da uđu u proces EMT zbog čega dolazi do depozicije proteina ECM i nastanka fibroznog plaka neposredno ispod anteriorne kapsule sočiva (primarna katarakta) ili, nakon njenog hiruškog uklanjanja, ispod posteriorne kapsule sočiva (sekundarna katarakta) što vodi narušavanju funkcije vida (de Jongh i sar., 2005; Awasthi i sar., 2009; Xiao i sar., 2015). Narušavanju vizuelne ose mogu doprineti i fibrozne promene ostalih anteriornih delova oka kao što su rožnjača i konjuktiva. Zbog svoje anatomske lokalizacije rožnjača je neprekidno izložena mehaničkim traumama i abrazivnim silama pa je kao rezultat razvila efikasan sistem brzog obnavljanja epitelnih ćelija na površini koji istovremeno omogućava očuvanje refraktivne funkcije rožnjače i sprečava prodor patogenih mikroorganizama i dalju povredu vezivnog tkiva strome (Saika i sar., 2004; Hamrah i Sahin, 2013; Rocher i sar., 2019). Ipak, **dublje povrede rožnjače** mogu da ometaju njeno ispravno zarastanje i da rezultuju neoangiogeneom, ponavljajućim erozijama površine rožnjače, epitelnoj keratinizaciji, maglenju strome i subepitelnoj fibrozi što vodi ozbiljnom oštećenju vida (Kawashima i sar., 2010; Lee i sar., 2013; Meek i Knupp, 2015).

#### 1.1.2.1. Fibrozne promene konjunktive

##### 1.1.2.1.1. Građa konjunktive

Konjuktiva predstavlja providnu mukoznu membranu koja povezuje i pokriva zadnju stranu očnih kapaka i prednju površinu očne jabučice izuzev rožnjače, od korneoskleralnog spoja

(limbusa) do ivica kapaka i suzne bradavice (lat. *caruncula lacrimalis*) u unutrašnjem uglu otvora kapaka (**Slika 1.1.**). Tkivo konjunktive se sastoji od višeslojnog pločastog nekeratinizovanog epitela u kome se, u zavisnosti od regiona, nalaze peharaste ćelije (engl. *goblet cells*) koje proizvode mucin i druge sekretorne žlezde koje proizvode različite komponente suznog filma, melanocite, Langerhansove ćelije, limfociti i dendritske ćelije. Stromu ili konjunktivalnu submukozu (lat. *substantia propria*) čini površinski limfoidni sloj sačinjen od rastresitog vezivnog tkiva sa razbacanim pre svega T-limfocitima, mast ćelijama, plazma ćelijama i neutrofilima, kao i dublji vezivni sloj sa krvnim sudovima i nervnim završecima. Između epitelnih ćelija i strome nalazi se bazalna membrana primarno izgrađena od kolagena tipa IV (Dartt, 1992; Harvey i sar., 2013; Takahashi i sar., 2013). Konjunktiva se anatomski može podeliti u tri različita regiona. **Bulbarna konjunktiva** pokriva beonjaču i podeljena je na skleralni i limbalni deo, dok **palpebralna konjunktiva** pokriva unutrašnju površinu kapaka i deli se na marginalnu, tarzalnu i orbitalnu konjunktivu. **Konjunktiva forniksa** povezuje bulbarni i palpebralni region konjunktive čineći gornji, donji, lateralni i medijalni forniks, pri čemu modifikacije konjunktivalnog tkiva u ovom regionu predstavljaju polumesečasti nabor (lat. *plica semilunaris*) i suzna bradavica (**Slika 1.1**) (Hatton i Rubin, 2005; Lang i Lang, 2006; Harvey i sar., 2013).



**Slika 1.1. Građa konjunktive.** Preuzeto i modifikovano iz (Hatton i Rubin, 2005; Lang i Lang, 2006).

#### 1.1.2.1.2. Funkcija konjunktive

Iako se često previđa, tkivo konjunktive obavlja različite složene funkcije neophodne za održavanje homeostaze površine oka (Hatton i Rubin, 2005). Tako, površina konjunktive premašuje površinu tkiva sa kojima je u kontaktu što omogućava slobodne pokrete oka i kapaka. Višeslojni epitel konjunktive obezbeđuje selektivnu propustljivost i predstavlja anatomsku barijeru za patogene, dok mikrovili na njegovoj površini obezbeđuju adheziju suznog filma (McDermott, 2013). Suzni film sprečava isušivanje, podmazuje rožnjaču, omogućava formiranje glatke površine za refrakciju svetlosti, obezbeđuje kiseonik avaskularnoj rožnjači i mehanički čisti oko od mehaničkih čestica, alergena i patogena. Mucini prisutni u unutrašnjem sloju suznog filma učestvuju u formiranju glikokaliksa na površini mikrovila koji ometa vezivanje patogena za epitelne ćelije konjunktive, dok sekretovani mucini formiraju hidrofилni sloj preko glikokaliksa koji spira debris i patogene sa površine oka (Gipson i Argüeso, 2003). Takođe, u vodenoj fazi suznog

filma se nalaze različite antimikrobne komponente uključujući lizozim, laktoferin, lipokalin, sekretorni IgA (imunoglobulin A) i proteine komplementa koji imaju zaštitnu ulogu (McDermott, 2013). U konjunktivi su prisutni i imunološki odbrambeni mehanizmi klasifikovani kao urođeni, nespecifični imunski odgovor i adaptivni, stečeni imunski odgovor koji zahteva prethodno izlaganje antigenu i razvijanje specifičnog imuniteta. U urođenom imunskom odgovoru učestvuju različite ćelije imunskog sistema prisutne u konjunktivi, kao što su polimorfonuklearni (PMN) leukociti, kao i epitelne ćelije konjunktive, pri čemu nakon prepoznavanja patogena od strane npr. receptora sličnih Tolu (engl. *Toll-like receptors* - TLRs) na ovim ćelijama dolazi do sekrecije citokina, hemokina i faktora rasta dovodeći do razvoja inflamacije i pokretanja adaptivnog imunskog odgovora (Akpek i Gottsch, 2003). Takođe, sve više dokaza ukazuje da konjunktiva poseduje specifičan mukozni imuni sistem, odnosno da sadrži organizovano limfoidno tkivo koje se sastoji od intraepitelnih limfocita, subepitelnih limfoidnih folikula i okolnih limfnih i krvnih sudova, sveukupno označenih kao limfoidno tkivo povezano sa konjunktivom (engl. *conjunctival associated lymphoid tissue*-CALT) za koje se pretpostavlja da igra ključnu ulogu u zaštiti površine oka pokretanjem i regulisanjem imunskog odgovora (Steven i Gebert, 2009).

Inflamacija konjunktive je zajednička za mnoge bolesti koje pogađaju oko i u teoriji svaka hronična inflamacija konjunktive može pokrenuti fibrozne promene u ovom tkivu. Iako većina bolesti, kao što je virusni konjunktivitis, spontano prođe i normalna anatomija i funkcija konjunktive ostaje očuvana nakon inflamacije, neki poremećaji mogu dovesti do trajnog nastanka ožiljačnog tkiva na konjunktivi (Hatton i Rubin, 2005). Prve posledice hronične inflamacije ogledaju se u nastanku skvamozne metaplazije koja uključuje oštećenje i deficijenciju peharastih ćelija i taloženje keratina na površini oka, dok posledičan nedostatak mucina dovodi do poremećaja u sastavu suznog filma i do isušivanja oka (Hatton i Rubin, 2005). U stromi dolazi do fibrotičnih promena koje uzrokuju opstrukciju suznih i pomoćnih suznih žlezda, skraćivanje forniksa, uvrtnje kapaka ka unutra (entropion), kontakt trepavica i rožnjače (trihijaza), adheziju palpebralne konjunktive kapaka za bulbarnu konjunktivu očne jabučice (simblefaron), adheziju gornje i donje ivice kapaka jedne za druge (ankiloblefaron), što sve za posledicu ima smanjenje pokretljivosti oka i oštećenje rožnjače (Hatton i Rubin, 2005). Bliska fizička i funkcionalna veza konjunktive i rožnjače dovodi do toga da istovremeno bivaju pogođene povredama i bolestima, pa promene na konjunktivi u vidu ožiljaka i drugih poremećaja mogu dovesti do zamućenja i fibroze rožnjače.

#### 1.1.2.1.3. Bolesti povezane sa fibroznim promenama konjunktive

Uzročnici konjunktivalne fibroze su, kao i kod drugih tkiva, heterogene prirode, i obuhvataju traume konjunktive u koje spada i hiruška intervencija, hemijske i termalne opekotine, zračenje, bakterijske infekcije, sistemske bolesti, kao i autoimunske, alergijske i atopijske reakcije.

Da bi se doprlo do dubljih tkiva, mnoge operacije oka zahtevaju rezove na konjunktivi i ukoliko se zarastanje konjunktive pokaže kao neadekvatno može doći do nastanka fibrotičnih promena. Tako se u slučaju **glaukoma**, kada se lečenje lekovima ne pokaže kao uspešno, primenjuje trabekulektomija koja dovodi do smanjenja IOP. Ovaj hiruški zahvat podrazumeva uspostavljanje novog puta kroz koji očna vodica može izaći u rezervoar između beonjače i bulbarne konjunktive. Glavnu postoperativnu komplikaciju predstavlja nastanak konjunktivalne fibroze na mestu rane koje može dovesti do zatvaranja puta, dovodeći do neadekvatnog smanjenja pritiska (Schlunck i sar., 2016). Hiruški zahvat dovodi do traume tkiva koje pokreće lokalizovani imunski odgovor preko aktivacije krvnih pločica, regrutovanja makrofaga i PMN limfocita i otpuštanjem različitih citokina i faktora rasta.

Sa druge strane, izloženost sunčevim zracima, odnosno UV zračenju se smatra glavnim uzročnikom **pterigijuma** koji predstavlja rast bulbarne konjunktive preko površine rožnjače. Pterigijum, sačinjen od invazivnog hipertrofirano epitela i fibrotične strome konjunktive (Kim i sar., 2016), karakteriše se razaranjem Boumanove kapsule, elastoza, procesom EMT i prisustvom obimne fibrovaskularne proliferacije u tkivu rožnjače (Kato i Shimmura, 2008; Chien i sar., 2013). Iako još uvek nedovoljno rasvetljena, postoje dokazi da u patogenezi pterigijuma učestvuju faktori koji utiču na proliferaciju ćelija, inflamatorni medijatori, modulatori ECM, imunološki mehanizmi, virusne infekcije i genetički faktori (Di Girolamo i sar., 2004). Osim toga, veliki problem nakon hirurškog uklanjanja pterigijuma predstavlja i razvijanje sekundarnog pterigijuma koga karakteriše brži i ekstenzivniji rast fibrovaskularnog tkiva nego u slučaju primarnog (Kim i Kim, 2018).

Takođe, sistemske autoimune bolesti kao što je cikatricijalni pemfigoid, koji oštećuje kožu i mukozne membrane, mogu dovesti i do fibrotičnih promena na oku. **Očni cikatricijalni pemfigoid** (engl. *ocular cicatricial pemphigoid* - OCP) je retka bolest koja dovodi do stvaranja ožiljaka na konjunktivi (Chang i McCluskey, 2005). Autoimunski odgovor je usmeren protiv elemenata u bazalnoj membrani, gde dolazi do linearnog nakupljanja Ig i proteina komplementa. Hronična inflamacija dovodi do dominantne infiltracije aktiviranih T-limfocita u stromi i povećanog nivoa fibrogenih faktora rasta koji dovode do hiperproliferacije fibroblasta konjunktive (Faraj i Hoang-Xuan, 2001).

Iako su autoimune bolesti koje napadaju oko relativno retke, pokazano je da čak kod 60% do 90% pacijenata sa **hroničnom bolesti kalem protiv domaćina** (engl. *chronic graft versus host disease* - cGVHD) (Perez i sar., 2016), koja se razvija nakon alogene transplantacije hematopoetskih stem ćelija, dolazi do reakcije T-limfocita donora na antigene konjunktive domaćina (Kim, 2006). Prisustvo hronične inflamacije dovodi do oštećenja svih delova oka koje je najvidljivije na površini, gde dolazi do fibrotičnih promena na konjunktivi i suznim žlezdama. Osim toga, istraživanja ukazuju i na važnu ulogu procesa EMT tokom navedenih okularnih manifestacija cGVHD (Ogawa i sar., 2009).

Do fibroze konjunktive može doći i tokom hroničnih alergijskih bolesti oka. Alergijski odgovor u oku javlja se nakon izlaganja konjunktive alergenu iz okruženja koji se vezuje za specifične IgE prisutne na mast ćelijama konjunktive (Leonardi i sar., 2008). Sezonska i perenijalna forma konjunktivitisa su češće i manje ozbiljne forme od hroničnih formi u koje spadaju **vernalni** (engl. *vernal keratoconjunctivitis* - VKC) i **atopijski keratokonjunktivitis** (engl. *atopic keratoconjunctivitis* - AKC) (Leonardi, 2013). VKC je relativno retka bolest koja pogađa decu i mlađe ljude, uglavnom u toplim podnebljima, dok AKC predstavlja očnu manifestaciju sistemski poremećenog imunskog odgovora, često povezanu sa atopijskim dermatitisom i drugim alergijskim bolestima kao što je astma (Ono i Abelson, 2005). Mehanizmi posredovani IgE ne objašnjavaju u potpunosti klinički tok bolesti prisutan kod AKC i VKC, već je pokazana i uključenost Th2 T-limfocita i Th2 citokina u patološke promene povezane sa ovim hroničnim alergijskim bolestima oka (Leonardi, 2013).

Najpoznatija bakterijska infekcija oka je infekcija bakterijom *Chlamydia trachomatis*, koja osim što može inficirati urogenitalni trakt, može dovesti i do nekoliko očnih bolesti. Neonatalni konjunktivitis se javlja kod 20% do 50% novorođenčadi čije su majke na porođaju imale cervikalnu infekciju bakterijom *C. trachomatis* (Rours i sar., 2008), dok je hlamidijalni konjunktivitis primećen kod 80% odraslih pacijenata sa genitalnom hlamidijalnom infekcijom (Petrovay i sar., 2015). Ipak,

samo serovari *C. trachomatis* specifični za oko mogu dovesti do bolesti nazvane **trahom** tokom koje nastaju fibrozne promene konjunktive (Hu i sar., 2013).

## 1.2. Trahom

### 1.2.1. Epidemiologija trahoma

Infekcija tarzalne konjunktive intracelularnom bakterijom *Chlamydia trachomatis* dovodi do nastanka trahoma. Trahom predstavlja vodeći svetski uzrok slepila infektivnog porekla. Svetska zdravstvena organizacija (SZO) je 1993. godine usvojila strategiju za iskorenjivanje trahoma do 2020. godine pod akronimom SAFE (engl *surgery-S, antibiotic-A, facial cleanliness-F, environmental improvement-E*). Strategija je obuhvatala hiruške korekcije komplikacija kasne faze bolesti (S), antibiotike za lečenje infekcije (A), povećanje stepena lične higijene koje bi dovelo do smanjenja prenošenja bolesti putem ruku, muva i odeće (F) i poboljšavanje higijenskih uslova života kroz obezbeđivanje lakšeg pristupa čistoj vodi i uvođenje boljih sanitarnih mera (E) (WHO, 1997). SZO je procenila da je broj ljudi obolelih od trahoma pao sa 1,5 milijarde 2002. godine na 142,2 miliona u 2019. godini, što predstavlja smanjenje od 91%. Takođe, broj osoba kojima je potrebna operacija u kasnoj fazi bolesti je pala za 68%, sa 7,6 miliona 2002. godine na 2,5 miliona 2019. godine. Od 2011. godine do danas, SZO je potvrdila da je 8 država eliminisalo trahom kao zdravstveni problem od javnog značaja. Uprkos velikom napretku koji je postignut, eliminacija trahoma na globalnom nivou planirana do decembra 2020. godine neće biti ispunjena (Oldenburg, 2019). Ova bolest još uvek ostaje endemska u 44 zemlje i odgovorna je za 1,4% svih slučajeva slepila širom sveta (WHO, 2019). Smatra se da je najveća prevalencija trahoma u određenim regionima Etiopije, gde je nacionalni izveštaj iz 2005/2006. godine pokazao da je na nivou čitave države u proseku aktivna bolest prisutna kod 40,14% dece ispod 9 godina, dok su se kod 3,1% populacije starije od 15 godina razvile komplikacije trahoma karakteristične za kasnu fazu bolesti (Berhane i sar., 2006). Oštećenje vida i slepilo prouzrokovano trahomom dovode do pogoršanja kvaliteta života pogođenih osoba i njihovih porodica, koji i inače spadaju među najsiromašnije u svetu. Procene govore da se ekonomski gubici nastali smanjenjem radne sposobnosti obolelih od trahoma kreću od 3 do 8 milijardi dolara godišnje (Frick i sar., 2003a; Frick i sar., 2003b).

### 1.2.2. Tretman trahoma

Za sada azitromicin predstavlja antibiotik izbora za lečenje trahoma i masovno se distribuira u endemskim područjima. Problemi koji se javljaju sa upotrebom ovog antibiotika uključuju neophodnost njegove duge primene u populacijama sa visokom prevalencom aktivne bolesti, gde ni 5 godišnjih ciklusa tretmana azitromicinom ne dovodi do kontrolisanja bolesti (Jimenez i sar., 2015), kao i stvaranje rezistencije kod drugih patogenih bakterija (Coles i sar., 2013). Fenomen autoinokulacije predstavlja jedan od mogućih uzroka povremene neuspešnosti azitromicina u tretmanu trahoma (Craig i sar., 2015). Naime, istraživanja su pokazala da *Chlamydiae* mogu opstati u gastrointestinalnom traktu i bez kliničkih znakova bolesti (Rank i Yeruva, 2014). Dodatne komplikacije koje otežavaju pravilnu primenu antibiotika predstavljaju saznanja da aktivna bolest ne mora biti u sprezi sa prisustvom bakterije, da trahom napreduje ka kasnim fazama i u odsustvu infekcije, kao i da se bakterija *C. trachomatis* može detektovati kod klinički zdravih osoba (Burton i sar., 2003; Wright i Taylor, 2005). Takođe, ponovno razvijanje komplikacija bolesti može biti i do 60% u periodu od 3 godine nakon operacije trahoma (Hu i sar., 2010). Zbog svega pomenutog, ulažu se naponi i u razvoj vakcine, ali još uvek bez zadovoljavajućih rezultata (Mabey i sar., 2014), pa se istraživanja usmeravaju i ka pronalaženju alternativnih vidova terapije koja bi doprinela lečenju trahoma.

### 1.2.3. Kliničke manifestacije trahoma

Trahom započinje u ranom detinjstvu ponovljenim infekcijama konjunktive bakterijom *C. trachomatis* koje uzrokuju stanje hronične inflamacije (Burton, 2007). Nakon godina ponovljenih infekcija dolazi do progresivnog nastanka ožiljaka na konjunktivi, pri čemu ožiljačno tkivo dovodi do entropiona i trihijaze uzrokujući oštećenje rožnjače i zamućenje vida koje može prerasti u potpuno slepilo. Klinički, postoji aktivna ili rana i ožiljna ili kasna faza trahoma (Wright i sar., 2007). Kliničke manifestacije trahoma se menjaju sa starošću pa je tako aktivni trahom češće prisutan kod dece, dok sa starenjem infekcije bakterijom *C. trachomatis* vremenski kraće traju i postaju ređe (Solomon i sar., 2003; Grassly i sar., 2008). Oštećenja oka nastala zbog ponovljenih epizoda infekcije i inflamacije uobičajeno postaju očigledna nakon četvrte decenije života (Burton, 2007), manifestujući se u stvaranju ožiljačnog tkiva na konjunktivi. Komplikacije koje nastaju u kasnoj fazi trahoma i koje zahtevaju operativne zahvate su obično češće prisutne kod žena (Dolin i sar., 1998; Cromwell i sar., 2009), verovatno zbog bližeg kontakta sa inficiranom decom što i dovodi do veće učestalosti infekcija (Congdon i sar., 1993).

Uprošćen sistem SZO za procenu trahoma i njegovo klasifikovanje deli bolest na pet stadijuma (Thylefors i sar., 1987; Marić, 2015). Prvi stadijum predstavlja trahomska folikularna inflamacija (engl. *trachomatous inflammation follicular* - TF) kada je prisutno 5 ili više folikula (>0.5 mm) koji predstavljaju kolekciju limfoidnih ćelija ispod epitela gornje tarzalne konjunktive. Trahomsku intenzivnu inflamaciju (engl. *trachomatous inflammation intense* - TI) karakteriše izraženo inflamatorno zadebljavanje i edem tarzalne konjunktive. Sledeća faza podrazumeva pojavu ožiljačnog tkiva i označava se kao faza trahomskog ožiljavanja (engl. *trachomatous scarring* - TS). Za njom sledi faza koja se naziva trahomska trihijaza (engl. *trachomatous trichiasis* - TT) kada barem jedna trepavica grebe površinu rožnjače, dok finalni stadijum trahoma predstavlja zamućenje rožnjače (engl. *corneal opacity* - CO).

### 1.2.4. Patogeneza trahoma

*C. trachomatis* je obligatna intracelularna bakterija koja inficira epitelne ćelije domaćina. Sojevi *C. trachomatis* dele se u 15 serovara dalje razvrstana u dva biovara: sojevi koji predominantno inficiraju oko i uzrokuju trahom (A, B, Ba i C) i sojevi (D, E, F, G, H, I, J i K) koji predominantno inficiraju urogenitalni trakt i koji, ako se ne leče, dovode do pelvične inflamatorne bolesti, ektopične trudnoće, fibroze jajovoda, steriliteta, uretritisa i prostatitisa. Sojevi (L1, L2 i L3) takođe inficiraju genitalni trakt ali su invazivniji, preživljavaju u makrofagima i šire se u lokalne limfne čvorove, dovodeći do razvijanja bolesti limfogranuloma venereum (Hafner, 2015; Elwell i sar., 2016; Faris i sar., 2019).

Tokom razvojnog ciklusa bakterija *C. trachomatis* prolazi kroz dve faze, fazu retikularnog tela (engl. *reticulate body* - RB) i fazu elementarnog tela (engl. *elementary body* - EB) (AbdelRahman i Belland, 2005). EB predstavljaju infektivnu formu bakterije, koja zahvaljujući svom ćelijskom zidu gotovo bez peptidoglikana, sa čvrsto umreženim glavnim (engl. *major outer membrane protein* - MOMP) i drugim proteinima spoljašnjeg membranskog kompleksa (engl. *outer membrane protein A/B/C* - OmpA, OmpB, OmpC), opstaju van ćelija domaćina. (AbdelRahman i Belland, 2005). MOMP čini 60% ukupne količine proteina na površini EB i varijacije u njegovim epitopima definišu serovar *C. trachomatis* (Caldwell i sar., 1981). Razvojni ciklus bakterije *C. trachomatis* započinje kačenjem EB za površinu epitelnih ćelija preko nekoliko receptora na ćelijama domaćina (Puolakkainen i sar., 2005; Kim i sar., 2011). Nakon endocitoze bakterije, dolazi do formiranja intracelularne vakuole koja se naziva inkluziono telo (engl. *inclusion body* - IB), smeštene u



perinuklearnom regionu ćelije domaćina. Više IB se fuzionišu, pri čemu dolazi do koaptiranja funkcije aktina i intermedijarnih filamenata ćelije domaćina, koji formiraju strukturu oko inkluzije obezbeđujući joj stabilnost i bezbednu nišu (Kumar i Valdivia, 2008). Bakterija *C. trachomatis* poseduje brojne faktore virulencije koji joj omogućavaju da u zaštićenoj intracelularnoj niši završi razvojni ciklus i izbegne imuni odgovor domaćina (Derrick, i sar., 2015). U inkluzionim telima EB se transformišu u veća i metabolički aktivna RB, koja se dalje umnožavaju binarnom fisijom. Nakon nekoliko sati novonastala RB se ponovo transformišu u EB koja izlaze u vanćelijsku sredinu bilo ekstruzijom (fuzijom inkluzionog tela sa plazma membranom), bilo nakon lize ćelije domaćina (Hybiske i Stephens, 2007). Nakon ekstruzije ćelija može reparirati plazma membranu i ostati vijabilna, služeći kao pogodan domaćin u kojoj preostala EB mogu završiti svoj razvojni ciklus (Beatty, 2007). Čitav razvojni ciklus bakterije *C. trachomatis* je kod okularnih serovara duži u poređenju sa urogenitalnim serovarima. Urogenitalni serovari završavaju razvojni ciklus za 30-48 h, dok kod okularnih serovara razvojni ciklus traje 48-68 h nakon *in vitro* infekcije (Miyairi i sar., 2006). Primećeno je i da različite forme stresa mogu da dovedu do toga da RB formiraju aberantna tela koja ostaju vijabilna i perzistiraju dok je ćelija izložena stresnim uslovima, nakon čega formiraju EB, što je primećeno i u *in vitro* (Hogan i sar., 2004; Wyrick, 2010) i u *in vivo* uslovima (Lewis i sar., 2014).

### 1.2.5. Imunopatologija trahoma

Nakon prepoznavanja patogena, epitelne ćelije domaćina sekretuju citokine i hemokine koji regrutuju i aktiviraju ćelije urođenog imunskog sistema i koje posledično aktiviraju adaptivni imunski odgovor. Osnovno patološko i kliničko obeležje aktivne trahomatozne inflamacije je formacija limfoidnih folikula u subepitelnom tkivu konjunktive. Limfoidni folikul čini germinalni centar u kome se u najvećem broju nalaze nezreli B-limfociti i parafolikularni region u kome dominiraju zreli B-limfociti. Između folikula prostire se difuzni inflamatorni infiltrat sačinjen od B i T-limfocita, plazma ćelija, dendritskih ćelija, makrofaga, neutrofila, eozinofila i mast ćelija (Abu El-Asrar i sar., 1989; Taylor i sar., 2014). Kod najvećeg broja ljudi reinfekcije konjunktive bakterijom *C. trachomatis* predstavljaju osnovni stimulus za razvijanje fibroznih komplikacija (Wolle i sar., 2009), dok kod manjine infekcija postaje perzistentna dovodeći do hronične inflamacije i fibroze (Smith i sar., 2001). Hronična inflamacija predstavlja centralni događaj u procesu nastajanja ožiljačnog tkiva u mnogim bolestima. U okruženju hronične inflamacije dolazi do poremećaja u normalnom fiziološkom odgovoru na oštećenje tkiva koje posledično vodi do progresivnih fibroznih promena. U inflamatornoj fazi, ćelije imunog sistema, uključujući makrofage koji su regrutovani na mesto infekcije i rezidentne fibroblaste, oslobađaju proinflamatorne citokine, faktore rasta i MMP. Osim suzbijanja infekcije, ovi faktori stimulišu proliferaciju fibroblasta i akumulaciju ECM. Aktivirani fibroblasti, poznati kao miofibroblasti, migriraju na mesto povrede, produkuju ECM i kontrahuju ranu dovodeći do nastanka ožiljka. Pokazano je da u tkivu konjunktive obolelih od trahoma dolazi do promena u sastavu ECM, posebno u zastupljenosti različitih tipova kolagena čiji se sastav menja u različitim fazama bolesti (Abu El-Asrar i sar., 1998; Abu El-Asrar i sar., 2001), pri čemu kontrakcija vertikalno orijentisanih kolagenih vlakna predstavlja jedan od osnovnih faktora koji doprinose entropionu (Al-Rajhi i sar., 1993). Sled događaja koji povezuju stanje hronične inflamacije i progresivno nastajanje ožiljačnog tkiva u trahomu još uvek nije dovoljno razjašnjen. Trenutno postoje dva modela kojima se objašnjava imunopatogeneza bolesti uzrokovanih infekcijom bakterijom *C. trachomatis*: imunološka i ćelijska paradigma.

Tradicionalna **imunološka paradigma** ističe ulogu adaptivnog imunskog odgovora u nastajanju patologije trahoma. Rane studije na primatima, kao i studije u kojima su učestvovali volonteri, ukazale su da do nastanka ožiljačnog tkiva ne dolazi nakon jedne infekcije bakterijom *C.*

*trachomatis* (Mabey i sar., 2014). Takođe je primećeno i da ponovno izlaganje istom bakterijskom soju dovodi do slabije kliničke slike bolesti u poređenju sa primarnom infekcijom, što je ukazalo na postojanje memorije koja je karakteristika adaptivnog imunskog odgovora (Dawson i sar., 1966; Wang i sar., 1967). Još nekoliko otkrića ide u prilog imunološkoj paradigmi i sticanju zaštitnog imuniteta. Tako, u zajednicama gde trahom predstavlja endemsku bolest uočeno je da se prevalencija okularne infekcije smanjuje sa godinama, da infekcija bakterijom *C. trachomatis* kod dece traje gotovo duplo duže nego kod starijih (8 nedelja), kao i da ožiljačno tkivo nastaje i u odustvu infekcije (Bailey i sar., 1999; Grassly i sar., 2008; Burton i sar., 2015). Takođe, ponovljene infekcije bakterijom *C. trachomatis* i perzistencija povećavaju ozbiljnost inflamatornog odgovora i promovišu hroničnu inflamaciju na mestu infekcije, dovodeći do oštećenja tkiva i nastajanja ožiljaka (Grayston i sar., 1985).

Animalni modeli infekcije bakterijom *C. trachomatis*, pokazali su da je ćelijski imunski odgovor, kao deo adaptivnog imunskog odgovora, neophodan za rezoluciju infekcije (Ramsey i Rank, 1991). Uloga ćelijskog adaptivnog odgovora i Th1 i Th2 fenotipa CD4(+) T-limfocita je ispitana u studijama koje su pratile imunski odgovor pacijenata sa različitim stepenom fibroznih promena u trahomu. Pacijenti kod kojih je došlo do nastanka ozbiljnih ožiljaka na konjuktivi imali su povećanu količinu IgG antitela specifičnih za bakteriju *C. trachomatis* i slabiji proliferativni odgovor T-limfocita u odgovoru na bakterijske antigene u poređenju sa zdravim kontrolama (Holland i sar., 1993), kao i Th2 šemu ekspresije citokina (IL-4) u odnosu na kontrole kod kojih je pokazana Th1 šema ekspresije citokina (interferon- $\gamma$  - IFN- $\gamma$ ) (Holland i sar., 1996). Takođe su i pacijenti kod kojih je došlo do spontanog razrešenja inflamacije pokazali jaču proliferaciju T-limfocita u odnosu na one kod kojih je infekcija bila perzistentna (Bailey i sar., 1995). Navedeno ukazuje da Th1 tip odgovora prvenstveno ima ulogu u rezoluciji infekcije, dok je Th2 tip odgovora neefikasan u uklanjanju infekcije i vodi do pojačane patologije manifestovane u nastanku ožiljačnog fibroznog tkiva na konjuktivi.

Pokazano je i da se nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* razvija i humoralni imunski odgovor posredovan antitelima. IgG antitela specifična za bakteriju *C. trachomatis* nađena su u suzama i serumu osoba sa aktivnim trahomom i dovedena su u vezu sa olakšavanjem ulaska bakterije u epitelne ćelije konjunktive, dok sa druge strane prisustvo IgA antitela specifičnih za bakteriju *C. trachomatis* potencijalno interferira sa kačenjem bakterije za ćeliju domaćina smanjujući rizik od ponovne infekcije (Bailey i sar., 1993).

Osim adaptivnog, u odgovoru na infekciju epitelnih ćelija se pokreće i urođeni imunski odgovor. Stephens je 2003. godine predložio alternativni model nastanka trahoma u kome epitelne ćelije na mestu infekcije igraju glavnu ulogu kao medijatori urođenog imunskog odgovora – **ćelijska paradigma** (Stephens, 2003). Pokazano je da epitelne ćelije *in vitro* inficirane bakterijom *C. trachomatis* produkuju brojne proinflamatorne citokine i faktore rasta kao što su IL-8, hemokinski ligand 1 sa C-X-C motivom (engl. *C-X-C motif chemokine ligand 1* - CXCL1), IL-1 $\alpha$ , IL-6 i faktor stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*-GM-CSF) (Rasmussen i sar., 1997). Neki od ovih citokina su moćni hemoatraktanti i aktivatori neutrofila, monocita i T-limfocita, dok drugi indukuju ekspresiju adhezivnih molekula na površini endotelnih ćelija, sekreciju dodatnih proinflamatornih citokina od strane makrofaga i drugih ćelija i pokretanje akutno-faznog odgovora u epitelnim ćelijama i makrofagima. Sekrecija ovih citokina je odložena u odnosu na kinetiku sekrecije nakon infekcije drugim invazivnim bakterijama i prisutna je tokom 2 do 4 dana, koliko traje razvojni ciklus bakterije *C. trachomatis* (Rasmussen i sar., 1997). Sekrecija IL-1 $\alpha$  od strane inficiranih ćelija dovodi do povećane ekspresije proinflamatornih citokina od strane susednih neinficiranih ćelija što

dovodi do jakog inflamatornog odgovora i što za rezultat ima i protektivne i štetne efekte jer inflamatorni odgovor dovodi i do uklanjanja infekcije ali doprinosi i fibrozi i nastanku ožiljačnog tkiva. Epitelne ćelije *in vitro* inficirane bakterijom *C. trachomatis* takođe proizvode i profibrotični citokin IL-11 (Dessus-Babus i sar., 2002).

Studije rađene *in vivo* takođe podržavaju ćelijsku hipotezu. Tako, studija transkriptoma rađena na uzorcima dobijenim od pacijenata kod kojih je došlo do nastanka ožiljačnog tkiva ukazala je na aktivnu uključenost epitelnog tkiva u progresiji trahoma kroz produkciju proinflamatornih faktora IL-1 $\beta$ , CXCL5, antimikrobnog peptida psorijazina (engl. *psoriasis*, *S100 calcium binding protein A7* - S100A7) (Burton i sar., 2011b). Pored toga, brojne studije su pokazale važnu ulogu urođenog imunskog odgovora, uključujući i ulogu epitelnih ćelija u patologiji trahoma (Abu El-Asrar i sar., 1998; Skwor i sar., 2008; Burton i sar., 2011a; Hu i sar., 2012). Naime, ove studije su pokazale povećanu ekspresiju inflamatornih, profibrotičnih i faktora koji učestvuju u remodelovanju tkiva kao što su IL-17 $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ , S100A7, CXCL5, hemokinski ligand sa C-C motivom (engl. *C-C motif chemokine ligand 18* - CCL18), MMP7, MMP9, MMP10 i MMP12, TIMM1 i faktora rasta vezivnog tkiva (engl. *connective tissue growth factor* - CTGF) kod pacijenata sa trahomom. Takođe, *in vitro* i *in vivo* studije pokazale su da se aktivnost prototipskog profibrotičnog faktora TGF- $\beta$  povećava nakon infekcije miša bakterijom *C. trachomatis* (*C. muridarum*) (Williams i sar., 1996), kao i kod obolelih od trahoma (Bobo i sar., 1996; Burton i sar., 2004; Skwor i sar., 2008).

Prema ćelijskoj hipotezi nakon aktivacije epitelnih ćelija i različitih ćelija urođenog imunskog odgovora, limfociti adaptivnog imunskog odgovora bivaju privučeni na mesto infekcije hemotaktičkim gradijentom i proizvode sopstveni repertoar citokina i faktora rasta. Tokom narednih infekcija prisutne su i memorijske populacije T-limfocita koje dovode do amplifikacije imunskog odgovora. Prema ćelijskoj paradigmi, akutne, hronične i perzistentne infekcije bakterijom *C. trachomatis* svaki put dovode do odgovora epitelnih ćelija koji promoviše proliferaciju ćelija i remodelovanje tkiva koje ako opstaje vodi nastanku ožiljačnog fibroznog tkiva (Stephens, 2003).

Uloga epitelnih ćelija u patogenezi trahome koju pretpostavlja ćelijska paradigma bi mogla da bude i značajnija od opisane. Naime, epitelne ćelije konjunktive bi nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis*, a u odgovoru na inflamaciju, mogle da doprinesu nastanku ožiljačnog tkiva putem procesa EMT. Tako je pre nekoliko godina i predložen alternativni put kojim bi mogla da se objasni patogeneza kasnih faza trahoma, a koji uključuje proces EMT (Derrick i sar., 2015). Sve je više dokaza da proces EMT ima šire implikacije nego što se prvobitno mislilo i da doprinosi gotovo svakom fibrotičnom procesu (Stone i sar., 2016), pa je tako važna uloga procesa EMT u fibroznim promenama dokumentovana u bubrezima, jetri, plućima, tiroidnoj žlezdi i reumatskim bolestima (Tennakoon i sar., 2015; Rout-Pitt i sar., 2018; Fintha i sar., 2019), dok su se dokazi za ključnu ulogu EMT u okularnim fibrotičnim procesima nedavno pojavili (Saika i sar., 2008; Shu i Lovicu, 2017). Postoje dokazi koji govore u prilog uloge procesa EMT i u razvoju fibroznih bolesti konjunktive. Smatra se da je proces EMT uključen u patogenezu pterigijuma (Kato i sar., 2007), kao i da je delimično odgovoran za fibrozu konjunktive i suznih žlezda kod pacijenata sa cGVHD (Ogawa i sar., 2009). Ispitivanje uloge EMT i bolje razumevanje uzročnika i mehanizama koji leže u osnovi trahoma mogli bi da doprinesu sprečavanju progresivne fibroze konjunktive nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis*, a samim tim i u lečenju ove bolesti.

### 1.3. Proces epitelno-mezenhimske tranzicije

Pre više decenija embriolozi su bili prvi koji su primetili da u nekoliko navrata tokom razvića dolazi do velikih promena u morfologiji i ponašanju epitelnih ćelija koje zadobijaju fenotip mezenhimskih ćelija i pri tome prelaze velike razdaljine u embrionu da bi učestvovala u formiranju određenog tkiva i organa (Nieto, 2009). Pionirski rad Elizabet Hej iz 1968. godine je prvi doveo do opisivanja biološkog fenomena „epitelno-mezenhimske“ transformacije koristeći kao model formiranje primitivne brazde kod pileta (Hay, 1995). Takođe, tom prilikom je uočeno i da jednom kada ćelije nakon transformacije stignu do krajnje pozicije u embrionu, njihova diferencijacija u različite tipove ćelija često uključuje reverzan proces, mezenhimsko-epitelnu transformaciju (Nieto, 2009). Tokom vremena termin „transformacija“ zamenjen je pojmom „tranzicija“, koji bolje opisuje reverzibilnu i tranzijentnu prirodu ovog fenomena, kao i činjenicu da se ovaj proces razlikuje od onkogene konverzije epitela (Kalluri i Neilson, 2003), pa se na dalje govori o procesima epitelno-mezenhimske tranzicije (engl. *epithelial-mesenchymal transition* - EMT) i mezenhimsko-epitelne tranzicije (engl. *mesenchymal-epithelial transition* - MET).

#### 1.3.1. Opšte odlike procesa EMT

Plan građe metazoa se u najvećoj meri sastoji od dva morfološki i funkcionalno različita ćelijska tipa, epitelnog i mezenhinskog, kombinovanih u organe sa jasnom trodimenzionalnom strukturom (Thiery i Sleeman, 2006; Lynch i Watt, 2018). Istorijski posmatrano epitelne i mezenhimske ćelije identifikovane su na osnovu njihovog jedinstvenog fenotipa i morfologije višćelijskih struktura koje formiraju (Shook i Keller, 2003). Tipičan epitel se često sastoji iz jednog sloja ćelija, pri čemu pravilno raspoređene međućelijske veze drže epitelne ćelije čvrsto pripojene jedne za druge omogućavajući epitelnoj ploči da formira trodimenzionalni prostor i obezbeđujući mu strukturnu definiciju i mehaničku rigidnost, dok sa druge strane sprečavaju migraciju i disocijaciju individualnih ćelija (Lee i sar., 2006; Thiery i Sleeman, 2006). Sama epitelna ploča je karakteristično polarizovana što znači da se apikalna i bazalna površina razlikuju u specifičnoj lokalizaciji i distribuciji adhezionih molekula, organizaciji specijalizovanih međućelijskih struktura, polarizaciji aktinskog citoskeleta i prisustvu bazalne membrane koja razdvaja epitel od drugih tkiva što se i ogleda u njihovoj vizuelnoj različitosti, adheziji za različite supstrate i različitoj funkciji (Lee i sar., 2006; Lee i Nelson, 2012). Sa druge strane, vretenaste mezenhimske ćelije nisu apikalno-bazalno polarisane nego se kod njih razlikuju prednja i zadnja strana ćelije i ne formiraju regularne slojeve ćelija, već obrazuju strukture nepravilnog oblika koje nisu uniformne po sastavu ili gustini (Lee i sar., 2006). S' obzirom da ne formiraju specijalizovane čvrste međućelijske adhezione komplekse, adhezija između mezenhimskih ćelija je manje snažna nego između epitelnih ćelija, obezbeđujući im povećanu sposobnost migacije (Lee i sar., 2006). Migracija mezenhimskih ćelija se mehanistički razlikuje od kretanja epitelnih ćelija. Epitelne ćelije migriraju zajedno u formi kontinuiranog sloja, dok mezenhimske ćelije lako migriraju, bilo individualno, bilo kolektivno, formirajući lanac migrirajućih ćelija i kontaktirajući sa susednim mezenhimskim ćelijama samo preko fokalnih adhezija (Thiery i Sleeman, 2006; Lee i Nelson, 2012; Lu i Kang, 2019). Inicijalan korak procesa EMT predstavlja narušavanje epitelnih međućelijskih veza, nakon čega dolazi do reorganizacije citoskeletne arhitekture i apikalno pozicioniranih kompleksa polarnosti (Xu i sar., 2009; Lamouille i sar., 2014). Epitelna ćelija menja oblik, izdužuje se, dolazi do formiranja mebranskih protruzija - lamelipodija, filopodija i invadopodija i uspostavljanja razlika u prednjoj i zadnjoj strani ćelije što sve za posledicu ima sticanje sposobnosti usmerenog kretanja (Lamouille i sar., 2014). Ćelija zadobija mezenhimski fenotip eksprimiranjem adhezionih molekula i citoskeletnih proteina karakterističnih za mezenhimske ćelije i povećanom sintezom

proteina ECM. Do raslojavanja ćelija i napuštanja epitelne struktura dolazi zbog povećane ekspresije i aktivnosti MMP koje omogućavaju ćeliji da degraduje ECM obezbeđujući invazivno ponašanje (Xu i sar., 2009). Na kraju procesa EMT dolazi do formiranja aktinskih stres vlakana usidrenih u fokalne adhezione komplekse i povećane kontraktilnosti ćelije (Lamouille i sar., 2014). Takođe, ćelije koje prolaze kroz proces EMT stiču rezistenciju na senescenciju i apoptozu (Thiery i sar., 2009).

### 1.3.2. Klasifikacija procesa EMT

Nakon završetka razvića mezenhimske ćelije u epitelnim tkivima imaju potpunu ulogu dok epitelne ćelije uglavnom obavljaju različite specijalizovane funkcije, zbog čega je i pretpostavljeno da je kod adulta stanje terminalne diferencijacije epitelne ćelije neophodno i trajno (Kalluri i Neilson, 2003; Kalluri i Weinberg, 2009). Ipak, postojanje postnatalne dediferencijacije epitelne ćelije tokom tkivne morfogeneze (razvića mlečnih žlezda), popravke (zarastanja rana) i patogeneze nekih bolesti (kancera i fibroze tkiva), ukazalo je na postojanje plastičnosti epitelne ćelije i u adultnim tkivima (Lee i Nelson, 2012). Tako se proces EMT sreće u tri različita biološka konteksta koji dovode do veoma različitih funkcionalnih posledica i danas predstavlja priznat mehanizam za rasejavanje ćelija u embrionu, formiranje mezenhimske ćelije u povređenim tkivima i uspostavljanje invazivnog i metastatskog ponašanja epitelne ćelije (Kalluri i Neilson, 2003; Kalluri i Weinberg, 2009).

**EMT tipa 1** se javlja kod sisara tokom implantacije embriona u uterus, tokom gastrulacije kod mnogih metazoa i tokom formiranja nervne kreste svih kičmenjaka (Thiery i sar., 2009). Tokom implantacije embriona ćelije trofoektoderma ulaze u proces tranzicije i dovode do usidravanja placente u endometrijum (Pijnenborg i sar., 1980). U samom embrionu tokom gastrulacije proces EMT je uključen u nastanak tri klicina lista prilikom čega deo ćelija epiblasta prolazi proces EMT formirajući mezoderm i endoderm, dok od preostalih ćelija epiblasta nastaje ektoderm (Acloque i sar., 2009). Nakon gastrulacije, mezenhimske ćelije ranog mezoderma procesom MET, formiraju notohordu, somite, prekursore urogenitalnog sistema i somatopleure i splanhopleure (Thiery i sar., 2009). Da bi došlo do finalne diferencijacije specijalizovanih ćelijskih tipova i definisanja finalne arhitekture različitih tkiva i organa, sve prolazne epitelne strukture, izuzev notohorde, se kasnije remodeluju sukcesivnim rundama procesa EMT i MET (Pérez-Pomares i Muñoz-Chápuli, 2002; Acloque i sar., 2009; Thiery i sar., 2009). Tkiva endoderma, pankreasni pupoljak i divertikulum jetre prolaze kroz morfološke promene slične sekundarnom procesu EMT (Johansson i Grapin-Botton, 2002; Tanimizu i Miyajima, 2007), dok se srce formira kroz tri sukcesivna ciklusa (Nakajima i sar., 2000). Smatra se da je važnost procesa EMT za razviće i evoluciju embriona viših kičmenjaka ogromna, s' obzirom da je ovaj proces omogućio filumu hordata da evoluiraju dalje od svoje predačke epitelne arhitekture prisutne kod amfioksusa (Hay, 2005).

**EMT tipa 2** uključuje tranziciju epitelne ćelije u miofibroblaste tokom reparativne i progresivne fibroze (Tennakoon i sar., 2015). U odnosu na fibroblaste koji su zaduženi za održavanje homeostaze vezivnog tkiva, miofibroblasti se karakterišu većim stepenom proliferacije, migracije, ekspresije inflamatornih i antiinflamatornih citokina i drugih medijatora, faktora rasta, pojačanom produkcijom ECM i proteaza i prisustvom kontraktilnih snopova mikrofilamenata u citoplazmi (Desmoulière i sar., 2005; Guarino i sar., 2009; Fintha i sar., 2019). Miofibroblasti su retko prisutni u normalnom tkivu izuzev u nekim specijalizovanim regionima (Hinz i sar., 2007), ali se nakon povrede pojavljuju de novo u velikom broju, omogućavajući ponovno uspostavljanje integriteta povređenog tkiva, pri čemu postepeno nestaju nakon rezolucije

inflamacije i završene popravke (Hinz i sar., 2012). U normalnim fiziološkim uslovima reepitelizacija je omogućena konverzijom keratinocita na obodu rane iz sedentarnog u migratorno stanje, prilikom čega ove ćelije stiču pokretljivost uz istovremeno održavanje labavih međućelijskih kontakata (Thiery i sar., 2009). Takođe, pokazano je i da tokom svakog menstrualnog ciklusa, prilikom postovulatornog zarastanja rana, epitel na površini jajnika prolazi procese slične procesu EMT (Ahmed i sar., 2006). S druge strane, tokom progresivne fibroze proces EMT se nastavlja zbog prisustva hronične inflamacije i opstanka miofibroblasta koji putem stvaranja prekomerne količine ECM dovode do destrukcije tkiva i do gubitka funkcije pogođenog organa (López-Novoa i Nieto, 2009; Hinz i sar., 2012). Nekada se smatralo da miofibroblasti nastaju isključivo patološkom aktivacijom intersticijalnih fibroblasta ali su istraživanja pokazala da progenitori miofibroblasta uključuju i epitelne i endotelne ćelije, fibrocite i različite mezenhimske ćelije povezane sa krvnim sudovima kao što su pericite, adventicijalne i mezenhimske stem ćelije (Di Carlo i Peduto, 2018). Pokazano je da EMT tipa 2 doprinosi progresivnoj fibrozi bubrega, tiroidne žlezde, jetre, pluća, različitih delova oka, kao i reumatskim bolestima (Kim i sar., 2006; Saika i sar., 2008; Guarino i sar., 2009; Fintha i sar., 2019).

**EMT tipa 3** je najintenzivnije izučavan u karcinomima, gde zadobijanje mezenhinskog fenotipa omogućava neoplastičnim ćelijama da izvrše lokalnu invaziju sa mesta primarnog tumora, intravazaciju u krvne sudove, translokaciju kroz cirkulaciju, ekstravazaciju u parenhim udaljenih tkiva i preživljavanje u formi mikrometastatskih depozita (Thiery i sar., 2009; Mittal, 2018; Zhang i Weinberg, 2018; Lu i Kang, 2019). Takođe, u određenim ćelijskim kontekstima, aktivacijom procesa MET dolazi do vraćanja epitelnih osobina što omogućava nastanak makroskopskih metastaza i označeno je kao proces kolonizacije. Dugo vremena je bilo teško razlikovati pojedinačne mezenhimske ćelije nastale tranzicijom epitelnih ćelija tumora od ćelija strome i drugih fibroblasta asociiranih sa tumorom, prvenstveno zbog činjenice da se proces EMT u tkivu tumora ne odigrava kod svih ćelija (Nieto i sar., 2016). Tako, ćelije na invazivnom frontu tumora prolaze tranziciju i u najvećoj meri zadobijaju mezenhimske odlike, dok solidna masa tumora predominantno ostaje epitelnog fenotipa i ne podleže procesu EMT, pri čemu se, u zavisnosti od tipa tumora, u njegovom tkivu formira manje ili više strm gradijent fenotipski i funkcionalno različitih ćelija. Osim invazivno-metastatske kaskade, proces EMT ima ulogu i u drugim procesima koji imaju terapeutske implikacije kao što su zadobijanje osobina karakterističnih za stem ćelije, a koje omogućavaju dugotrajan opstanak tumora, rezistencija tumorskih ćelija na apoptozu i senescenciju, izbegavanje mehanizama kojima imunski sistem prepoznaje neoplastične ćelije, uspostavljanje i održavanje imunosupresivnog i inflamatornog okruženja i rezistencija ćelija tumora na hemoterapiju i imunoterapiju (Thiery i sar., 2009).

Iako ove tri klase procesa EMT dovode do veoma različitih funkcionalnih posledica, još uvek je nejasno koji su signali specifični za određene podtipove. Ipak, sva tri podtipa procesa EMT mogu biti pokrenuta i regulisana zajedničkim setom stimulusa i kod svih dolazi do aktivacije istih puteva signalne transdukcije, istih transkripcionih faktora i post-transkripcionih regulatornih molekula (Lee i Nelson, 2012).

### **1.3.3. Biomarkeri procesa EMT**

Predloženi su brojni biomarkeri koji bi služili za definisanje procesa EMT, iako promene koje se događaju tokom tranzicije nisu uvek identične i mogu biti određene integracijom brojnih ekstraćelijskih signala (Lee i Nelson, 2012). Smatra se da set makromolekula prisutan u ćeliji u određenom vremenskom trenutku definiše njen identitet. Ipak, ova definicija ne uzima u obzir mogućnost da ćelije sa identičnim obrascem ekspresije gena u određenom vremenskom trenutku

mogu različito da odgovore na spoljašnji stimulus ili da se spontano diferenciraju zbog prisustva epigenetičkih i drugih faktora. Dalju komplikaciju predstavlja gubitak prostorne pozicije ćelija i gubitak signala poreklom od komponenti ECM i drugih ćelija koji mogu biti važni u održavanju specifičnog ćelijskog identiteta. Kao posledica ovih faktora, određivanje ćelijskog identiteta i odnosa ćelijskih loza je naročito izazovno kada su u pitanju ćelije koje čine solidna tkiva (Lynch i Watt, 2018).

Ono što dodatno otežava praćenje procesa EMT korišćenjem specifičnih biomarkera, je saznanje da se ćelije tokom tranzicije kreću kroz reverzibilan spektar različitih intermedijarnih, hibridnih stanja koja leže između potpuno epitelnog i potpuno mezenhinskog fenotipa (Nieto i sar., 2016; Sha i sar., 2019). Kompjutersko modelovanje, in vitro i in vivo studije ukazuju da broj intermedijarnih fenotipova može biti različit (Huang i sar., 2013; Tam i Weinberg, 2013; Zhang i sar., 2014; Grigore i sar., 2016; Sha i sar., 2019) zahvaljujući prisustvu kompleksne regulatorne mreže koja leži u osnovi odigravanja procesa EMT (Jolly i sar., 2015; Jia i sar., 2017; MacLean i sar., 2018). Postojanje intermedijarnih fenotipova sa morfološkim i/ili molekularnim karakteristikama epitelnih i mezenhinskih ćelija (Huang i sar., 2013; Nieto i sar., 2016) koje ukazuju na odigravanja delimičnog procesa EMT je primećeno tokom brojnih razvojnih faza, kao i tokom zarastanja rana, fibroze i kancera (Grande i sar., 2015; Lovisa i sar., 2015; Grigore i sar., 2016; Nieto i sar., 2016; Jolly i sar., 2019). Takođe, tokom rane faze tranzicije samo gubitak epitelnih svojstava ćelije može biti dovoljan da dovede do promena u ponašanju ćelija koje bi bilo bliže ponašanju ćelija mezenhinskog tipa (Huang i sar., 2012). Osim toga, pokazano je da čak i kada epitelna ćelija stekne odlike mezenhimske ćelije, i dalje postoji velika heterogenost među njima (Nieto i sar., 2016). Dokazi ukazuju i da intermedijarna stanja prisutna tokom procesa EMT ne moraju biti isključivo metastabilna već mogu biti i stabilna (Tam i Weinberg, 2013; Zadran i sar., 2014; Jolly i sar., 2016; Nieto i sar., 2016), kao i da u nekim slučajevima, delimičan proces EMT može predstavljati krajnju tačku tranzicije. Pokazano je da dediferencirane epitelne ćelije bubrega tokom bubrežne fibroze ne prolaze kompletan proces tranzicije nego ostaju integrisane u bubrežne tubule i putem produkcije parakrinih faktora doprinose regrutovanju i diferencijaciji miofibroblasta i makrofaga (Grande i sar., 2015; Lovisa i sar., 2015).

Konverzija epitelnih ćelija u ćelije sa mezenhinskim karakteristikama zahteva promene u morfologiji ćelija, njihovoj adheziji, migratornoj i invazivnoj sposobnosti, sintezi komponenti ECM i kontraktilnosti. Ove promene epitelnih ćelija tokom procesa EMT praćene su promenama u njihovom proteomu - smanjena je ekspresija gena čiji su proteinski produkti karakteristični za epitelne ćelije, dok su geni koji definišu mezenhinski fenotip aktivirani (Lamouille i sar., 2014), pa različiti proteini mogu biti upotrebljeni kao biomarkeri procesa EMT tokom različitih faza tranzicije.

Inicijalni korak EMT predstavlja narušavanje specijalizovanih proteinskih kompleksa na površini epitelnih ćelija koji učestvuju u formiranju međućelijskih veza i relokalizacija i/ili degradacija proteina koji ulaze u njihov sastav (Huang i sar., 2012; Lamouille i sar., 2014), uz istovremeno remećenje apikalnih kompleksa polarnosti i započinjanje reorganizacije citoskeleta u ćeliji (Xu i sar., 2009). Narušavanje subapikalnih čvrstih veza (lat. *zonula occludens*) je praćeno smanjenom ekspresijom **kludina** i **okludina** i redistribucijom proteina zonule okludens koja povezuje transmembranske proteine sa aktinskim citoskeletom (Huang i sar., 2012). Na bočnim stranama ćelija zbog represije gena za **dezmozoplakin** i drugih proteina dolazi do dezintegracije dezmozoma (lat. *macula adherens*) i njihovog razdvajanja od intermedijarnih filamenata (Xu i sar., 2009; Huang i sar., 2012), dok smanjenje nivoa **koneksina** ometa integritet pojasnih veza (Bax i sar., 2011). Iako smanjena ekspresija bilo kog proteina koji ulazi u sastav međućelijskih veza

epitelnih ćelija može predstavljati znak da je došlo do započinjanja tranzicije, smanjenje ekspresije **E-kadherina** koji učestvuje u formiranju pojasnih veza (lat. *zonula adherens*) smatra se prototipskim markerom sva tri tipa procesa EMT (Kalluri i Neilson, 2003; Zeisberg i Neilson, 2009; Lee i Nelson, 2012). Ovi molekuli sastoje se od N-terminalnog vanćelijskog regiona zaduženog za homotipske interakcije sa ektodomenima E-kadherina na susednim ćelijama, transmembranskog regiona i C-terminalnog unutarćelijskog regiona (Shapiro i Weis, 2009). Citoplazmatični domen E-kadherina interaguje sa kateninima koji se sa druge strane vezuju za aktinski citoskelet, zbog stabilizacije međućelijske adhezije (Xu i sar., 2009). Upravo zbog toga gubitak ekspresije E-kadherina, osim što dovodi do promena u adheziji između epitelnih ćelija, dovodi i do poremećaja u prenosu signala unutar ćelije i promovisanja procesa EMT (Kalluri i Neilson, 2003; Zeisberg i Neilson, 2009) preko oslobađanja **β-katenina**, koji predstavlja ključnu komponentu WNT (engl. *wingless-related integration site*) signalnog puta. β-katenin potom prelazi u jedro i funkcioniše kao transkripcioni koaktivator učestvujući u regulaciji ekspresije gena povezanih sa procesom EMT, pa njegova nuklearna lokalizacija takođe predstavlja biomarker odigravanja sva tri tipa tranzicije (Kalluri i Neilson, 2003; Zeisberg i Neilson, 2009; Lee i Nelson, 2012).

Represija gena koji kodiraju za proteine koji učestvuju u formiranju međućelijskih veza sprečavajući njihovo *de novo* formiranje i dovodeći do narušavanja integriteta epitela (Peinado i sar., 2007) istovremeno je praćena aktivacijom gena čiji proteinski produkti učestvuju u stimulisanju adhezije između mezenhimskih ćelija i povećanju pokretljivosti (Lamouille i sar., 2014).

„Promena“ kadherina (engl. *cadherin switch*), odnosno promene u nivou ekspresije različitih kadherina, sve češće se koriste kao marker procesa EMT (Zeisberg i Neilson, 2009; Lee i Nelson, 2012). Posebno je značajna promena E-kadherina u neuralni **N-kadherin** koji se normalno eksprimira u različitim ne-epitelnim tipovima ćelija kao što su nervne ćelije, ćelije endotela, ćelije strome i osteoblasti (Acloque i sar., 2009; Loh i sar., 2019). Tokom promene E-kadherina u N-kadherin, ćelije u tranziciji preko slabije homotipske interakcije između N-kadherina stiču afinitet za mezenhimске ćelije i lakše migriraju (Theveneau i Mayor, 2012; Lamouille i sar., 2014; Loh i sar., 2019). Povećana ekspresija N-kadherina je prisutna tokom embrionalnog razvića, kod različitih kancera i fibroznih poremećaja (Gheldof i Berx, 2013; Rout-Pitt i sar., 2018; Loh i sar., 2019), dok je kod EMT tipa 2 značajna i promena E-kadherina u **OB-kadherin** (Strutz i sar., 2002). Pokazano je da se u fibroznom tkivu N-kadherin eksprimira u proto-miofibroblastima, dok kod diferenciranih miofibroblasta postepeno biva zamenjen OB-kadherinom koji u populaciji ovih ćelija ima ulogu u koordinisanju kontrakcije (Hinz i sar., 2004; Hinz, 2007). Ipak, s' obzirom da je i OB-kadherin eksprimiran u različitim grupama ćelija mezenhimskog porekla, ne može se smatrati jedinstvenim površinskim markerom miofibroblasta (Hinz, 2007).

Povećanoj pokretljivosti ćelija tokom procesa EMT doprinose i promene u ekspresiji gena koji kodiraju proteine citoskeleta. Pokazano je da se tokom tranzicije menja sastav intermedijarnih filamenata pri čemu dolazi do smanjene ekspresije citokeratina karakterističnih za epitelne ćelije i povećane ekspresije **vimentina** karakterističnog za fibroblaste, endotelne, hematopoetske i glijalne ćelije (Guarino i sar., 2009; Huang i sar., 2012). Vimentin preko interakcije sa mikrotubulama i motornim proteinima dineinom i kinezinom povećava pokretljivost ćelija, dovodi do promena u njihovom obliku i adheziji, a utiče i na prenos unutarćelijskih signala i odgovor ćelija na mehanički stres (Mendez i sar., 2010). Vimentin se uobičajeno koristi kao biomarker odigravanja tranzicije tokom embriogeneze i progresije kancera (Zeisberg i Neilson, 2009; Lee i Nelson, 2012), ali je povećana ekspresija vimentina detektovana i u različitim fibroznim bolestima



i koristi se kao rani biomarker procesa EMT (Hackett i sar., 2009; Hoerster i sar., 2014; Zhang i sar., 2017; Fintha i sar., 2019).

**Fibronektin (FN)** je fibrilarni glikoprotein ECM koji posreduje u interakcijama ćelija sa ECM i ima važne uloge u adheziji, migraciji, rastu i diferencijaciji ćelija (Pankov i Yamada, 2002). Upotreba ćelijske forme fibronektina kao biomarkera procesa EMT je ograničena s' obzirom da ga eksprimiraju različite ćelije (White i sar., 2008; Zeisberg i Neilson, 2009; Lee i Nelson, 2012). Ipak, tokom zarastanja rana i fibrogeneze dolazi do eksprimiranja fetalne forme alternativno obrađenog transkripta fibronektina sačinjenog od ekstradomena ED-A FN, dok se tokom razvoja tumora i angiogeneze eksprimira alternativno obrađena fetalna forma sačinjena od ekstradomena ED-B FN (White i sar., 2008; Klingberg i sar., 2018; Walraven i Hinz, 2018; Lu i sar., 2019), pa detekcija ove dve forme fibronektina ukazuje na specifično odigravanje navedenih procesa. Tako, pokazano je da tokom evolucije granulacionog tkiva *in vivo* i nakon *in vitro* stimulacije ćelija TGF- $\beta$ 1 proteinom, depozicija ED-A FN prethodi ekspresiji  $\alpha$ -SMA od strane fibroblasta (Serini i sar., 1998), pri čemu ED-A FN, u većoj meri nego ED-B FN, ima ulogu u inkorporiranju velikog latentnog kompleksa u kome se nalazi vezan TGF- $\beta$ 1 u zreli ECM (Klingberg i sar., 2018).

U poslednjim fazama odigravanja procesa EMT, ćelije mogu povećati kontraktilnost ugradnjom  $\alpha$ -SMA u aktinska stres vlakna (Hinz i sar., 2012).  $\alpha$ -SMA izoforma aktina, eksprimirana u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama i mioepitelnim ćelijama, često je korišćena kao biomarker miofibroblasta (Hinz, 2007; Guarino i sar., 2009; Pakshir i Hinz, 2018), pri čemu se prisustvo ovog proteina smatra uznapređovalim stanjem tranzicije i ne očekuje se kod epitelnih ćelija koje tek ulaze u proces EMT (Zeisberg i Neilson, 2009). Ipak, skorašnja studija na tri mišja eksperimentalna modela fibroze organa pokazala je da korišćenje ovog proteina kao biomarkera procesa EMT u fibrozi može zavistiti od tipa tkiva, s' obzirom da  $\alpha$ -SMA ne eksprimiraju sve kontraktilne ćelije koje produkuju kolagen (Sun i sar., 2016).

#### **1.3.4. Signalni putevi uključeni u pokretanje i regulaciju procesa EMT**

Za započinjanje i regulaciju procesa EMT neophodno je prisustvo spoljašnjih signala koji aktivacijom unutarćelijskih signalnih puteva, često na kooperativan način, dovode do promena u ekspresiji ciljnih gena (Lamouille i sar., 2014). TGF- $\beta$  se smatra prototipskim citokinom koji dovodi do pokretanja procesa EMT zbog toga što različite izoforme TGF- $\beta$  svoj efekat ostvaruju u raznolikim ćelijskim kontekstima dok je pokretanje tranzicije od strane drugih induktora često varijabilno i u velikoj meri zavisi od konteksta (Xu i sar., 2009; Lee i Nelson, 2012).

##### **1.3.4.1. Signalni putevi pokrenuti TGF- $\beta$ proteinima**

Tri izoforme TGF- $\beta$  proteina (TGF- $\beta$ 1/2/3) zajedno sa pet aktivina i najmanje osam koštanih morfogenetičkih proteina (engl. *bone morphogenetic proteins* - BMP) spadaju u familiju TGF- $\beta$  proteina sačinjenu od 60 članova identifikovanih kod višćelijskih organizama (Feng i Derynck, 2005). Većina ovih sekretovanih polipeptida reguliše rast, proliferaciju i apoptozu ćelija, dok neki od njih imaju ulogu u diferencijaciji ćelija i tkiva, morfogenezi, održavanju hormonalne homeostaze, kontroli diferencijacije i funkcionisanja hematopoetskih i ćelija imunskog sistema. Shodno ovako širokom dijapozonu funkcija jasno je da disregulacija ekspresije TGF- $\beta$  proteina dovodi do poremećaja u razviću i nastanka različitih patoloških stanja (Xu i sar., 2012). TGF- $\beta$  proteini opisani su kao značajni regulatori procesa EMT tokom morfogeneze i migracije normalnih i ćelija kancera, a takođe su prepoznati i kao glavni pokretači fibroznih procesa u mnogim tkivima (Ellenrieder, 2008; López-Novoa i Nieto, 2009; Saika i sar., 2009; Lee i Nelson, 2012).

Pokazano je da se proces EMT pokrenut u odgovoru na TGF- $\beta$  proteine preferencijalno odigrava na mestima u tkivu gde je došlo do koncentracije mehaničkog stresa (Gomez i sar., 2010), što ukazuje da biološka dostupnost TGF- $\beta$  proteina nije regulisana samo otpuštanjem faktora rasta iz ćelija nego i ekstraćelijskim mehanizmima koji modulišu, inhibiraju, aktiviraju ili pojačavaju vezivanje ovih signalnih molekula za njihove receptore (Robertson i Rifkin, 2016). TGF- $\beta$  proteini se inicijalno translansiraju kao pro-proteini sačinjeni od faktora rasta i peptida latencije (engl. *latency-associated peptide* - LAP), koji se potom dimerizuju, savijaju i nakon formiranja disulfidnih veza između LAP i latentnog TGF- $\beta$  vezujućeg proteina (engl. *latent TGF- $\beta$ -binding protein* - LTBP), sekretuju iz ćelija u formi velikih latentnih kompleksa (Robertson i Rifkin, 2016). Kasnije se LAP proteini isecaju ali ostaju nekovalentno vezani za TGF- $\beta$  čineći mali latentni kompleks. Nakon sekrecije LTBP protein se vezuje za različite proteine ECM koji sekvstriraju latentni TGF- $\beta$  protein (Robertson i sar., 2015), dok ga aktivatori u vidu različitih bioloških, fizičkih i fizičko-hemijskih faktora (npr. pH), sa integrinima i proteazama kao najbolje okarakterisanim faktorima, ne oslobode (Robertson i Rifkin, 2016). Funkcionalni kompleks familije TGF- $\beta$  receptora na površini ćelija sastoji se od dva transmembranska serin-treonin kinazna TGF- $\beta$  receptora tipa I (T $\beta$ R-I) i dva transmembranska serin-treonin kinazna TGF- $\beta$  receptora tipa II (T $\beta$ R-II). Nakon vezivanja TGF- $\beta$ 1 i TGF- $\beta$ 3 za ektodomene T $\beta$ R-II homodimera i TGF- $\beta$ 2 za heterodimere sastavljene od oba tipa receptora, dolazi do formiranja i stabilizacije heterotetramernog kompleksa sačinjenog od dva receptora oba tipa (Feng i Derynck, 2005). U odgovoru na vezivanje liganada, kinaza T $\beta$ R-II fosforiliše konzervisanu sekvencu bogatu glicinom i serinom uzvodno od kinaznog domena T $\beta$ R-I što dovodi do konformacione promene T $\beta$ R-I i aktivacije kinazne aktivnosti koja započinje prenos signala preko unutarćelijskog kanonskog TGF- $\beta$  signalnog puta posredovanog SMAD proteinima (engl. *small mothers against decapentaplegic*) i nekanonskih TGF- $\beta$  signalnih puteva (Derynck i Zhang, 2003; Feng i Derynck, 2005).

#### 1.3.4.1.1. TGF- $\beta$ kanonski signalni put

Fosforilacija konzerviranog motiva na C-terminusu SMAD proteina aktiviranih receptorom (engl. *receptor-activated SMAD* - R-SMAD) - SMAD2/3 (u slučaju TGF- $\beta$  proteina) posredovana T $\beta$ R-I receptorom, kreira pSer-x-pSer motiv koga prepoznaje SMAD4, zajednički partner za sve R-SMAD proteine (Ross i Hill, 2008; Xu i sar., 2012). Zbog sekvence za lokalizaciju prisutne u SMAD4 proteinu, novonastali heterodimerni ili heterotrimerni kompleksi R-SMAD-SMAD4 prelaze u jedro gde se udružuju sa drugim regulatorima transkripcije i učestvuju u represiji ili aktivaciji ciljnih gena, odnosno tokom procesa EMT dovode do aktiviranja ekspresije transkripcionih faktora koji stimulišu tranziciju (Massagué i sar., 2005). N-terminalni domen je kod SMAD2/3 i SMAD4 proteina konzerviran i posreduje u vezivanju nastalih heterodimera ili heterotrimera za molekul dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) (Heldin i Moustakas, 2012). Struktura  $\beta$ -ukosnice insertuje se u veliki žleb molekula DNK i uspostavlja vodonične veze sa nukleotidima u okviru palindromske sekvence (CAGAC) nazvane Smad vezujući element (engl. *Smad binding element* - SBE), a u nekim slučajevima i sa „degenerisanim” SBE sekvencama ili regionima bogatim guaninom i citozinom (Shi i sar., 1998; Chen i sar., 2002; Massagué i sar., 2005). Vezivanje SMAD proteina za molekul DNK je niskog afiniteta pa visok afinitet Smad kompleksa za pojedinačne SBE prisutne u promotorskim regionima ciljnih gena obezbeđuje samo vezivanje njihovog C-terminalnog domena za specifične kofaktore (npr. FoxO3 i FoxO4) koji simultano prepoznaju sekvence odgovarajuće udaljenosti i orijentacije u blizini SBE (Derynck i Zhang, 2003; Massagué i sar., 2005; Shu i Lovicu, 2017). Na taj način partneri SMAD proteina prisutni u transkripcionim multiproteinskim kompleksima obezbeđuju njihovu specifičnost za ciljni gen, ali i specifičnost signalnog puta, tipa ćelija i, kroz uticaj na regrutovanje transkripcionih koaktivatora (npr. p300, CBP, P/CAF) ili korepresora (npr.

p107, HDAC4), specifičan transkripcioni efekat (Feng i Derynck, 2005; Massagué i sar., 2005; Xu i sar., 2012). Kanonski TGF- $\beta$  signalni put je regulisan putem negativnih povratnih sprega koje dovode do sprečavanja prenosa signala. Tako, inhibitorni SMAD proteini, SMAD6 i SMAD7, dovode do internalizacije i degradacije T $\beta$ R-I i putem kompeticije sprečavaju vezivanje R-SMAD proteina za receptor (Miyazono, 2009; Shu i Lovicu, 2017).

#### 1.3.4.1.2. TGF- $\beta$ nekanonski signalni putevi

Osim navedenog kanonskog TGF- $\beta$  signalnog puta, vezivanje TGF- $\beta$  proteina za receptore pokreće i različite signalne puteve nezavisne od aktivacije SMAD proteina, a koji doprinose procesu EMT u određenim tipovima ćelija. Među njima, mitogenom aktivirane protein kinaze (engl. *mitogen-activated protein kinase* - MAPK) ERK1/2 (engl. *extracellular signal-regulated kinases 1/2*), JNK (engl. *c-Jun N-terminal kinase*) i p38 MAP kinaze, fosfatidilinozitol-3 kinaza (PI3K) i RHOA (engl. *Ras homolog family member A*), RAC1 (engl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) i CDC42 (engl. *cell division cycle 42*) GTPaze imaju važnu ulogu u procesu EMT pokrenutom TGF- $\beta$  proteinima (Miyazono, 2009). Nakon vezivanja TGF- $\beta$ , T $\beta$ R-I može fosforilisati tirozin na adapterskom proteinu, kreirati mesto usidranja za GRB2 (engl. *growth factor receptor-bound protein 2*) i SOS (engl. *son of sevenless*) i pokrenuti RAS-RAF-MEK-ERK MAPK signalni put (Lee i sar., 2007). Preko posredne aktivacije uzvodne kinaze TAK1 (engl. *TGF $\beta$ -activated kinase*), aktivacija T $\beta$ R-I dovodi i do aktivacije p38 i JNK MAP kinaza (Sorrentino i sar., 2008; Lamouille i sar., 2014). TGF- $\beta$  aktivira PI3K/AKT signalni put i putem inhibicije aktivnosti GSK3 $\beta$  kinaze (engl. *glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ) i aktivacije mTORC (engl. *mammalian TOR complex*) i hnRNPE1 (engl. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1*) stimuliše sintezu proteina, povećanje veličine ćelije, pokretljivost i invazivnost i derepresiju translacije određenih transkripata dovodeći do pokretanja procesa EMT (Chaudhury i sar., 2010; Lamouille i sar., 2012) Takođe, TGF- $\beta$  kroz regulaciju RHOA, RAC i CDC42 GTPaza doprinosi narušavanju čvrstih međućelijskih veza, reorganizaciji aktina i formiranju lamelopodija i filopodija čime dovodi do reorganizacije citoskeleta i stimulisanja ćelijske pokretljivosti i invazivnosti (Lamouille i sar., 2014; Shu i Lovicu, 2017). Vezni region koji se nalazi između dva globularna domena R-SMAD proteina sadrži brojna serinska i treoninska konsenzusna mesta koja mogu biti fosforilisana od strane aktiviranih MAP i ciklin zavisnih kinaza (engl. *cyclin-dependent kinase* - CDK), čime je omogućena komunikacija i integracija različitih signalnih puteva pokrenutih vezivanjem TGF- $\beta$  proteina, pa balans između direktne aktivacije SMAD proteina i MAP kinaza često definiše odgovor ćelije na stimulaciju TGF- $\beta$  (Feng i Derynck, 2005; Massagué i sar., 2005).

#### 1.3.4.2. Ostali signalni putevi uključeni u pokretanje i regulaciju procesa EMT

WNT signalni put i signalni putevi nizvodno od receptora sa tirozin kinaznom aktivnošću (RTK) i integrina su neki od signalnih puteva koji, osim najbolje okarakterisanog TGF- $\beta$  signalnog puta, mogu dovesti do pokretanja procesa EMT. Tako, vezivanje WNT liganada za Frizzled receptore dovodi do pokretanja kanonskog **WNT signalnog puta** i stimulisanja tranzicije kroz inhibiciju GSK3 $\beta$  kinaze i stabilizaciju  $\beta$ -katenina, koji potom prelazi u jedro gde aktivira transkripcione faktore LEF1 (engl. *lymphoid enhancer-binding factor 1*) i TCF (engl. *T cell factor*) stimulišući ekspresiju gena koji favorizuju EMT (Niehrs, 2012; Lamouille i sar., 2014). WNT signalni put ukršta se sa TGF- $\beta$  signalnim putem na nivou interakcija kompleksa SMAD proteina sa TCF, LEF1 ili  $\beta$ -kateninom (Xu i sar., 2009). Takođe, fosforilacija GSK3 $\beta$  od strane AKT kinaze dovodi do ubikvitinacije i degradacije GSK3 $\beta$  i posledične stimulacije procesa EMT, dok fosforilacija SMAD proteina od strane GSK3 $\beta$  smanjuje njihovu stabilnost (Lamouille i sar., 2014). Do indukcije procesa EMT može doći i posredstvom još nekoliko faktora rasta kao što su **EGF**, **FGF**,

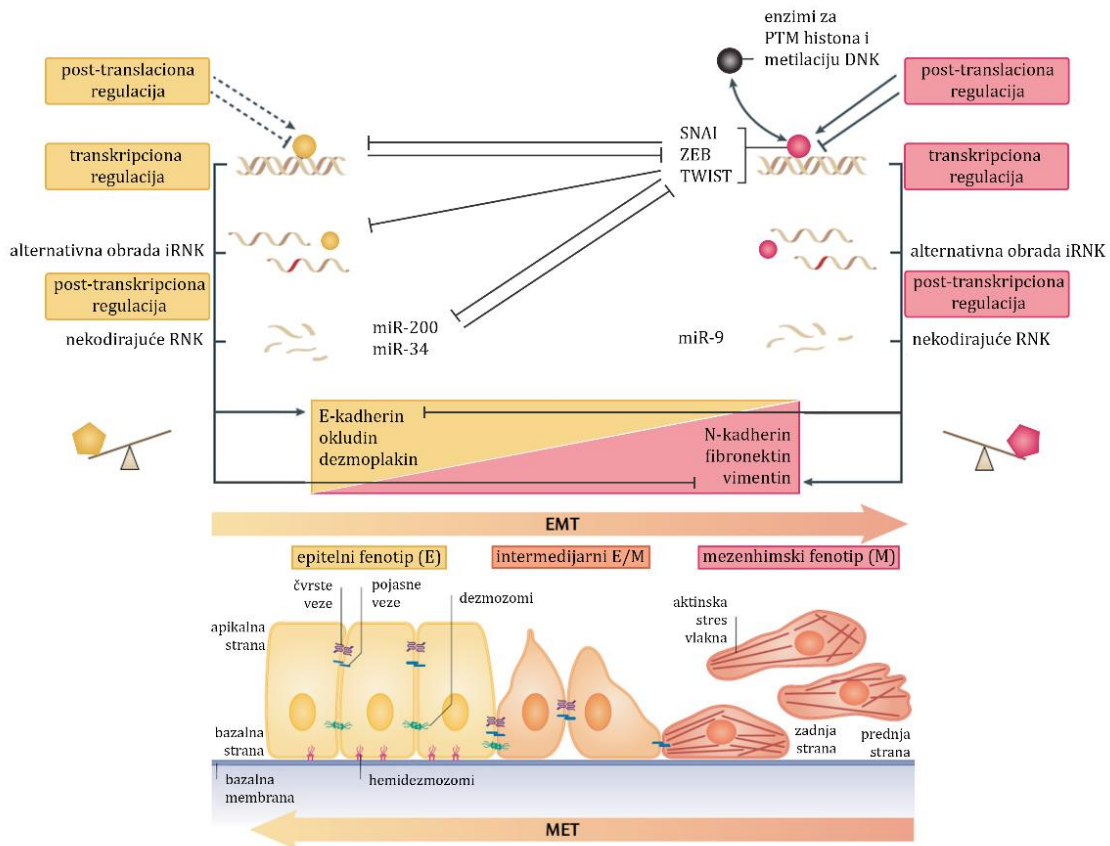
**PDGF**, faktor rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor* - **VEGF**), faktor rasta hepatocita (engl. *hepatocyte growth factor* - **HGF**) i insulinu sličan faktor rasta 1 (engl. *insulin-like growth factor 1* - **IGF1**). Indukciju procesa EMT ovi faktori rasta ostvaruju posredstvom vezivanja za RTK, dovodeći do njihove autofosforilacije i, u većoj meri nego TGF- $\beta$ , pokretanjem RAS-RAF-MEK-ERK MAPK signalne kaskade (Thiery i Sleeman, 2006; Lee i Nelson, 2012; Lamouille i sar., 2014). Jednom aktivirane ERK1 i ERK2 MAPK dovode do povećanja ekspresije transkripcionih faktora uključenih u proces EMT i regulatora ćelijske pokretljivosti i invazivnosti (Thiery i Sleeman, 2006). Takođe, aktivacija RTK dovodi i do pokretanja p38 MAPK i JNK signalnih puteva, kao i PI3K/AKT signalnog puta i signalnih puteva nizvodno od SRC kinaza (Lamouille i sar., 2014), pri čemu se mnogi od ovih nizvodnih medijatora udružuju sa signalima pokrenutim TGF- $\beta$  proteinima dovodeći do pokretanja EMT (Lee i Nelson, 2012). Osim biohemijskih signala za koje je već dugo vremena poznato da regulišu mnoge procese u ćeliji uključujući i proces EMT, sve je više dokaza da i mehanički aspekt, kao što su fizička sila ili rigidnost ECM krucijalno utiču na ponašanje i funkciju ćelije (Lee i Nelson, 2012). Tako integrini, vezivanjem za komponente ECM, detektuju **mehanički stres** nakon čega aktiviraju tirozinske kinaze fokalne adhezije (engl. *focal adhesion kinase* - FAK) i SRC (engl. *proto-oncogene Src kinase*) koje dalje pokreću GTPaze RAC1 i CDC42 dovodeći do suprimiranja aktinomiozinske kontraktilnosti i pojačanog nastanka protruzija, dok u kasnijim fazama preko aktivacije GTPaze RHOA dovode do formiranja stres vlakana smanjujući odnos monomera  $\alpha$ -SMA (G-aktina)/stres vlakna (F-aktina) i dovodeći do sazrevanja fokalnih adhezija (Huvenceers i Danen, 2009). Posledična kontrakcija ćelije i mehanotransdukcija u ćeliju od strane integrina dalje vode pojačavanju aktivacije RHOA i uspostavljanju pozitivne povratne sprege (Zent i Guo, 2018). Takođe, integrini preko kinaza SRC mogu aktivirati i PI3K/AKT signalni put i posledično RAS/MAPK signalnu kaskadu, i tako dovesti do tranzicije epitelnih u mezenhimalne ćelije (Lamouille i sar., 2014; Lee i Nelson, 2012; Zent & Guo, 2018).

## 1.4. Regulacija procesa EMT

Proces EMT je regulisan na više nivoa, pri čemu se bazičan nivo regulacije ogleda u aktivnosti grupe transkripcionih faktora povezanih sa EMT (ZEB, SNAIL i TWIST) (Lamouille i sar., 2014). Osim na transkripcionom, EMT je regulisan i na post-transkripcionom (alternativna obrada informacione ribonukleinske kiseline (iRNK) i nekodirajuće RNK od kojih mikro RNK (miRNK, miR) spadaju u najokarakterisanije) i post-translacionom (različite modifikacije proteina koje utiču na njihovu stabilnost i aktivnost) nivou (**Slika 1.2**).

### 1.4.1. Transkripcioni faktori uključeni u regulaciju procesa EMT

Promene u ekspresiji gena koje doprinose represiji epitelnog fenotipa i aktivaciji mezenhinskog fenotipa uključuju master regulatore - SNAIL, TWIST i ZEB transkripcione faktore. Njihova ekspresija je aktivirana rano tokom procesa EMT, pa ovi proteini imaju centralnu ulogu tokom razvića i nastanka fibroze ili kancera (Lamouille i sar., 2014). Kako ovi transkripcioni faktori imaju različite ekspresione profile, njihov doprinos procesu tranzicije zavisi od tipa ćelije ili tkiva, kao i signalnog puta koji dovodi do pokretanja tranzicije, mada se osnovni efekat manifestuje u transkripcionoj inhibiciji prototipskog adhezionog molekula E-kadherina (Thiery i sar., 2009; Lamouille i sar., 2014). Takođe, SNAIL, ZEB i TWIST često recipročno kontrolišu ekspresiju jedan drugog i funkcionalno kooperiraju u regulaciji ekspresije ciljnih gena (Peinado i sar., 2007), pri čemu isti transkripcioni faktor često može funkcionisati i kao represor i kao aktivator (de Craene i Berx, 2013).



**Slika 1.2. Regulacija procesa EMT.** Transkripcioni faktori koji učestvuju u pokretanju procesa EMT (SNAI, ZEB i TWIST) imaju centralnu ulogu u najbolje okarakterisanoj regulatornoj mreži koja kontroliše ekspresiju gena uključenih u tranziciju. Funkcija ovih proteina je pojačana njihovom bliskom saradnjom sa epigenetičkom mašinerijom koja obezbeđuje stabilnu represiju epitelnih karakteristika. Nekodirajuće RNK učestvuju u definisanju još jedne regulatorne mreže koja kontroliše proces EMT i obezbeđuje očuvanje epitelnog fenotipa putem formiranja negativnih povratnih sprega između članova familija miR-200 i miR-34 i transkripcionih faktora uključenih u pokretanje procesa EMT. Sa druge strane, miR-9 učestvuje u transkripcionoj represiji E-kadherina i ima ulogu u održavanju mezenhinskog fenotipa. U ostalim regulatornim mrežama koje se formiraju tokom procesa EMT, a koje nisu neposredna tema ove doktorske disertacije, učestvuju specifični faktori zaduženi za alternativnu obradu transkripata (iRNK), kao i faktori koji dovode do post-translacione regulacije različitih proteina. Čelije sa epitelnim fenotipom su apikalno-bazalno polarisane i povezane različitim međućelijskim vezama. Pokretanje procesa EMT dovodi do represije gena koji kodiraju za proteine povezane sa epitelnim fenotipom (žuti boks) i aktivacije ekspresije gena koji kodiraju za proteine povezane sa mezenhinskim fenotipom (rozi boks). Progresivan gubitak osobina karakterističnih za epitelne čelije je praćen sticanjem pojedinih osobina mezenhinskih čelija uz zadržavanje određenih epitelnih karakteristika (intermedijarni fenotip). U određenim slučajevima čelija može zadobiti kompletan set mezenhinskih osobina koji uključuje razliku između prednje i zadnje strane čelije, formiranje aktinskih stres vlakana, pokretljivost i invazivnost. Proces EMT se pokreće kada je balans regulatornih mreža narušen, dok stepen tranzicije zavisi od pomenosti balansa bliže jednoj ili drugoj strani. Osim toga, EMT predstavlja reverzibilan proces pa mezenhinske čelije mogu ponovo zadobiti epitelne karakteristike procesom MET. Preuzeto i modifikovano iz (de Craene i Berx, 2013; Dongre i Weinberg, 2019).

Kod kičmenjaka identifikovana su tri proteina koja pripadaju porodici Snail transkripcijskih faktora: **SNAI1**, **SNAI2** (poznat i kao SLUG) i **SNAI3**, koji sadrže karakterističan C-terminalni domen sa 4 do 6 cinkanih prstiju koji obezbeđuju specifično vezivanje za E-boks elemente (5'-CANNTG-3') na molekulu DNK (Peinado i sar., 2007; Xu i sar., 2009) i N-terminalni SNAG (Snail/Gfi) domen koji je esencijalan za nuklearnu lokalizaciju i represiju transkripcije (Grimes i sar., 1996). Indukcija ekspresije SNAI1 transkripcijskog faktora je zabeležena u svim proučavanim procesima EMT (Zeisberg i Neilson, 2009), dok je SNAI2 šire eksprimiran i njegova ekspresija je detektovana i nezavisno od procesa EMT (Hemavathy i sar., 2000; Barrallo-Gimeno i Nieto, 2005). Tako mišji embrioni koji ne eksprimiraju Snai1 ne uspeavaju da završe proces EMT i formiraju defektni mezodermalni sloj koji zadržava ekspresiju E-kadherina, dovodeći do smrti mutantnog embriona na nivou gastrulacije (Carver i sar., 2001), dok utišavanje ekspresije Snai2 u embrionu pileta dovodi do poremećaja na nivou mezoderma i neuspeha u migraciji ćelija nervne kreste (Nieto i sar., 1994). Osim TGF- $\beta$  proteina i SMAD3-SMAD4 kompleksa (Xu i sar., 2009), u zavisnosti od fiziološkog konteksta, indukciju ekspresije SNAI1 pokreće i aktivacija WNT i signalnih puteva nizvodno od RTK (Peinado i sar., 2007). Osim suprimiranja ekspresije E-kadherina, SNAI transkripcijski faktori dovode do smanjene ekspresije epitelnih biomarkera uključujući kladine, okludine, citokeratine, dezmozoplakin, plakofilin, dovode do narušavanja apikalnih kompleksa polarnosti, dok sa druge strane doprinose povećanoj ekspresiji mezenhimskih biomarkera uključujući fibronektin i N-kadherin, kolagen tip III i V i dovode do povećane ekspresije proteina uključenih u migraciju i invaziju ćelija, kao i transkripcijskih faktora TWIST, ID, ZEB1 i ZEB2. Takođe, utiču na povećanje inflamatornih citokina, a dovode i do inhibicije proliferacije ćelija putem supresije ciklin D proteina i CDK4. Istovremeno SNAI transkripcijski faktori utiču na povećano preživljavanje ćelija preko supresije kaspaza i drugih faktora uključenih u apoptozu (Kalluri i Neilson, 2003; Xu i sar., 2009; Zeisberg i Neilson, 2009; Lee i Nelson, 2012; Nieto i sar., 2016). SNAI1 i SNAI2 kooperiraju sa drugim regulatorima transkripcije kao što je SMAD3-SMAD4 kompleks da bi kontrolisali ekspresiju ciljnih gena (Vincent i sar., 2009). Post-translacione modifikacije pokrenute različitim signalnim putevima takođe kontrolišu aktivnost i stabilnost SNAI1 preko GSK3 $\beta$  kinaze koja fosforilacijom različitih aminokiselinskih ostataka SNAI1 dovodi do inaktivacije njegove transkripcijske aktivnosti, izlaska iz jedra i degradacije (Zhou i sar., 2004).

**ZEB1**, poznat i kao  $\delta$ EF1 ili AREB6 i **ZEB2**, poznat kao SIP1 (engl. *Smad-interacting protein 1*), su dva transkripcijska faktora kod kičmenjaka koja pripadaju ZEB porodici transkripcijskih faktora. Članovi ove porodice sadrže dva klastera cinkanih prstiju na C- i N-terminalnom kraju proteina čije istovremeno vezivanje za bipartitivne E-boksove obezbeđuje interakciju sa regulatornim sekvencama molekula DNK. Centralni region ZEB proteina sadrži domen za interakciju sa fosforilisanim R-SMAD proteinima, homeodomenu i domen za interakciju sa CtBP (engl. *C-terminal binding protein*) kofaktorima (Xu i sar., 2009). Represija transkripcije gena od strane ZEB1 i ZEB2 je omogućena prisustvom represornih motiva u centralnom homeodomenu i putem regrutovanja CtBP korepresornih proteina, dok interakcija ZEB1 sa koaktivatorima P/CAF i p300 histonskim acetiltransferazama omogućava ZEB1 proteinu da funkcioniše kao aktivator transkripcije (Postigo i sar., 2003; Peinado i sar., 2007). Ekspresija ZEB transkripcijskih faktora indukuje se u odgovoru na TGF- $\beta$  i WNT proteine kao i faktore rasta koji aktiviraju RAS/MAPK signalnu kaskadu (Lamouille i sar., 2014). Takođe, SNAI1 direktno (Wu i sar., 2017) ili u kooperaciji sa TWIST1 proteinom (Dave i sar., 2011a) dovodi do ekspresije gena za ZEB1. Osim suprimiranja ekspresije E-kadherina tokom procesa EMT (Peinado i sar., 2007b; Berx i van Roy, 2009), ZEB transkripcijski faktori dovode i do smanjene ekspresije kladina, proteina zonule okludens, plakofilina i proteina kompleksa apikalne polarnosti i povećane ekspresije proteina

karakterističnih za mezenhimske ćelije kao što su vimentin, N-kadherin, MMP (Xu i sar., 2009) i  $\alpha$ -SMA (Nishimura i sar., 2006). Takođe, učestvuju i u regulaciji proliferacije, apoptoze i senescencije (Vandewalle i sar., 2009). Ekspresija ZEB proteina je post-transkripciono reprimirana specifičnim mikroRNK (Xu i sar., 2009; Nieto i sar., 2016), dok post-translaciona sumoilacija ZEB2 promoviše njegovo zadržavanje u citoplazmi (Long i sar., 2005).

I članovi velike familije bHLH (engl. *basic helix-loop-helix*) transkripcionih faktora E12, E47, **TWIST1**, **TWIST2** i ID1, ID2, ID3 i ID4 uključeni su u proces EMT (Xu i sar., 2009). TWIST proteini, koji su uključeni u progresiju sva tri tipa procesa EMT (Lee i Nelson, 2012), sadrže konzervirani HLH motiv sačinjen od dva  $\alpha$ -heliksa razdvojena petljom, koji imaju ulogu u dimerizaciji i koji dovode do formiranja bipartitivnog domena koji se vezuje za E-boksove prisutne na molekulu DNK, kao i domen nazvan „Twist boks” koji može funkcionisati bilo kao represorni, bilo kao aktivatorski domen (Pei i sar., 2017). Izuzev SMAD3-SMAD4 kompleksa i nizvodni efektori drugih signalnih puteva aktiviraju ekspresiju TWIST proteina, pri čemu aktivnost ovih proteina u velikoj meri zavisi od sastava dimera (Lamouille i sar., 2014). TWIST1 i TWIST2 formiraju homodimere i heterodimere sa E12 ili E47 i na taj način učestvuju u regulaciji transkripcije, dok vezivanje za ID proteine kojima nedostaje domen za vezivanje za molekul DNK, dovodi do inhibicije funkcije TWIST proteina. Tako, represija ekspresije gena za ID od strane TGF- $\beta$  dovodi do derepresije TWIST transkripcionih faktora i njihove pojačane aktivnosti tokom procesa EMT (Kang i sar., 2003). TWIST proteini dovode do smanjene ekspresije epitelnih gena i aktivacije gena čiji su proteinski produkti specifični za mezenhimske ćelije (Peinado i sar., 2007; Lamouille i sar., 2014). Ektopična ekspresija TWIST1 ili TWIST2, osim smanjene ekspresije gena za E-kadherin, rezultuje smanjenim nivoom ekspresije okludina i kladina, ali i dovodi do povećanog nivoa ekspresije fibronektina, vimentina i N-kadherina i pospešuje migraciju i invazivno ponašanje ćelija (Xu i sar., 2009; Zeisberg i Neilson, 2009). Takođe, post-translaciona modifikacija u vidu fosforilacije od strane MAP kinaza povećava stabilnost i aktivnost TWIST1 transkripcionog faktora (Hong i sar., 2011).

#### 1.4.2. Epigenetička regulacija procesa EMT

Novija istraživanja su ukazala na značajnu uključenost epigenetičkih mehanizama u regulaciji ekspresije svih gena povezanih sa procesom EMT (Tam i Weinberg, 2013; Serrano-Gomez i sar., 2016). U širem smislu posmatrano epigenetika predstavlja most između genotipa i fenotipa - fenomen koji dovodi do varijacija u krajnjem ishodu genetički kodirane informacije bez promena u odgovarajućoj sekvenci molekula DNK. U užem smislu epigenetika može biti definisana kao izučavanje onih procesa koji omogućavaju nasleđivanje stabilnih promena u ekspresiji gena ili fenotipu ćelija, a koji se dešavaju bez ireverzibilnih promena u genetičkoj informaciji (Goldberg i sar., 2007; Zhang i Pradhan, 2014). Epigenetički mehanizmi su odgovorni za uspostavljanje, održavanje i reverziju metastabilnih transkripcionih stanja koja su fundamentalna za sposobnost ćelije da zapamti prethodne događaje, kao što su promene u spoljašnjim okruženju ili signali primljeni tokom razvića (Bonasio i sar., 2010). Reverzibilna priroda epigenetičkih modifikacija obezbeđuje mogućnost brze promene ekspresije brojnih gena karakterističnih za epitelne ili mezenhimske ćelije i uključena je u dinamične događaje koji se nalaze u osnovi metastabilnih ili stabilnih stanja tokom procesa EMT i MET (Kiesslich i sar., 2013; Tam i Weinberg, 2013; Nieto i sar., 2016; Pistore i sar., 2017), i kao takva predstavlja i polje terapijskog delovanja (Sun i Fang, 2017; Boulding i sar., 2015). Epigenom je kolektivni termin koji opisuje kompleksan i fleksibilan adaptivni biološki kod koji usmerava kako ćelija interpretira svoj genom (Mann i Mann, 2013). U najbolje opisane komponente epigenoma spadaju metilacija DNK molekula, post-translacione modifikacije histona i miRNK koje predstavljaju najpoznatiju klasu regulatornih nekodirajućih



RNK (Bonasio i sar., 2010; Zhang i Pradhan, 2014). Svaki od ovih epigenetičkih mehanizama zahteva postojanje precizno regulisane specifične mašinerije koja učestvuje u održavanju epigenetičkog pejzaža specifičnog za određeni tip ćelija i tkiva.

#### 1.4.2.1. Histonske modifikacije uključene u regulaciju procesa EMT

Iako dugi lanci polimera imaju visoku entropiju i prirodno teže nejneuređenijem stanju (Bloom i Joglekar, 2010), u ćeliji se molekul DNK obmotava oko oktamernih kompleksa sačinjenih od četiri para histonskih proteina (H2A, H2B, H3 i H4), formirajući nukleozom na svakih  $200 \pm 40$  baznih parova (bp) (Lawrence i sar., 2016; Skrypek i sar., 2017; Morgado-Pascual i sar., 2018). Osim njihove uloge u organizovanju i pakovanju velike količine genetičke informacije u formu hromatina, nukleozomi predstavljaju prirodnu barijeru za regulatorne proteine uključujući i transkripcione faktore koji zahtevaju pristup DNK, čime osobine nukleozoma, njihove međusobne interakcije i rezultujući nivo kompaktnosti hromatina jako utiču na nivo transkripcije i ekspresije gena (Skrypek i sar., 2017). Post-translacione modifikacije (PTM) histonskih proteina, posebno njihovih N-terminalnih domena (tzv. histonskih repova) (Lawrence i sar., 2016), imaju osnovnu ulogu u uspostavljanju strukture hromatina putem formiranja heterohromatina, koji kao kompaktniji onemogućava sklapanje transkripcione mašinerije i euhromatina koji je manje kompaktan i povezan sa aktivnom transkripcijom gena (Morgado-Pascual i sar., 2018). Osim direktnog uticaja na interakciju histona i molekula DNK, PTM histona utiču na ekspresiju gena i indirektno preko regrutovanja kompleksa za remodelovanje hromatina ili RNK II polimeraznog kompleksa (Bannister i Kouzarides, 2011). Najbolje izučene PTM histona uključuju acetilaciju i metilaciju aminokiselinskih ostataka lizina (K) i metilaciju aminokiselinskih ostataka arginina (R) (Zhang i Pradhan, 2014; Suriyamurthy i sar., 2019). U zavisnosti od specifičnih aminokiselinskih ostataka lizina ili arginina koji su metilovani, metilacija histona može voditi aktivaciji (H3K4me3) ili represiji (H3K27me3, H3K9me2/3 i H4K20me3) transkripcije, dok acetilacija histona najčešće koreliše sa transkripcionom aktivnošću s' obzirom da dovodi do smanjenja pozitivnog naelektrisanja lizina i smanjenog afiniteta ka negativno naelektrisanjoj okosnici molekula DNK što olakšava otvaranje hromatina (Bannister i Kouzarides, 2011). Za uvođenje i uklanjanje histonskih modifikacija odgovorni su enzimi histonske metiltransferaze (engl. *histone methyltransferases* - HMT) ili histonske acetiltransferaze (engl. *histone acetyltransferase* - HAT) i histonske deacetilaze (engl. *histone deacetylases* - HDAC) ili histonske demetilaze (engl. *histone demethylases* - HDM) (Zhang i Pradhan, 2014). Treću grupu čine enzimi koje sadrže PHD (engl. *plant homeodomain*), tudor-, hromo- ili bromodomene, koji se vezuju za modifikovane histone i odgovorni su za prepoznavanje epigenetičke informacije (Morgado-Pascual i sar., 2018; Suriyamurthy i sar., 2019).

Za mnoge od ovih enzima je pokazano da regulišu ekspresiju transkripcionih faktora uključenih u pokretanje EMT (SNAIL, ZEB i TWIST) (Massagué, 2012; Ramadoss i sar., 2012; Tan i sar., 2015), kao i da direktno ili indirektno interaguju sa njima i na taj način učestvuju u regulaciji gena koji kodiraju za biomarkere ovog procesa (Lamouille i sar., 2014; Lin i sar., 2014; Skrypek i sar., 2017). Tako, nekoliko studija koje su pratile epigenetičke promene na nivou čitavog genoma tokom procesa EMT pokrenutog u odgovoru na TGF- $\beta$  ili tokom pojačane ekspresije transkripcionih faktora uključenih u pokretanje tranzicije je pokazalo da dolazi do promena strukture hromatina koje utiču na ekspresiju velikog broja gena u ćeliji (McDonald i sar., 2011; Malouf i sar., 2013; Tiwari i sar., 2013; Lu i sar., 2019; Lin i Wu, 2020). Te promene najčešće uključuju gubitak aktivnih i sticanje represivnih histonskih modifikacija u hromatinskim domenima koji sadrže gene uključene u regulaciju epitelnog stanja ili gubitak represivnih i zadobijanje aktivnih obeležja hromatina povezanih sa aktivacijom mezenhimskih gena (Tam i Weinberg, 2013). Uočeno je i postojanje gena sa „bivalentnim“ obeležjima u promotorima



(istovremeno prisustvo H3K27me3 i H3K4me3) koji omogućavaju njihovu veoma brzu represiju ili aktivaciju pod uticajem vanćelijskih i/ili unutarćelijskih signala, doprinoseći reverzibilnoj prirodi procesa EMT (Ke i sar., 2010; Tam i Weinberg, 2013; Lin i sar., 2014; Skrypek i sar., 2017).

#### 1.4.2.2. Metilacija DNK uključena u regulaciju procesa EMT

Metilacija DNK se kod sisara najčešće odigrava u simetričnom kontekstu CpG (citozin-fosfodiesteraska veza-guanin) dinukleotida kovalentnim dodavanjem metil grupe (-CH<sub>3</sub>) na ugljenik na petoj poziciji u okviru pirimidinskog prstena citozina (5-metilcitozin, 5mC) ne ometajući bazno sparivanje (Cardenas i sar., 2014). Metilacija DNK učestvuje u regulaciji transkripcije gena i predstavlja najbolje okarakterisanu epigenetičku modifikaciju, iako glavni target metilacije DNK u sisarskim genomima zapravo ne predstavljaju geni nego transpozoni (Greenberg i Bourc'his, 2019). Ovaj epigenetički mehanizam je uključen u regulaciju mnogih procesa u ćeliji, kao što su transkripcija različitih gena, embrionalno razviće, uspostavljanje strukture hromatina, inaktivacija X hromozoma, genomski imprinting i stabilnost hromozoma, dok su poremećaji u metilacionim profilima povezani sa mnogim bolestima (Robertson, 2005). Metilacija DNK je posredovana familijom enzima DNK metiltransferaza (engl. *DNA methyltransferases* - DNMT) koje katalizuju prenos metil grupe sa S-adenozil-L-metionina (SAM) na citozin (Bestor, 2000; Klose i Bird, 2006). Među njima, DNMT1 spada u grupu DNMT za održavanje koje pokazuju preferenciju ka hemimetilovanoj DNK i na taj način održavaju metilacione obrasce u somatskim ćelijama nakon svake runde replikacije DNK. DNMT3A i DNMT3B spadaju u grupu *de novo* DNMT koje inkorporiraju prethodno nepostojeće 5mC u genom i odgovorne su za globalnu metilaciju genoma tokom razvića germinativnih ćelija i ranog embrionalnog razvića. Do demetilacije DNK može doći pasivno usled odsustva aktivnosti DNMT1 (Gehring i sar., 2009) ili aktivno kao rezultat serije oksidativnih reakcija tokom kojih enzimi TET (engl. *ten-eleven translocator*) familije proteina (TET1/2/3) katalizuju prelazak 5mC preko 5-hidroksimetilcitozina (5hmC) do 5-formilcitozina (5fC) i 5-karboksilcitozina (5caC) koji bivaju isečeni iz lanca DNK aktivnošću timin DNK glikozilaze i zamenjeni nemetilovanim citozinima (Wu i Zhang, 2017).

U humanim somatskim ćelijama zastupljenost 5mC je oko 1%, što ukazuje da je čak 70% do 80% svih CpG dinukleotida humanog genoma metilovano (Ehrlich i sar., 1982; Li i Zhang, 2014). Ipak, pokazano je da sisari imaju skoro pet puta nižu frekvenciju pojavljivanja CpG dinukleotida u genomu nego što bi to bilo očekivano na osnovu slučajnosti (Bird i Taggart, 1980; Cooper i Krawczak, 1989; Larsen i sar., 1992), za šta bi mogla biti odgovorna česta spontana deaminacija 5mC i nastanak timina koji se tokom bazne ekscizije reparacije (engl. *base excision repair* - BER) manje efikasno uklanja nego uracil nastao deaminacijom nemetilovanog citozina (Bird i Taggart, 1980; Lindahl, 1982; Holliday i Grigg, 1993). Takođe, regioni bogati CpG dinukleotidima nazvani CpG ostrvca nisu ravnomerno raspoređeni u genomu kičmenjaka već se često nalaze na 5' kraju gena, u regionu promotora i prvog kodirajućeg egzona (Gardiner-Garden i Frommer, 1987; Larsen i sar., 1992; Bird, 2002; Medvedeva i sar., 2010). Analize su pokazale da 67%-100% gena eksprimiranih u svim ćelijama, 61%-100% gena široko eksprimiranih i 25%-45% gena specifičnih za određena tkiva u humanom genomu imaju CpG ostrvce koje obuhvata mesto početka transkripcije (engl. *transcription start site* - TSS) (Larsen i sar., 1992; Jiang i sar., 2007). Odsustvo metilacije ovih regiona u germinativnim ćelijama i posledično odsustvo deaminacije 5mC objašnjava visok sadržaj CpG dinukleotida u CpG ostrvcima u odnosu na ostatak genoma (Bird i sar., 1985; Antequera i Bird, 1993). Takođe CpG ostrvca ostaju nemetilovana i u adultnim somatskim ćelijama posebno u okviru promotora gena (Bird i sar., 1985; Jones, 2012), izuzev gena na inaktiviranom X hromozomu, imprintovanih gena i gena specifičnih za germinativne ćelije (Greenberg i Bourc'his, 2019). Ipak *de novo* metilacija u somatskim ćelijama dešava se tokom

starenja, razvoja kancera i drugih različitih bolesti (Bird, 2002; Jin i Liu, 2018). CpG ostrvca nisu prisutna samo u 5' regionima gena nego su identifikovana i unutar intragenskih i intergenskih regiona, kao i u 3' regionima gena (Jones, 1999; Attwood i sar., 2002), pri čemu se najčešće preklapaju sa egzonima, ali se često pružaju i 200 bp unutar granica introna (Lister i sar., 2009; Laurent i sar., 2010; Medvedeva i sar., 2010). Postoje podaci i da se većina tkivno specifične metilacije DNK odigrava ne na ostrvcima nego u regionima udaljenim oko 2000 bp od ostrvaca nazvanim obale, čiji je nivo metilacije u direktnoj korelaciji sa nivoom ekspresije gena (Irizarry i sar., 2009).

Odnos između metilacije DNK i ekspresije je složen i u bliskoj je vezi sa lokalizacijom metilovanih elemenata. Represivna uloga metilacije DNK u transkripciji je pokazana korelacijom između metilacije DNK i utišavanja gena koja je jača kako raste gustina CpG dinukleotida u promotoru (M. Weber i sar., 2007; Jones, 2012; Greenberg i Bourc'his, 2019). Metilacija DNK reguliše ekspresiju gena direktno, inhibicijom vezivanja transkripcionih faktora za svoja vezujuća mesta. Tako je pokazano da su u odnosu na ostatak genoma sisara mesta vezivanja transkripcionih faktora obogaćenija CpG dinukleotidima (Deaton i Bird, 2011), kao i da je nivo vezivanja 22% humanih transkripcionih faktora za DNK smanjen ukoliko su njihova mesta vezivanja metilovana (Yin i sar., 2017). Metilacija DNK može regulisati ekspresiju gena i indirektno, vezivanjem proteina koji imaju sposobnost prepoznavanja 5mC (engl. *methyl-CpG-binding protein* - MBP) i koji dovode do regrutovanja različitih transkripcionih korepresora da bi utišali transkripciju i modifikovali okolni hromatin, obezbeđujući vezu između metilacije DNK i remodelovanja i modifikacije hromatina (Jones i Takai, 2001; Ren i sar., 2018). Takođe, pokazano je da se kod sisara stepen metilacije prvog kodirajućeg egzona nalazi u većoj negativnoj korelaciji sa nivoom ekspresije analiziranih gena u odnosu na stepen metilacije promotorskog regiona uzvodno od TSS (Brenet i sar., 2011), što se objašnjava onemogućavanjem efikasne inicijacije transkripcije ili zaustavljanem RNK polimeraze II. Ipak, metilacija DNK u okviru intragenskih regiona, u manjoj je meri povezana sa inhibicijom transkripcije, s' obzirom da je u humanom genomu često prisutna metilacija DNK intragenskih regiona visoko ekspimiranih gena (Bender i sar., 1999; Ball i sar., 2009; Lister i sar., 2009; Varley i sar., 2013). Uloga metilacije DNK u okviru tela gena može imati ulogu u utišavanju repetitivnih elemenata DNK (retrovirusi, LINE1 elementi, Alu elementi), može učestvovati u regulaciji aktivnosti nekodirajućih RNK (Yoder i sar., 1997), regulaciji alternativne obrade iRNK (Majewski i Ott, 2002; Shukla i sar., 2011; Gelfman i sar., 2013; Shayevitch i sar., 2018) ili funkcionisati kao mehanizam kontrolisanja transkripcije sa alternativnih promotora (Maunakea i sar., 2010).

Promene u obrascima metilacije DNK najčešće su povezivane sa gubitkom imprintinga, ekspresijom zaključanih gena i sa nastankom kancera, ali su njihovi poremećaji pokazani i u mnogim drugim bolestima (Das i Singal, 2004). Ukupan značaj metilacije DNK za proces EMT je potvrđen praćenjem metiloma ćelija koje su ušle u tranziciju pod uticajem TGF- $\beta$  proteina, a detektovane promene u metilaciji DNK određenih regiona genoma povezane sa transkripcionom regulacijom gena uključenih u proces EMT (Sun i Fang, 2017; McDonald i sar., 2011; Carmona i sar., 2014). Ipak, značaj metilacije DNK za pokretanje procesa EMT je nedovoljno razjašnjen zbog suprotstavljenih rezultata dobijenih u zavisnosti od korišćenog tipa ćelija i načina pokretanja tranzicije u različitim eksperimentalnim modelima (Choi i sar., 2017; Pistore i sar., 2017). Trenutno se smatra da tokom tranzicije dolazi do generalne hipometilacije genoma i hipermetilacije specifičnih promotora gena koji kodiraju za epitelne biomarkere, što predstavlja obeležje odigravanja stabilnog procesa EMT (Pistore i sar., 2017). Takođe, dok modifikacije histona obezbeđuju zatvorenu lokalnu strukturu hromatina, metilacija DNK dodaje dodatan nivo zaštite i

omogućava relativno dugotrajno utišavanje ekspresije gena (Lin i sar., 2014). Tako, osim histonskih modifikacija H3K27me3 i H3K9me3, tokom procesa EMT ne iznenađuje i prisustvo metilacije DNK u promotorima stabilno reprimiranih gena čiji proteinski produkti definišu epitelni fenotip (Tam i Weinberg, 2013; Skrypek i sar., 2017).

Uticao metilacije DNK na ekspresiju gena direktno je pokazan i u slučaju nekoliko markera procesa EMT (Lombaerts i sar., 2006; Hu i sar., 2010). Tako je lokalna hipermetilacija CpG ostrvaca u promotoru gena za E-kadherin povezana sa regrutovanjem DNMT1 preko interakcije sa transkripcionim faktorima SNAIL (Lim i sar., 2008; Espada i sar., 2011) i ZEB (Fukagawa i sar., 2015). Takođe, ne samo da transkripcioni faktori uključeni u EMT regulišu metilaciju DNK određenih gena, nego je i njihova ekspresija regulisana metilacijom DNK (Skrypek i sar., 2017). Tako je metilacioni status promotora TWIST1/2 i ZEB2 proteina u obrnutoj korelaciji sa njihovom ekspresijom (Li i sar., 2010; Acun i sar., 2011; Galván i sar., 2015), dok je ekspresija SNAIL1/2 u obrnutoj korelaciji sa metilacijom u prvom intronu (Chen i sar., 2013).

#### 1.4.2.3. miRNK u regulaciji procesa EMT

miRNK pripadaju evolutivno konzerviranoj klasi malih nekodirajućih molekula RNK sa ulogom u post-transkripcionom utišavanju komplementarnih iRNK obezbeđujući dodatan nivo složenosti regulacije ekspresije gena (Jonas i Izaurralde, 2015; Raghunath i Perumal, 2015). miRNK su uključene u gotovo svaki proces u ćeliji (Gebert i MacRae, 2019), pa ne iznenađuju bioinformatičke procene koje ukazuju da bi ekspresija više od 60% humanih gena koji kodiraju za proteine mogla biti regulisana miRNK (Friedman i sar., 2009). Dok neke miRNK regulišu ekspresiju specifičnih ciljnih gena, druge (pojedinično ili kao grupa miRNK jednog klastera) mogu funkcionisati kao master regulatori nekog procesa u ćeliji istovremeno regulišući ekspresiju hiljade gena (Selbach i sar., 2008; Esteller, 2011; Uhlmann i sar., 2012; Gebert i MacRae, 2019). Takođe, s' obzirom da pojedinačna iRNK može sadržati više mesta vezivanja za različite miRNK, više miRNK kooperativno može regulisati ekspresiju jednog gena (Broderick i sar., 2011; Uhlmann i sar., 2012; Chou i sar., 2018). Istraživanja su pokazala da ekspresija miRNK pokazuje veću tkivnu specifičnost u poređenju sa ekspresijom iRNK (Ludwig i sar., 2016).

Biogeneza zrelih miRNK podrazumeva više koraka. Geni koji kodiraju miRNA se nalaze na svim hromozomima čoveka izuzev Y hromozoma (Kim i Nam, 2006) i inicijalno se transkribuju u primarne miRNK (pri-miRNK) koje potom bivaju obrađene u prekusorske miRNK (pre-miRNK) i konačno u zrele miRNK (Ha i Kim, 2014). U verziji 22.1 javnog repozitorijuma miRBase trenutno je uneto 1917 sekvenci pre-miRNK i 2654 sekvenci zrelih miRNA čoveka (Kozomara i sar., 2018; Gebert i MacRae, 2019), dok su bioinformatičke analize identifikovale 1357 potencijalnih promotora miRNK (de Rie i sar., 2017). Prvobitno se smatralo da su geni za miRNK prisutni samo u intergenskim regionima, ali se pokazalo da se kod sisara oko 70% gena za miRNK nalazi i u intragenskim regionima (Rodriguez i sar., 2004). Geni za miRNK u intergenskim regionima se transkribuju sa sopstvenog promotora dajući monocistronsku iRNK ili više miRNK lokusa formira klaster koji ima zajednički promotor i koji se prepisuje u jednu policistronsku iRNK (Olena i Patton, 2010). U intragenskim regionima pojedinačni ili klasteri gena za miRNK se često prepisuju sa istog promotora kao i taj gen i najčešće se nalaze u intronima gena koji kodiraju proteine, ali mogu biti prisutni i u intronima gena za nekodirajuće RNK i u najređem slučaju u nekodirajućim egzonima gena (Rodriguez i sar., 2004; Kim i Nam, 2006). Pokazano je da se kod čoveka 36% miRNK nalazi u klasterima, pri čemu se za te miRNK smatra da učestvuju u regulaciji ekspresije istog gena ili različitih gena koji učestvuju u istom procesu u ćeliji (Griffiths-Jones i sar., 2008; Yuan i sar., 2009). Transkripcija gena za miRNK, koju najčešće obavlja RNK polimeraza II, i koja je kontrolisana

transkripcionim faktorima i epigenetičkim mehanizmima kao što su modifikacije histona i metilacija DNK (Cai i sar., 2004; Lee i sar., 2004), dovodi do nastanka duge pri-miRNK. Pri-miRNK formira lokalnu strukturu ukosnice u kojoj je sadržana sekvenca zrele miRNK (Ha i Kim, 2014) i koju u osnovi prepoznaje i iseca mikroprocesorni kompleks sačinjen od RNaze tipa III koja se naziva Drosha i kofaktora DGCR8 (engl. *DiGeorge syndrome critical region gene 8*) pri čemu nastaje pre-miRNK dužine od oko 70 nukleotida (Lee i sar., 2003; Gregory i sar., 2004; Han i sar., 2004). Nakon eksporta u citoplazmu za pre-miRNK se vezuje RNaza tipa III nazvana Dicer koja iseca pre-miRNK na udaljenosti od 21-25 nukleotida od mesta vezivanja (MacRae i sar., 2007) što dovodi do oslobađanja dupleksa miRNK dugog od 18 do 24 nukleotida (Ha i Kim, 2014). Nastala dvolančana miRNK se vezuje za proteine Argonaut (AGO) familije (AGO1/2/3/4 kod čoveka), pri čemu se jedan lanac miRNK iseca aktivnošću AGO2 proteina ili se pasivno odvija i potom degraduje u ćeliji (engl. *passenger stri*), dok drugi lanac miRNK ostaje asociran sa AGO proteinima (vodeći lanac, engl. *guide stri*) učestvujući u formiranju zrelog efekorskog kompleksa nazvanog RISC (engl. *RNA-induced silencing complex*) (Hammond i sar., 2001; Ha i Kim, 2014). Odabir vodećeg lanca vrši se na osnovu termodinamičke nestabilnosti 5' kraja ili prisustva uracila na prvoj poziciji nukleotida na 5' kraju (Khvorova i sar., 2003; Hu i sar., 2009). Usmerenost lanca nukleotida u kompleksu RISC određuje sufiks u imenu zrele miRNK, pa se tako miRNK nastala od 5' kraja ukosnice pre-miRNA označava sa 5p, dok se miRNK nastala od 3' kraja označava kao 3p (Ha i Kim, 2014). Oba lanca iz dupleksa miRNK mogu se vezati za AGO proteine, a izbor zavisi od tipa ćelije i okruženja i može varirati od gotovo jednakih proporcija do veće zastupljenosti jednog lanca u odnosu na drugi (Meijer i sar., 2014).

Vezivanje kompleksa RISC za komplementarne sekvence u 3' netranslatirajućem regionu (engl. *3' untranslated region - 3' UTR*) ciljnih iRNK, nazvane MRE (engl. *miRNA response elements*), dovodi do sprečavanja translacije ili do destabilizacije i degradacije iRNK i time do smanjene ekspresije gena (Bartel, 2009; Huntzinger i Izaurralde, 2011; Jonas i Izaurralde, 2015). Osim u 3' UTR, MRE su nađeni i u drugim regionima gena uključujući 5' UTR i kodirajuću sekvencu (Xu i sar., 2014). miRNK sa identičnom sekvencom nukleotida od pozicije 2 do 8 počev od 5' kraja (engl. *seed*) pripadaju istoj familiji miRNK (Bartel, 2009). Ukoliko dođe do savršeno komplementarog sparivanja između miRNK i MRE aktivira se endonukleazna aktivnost AGO2 proteina i dolazi do isecanja ciljne iRNK (Jo i sar., 2015). Sa druge strane, prilikom nepotpunog komplementarnog sparivanja, kao što je to slučaj u većini animalnih ćelija, dolazi do ometanja funkcije eukariotskih faktora inicijacije translacije 4A1 i 4A2 (engl. *eukaryotic initiation factors 4A1/2*) i inhibicije inicijacije translacije iRNK ili do kontrolisane degradacije iRNK odgovorne za utišavanje 66% do 90% gena (Fukao i sar., 2014; Jonas i Izaurralde, 2015; Gebert i MacRae, 2019).

miRNK utiču na mnoge važne biološke procese neophodne za embrionalno razviće, diferencijaciju ćelija i održavanje homeostaze, dok poremećena regulacija miRNK ima važnu ulogu u progresiji starenja i različitih bolesti kao što je kancer (Esteller, 2011; Gebert i MacRae, 2019). U regulaciji procesa EMT miRNK učestvuju putem uticaja na nivo ekspresije različitih proteina karakterističnih za epitelni ili mezenhimski fenotip, kao i transkripcionih faktora koji dovode do pokretanja procesa EMT (Lamouille i sar., 2014). Određene miRNK ili familije miRNK smatraju se čuvarima epitelnog fenotipa koji imaju najveći uticaj na tok i ishod procesa EMT i odgovorni su za očuvanje epitelne homeostaze u normalnim uslovima i supresiju EMT (Zaravinos, 2015; Nieto i sar., 2016). Regulatorne mreže sačinjene od miRNK i transkripcionih faktora SNAI, ZEB i TWIST predstavljaju važan mehanizam koji omogućava ćelijama očuvanje stabilnosti ili sa druge strane tranziciju između različitih fenotipa u zavisnosti od mikrookruženja i signalnog konteksta prisutnog u ćeliji (D'Amato i sar., 2013), pa samim tim narušavanje balansa ovih regulatornih

mreža dovodi do pokretanja procesa EMT (de Craene i Berx, 2013). *In silico* analize čak ukazuju da upravo postojanje mreža inhibitornih petlji između miRNK i transkripcionih faktora SNAI, ZEB i TWIST može biti razlog postojanja stabilnih intermedijarnih stanja tokom procesa EMT (Lu i sar., 2013; Tian i sar., 2013; Jolly i sar., 2015, 2016; Jia i sar., 2017; Sha i sar., 2019). Pokazano je da članovi familije miR-34 (miR-34a, miR-34b i miR-34c) (Siemens i sar., 2011), miR-203 (Moes i sar., 2012) i miR-182 (Zhan i sar., 2017) dovode do represije *SNAI1*, pri čemu i sam *SNAI1* negativno reguliše ekspresiju ovih miRNK dovodeći do progresije procesa EMT. Slične regulatorne petlje zabeležene su i u slučaju *SNAI2* i miR-1, miR-200b (Liu i sar., 2013), miR-203 (Ding i sar., 2013) i miR-145 (Findlay i sar., 2014). Takođe, prvi dokazi koji su potvrdili funkcionalnu ulogu miRNK u kontroli plastičnosti epitelnih ćelija predstavljaju studije koje su ukazale da ekspresija ZEB proteina može biti regulisana od strane familije miR-200. Ekspresija pet članova familije miR-200 organizovanih u dva klastera lokalizovana na hromozomu 1 (miR-200a, miR-200b i miR-429) i hromozomu 12 (miR-200c i miR-141) snažno je povezana sa diferencijacijom epitelnih ćelija pri čemu dvostruke negativne povratne sprege formirane između familije miR-200 i familije ZEB transkripcionih faktora precizno kontrolišu procese EMT i MET (de Craene i Berx, 2013). Pokazano je da ove miRNK dovode do post-transkripcione represije ZEB1 i ZEB2 proteina (Christoffersen i sar., 2007; Gregory i sar., 2008a; Park i sar., 2008) ali i do recipročnog utišavanja članova familije miR-200 od strane ZEB proteina i promovisanja procesa EMT (Bracken i sar., 2008; Burk i sar., 2008). Recipročna represija zabeležena je i u slučaju interakcija između ZEB1 i miR-340 (Hou i sar., 2016) i miR-1199 (Diepenbruck i sar., 2017), kao i između ZEB2 i miR-145 (Ren i sar., 2014). Osim SNAI i ZEB, pokazano je i da transkripcioni faktor TWIST1 učestvuje u formiranju negativnih povratnih sprega sa miR-373 (Chen i sar., 2015) i miR-129 (Yu i sar., 2015). Izuzev u kontroli ekspresije transkripcionih faktora uključenih u EMT, miRNK targetuju i gene koji učestvuju u definisanju epitelnog ili mezenhinskog fenotipa. Tako, povećane ekspresije miR-9 (Ma i sar., 2010), miR-10b (Zhang i sar., 2015) i miR-214 (Liu i sar., 2018) dovode do direktne represije E-kadherina i promovisanja mezenhinskog fenotipa. Sa druge strane, pokazano je da do inhibicije ekspresije N-kadherina dolazi od strane miR-194 (Song i sar., 2012), dok miR-22 i miR-638 na indirektan način utiču na ekspresiju vimentina (Xu i sar., 2018) i fibronektina (Xia i sar., 2014), respektivno.

Uloga miRNK u procesu EMT je složena i dinamična, pa je tako pokazano da više miRNK može funkcionisati kooperativno, da jedna miRNK može kontrolisati ekspresiju više targeta, kao i da različiti transkripcioni faktori uključeni u EMT mogu kontrolisati ekspresiju miRNK. Osim prethodno nabrojanih, postoje i brojne druge miRNK koje na direktan ili indirektan način mogu dovesti do represije SNAI, ZEB ili TWIST proteina i različitih biomarkera procesa EMT, dovodeći do sličnih fenotipskih posledica. Takođe, pokazano je i da neke miRNK mogu promovisati tranziciju dovodeći do pojačane ekspresije transkripcionih faktora uključenih u proces EMT, kao i da u normalnim i patološkim stanjima mogu regulisati proces EMT putem modulacije uzvodnih signalnih puteva, uključujući signalne puteve pokrenute TGF- $\beta$  proteinima (Abba i sar., 2016; Expósito-Villén i sar., 2018).

Osim regulacije ekspresije miRNK od strane transkripcionih faktora uključenih u proces EMT, sve više rezultata ukazuje da, ne samo da miRNK predstavljaju deo epigenetičke mašinerije, nego i da je značajan broj gena za miRNK podložan epigenetičkim modifikacijama (Lujambio i sar., 2007; Tao i sar., 2017). Pokazano je da je većina miRNK lokusa asocirana sa CpG ostrvcima što ukazuje na poseban značaj metilacije DNK u njihovoj regulaciji (Weber i sar., 2007), kao i da tokom procesa EMT i MET dolazi do promena metilacionih obrazaca gena za miRNK (Sun i Fang, 2017). Tako, noviji podaci pokazuju da se hipermetilacija promotora miRNK, kao što je to slučaj za familije

miR-34 ili miR-200, i njihova posledična represija, nameće kao novi mehanizam koji dovodi do sticanja mezenhimskih karakteristika epitelnih ćelija tokom procesa EMT (D'Amato i sar., 2013; Díaz-López i sar., 2014).

---

## 2. CILJEVI

---

Mehaničke povrede, infekcije i poremećaji imunog sistema pod određenim uslovima mogu dovesti do fibroze konjunktive, a u najtežim slučajevima i do oštećenja ili potpunog gubitka vida (Friedlander, 2007). Bez obzira na inicijalni okidač, narušavanje homeostaze konjunktive za posledicu ima razvijanje inflamacije koja može rezultovati u hroničnoj aktivaciji fibroblasta i prekomernoj produkciji ECM čija akumulacija narušava normalnu arhitekturu tkiva. Osim lokalne populacije fibroblasta, u nastanku fibroze, između ostalih, učestvuju i epitelne ćelije koje procesom EMT prelaze u ćelije sa mezenhimskom fenotipom (Micallef i sar., 2012). Osnovnim preduslovom za pokretanje procesa EMT smatra se akumulacija biološki aktivnog TGF- $\beta$  proteina, a sam proces je regulisan na nekoliko nivoa. Pored aktivacije transkripcionih faktora (SNAI, ZEB i TWIST) koji regulišu ekspresiju gena karakterističnih za epitelne i/ili mezenhimske ćelije (Lamouille i sar., 2014), određene miRNK imaju sposobnost direktne regulacije ekspresije transkripcionih faktora uključenih u proces EMT i njihovih ciljnih gena (Zaravinos, 2015). Transkripcione faktore uključene u proces EMT, gene karakteristične za određeni fenotip ćelije, kao i miRNK povezuje regulacija na transkripcionom nivou koja uključuje metilaciju DNK (Sun i Fang, 2017; Carmona i sar., 2014; Díaz-López i sar., 2014).

Literaturni podaci ukazuju da proces EMT u konjunktivi doprinosi nastanku pterigijuma i fibrozi tokom okularnih manifestacija cGVHD (Kato i sar., 2007; Ogawa i sar., 2009), ali se od skoro razmatra i u etiologiji trahoma (Derrick i sar., 2015). Trahom se razvija nakon ponovljenih infekcija epitelnih ćelija konjunktive intracelularnom bakterijom *Chlamydia trachomatis*, pri čemu se uspostavlja stanje hronične inflamacije koje u kasnijim fazama može dovesti do formiranja fibroznih promena na konjunktivi, uvrtnja kapaka, abrazije rožnjače trepavicama i gubitka vida (Hu i sar., 2013). Različite bolesti oka u kojima fibroza konjunktive ima važnu ulogu retko se nalaze u fokusu istraživanja s' obzirom da ovo tkivo ne pripada samoj vizuelnoj osi. Ipak kada je u pitanju oko, specifičan problem predstavlja fibroza i nastanak ožiljačnog tkiva nakon hiruških zahvata koji trenutno predstavljaju jedini tretman za mnoge očne bolesti koje dovode do slepila (Yu-Wai-Man i Khaw, 2015). Za ovakve slučajeve još uvek ne postoji adekvatan klinički testiran i dostupan antifibrotični tretman, pa ove situacije predstavljaju jednu od najproblematičnijih oblasti oftalmologije. Aktuelni pristupi u terapiji fibroznih stanja podrazumevaju delovanje na molekule koji su se pokazali kao ključni za pokretanje, kako fibroze, tako i procesa EMT, kao što su TGF- $\beta$  proteini. S' obzirom da deluje na molekule koji učestvuju u brojnim vitalnim procesima u ćeliji, ovakav pristup u terapiji bolesti povezanih sa fibrozom nije se pokazao dovoljno specifičan i efikasan, a jedan od potencijalnih razloga je zanemarivanje epitelnih ćelija kao važnih činioca u nastanku patologije.

U skladu sa navedenim, opšti cilj ove doktorske disertacije obuhvata ***ispitivanje sposobnosti humanih epitelnih ćelija konjunktive da uđu u proces EMT pod različitim uslovima i identifikaciju ključnih faktora povezanih sa pokretanjem i progresijom tranzicije. Posebna pažnja biće usmerena na rasvetljavanje uloge metilacije DNK u regulaciji ekspresije gena uključenih u proces EMT u humanim epitelnim ćelijama konjunktive.*** Dobijeni rezultati potencijalno bi omogućili razvijanje novih selektivnih terapijskih strategija u lečenju fibrotičnih stanja konjunktive zasnovanih na reverzibilnosti procesa EMT i epigenetičkih mehanizama. Kako bi se došlo do opšteg cilja postavljeno je nekoliko neposrednih ciljeva:

- 1. Ispitivanje potencijala infekcije humanih epitelnih ćelija konjunktive bakterijom *C. trachomatis* da indukuje proces EMT i ispitivanje uloge metilacije DNK tokom ovog procesa.** Navedeni cilj će biti ostvaren praćenjem aktivacije različitih signalnih puteva uključenih u pokretanje procesa EMT 72 h nakon infekcije ćelijske linije humanih epitelnih ćelija konjunktive (HCjE) bakterijom *C. trachomatis* u *in vitro* uslovima, kao i praćenjem ekspresije izabranih markera specifičnih za epitelne i mezenhimske ćelije na nivou iRNK i proteina. Praćenjem metilacionog statusa DNK izabranih regiona u okviru gena koji kodiraju za markere epitelnih i mezenhimskih ćelija korišćenjem tri različite metode ispitaće se da li su uočene promene u ekspresiji ovih gena u korelaciji sa promenama u obrascima metilacije DNK.
- 2. Uspostavljanje *in vitro* modela procesa EMT u cilju identifikacije ključnih faktora odgovornih za proces tranzicije humanih epitelnih ćelija konjunktive i ispitivanja regulatornih mehanizama koji leže u osnovi ovog procesa.** Sa tim ciljem, sposobnost HCjE ćelija da uđu u proces EMT biće testirana dugotrajnim tretmanima različitim izoformama TGF- $\beta$  proteina, čime će se identifikovati najefikasniji induktor ovog procesa. U cilju potvrde odigravanja tranzicije tokom tretmana pratiće se morfologija i sposobnost migracije HCjE ćelija, kao i ekspresija izabranih markera procesa EMT na nivou iRNK i proteina. Na uspostavljenom modelu EMT pratiće se promene u profilu ekspresije seta od 84 gena koji su vezani za proces EMT, uključujući transkripcione faktore i gene koji kodiraju za markere epitelnih i mezenhimskih ćelija. Takođe, pratiće se i ekspresija seta miRNK koje bi mogle biti uključene u regulaciju ovog procesa.
- 3. Rasvetljavanje uloge metilacije DNK u pokretanju procesa EMT u humanim epitelnim ćelijama konjunktive i ispitivanje mogućnosti za zaustavljanje i/ili delimičnu reverziju ovog procesa promenom profila metilacije određenih gena.** HCjE ćelije će se istovremeno tretirati najuspešnijim induktorom procesa EMT i DNK demetilujućim agensom 5-azacitidinom (5-AzaC) u dve vremenske tačke da bi se ispitali neposredni i odloženi efekti ovog demetilujućeg agensa. Uticaj 5-AzaC na zaustavljanje i/ili reverziju tranzicije na uspostavljenom *in vitro* modelu procesa EMT pratiće se na nivou morfoloških promena HCjE ćelija, sposobnosti migracije i promenom ekspresije gena koji kodiraju za proteine i miRNK uključene u proces EMT. Za gene za koje se pokaže da su potencijalno regulisani metilacijom DNK, odnosno za gene čija se ekspresija menja kao posledica tretmana demetilujućim agensom, uradiće se analiza metilacionog statusa korišćenjem dve različite metode. Geni koji su regulisani metilacijom DNK, a čija se ekspresija menja u zavisnosti od fenotipa ćelije biće selektovani kao potencijalni targeti za razvijanje novih selektivnih terapijskih strategija u tretmanu fibroznih bolesti konjunktive u čiju patologiju je uključen i proces EMT.



---

## 3. MATERIJAL I METODE

---

### 3.1. Čelijska kultura

Za eksperimente u ovoj doktorskoj disertaciji korišćena je čelijska linija imortalizovanih humanih epitelnih ćelija konjunktive (HCjE) (Rheinwald i sar., 2002; Gipson i sar., 2003) obezbeđena ljubaznošću prof. Ilene Gibson sa Schepens Eye Research Institute, Medicinske škole Univerziteta Harvard u Bostonu. Primarna kultura zdravog epitela konjunktive transdukovana je da ekspresira dominantno-negativan fragment p53 proteina i p16<sup>INK4A/Rb</sup> rezistentnu mutiranu formu CDK4 proteina (tačkasta mutacija R24C), čime je obezbeđeno da ćelije zaobiđu mehanizme senescencije identifikovane kod primarnih kultura keratinocita. Ove ćelije su potom transdukovane da ekspresiraju katalitičku subjedinicu humane telomeraze hTERT koja im omogućava da održe dužinu svojih telomera i da se dele neograničeno. HCjE ćelije gajene su u medijumu za keratinocite bez seruma (K-SFM) (Life Technologies, Paisley, UK i Gibco, Carlsbad, CA, USA) u koji je dodato 25 µg/ml goveđeg ekstrakta hipofize, 0,2 ng/ml rekombinovanog humanog EGF, 0,4 mM CaCl<sub>2</sub> i 100 U/ml antibiotika (penicilin i streptomycin) (GE Healthcare, South Logan, UT, USA i Gibco). HCjE ćelije su gajene na temperaturi od 37°C u inkubatoru (Sanyo Electric Co., Ltd, Osaka, Japan), u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> i 95% vlažnosti. Medijum je menjan svakog drugog dana a ćelije su pasažirane korišćenjem 0,05% tripsina/0,02% etilen-diaminotetrasirćetne kiseline (engl. ethylene-diamine-tetraacetic acid – EDTA) (GE Healthcare i Gibco) u PBS (engl. *phosphate-buffered saline*) u eksponencijalnoj fazi rasta po dostizanju 70%-80% konfluentnosti.

#### 3.1.1. Infekcija HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis*

Eksperimenti koji su uključivali manipulaciju bakterijom *Chlamydia trachomatis* urađeni su u Centru za okularnu inflamaciju i infekciju, Laura Bassi Centres of Expertise; Centar za patofiziologiju, infektologiju i imunologiju Medicinskog univerziteta u Beču. Svi eksperimenti koji su uključivali biohazardni materijal (*C. trachomatis* i čelijske linije) ili opasne hemikalije, izvedeni uz propisane standardne zaštitne mere i praćenjem lokalnih i nacionalnih regulativa. Za propagaciju bakterije *C. trachomatis* (serovar B/HAR-36, ATCC® VR-573™) i pravljenje inokulacionih štokova u svrhu infekcije HCjE ćelija korišćena je McCoy čelijska linija (ATCC® CRL-1696™) (Rank i sar., 1988). McCoy ćelije su gajene u flaskovima površine 75 cm<sup>2</sup> i po dostizanju konfluentnosti inficirane *C. trachomatis* pri multiplicitetu infekcije (engl. *multiplicity of infection* - MOI) od 10. Ćelije su zatim centrifugirane na 900 × g /h i inkubirane 48 h u prisustvu 1 µg/ml cikloheksimida (Sigma, Steinheim, Germany), nakon čega su lizirane staklenim perlama i ponovo centrifugirane na 900 × g/15 min da bi se uklonili čelijski ostaci poreklom od ćelija domaćina. Testiranje štokova za inokulaciju i McCoy ćelija nije pokazalo prisustvo mikoplazme. Za potrebe infekcije, HCjE ćelije su sejane u gustini od 400.000 ćelija po flasku površine 75 cm<sup>2</sup>. Konfluentne kulture HCjE ćelija (oko 3,5 × 10<sup>6</sup> ćelija) inficirane su sa 10<sup>7</sup> infektivnih jedinica (IFU) bakterije *C. trachomatis* po flasku (pri MOI od 3) u inokulacionom medijumu (DMEM/Ham's F-12 1:1, Life Technologies). Da bi se podstakla adhezija, flaskovi su centrifugirani na 900 × g/1 h na 37°C. Nakon inkubacije od 1 h na 37°C, inokulacioni medijum je zamenjen K-SFM medijumom bez antibiotika i ćelije su inkubirane dodatnih 72 h. Vijabilnost HCjE ćelija nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis*

praćena je imunoblot analizom PARP-1 (engl. *poly(ADP-ribose) polymerase-1*) proteina, prokaspaze 3 i aktivne forme kaspaze 3.

### 3.1.2. Tretmani HCjE ćelija

Za tretmane HCjE ćelija različitim izoformama TGF- $\beta$  proteina korišćeni su rekombinovani humani TGF- $\beta$ 1 (Gibco) i TGF- $\beta$ 2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) proteini. TGF- $\beta$ 1 je rastvaran u 10 mM limunskoj kiselini (pH 3) u koju je kao protein nosač dodat 0,1% fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum* - FBS) (Bio West, Nuaille, France), dok je TGF- $\beta$ 2 rastvoren u sterilnoj dejonizovanoj vodi sa 0,1% FBS. Radni alikvoti koncentracije 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l su čuvani na -80°C do upotrebe. TGF- $\beta$  proteini dodavani su u K-SFM medijum pojedinačno u finalnoj koncentraciji od 10 ng/ml i u kombinaciji u finalnoj koncentraciji od 5 ng/ml svaki. Medijum sa TGF- $\beta$  proteinima menjan je svakog drugog dana tokom šest pasaža (30 dana). Za tretman epigenetičkim agensima, HCjE ćelije su kotretirane demetilujućim DNK agensom 5-azacitidinom (5-AzaC) (Sigma-Aldrich) finalne koncentracije 0,05  $\mu$ M, koja odgovara IC<sub>80</sub> za HCjE ćelije u testu vijabilnosti. 5-AzaC je rastvorena u 100% dimetil sulfoksidu (DMSO) (Serva) i radni alikvoti koncentracije 10 mM su čuvani na -80°C. Medijum koji sadrži 5-AzaC i TGF- $\beta$ 1 (finalne koncentracije od 10 ng/ml) menjan je svakog dana u periodu između drugog i trećeg pasaža (5 dana) za 5-AzaC tretman sa periodom oporavka (engl. *recovery-R*) (uzorci obeleženi kao 5-AzaC R) i između petog i šestog pasaža (5 dana) za 5-AzaC tretman bez perioda oporavka (uzorci obeleženi kao 5-AzaC). Eksperiment je trajao šest pasaža (30 dana) tokom koga je TGF- $\beta$ 1 kontrinuirano primenjivan. Morfologija HCjE ćelija je praćena korišćenjem invertnog mikroskopa Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Tokyo, Japan) i fotografisana digitalnom kamerom Nikon Coolpix E5000 (Nikon, Tokyo, Japan) pre prvog, trećeg i šestog pasaža. Sve dalje izolacije i analize rađene su na HCjE ćelijama nakon šestog pasaža ukoliko nije drugačije naznačeno.

### 3.1.3. Test vijabilnosti ćelija (MTT esej)

Za ispitivanje vijabilnosti HCjE ćelija korišćen je 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolijum bromid (MTT) esej koji se zasniva na redukciji žuto obojene tetrazolijumove soli do ljubičastog formazana od strane mitohondrijalne dehidrogenaze na membrani funkcionalnih mitohondrija. HCjE ćelije su sejane u sterilne ploče sa 96 bunarića i nakon dostizanja 70%-80% konfluentnosti tretirane rastućim koncentracijama 5-AzaC (0,05  $\mu$ M, 0,075  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 0,125  $\mu$ M, 0,15  $\mu$ M, 0,175  $\mu$ M, 0,2  $\mu$ M, 0,25  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 7,5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ M, 15  $\mu$ M). Po završetku tretmana medijum je odlivan i u bunariće je dodavano po 200  $\mu$ l MTT (Sigma, M5655), koncentracije 0,1 mg/ml rastvorenog u K-SFM medijumu. Nakon inkubacije od 2 h na 37°C u mraku, medijum sa MTT je odlivan, a formirani kristali formazana su rastvarani dodavanjem 100  $\mu$ l DMSO. Apsorbanca je merena na 570 nm korišćenjem ELISA čitača (Sunrise Basic, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria). Vijabilnost ćelija je iz tri nezavisna eksperimenta računata u odnosu na vijabilnost kontrolnih ćelija (100%) i izražavana u procentima. U daljim eksperimentima, za tretmane HCjE ćelija 5-AzaC izabrana je koncentracija od 0,05  $\mu$ M koja predstavlja IC<sub>80</sub> za HCjE ćelije, odnosno dovodi do inhibicije rasta HCjE ćelija za 20%.

### 3.1.4. Test zarastanja povrede

Za određivanje sposobnosti migracije HCjE ćelija nakon tretmana korišćen je *in vitro* test zarastanja povrede (engl. *wound healing assay*; *scratch assay*). Kontrolne i tretirane HCjE ćelije gajene su u Petri šoljama promera 35 mm do dostizanja konfluentnosti, nakon čega je kroz sloj ćelija napravljena povreda korišćenjem sterilnog nastavka za pipetu zapremine 200  $\mu$ l. Ćelijski ostaci su ukonjeni ekstenzivnim ispiranjem PBS puferom. Da bi se pratila migracija ćelija tokom

vremena, isto vidno polje je fotografisano na početku eksperimenta (0 h) i nakon 24 h korišćenjem invertnog mikroskopa Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Tokyo, Japan) opremljenog digitalnom kamerom Nikon Coolpix E5000 (Nikon, Tokyo, Japan). Za analizu slika dobijenih fotografisanjem 5 različitih vidnih polja po Petri šolji, iz tri nezavisna eksperimenta, korišćena je ver. 1.52 ImageJ programa (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Površina „čiste“ površine između dva konfluentna fronta ćelija sa obe strane povrede je izražena u pikselima nakon čega je izračunata razlika između vrednosti dobijenih za 0 h i 24 h.

## **3.2. Metode za manipulaciju nukleinskim kiselinama**

### **3.2.1. Izolacija genomske DNK i ukupne RNK**

Za izolaciju genomske DNK, iRNK i proteina iz kontrolnih i HCjE ćelija inficiranih bakterijom *C. trachomatis* korišćen je set za izolaciju DNK/RNK/proteina (AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit; Qiagen, Hilden, Germany), dok je za izolaciju genomske DNK i iRNK iz kontrolnih i tretiranih HCjE ćelija korišćen set za izolaciju DNK/RNK (AllPrep DNA/RNA Mini Kit; Qiagen) po uputstvima proizvođača. Na početku izolacije HCjE ćelije su ispirane PBS puferom, a potom mehanički odlepljene, pokupljene i centrifugirane na 900 × g. Talog je liziran korišćenjem RLT ili RLT Plus pufera, u zavisnosti od seta korišćenog za izolaciju, u koji je dodat 1% β-merkaptetanol (Serva) radi inhibicije nukleaza oslobođenih liziranjem ćelija. Ćelije su homogenizovane pomoću šprica i igle promera 21G, nakon čega su uzorci nalivani na kolonice za izolaciju DNK, centrifugirani 30 s na 8000 × g nakon čega je kolonica prebacivana u novu tubu za sakupljanje. Zatim je kolonica ispirana odgovarajućim puferima iz seta koji sadrže haotropne soli i etanol. Za eluciju genomske DNK korišćen je EB pufer iz seta, zagrejan na 70°C, i nakon inkubacije od 2 min na sobnoj temperaturi kolonica je centrifugirana 1 min na 8000 × g. Eluat dobijen nakon prvog centrifugiranja pomešan je sa odgovarajućom zapreminom 100% ili 70% etanola u zavisnosti od seta i prebačen na kolonicu za izolaciju RNK. Posle centrifugiranja, kolonica je isprana odgovarajućim puferima iz seta. Da bi se eluirala RNK na kolonicu je naneta voda i kolonica je centrifugirana 1 min na 8000 × g. Koncentracija i čistoća eluirane DNK i RNK proveravane su na NanoPhotometer N60 spektrofotometru (Implen GmbH, Munich, Germany), a kvalitet RNK elektroforetskim razdvajanjem na 1,5% agaroznom gelu. Uzorci su čuvani na -80°C do analize.

### **3.2.2. Izolacija miRNK**

Za izolaciju miRNK iz kontrolnih i tretiranih HCjE ćelija korišćen je set za izolaciju miRNK (miRNeasy Mini Kit; Qiagen) po preporuci proizvođača. Ćelije su ispirane PBS puferom i na njih je direktno nanet pufer iz seta koji predstavlja rastvor fenola i guanidin tiocijanata, a pomoću koga se vrši liziranje ćelija, inhibicija RNKaza i uklanjanje većeg dela DNK i proteina organskom ekstrakcijom. Nakon liziranja, ćelije su mehanički odlepljene, prebačene u tubice i homogenizovane pomoću šprica i igle promera 21G. Po dodavanju hloroforma (Serva), intenzivnog vorteksovanja, inkubacije od 3 min na sobnoj temperaturi i centrifugiranja na 4°C 15 min/12000 × g, homogenat se razdvojio na vodenu i organsku fazu. RNK se nalazila u vodenoj, gornjoj, bezbojnoj fazi, DNK u beličastoj interfazi, dok su se u organskoj, donjoj fazi, crvene boje nalazili proteini. Vodena faza je prebacivana u novu tubicu i pomešana sa 1,5 zapreminom 100% etanola, posle čega je ukupna zapremina nanošena na kolonicu za izolaciju RNK. Nakon centrifugiranja ukupna RNK (duža od 18 nukleotida) ostajala je vezana za silikatnu membranu na kolonici. Posle nekoliko koraka ispiranja odgovarajućim puferima iz seta, na kolonicu je naneta voda i nakon 1 min centrifugiranja ukupna RNK je eluirana. Ukupna RNK je kvantifikovana na NanoPhotometer

N60 (Implen), a kvalitet RNK proveravan elektroforetskim razdvajanjem na 1,5% agaroznom gelu. Uzorci su čuvani na -80°C do analize.

### 3.2.3. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (RT-qPCR)

Ekspresija gena analizirana je kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu (engl. *real-time quantitative polymerase chain reaction* - RT-qPCR). Priprema ukupne RNK za ovu analizu podrazumevala je uklanjanje potencijalno zaostale DNK i reverznu transkripciju RNK. Izolovana ukupna RNK u količini od 1 µg inkubirana je 30 min na 37°C sa 1 U DNKaze I i 10x reakcionog pufera sa MgCl<sub>2</sub> u ukupnoj zapremini od 10 µl. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 1 µl 50 mM EDTA i inkubacijom 10 min na 65°C. Za sintezu cDNK korišćen je set za reverznu transkripciju (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit; Fermentas, Burlington, Canada). Reakciona smeša se sastojala od 1 µg izolovane ukupne RNK tretirane DNKazom, oligo-dT prajmera (u slučaju analize nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis*) ili miksa oligo-dT i nasumičnih heksamernih prajmera (u slučaju analiza u *in vitro* modelu procesa EMT), dNTP, 5x reakcionog pufera, 20 U inhibitora RNKaze i 200 U reverzne transkriptaze u finalnoj zapremini od 20 µl. Reakciona smeša je inkubirana 5 min na 25°C, potom 60 min na 42°C, a reakcija je zaustavljena zagrevanjem uzoraka 5 min na 70°C. Reverzno transkribovana RNK čuvana je na -20°C do upotrebe.

Nivo iRNK kvantifikovan je korišćenjem QuantStudio 3 Real-Time PCR sistema (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) i QuantStudio Design & Analysis programa. Reakciona smeša za PCR reakciju sastojala se od 50 ng reverzno transkribovane RNK, 2x Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix reagensa (Fermentas) i 5 µM prajmera u finalnoj zapremini od 10 µl. Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix reagens predstavlja smešu Maxima Hot Start Taq DNK polimeraze, dNTP, odgovarajućeg pufera, SYBR green I fluorescentne boje koja se preferencijalno vezuje za dvolančanu DNK i ROX pasivne referentne boje za normalizaciju fluorescentnog signala. Korišćeni temperaturni profil za PCR reakciju obuhvatao je: inicijalnu denaturaciju DNK na 95°C/10 min i 40 ciklusa dvostepenog PCR koji se sastojao od denaturacije na 95°C/15 s i vezivanja i elongacije prajmera na 57°C/60 s (svi geni osim *SNAI1* i *ZEB2* u slučaju analize nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis*), ili 60°C/60 s (u slučaju analize u *in vitro* modelu procesa EMT i *SNAI1* i *ZEB2* u slučaju analize nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis*). Nivo ekspresije iRNK od interesa je normalizovan u odnosu na nivo iRNK *GAPDH* koji je korišćen kao referentni gen. Relativni nivo ekspresije ciljnih gena u kontrolnim i HCjE ćelijama inficiranim bakterijom *C. trachomatis* izračunat je korišćenjem komparativne delta Ct metode ( $2^{-\Delta Ct}$ ) i rezultati su prikazani na graficima kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (engl. *standard deviation* - SD). Relativni nivo promene (engl. *fold-change*) u ekspresiji iRNK ciljnih gena u tretiranim HCjE ćelijama u poređenju sa kontrolom određen je delta delta Ct metodom ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) (Livak i Schmittgen, 2001). Srednje vrednosti i standardne greške srednje vrednosti (engl. *standard error of the mean* - SEM) su prikazane na log<sub>2</sub> (log<sub>2</sub>FC) skali, dok je ekvivalentna linearna skala ucrtana na desnoj y-osi grafika. Prajmeri su dizajnirani pomoću programa Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) koristeći humane sekvence deponovane u GenBank pod identifikacionim brojevima: *TGF-β1* (engl. *transforming growth factor beta-1*) NM\_000660; *TGF-β2* (engl. *transforming growth factor beta-2*) NM\_003238; *CDH1* (engl. *cadherin 1*) NM\_004360; *OCN* (engl. *occludin*) NM\_002538; *DSP* (engl. *desmoplakin*) NM\_004415; *CDH2* (engl. *cadherin 2*) NM\_001792; *FN1* (engl. *fibronectin 1*) NM\_212482; *VIM* (engl. *vimentin*); NM\_003380; *ACTA2* (engl. *α 2-actin, smooth muscle*) NM\_001141945; *SNAI1* (engl. *snail family transcriptional repressor 1*) NM\_005985; *ZEB2* (engl. *zinc finger E-box binding homeobox 2*) NM\_014795; *TWIST1* (engl. *twist family BHLH transcription factor 1*) NM\_000474; *GAPDH* (engl.

*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) NM\_002046. Specifičnost prajmera proveravana je elektroforetskim razdvajanjem na 2% agaroznom gelu i njihovi nazivi, sekvence i dužine PCR produkata su izlistani u **Tabeli 3.1.**

**Tabela 3.1. Prajmeri korišćeni u RT-qPCR analizi**

Naziv gena	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera (5' - 3')	Dužina PCR produkta
<b>TGFβ1</b>	Fw	TACTACGCCAAGGAGGTCAC	198 bp
	Rev	CACGTGCTGCTCCACTTTTA	
<b>TGFβ2</b>	Fw	CAAGAGCAGAAGGCGAATGG	275 bp
	Rev	AGCAGGAGATGTGGGGTCT	
<b>CDH1</b>	Fw	CTTTGACGCCGAGAGCTACA	154 bp
	Rev	CACACCATCTGTGCCCACTT	
<b>OCN</b>	Fw	GAAGCAAGTGAAGGGATCTGC	245 bp
	Rev	GCAACCAAACCTTTGTGATGCTC	
<b>DSP</b>	Fw	ATTCCAACACAGTCATGCGG	255 bp
	Rev	TGTACCGAGCATGAACATCTG	
<b>CDH2</b>	Fw	CATTCGCCAAGAAGAAGGGC	264 bp
	Rev	AGCGTTCCTGTTCCACTCAT	
<b>FN1</b>	Fw	GCTGGGCGAGGGAGAATAA	209 bp
	Rev	CCACATAGGAAGTCCCAGC	
<b>VIM</b>	Fw	CCCTTGACATTGAGATTGCCAC	138 bp
	Rev	AGTGGGTATCAACCAGAGGGA	
<b>ACTA2</b>	Fw	CTACGTGGGTGACGAAGCA	147 bp
	Rev	TGCTCTTCAGGGGCAACAC	
<b>SNAI1</b>	Fw	CAAGGATCTCCAGGCTCGAA	266 bp
	Rev	TGACATCTGAGTGGGTCTGG	
<b>ZEB2</b>	Fw	AAGTACCAGCGGAAACAAGGA	277 bp
	Rev	AGTGCTCGATAAGGTGGTGC	
<b>TWIST1</b>	Fw	TTCTCGGTCTGGAGGATGGA	230 bp
	Rev	CCACGCCCTGTTTCTTTGAAT	
<b>GAPDH</b>	Fw	CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT	307 bp
	Rev	AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC	
<b>HPRT</b>	Fw	TTATGGACAGGACTGAACGTC	212 bp
	Rev	CCCTGTTGACTGGTCATTACA	
<b>ACTB</b>	Fw	CTCGCCTTTGCCGATCC	257 bp
	Rev	GGGTACTTCAGGGTGAGGATG	

### 3.2.4. Paneli bazirani na metodi kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu

#### 3.2.4.1. Humani panel za ispitivanje ekspresije gena povezanih sa procesom EMT

Za analizu nivoa ekspresija seta od 84 gena uključenih u proces EMT, u kontrolnim i tretiranim HCjE ćelijama, korišćen je humani panel za ispitivanje ekspresije gena povezanih sa procesom EMT (*Human Epithelial to Mesenchymal Transition RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array*; PAHS-090ZA; Qiagen, Valencia, CA, USA). Reverzna transkripcija je izvedena na način opisan u Poglavlju 3.2.3. korišćenjem seta za reverznu transkripciju (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit; Fermentas) na 0,5 µg izolovane ukupne RNK tretirane DNKazom I (Poglavlje 3.2.3.). U 20 µl



dobijene jednolančane cDNK je dodato 91 µl sterilne vode, nakon čega je 102 µl cDNK pomešano sa 1350 µl 2x Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix reagensa (Fermentas) i vodom do ukupne zapremine od 2700 µl. U svaki bunarić na PCR ploči, koji je već sadržao komercijalne prajmere, naneto je po 25 µl reakcione smeše. Za RT-qPCR korišćen je QuantStudio 3 Real-Time PCR sistem (Applied Biosystems), dok je temperaturni profil za PCR reakciju obuhvatao: inicijalnu denaturaciju DNK na 95°C/10 min i 40 ciklusa sastavljenog od denaturacije na 95°C/15 s i vezivanja i elongacije prajmera na 60°C/60 s. Analiza podataka urađena je u *on-line* programu dostupnom na internet strani <https://www.qiagen.com/it/shop/genes-i-pathways/data-analysis-center-overview-page/>. Za relativnu kvantifikaciju transkripata korišćena je  $2^{-ddCt}$  metoda, nakon normalizacije u odnosu na nivo ekspresije *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1* i *RPLP0* gena. Za značajnu promenu je uziman nivo ekspresije najmanje 2 puta veći ili manji u poređenju sa kontrolom. Dobijene vrednosti su prikazane na  $\log_2$  ( $\log_2FC$ ) skali, dok je ekvivalentna linearna skala ucrtana na desnoj y-osi grafika. Rezultati dobijeni korišćenjem panela validirani su u pojedinačnim, nezavisnim RT-qPCR eksperimentima u kojima su korišćeni prajmeri navedeni u Tabeli 3.1. (Poglavlje 3.2.3.).

#### 3.2.4.2. Humani panel za ispitivanje ekspresije miRNK uključenih u proces EMT

Da bi se odredile diferencijalno eksprimirane miRNK između kontrolnih i tretiranih HCjE ćelija korišćen je humani panel za ispitivanje ekspresije 84 miRNK uključenih u proces EMT (*miRCURY LNA miRNA Cancer Focus PCR Panel*; YAHS-102YA; Qiagen, Valencia, CA, USA). Količina od 100 ng ukupne RNK je reverzno transkribovana korišćenjem seta za reverznu transkripciju miRNK (*miRCURY LNA RT Kit*; Qiagen, Hilden, Germany). Tokom ovog koraka koji se sastojao od 60 min inkubacije na 42°C, miRNK je poliadenilovana i reverzno transkribovana korišćenjem univerzalnih oligo-dT prajmera, nakon čega je reakcija zaustavljena inkubacijom od 5 min na 95°C. U funkciji interne pozitivne kontrole reverzne transkripcije i/ili kalibracije između različitih PCR ploča u reakcionu smešu je dodat i UniSp6 RNK *spike-in* iz seta. Nakon reverzne transkripcije polovina dobijene cDNK je pomešana sa 2x miRCURY SYBR Green/ROX Master Mix reagensom koji sadrži QuantiNOVA DNK polimerazu uz dodatak ROX referentne boje do ukupne zapremine od 1000 µl, nakon čega je u svaki bunarić na PCR ploči, koji je već sadržao komercijalne prajmere, nalivano po 10 µl reakcione smeše. Za amplifikaciju zrelih miRNK je korišćen QuantStudio 3 Real-Time PCR sistemu (Applied Biosystems), pri čemu se temperaturni profil sastojao od inicijalne denaturacije na 95°C/2 min i 40 ciklusa denaturacije na 95°C/10 s i vezivanja i elongacije prajmera na 56°C/60 s. Ovaj panel je baziran na primeni LNA tehnologije (engl. *locked nucleic acids*) i uključuje korišćenje „forward” prajmera specifičnih za pojedinačne zrele miRNK koji sadrže toplotno stabilne RNK analoge i zbog toga obezbeđuju veću senzitivnost i specifičnost PCR reakcije. Analiza podataka je urađena u *on-line* programu dostupnom na strani <https://www.qiagen.com/it/shop/genes-i-pathways/data-analysis-center-overview-page/>. Za relativnu kvantifikaciju ciljnih miRNA korišćena je  $2^{-ddCt}$  metoda, nakon normalizacije u odnosu na nivo ekspresije deset miRNK iz čitavog panela sa najboljim izračunatim parametrom stabilnosti gNorm. Za značajnu promenu je smatrano kada bi nivo ekspresije bio najmanje 2 puta veći ili manji u poređenju sa kontrolom. Dobijene vrednosti prikazane su na  $\log_2$  ( $\log_2FC$ ) skali, dok je ekvivalentna linearna skala ucrtana na desnoj y-osi grafika.

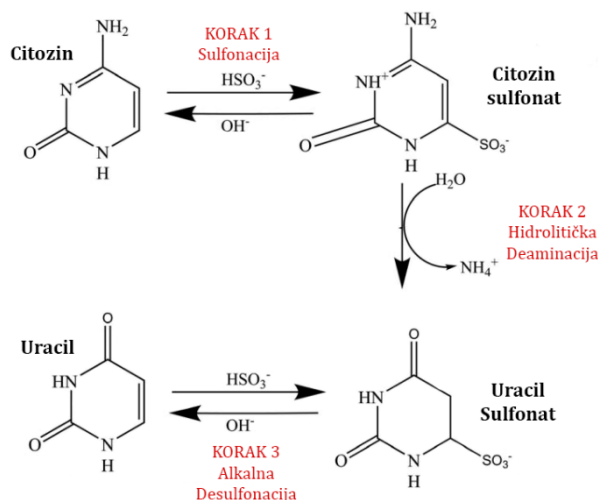
### 3.2.5. Metode za analizu metilacije DNK bazirane na tehničkim lančanim reakcijama polimeraze

#### 3.2.5.1. *In vitro* metilacija DNK

Za kompletnu *in vitro* metilaciju svih citozina koji se nalaze u okviru CpG dinukleotida u dvolančanom lancu DNK, korišćen je rekombinovan enzim CpG Methylase (M. Sssl) izolovan iz bakterije *Escherichia coli* koja eksplicira gen za metiltransferazu poreklom iz soja MQ1 bakterije *Spiroplasma sp.* (E2010; Zymo) po uputstvu proizvođača. Naime, 1 µg DNK izolovane iz kontrolnih HCjE ćelija pomešan je sa 10x CpG reakcionog pufera, 20x SAM (12 mM) kao donorom metil grupe i 1 µl CpG metilaze (4 U) u ukupnoj zapremini od 20 µl. Reakciona smeša je inkubirana preko noći na 30°C. U cilju što efikasnije metilacije DNK, nakon 4 h od početka inkubacije dodato je još 1 µl CpG metilaze. Sutradan je enzim inaktiviran na 65°C/20 min nakon čega je metilovana DNK odmah korišćena za bisulfitnu konverziju.

#### 3.2.5.2. Bisulfitna konverzija DNK

Genomska DNK bisulfitno je konvertovana (**Slika 3.1**) korišćenjem seta za bisulfitnu konverziju (EZ-DNA methylation kit; D5002; Zymo Research, Orange, CA, USA) po uputstvu proizvođača. DNK u količini od 100-1200 ng je pomešana i inkubirana sa puferom za diluciju (M-Dilution Buffer) iz seta. Da bi se pospešila denaturacija dvolančanog molekula DNK, protokol je modifikovan po preporuci proizvođača upotrebom 7,5 µl pufera za diluciju i inkubacijom na 42°C/30 min. Nakon toga u uzorak je dodato 100 µl reagensa za konverziju (CT Conversion Reagent) koji u sebi sadrži Na-bisulfit za deaminaciju nemetilovanog citozina i smeša je inkubirana preko noći na 50°C. Sutradan je u kolonicu (Zymo-Spin™ IC Column) u koju je dodat pufer za vezivanje (M-Binding Buffer) nanet uzorak, nakon čega je kolonica centrifugirana na 10000 x g/30 s. Nakon ispiranja puferom iz seta koji sadrži etanol, kolonica je inkubirana 20 min na sobnoj temperaturi sa puferom za desulfonaciju (M-Desulphonation Buffer), centrifugirana na 10000 x g/30 s čime su otklonjeni bisulfitni adukti sa uracilovog prstena, i isprana dva puta. Finalno je za eluciju bisulfitno konvertovane DNK korišćeno ≥10 µl pufera za eluciju koji je dva puta vraćen na kolonicu i eluiran da bi se postigla veća koncentracija eluata. Bisulfitno konvertovana DNK je čuvana na -20°C do upotrebe.



**Slika 3.1. Hemijska reakcija bisulfitne konverzije DNK.** Tokom koraka sulfonacije u kiselim uslovima dolazi do nukleofilne adicije bisulfitnog jona ( $\text{HSO}_3^-$ ) na C-6 poziciju citozina. Drugi korak konverzije podrazumeva hidrolitičku deaminaciju derivata citozina u 5,6-dihidrouracil-6-sulfonat, a tokom desulfonacije sulfitna grupa se uklanja alkalnim tretmanom, regeneriše se dvoguba veza i nastaje uracil. Preuzeto i modifikovano iz (Liu i sar., 2019).

### 3.2.5.3. Dizajniranje prajmera specifičnih za bisulfitno konvertovanu DNK

Za predikciju CpG ostrvaca u okviru *CDH1*, *FN1* i *ACTA2* gena korišćen je bioinformatički alat CpG Isli Searcher (<http://cpgisli.usc.edu/>) (Takai i Jones, 2003) sa stardnim parametrima (%GC parova veći od 55%; detektovan broj CpG/očekivani broj CpG veći od 0,65; dužina CpG ostrvca veća od 500 bp). Genomske DNK sekvence koje su korišćene za analizu obuhvatale su regione 3000 bp uzvodno i nizvodno od TSS gena za E-kadherin (*CDH1*; NCBI referentne sekvence NG\_008021.1), fibronektin (*FN1*; NG\_012196.1) i  $\alpha$ -SMA (*ACTA2*; NG\_011541.1). Pozicija CpG ostrvaca u okviru 5' UTR i kodirajućeg regiona gena koji kodiraju za miRNK određena su korišćenjem Methyl Primer Express ver. 1.0 programa (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) od strane Davalos i sar. (Davalos i sar., 2012). Takođe, prajmeri korišćeni za analizu metilacije DNK hsa-miR-200b/a/429 lokusa preuzeti su od Davalos i sar. (Davalos i sar., 2012), dok su prajmeri korišćeni za analizu DNK metilacije *CDH1*, *FN1* i *ACTA2* gena i hsa-miR-200c/141 lokusa dizajnirani pomoću programa MethPrimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>). Parovi prajmera su napravljeni tako da budu komplementarni bisulfitno konvertovanoj kompletno metilovanoj DNK (M), kompletno nemetilovanoj DNK (U) ili sekvenci DNK koja ne sadrži CpG dinukleotide koji mogu biti diferencijalno metilovani. Za metilaciono-specifičnu PCR analizu i bisulfitno sekvenciranje *CDH1*, *FN1* i *ACTA2* gena korišćeni su M prajmeri, dok je za analizu kriva topljenja korišćen miks sva četiri prajmera (M i U) da bi se pokrile sve moguće varijante u metilacionom statusu. U slučaju miR-200b/a/429 lokusa za analizu kriva topljenja i bisulfitno sekvenciranje korišćena su dva različita „forward” i isti reverzni prajmer koji se vezuju i za metilovanu i za nemetilovanu DNK, dok je isti set prajmera koji se vezuje i za metilovanu i za nemetilovanu DNK korišćen u obe metode za analizu metilacije miR-200c/141 lokusa. Nazivi prajmera, sekvence i dužine PCR produkata nabrojani su u **Tabeli 3.2.**

### 3.2.5.4. Metilaciono-specifična PCR analiza (MSP)

Metilaciono-specifična PCR analiza (engl. *methylation-specific PCR analysis* - MSP) sprovedena je korišćenjem M para prajmera koji sadrže 2 CpG dinukleotida u svakom pojedinačnom prajmeru za *CDH1*, kao i jedan CpG par u „forward” i dva CpG para u reverznim prajmerima za *FN1* i *ACTA2*. Reakciona smeša za MSP sastojala se od Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix reagensa (Fermentas), 4  $\mu\text{l}$  bisulfitno konvertovane DNK (teorijske koncentracije od 60 ng/ $\mu\text{l}$ ) i 0,5  $\mu\text{M}$  M prajmera u finalnoj zapremini od 10  $\mu\text{l}$ . MSP je urađen na QuantStudio 3 Real-Time PCR sistemu. Temperaturni profil sastojao se od inicijalne denaturacije na 95°C/10 min praćene sa 40 ciklusa denaturacije na 95°C/15 s i vezivanja i elongacije na 58°C/60 s za *CDH1* i *FN1*, odnosno 55°C/60 s za *ACTA2*. Kao endogena kontrola za normalizaciju rezultata MSP analize i kao kontrola efikasnosti bisulfitne konverzije korišćeni su referentni prajmeri koji ne sadrže CpG dinukleotide, vezuju se i za metilovanu i za nemetilovanu DNK i isključivo amplifikuju bisulfitno konvertovanu DNK. Nakon normalizacije, količina metilovanog produkta u uzorcima procenjena je poređenjem sa *in vitro* metilovanom DNK, bisulfitno konvertovanom i amplifikovanom pod istim uslovima, za koju se pretpostavlja da je 100% metilovana.



**Tabela 3.2. Prajmeri korišćeni u analizi metilacije DNK**

Naziv gena/miRNK	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera (5' - 3')	Dužina PCR produkta	
<b>CDH1</b>	Fw M	GTAATTTTAGGTTAGAGGGTTATCGC	212 bp	
	Rev M	CACAAATACTTTACAATCCGACG		
	Fw U	ATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGTGT	208 bp	
	Rev U	ACAAATACTTTACAATCCAACACC		
<b>FN1</b>	Fw M	AAAACATTAATAAAAAATTTTCCCG	143 bp	
	Rev M	TTGGACGGTTAGTAGTAGTAGTTCG		
	Fw U	AACATTAATAAAAAATTTTCCACACA	141 bp	
	Rev U	TTGGATGGTTAGTAGTAGTAGTTTGG		
<b>ACTA2</b>	Fw M	TTTTTAGGTTCCGGTGTTTAGAAC	239 bp	
	Rev M	TATCAAAACTTATCCAAAAATCCG		
	Fw U	TTTTTAGGTTTGGGTGTTTAGAATG	237 bp	
	Rev U	TCAAAACTTATCCAAAAATCCACT		
<b>ACTA2</b> (referentni prajmeri za MSP)	Fw	TTTGAGAATTGTTAGAAAATGAGTAATATT	139 bp	
	Rev	AACTCCTAAACAAACCCTAACAAAC		
<b>hsa-miR-200c/141</b>	Bis-Seq/HRM Fw	GTGATAGGTAAGGTTATTAGGGGAG	188 bp	
	Bis-Seq/HRM Rev	CCCAAATTACAATCCAAACAAAC		
<b>hsa-miR-200b/a/429</b>	HRM Fw	GGAGTATTGTTTTTTGTAAG	249 bp	326 bp
	Bis-Seq/HRM Rev	TCTACCTCAACCAAATCAAACC		
	Bis-Seq Fw	TGGGAGTTTAGGGGATATATTTG		

### 3.2.5.5. Analiza kriva topljenja visoke rezolucije (HRM)

Za potrebe analize krive topljenja visoke rezolucije (engl. *high-resolution melting analysis* - HRM) inicijalno je bilo neophodno bisulfitno konvertovati komercijalno dostupne humane metilovane i nemetilovane standarde (D5014; Zymo Research) korišćenjem seta za bisulfitnu konverziju (EZ-DNA methylation kit; D5002; Zymo Research) na način opisan u Poglavlju 3.2.5.2. Nemetilovani standardi prečišćeni su iz humane ćelijske linije HCT116 u kojoj su isključeni geni koji kodiraju za DNMT1 i DNMT3b, dok je metilovani standard dobijen enzimskom metilacijom DNK izolovane iz iste ćelijske linije. Da bi se napravio opseg standarda potrebnih za HRM analizu, a koji sadrže različit procenat metilacije DNK, bisulfitno konvertovani metilovani i nemetilovani standardi su mešani u odnosima (M:U) 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 i 100:0. PCR amplifikacija i HRM analiza urađene su sekvencijalno na QuantStudio 3 Real-Time PCR sistemu. Za PCR reakciju korišćen je miks sva četiri prajmera (M i U) u slučaju *CDH1*, *FN1* i *ACTA2* gena, ili par prajmera koji amplifikuje bisulfitno konvertovanu DNK nezavisno od metilacije CpG parova za analizu gena koji kodiraju za miRNK. Za HRM analizu u slučaju *CDH1*, *FN1* i *ACTA2* gena reakciona smeša zapremine 10 µl sastojala se od 5 µl 2x MeltDoctor HRM Master Mix reagensa (Applied Biosystems), 0,15 µM svakog prajmera i 1 µl bisulfitno konvertovanog templata (teorijske koncentracije od 20 ng/µl), dok je za gene koji kodiraju za miRNK korišćeno 0,3 µM svakog prajmera i 2 µl bisulfitno konvertovanog templata (teorijske koncentracije od 10 ng/µl). Temperaturni profil amplifikacije

sastojao se od inicijalne denaturacije 95°C/10 min, praćene sa 45 ciklusa PCR od tri koraka i finalnog koraka elongacije prajmera na 72°C/7 min. PCR program od tri koraka za analizu *CDH1*, *FN1* i *ACTA2* podrazumevao je 5 ciklusa denaturacije na 95°C/30 s, vezivanja prajmera na 58°C/30 s i elongacije na 72°C/60 s; 5 ciklusa denaturacije na 95°C/30 s, vezivanja prajmera na 53°C/30 s i elongacije na 72°C/60s; i 35 ciklusa denaturacije na 95°C/30 s, vezivanja prajmera na 48°C/30 s i elongacije na 72°C/60 s. PCR program od tri koraka za analizu gena koji kodiraju za miRNK sastojao se od 5 ciklusa denaturacije na 95°C/30 s, vezivanja prajmera na 62°C/30 s i elongacije na 72°C/60 s; 5 ciklusa denaturacije na 95°C/30 s, vezivanja prajmera na 58°C/30 s i elongacije na 72°C/60s; i 35 ciklusa denaturacije na 95°C/30 s, vezivanja prajmera na 55°C/30 s i elongacije na 72°C/60 s. HRM program sastojao se od podizanja temperature od 60-95°C za 0.025°C/s sa akvizicijom fluorescencije na svakom temperaturnom inkrementu. HRM v3.1 program (Applied Biosystems) je korišćen za analizu krajnjih produkata. Visina pikova stiarda dobijena sa grafika razlika u odnosu na nemetilovani stiard (0%), ucrtana je naspram procenta metilacije DNK korišćenih standarda da bi se dobila standardna kriva i jednačina linearne regresije pomoću koje je izračunat nivo metilacije DNK svakog uzorka.

#### 3.2.5.6. Bisulfitno sekvenciranje (Bis-Seq)

Bisulfitno modifikovana DNK je za potrebe bisulfitnog sekvenciranja (engl. *bisulfite sequencing* – Bis-Seq) *CDH1*, *FN1* i *ACTA2* gena inicijalno amplifikovana korišćenjem M prajmera u reakcionoj smeši ukupne zapremine od 30 µl. Reakciona smeša sastojala se od 15 µl 2x AmpliTaq Gold 360 Master Mix reagensa (Applied Biosystems), 0,5 µM svakog prajmera i 4 µl bisulfitno konvertovanog templata (teorijske koncentracije od 80 ng/µl). U slučaju bisulfitnog sekvenciranja gena koji kodiraju za miRNK korišćeni su prajmeri koji amplifikuju DNK nezavisno od metilacionog statusa CpG parova i 3 µl bisulfitno konvertovanog templata (teorijske koncentracije od 15 ng/µl). Amplifikacija gena urađena je na Eppendorf Mastercycler Pro aparatu (Eppendorf Austria GmbH, Vienna, Austria). Za amplifikaciju *CDH1*, *FN1* i *ACTA2* korišćen je temperaturni profil koji se sastojao od inicijalne denaturacije na 95°C/10 min, 45 ciklusa PCR od tri koraka i finalne elongacije prajmera na 72°C/7 min. PCR program podrazumevao je 5 ciklusa denaturacije na 95°C/30 s, vezivanja prajmera na 62°C/30 s i elongacije na 72°C/60 s; 5 ciklusa denaturacije na 95°C/30s, vezivanja prajmera na 57°C/30 s i elongacije na 72°C/60 s; i 35 ciklusa denaturacije na 95°C/30 s, vezivanja prajmera na 51,5°C/30 s i elongacije na 72°C/60 s. Nakon toga, prečišćavanje produkata PCR reakcije i Sangerovo sekvenciranje umnožene bisulfitno konvertovane DNK urađeno je u Eurofins Genomics AT (Vienna, Austria). Uslovi amplifikacije u slučaju gena koji kodiraju miRNK sastojali su se od inicijalne denaturacije na 95°C/10 min, 60 ciklusa dvostepene PCR reakcije i finalne elongacije prajmera na 72°C/7 min. Dvostepeni PCR program podrazumevao je 5 ciklusa denaturacije na 95°C/30 s, vezivanja prajmera na 58°C/30 s i elongacije na 72°C/60 s; i 55 ciklusa denaturacije na 95°C/30 s, vezivanja prajmera na 55°C/30 s i elongacije na 72°C/60 s. Nakon toga, prečišćavanje produkata PCR reakcije i Sangerovo sekvenciranje umnožene bisulfitno konvertovane DNK urađeno je u Macrogen Europe B.V. (Amsterdam, Netherlands). Za poravnavanje svih sekvenci dobijenih nakon bisulfitnog sekvenciranja korišćen je program BiQ Analyzer (Max Planck Institute for Informatics, Saarbrücken, Germany).

### 3.3. Metode za manipulaciju proteinima

#### 3.3.1. Priprema ukupnih ćelijskih lizata

Za izolaciju proteina nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* korišćen je set za izolaciju DNK/RNK/proteina (AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit; Qiagen) prema uputstvu

proizvođača opisanom u Poglavlju 3.2.1. Nakon prebacivanja uzoraka na kolonicu za izolaciju RNK i prvog centrifugiranja, eluat je sačuvan i korišćen za izolaciju proteina. Da bi proteini precipitovali eluat je pomešan sa 1 zapreminom APP pufera iz seta i inkubiran 10 min na sobnoj temperaturi. Potom su tubice centrifugirane na 16000 x g/10 min, supernatant je odliven, pelet je ispran 70% etanolom i tubica je ponovo centrifugirana na 16000 x g/1 min. Nakon toga supernatant je odliven i talog je osušen stajanjem 5-10 min na sobnoj temperaturi. Proteini su rastvoreni u ALO puferu iz seta u koji je dodan ditiotreitol (finalne koncentracije 0,05 M) koji sprečava formiranje intramolekulskih i intermolekulskih disulfidnih veza između cisteinskih aminokiselinskih ostataka u proteinima. Čelijski lizati čuvani su na -80°C do upotrebe. Za izolaciju proteina u *in vitro* modelu procesa EMT, nakon dostizanja 80% konfluentnosti, kontrolne i tretirane HCJE ćelije su isprane PBS puferom i lizirane korišćenjem RIPA pufera (engl. *radioimmunoprecipitation assay buffer*) (Sigma-Aldrich) u prisustvu miksa proteaznih inhibitora (39101 i 39050; SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany). Posle inkubacije od 30 min na ledu, ćelije su centrifugirane na 4°C na 16000 x g/20 min, nakon čega je supernatant (ćelijski lizat) prebačen u novu tubicu i čuvan na -80°C do upotrebe.

### 3.3.2. Određivanje koncentracije proteina

Ukupna koncentracija proteina u ćelijskim lizatima određivana je kolorimetrijskim Lowry esejem (Lowry i sar., 1951). Uzorci razblaženi 100 puta su pomešani sa 1 ml rastvora koji se sastojao od 0,01% CuSO<sub>4</sub>; 0,02% K-Na-tartarata; 0,01 N NaOH i 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Nakon vorteksovanja i inkubacije od 10 min na sobnoj temperaturi u uzorke je dodato 0,1 ml 2x razblaženog Folinovog reagensa (Institut Mol, Stara Pazova, Srbija) i reakciona smeša je ponovo vorteksovana i inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi. Apsorbanca je merena na 750 nm na spektrofotometru (Shimatzu UV-160). Korišćenjem standardne krive dobijene na osnovu vrednosti apsorbance albumina seruma govečeta (engl. *bovine serum albumin* - BSA) poznatih koncentracija (100-400 µg/ml), izračunata je koncentracija proteina prisutna u ćelijskim lizatima.

### 3.3.3. Imunoblot analiza proteina (IBA)

Za razdvajanje proteina prema molekulskim masama korišćena je tris-glicinska SDS-PAGE elektroforeza (engl. *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*). Jednaka količina ćelijskih lizata (20-60 µg u zavisnosti od zastupljenosti proteina koji se detektuje) razdvajana je na gelu koji se sastojao od gornjeg gela za skoncentrisavanje (4% poliakrilamid; 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,05% amonijum-persulfat (APS) i 0,1% tetrametiletilendiamin (TEMED)) i donjeg gela za razdvajanje (12% poliakrilamid; 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,05% APS i 0,05% TEMED). Pre nanošenja na gel proteini su pomešani sa Laemmli puferom (1 mM EDTA; 8 M urea; 0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8; 5% β-merkaptotanol; 2% SDS i 5% bromfenol plavo) u odnosu 1:1. Kao pufer za elektroforezu korišćen je Tris-glicinski pufer (0,195 M glicin; 25 mM Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS). Uzorci su putovali kroz gel za skoncentrisavanje i razdvajanje pri naponu 120 V i 150 V, respektivno. Za elektroforezu je korišćen sistem Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell (BioRad). Nakon SDS-PAGE elektroforeze proteini su pod uticajem konstantne struje i napona od 30 V preko noći prenešeni sa gelova na PVDF (polivinilidendifluorid) membranu (Amersham Hybond P 0.45 PVDF, GE Healthcare Life Sciences). Pre transfera PVDF membrane su aktivirane 2 min u metanolu a potom, zajedno sa gelovima, inkubirane 30 min u ohlađenom puferu za transfer (25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 192 mM glicin; 20% methanol; 0,02% SDS), nakon čega su gelovi i membrane zajedno sa filter papirima slagani u aparat za transfer (Bio-Rad, Mini TransBlot Electrophoretic Transfer Cell). Da bi se proverila uspešnost transfera i elektroforeze, membrane su nakon transfera bojene 1% Ponceau-S rastvorenim u 5% sirćetnoj kiselini. Nakon ispiranja boje

TBS-T puferom (0,05% Tween-20 (Serva) u TBS puferu (20 mM Tris-HCl, pH 7,6; 150 mM NaCl)), nespecifično vezivanje antitela je blokirano inkubacijom membrana u 5% rastvoru nemasnog mleka u prahu (Santa Cruz Biotechnology) u TBS-T puferu. Posle ponovnog ispiranja u TBS-T puferu membrane su inkubirane sa primarnim antitelima na +4°C preko noći. Sutradan, nakon ispiranja nevezanog primarnog antitela TBS-T puferom, membrane su na sobnoj temperaturi inkubirane 60 min sa odgovarajućim sekundarnim antitelima obeleženim peroksidazom rena (engl. *horseradish peroxidase* - HRP). Sva antitela korišćena u imunoblot analizi (engl. *immunoblot analysis* - IBA) navedena su u **Tabeli 3.3**. Posle ispiranja nevezanog sekundarnog antitela TBS-T puferom, membrane su bojene luminolom (Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruz Biotechnology) i proteini su vizualizovani na filmovima (Hyperfilm ECL, Santa Cruz Biotechnology, RPN 3103 K). Ukoliko je ista membrana ponovo korišćena, vezana antitela su uklanjana inkubacijom membrane na 55°C 35 min u puferu za uklanjanje (100 mM  $\beta$ -merkaptotanol; 2% SDS; 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8). Intenzitet signala na filmu meren je denzitometrijski korišćenjem TotalLab ver. 1.10 programa (Phoretix International Ltd, Newcastle upon Tyne, UK). Nakon normalizacije u odnosu na vrednost dobijenu za GAPDH u istom uzorku kvantifikovan je relativan nivo proteina od interesa.

**Tabela 3.3. Antitela korišćena u IBA, ICC i FCM analizama**

	<b>Razblaženje IBA/ICC/FCM</b>	<b>Kat. broj/Proizvođač</b>
<b><i>Primarna antitela</i></b>		
<b>anti-p-SMAD3 (Ser208)</b>	1:1000/-/-	sc-130218/Santa Cruz Biotechnology
<b>anti-P38<math>\alpha</math></b>	1:1000/-/-	C-20/Santa Cruz Biotechnology
<b>anti-p-P38 (Tyr182-R)</b>	1:1000/-/-	sc-7975-R/Santa Cruz Biotechnology
<b>anti-JNK1</b>	1:750/-/-	F-3/Santa Cruz Biotechnology
<b>anti-pJNK (Thr183/Tyr185-R)</b>	1:750/-/-	sc-12882-R/Santa Cruz Biotechnology
<b>anti-GSK-3<math>\beta</math></b>	1:2000/-/-	H-76/Santa Cruz Biotechnology
<b>anti-pGSK-3<math>\beta</math> (Ser9-R)</b>	1:1500/-/-	sc-11757-R/Santa Cruz Biotechnology
<b>anti-PI3 Kinase p110<math>\gamma</math></b>	1:1000/-/-	#4252/Cell Signaling Technology
<b>anti-Akt</b>	1:2000/-/-	#9272/Cell Signaling Technology
<b>anti-phospho-Akt (Ser473) (193H12)</b>	1:1000/-/-	#4058/Cell Signaling Technology
<b>anti-p44/42 MAPK (ERK1/2) (137F5)</b>	1:2000/-/-	#4695/Cell Signaling Technology
<b>anti-phospho-p44/42 MAPK (pERK1/2) (Thr202/Tyr204)</b>	1:1000/-/-	#9101/Cell Signaling Technology

<b>anti-E-cadherin (H-108)</b>	1:4000 (eksperimenti sa <i>C. trachomatis</i> ); 1:1000/1:100 (eksperimenti sa <i>C. trachomatis</i> ); 1:50/-	sc-7870/Santa Cruz Biotechnology
<b>anti-E-cadherin [M168]</b>	-/-/1:100	ab76055/Abcam
<b>anti-Desmoplakin [EPR4383(2)]</b>	1:2000/1:100/-	ab109445/Abcam
<b>anti-N-cadherin</b>	1:1000/1:100/1:100	ab18203/Abcam
<b>anti-Fibronectin (H-300)</b>	1:1000/1:150/-	sc-9068/Santa Cruz Biotechnology
<b>anti-Smooth Muscle Actin (CGA7)</b>	1:1000/1:100/-	sc-53015/Santa Cruz Biotechnology
<b>anti-PARP-1 (H-205)</b>	1:1000/-/-	sc-7150/Santa Cruz Biotechnology
<b>anti-caspase-3 (H-277)</b>	1:5000/-/-	sc-7148/Santa Cruz Biotechnology
<b>anti-cleaved caspase-3 (Asp175)</b>	1:3000/-/-	#9661/Cell Signaling Technology
<b>anti-GAPDH</b>	1:1500 (eksperimenti sa <i>C. trachomatis</i> ); 1:1000/-/-	FL-335/Santa Cruz Biotechnology
<b><i>Sekundarna antitela</i></b>		
<b>anti-zečji IgG-HRP</b>	1:2000/-/-	sc-2379/Santa Cruz Biotechnology
<b>anti-mišji IgG-HRP</b>	1:2000/-/-	#7076/Cell Signaling Technology
<b>anti-zečji IgG, F(ab')<sub>2</sub>-TRITC (eksperimenti sa <i>C. trachomatis</i>)</b>	-/1:100/-	sc-3841/Santa Cruz Biotechnology
<b>anti-mišji IgG H&amp;L-Alexa Fluor 488 (eksperimenti sa <i>C. trachomatis</i>)</b>	-/1:100/-	ab169345/Abcam
<b>anti-zečji IgG (H+L), Alexa Fluor 488</b>	-/1:2000/-	A-21206/Invitrogen
<b>anti-mišji IgG (H+L), Alexa Fluor 488</b>	-/-/1:1000	A-21202/Invitrogen
<b>anti-zečji IgG (H+L), Alexa Fluor 555</b>	-/-/1:1000	A-31572/Invitrogen

### 3.3.4. Imunocitohemija (ICC)

Za imunocitohemijsko bojenje (engl. *immunocytochemistry* - ICC) HCjE ćelije su gajene na sterilnim stakalcima u ploči sa 24 bunara i po dostizanju 70% konfluentnosti inficirane sa 10<sup>5</sup> IFU bakterije *C. trachomatis* po bunaru. Infekcija je sprovedena na način opisan u Poglavlju 3.1.1. Nakon 72 h, kontrolne i inficirane HCjE ćelije su fiksirane inkubacijom od 15 min u 4% rastvoru paraformaldehida (Science Services GmbH, Munich, Germany) u PBS puferu na 37°C. Za permeabilizaciju ćelija korišćen je 0,3% Triton X-100 (Amersham Biosciences, Uppsala Sweden)

rastvoren u PBS puferu (10 min), dok je za blokiranje upotrebljavan 3% BSA (Serva) rastvoren u PBS puferu (60 min). Za dobijanje fluorescentnog signala stakalca su sukcesivno inkubirana preko noći na 4°C sa primarnim i odgovarajućim fluorescentno obeleženim sekundarnim antitelima navedenim u **Tabeli 3.3**. Sva antitela su razblaživana u 0,2% rastvoru Tween-20 u PBS puferu, pri čemu je i za sva ispiranja između različitih koraka korišćen isti rastvor. DNK je vizualizovana inkubacijom ćelija 20 min sa 4,6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI) (0,2 µg/ml) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). U odnosu na prethodno navedenu proceduru, kontrolne i tretirane HCjE ćelije korišćene u eksperimentima na *in vitro* EMT modelu su fiksirane inkubacijom od 10 min na 37°C u 3,5% rastvoru formaldehida (Zorka Pharma, Sabac, Serbia) u PBS puferu i permeabilizovane korišćenjem 0,2% rastvora Triton X-100 u PBS puferu (10 min). Za vizualizaciju DNK, u ovom slučaju, stakalca su inkubirana 5 min u prisustvu DAPI (0,1 µg/µl). Sva stakalca su lepljena na mikroskopske pločice korišćenjem Mowiol reagensa (Calbiochem, San Diego, CA, USA), nakon čega su ćelije fotografisane pomoću mikroskopa (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) korišćenjem odgovarajućih filtera.

### 3.3.5. Protočna citometrija (FCM)

Za citometrijsku analizu (engl. *flow cytometry* - FCM) ekspresije E-kadherina i N-kadherina kontrolne i HCjE ćelije tretirane TGF-β1 proteinima su odlepljene od podloge korišćenjem 0,05% tripsina/0.02% EDTA rastvora u PBS puferu. Da bi se postigao oporavak površinskih antigena čija je konformacija narušena tripsinizacijom, ćelije su resuspendovane u svežem K-SFM medijumu. Nakon inkubacije od 60 min na 37°C, na 5% CO<sub>2</sub> i 95% vlažnosti, ćelije su permeabilizovane resuspendovanjem u 0,3% rastvoru saponina (Sigma-Aldrich) u PBS puferu. Nakon 15 min, polovina ćelija iz svake grupe inkubirana je 60 min sa po jednim primarnim antitelom i sukcesivno 30 min sa odgovarajućim fluorescentno obeleženim sekundarnim antitelom, navedenim u **Tabeli 3.3**. Antitela su razblaživana u rastvoru PBS pufera koji je sadržao 0,1% saponin i 3% BSA, dok su sva ispiranja rađena 0,1% rastvorom saponina u PBS puferu. Nakon procedure bojenja, ćelije su resuspendovane u K-SFM medijumu i ekspresija E-kadherina i N-kadherina je analizirana na FACS Aria III protočnom citometru (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), korišćenjem programa FACSDiva.

## 3.4. Bioinformatička predikcija vezivnih mesta za regulatorne proteine u promotorima gena

Za identifikaciju potencijalnih mesta vezivanja regulatornih proteina SP1 i c-MYB u promotoru miR-200b/a/429 i miR-200c/141 lokusa, korišćen je bioinformatički alat Match<sup>TM</sup>-public ver. 1.0 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html#match>) sa zadatim parametrima. Pozicije Z-boksa (CAGGTA) i E-boksa (CACCTG) u analiziranim regionima miR-200b/a/429 i miR-200c/141 lokusa identifikovana su od strane Burk i sar. i Bracken i sar., respektivno (Bracken i sar., 2008; Burk i sar., 2008). Takođe, iz literature su poznate pozicije CCAAT-boksa, GC-boksa i više E-boksova u regionu promotora *CDH1* koje prepoznaju proteini koji se specifično vezuju za CAAT sekvencu, regulatorni proteini AP-2 i SP1 i transkripcioni faktori ZEB, TWIST i SNAI, respektivno (Behrens i sar., 1991; Bussemakers i sar., 1994; Hennig i sar., 1996; Faraldo i sar., 1997; Giroldi i sar., 1997; Comijn i sar., 2001; Thiery i sar., 2009).

## 3.5. Statistička obrada podataka

Svi eksperimenti urađeni su u triplikatu ukoliko nije drugačije naznačeno i rezultati su, u zavisnosti od eksperimenta, prikazani kao srednja vrednost ± SD ili srednja vrednost ± SEM. Za

statističku analizu je korišćen program IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0 (Armonk, NY, USA). Da bi se utvrdilo da li dobijeni podaci prate normalnu raspodelu upotrebljavan je Shapiro-Wilk test. Za poređenje srednjih vrednosti normalno distribuiranih varijabli između dve grupe korišćen je Studentov t-test, dok je za podatke koji ne prate normalnu distribuciju primenjen Mann-Whitney U test. One-Way ANOVA praćena *post-hoc* analizom u kojoj je korišćen Tukey's HSD test upotrebljavana je za poređenje srednjih vrednosti više grupa. U pojedinim eksperimentima je za analizu RT-qPCR podataka, radi procene statističke značajnosti između srednjih vrednosti kontrolne grupe i srednjih vrednosti ostalih grupa, primenjivan One Sample t-test na log<sub>2</sub> transformisanim podacima. Nakon tog testa, srednje vrednosti i SEM prikazane su na log<sub>2</sub> skali dok je odgovarajuća linearna skala prikazana na desnoj y-osi grafika. Nulta hipoteza je odbacivana ukoliko je  $p \leq 0,05$ , pri čemu "\*" ukazuje na statistički značajnu razliku u poređenju sa kontrolom ( $*p \leq 0,05$ ;  $**p \leq 0,01$ ), "#" ukazuje na statistički značajnu razliku u poređenju sa HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1 ( $\#p \leq 0,05$ ;  $\#\#p \leq 0,01$ ), dok "+" ukazuje na statistički značajnu razliku u poređenju sa HCjE ćelijama tretiranim 5-AzaC R ( $+p \leq 0,05$ ;  $++p \leq 0,01$ ).

---

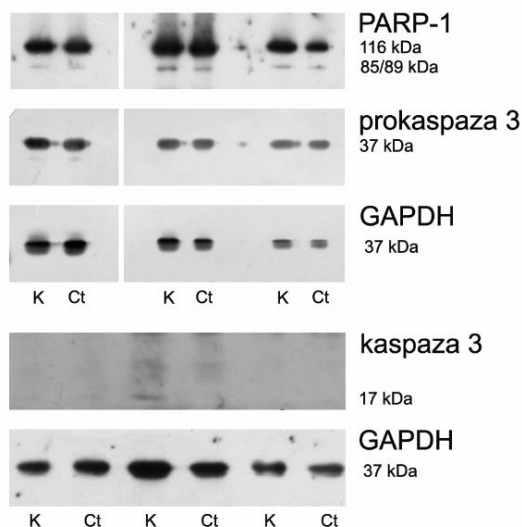
## 4. REZULTATI

---

### 4.1. Potencijal infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* za pokretanje procesa EMT

#### 4.1.1. Određivanje vijabilnosti HCjE ćelija nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis*

Sa ciljem ispitivanja efekata infekcije humanih epitelnih ćelija konjunktive (HCjE) bakterijom *Chlamydia trachomatis*, u flaskove u kojima su gajene HCjE ćelije je dodata bakterijska suspenzija pri MOI od 3, pri čemu su sve dalje analize rađene nakon 72 h. Kako se pokazalo da infekcija HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* pri niskoj vrednosti MOI, koja se najčešće koristi u istraživanjima, ne dovodi do produktivne infekcije ovih ćelija, moguće zbog prisustva mucina na apikalnoj strani koji uspešno sprečavaju vezivanje i ulazak bakterije u ćeliju (Gipson i Argüeso, 2003; Derrick i sar., 2016b), u ovoj tezi su korišćene veće vrednosti MOI. S' obzirom na relativno visoku vrednost MOI u trenutku infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* zbog koje može doći do nepoželjnog citotoksičnog efekta po ćelije domaćina, analizom proteinske ekspresije PARP-1, prokaspaze 3 i aktivne kaspaze 3 ispitana je vijabilnost inficiranih HCjE ćelija. PARP-1 je jedarni protein sa brojnim funkcijama u ćeliji uključujući i ulogu u usmeravanju ćelije ka preživljavanju ili specifičnom tipu ćelijske smrti. Naime, PARP-1 prvenstveno funkcioniše kao senzor stresa kojem je ćelija izložena i u zavisnosti od tipa, trajanja i jačine stimulusa pokreće ili popravku nastalih oštećenja na lancu DNK ili eliminaciju ćelije, pri čemu se različiti proteolitički fragmenti PARP-1 često koriste za definisanje tipa ćelijske smrti. Imunoblot analiza je pokazala da se kontrolne i HCjE ćelije inficirane bakterijom *C. trachomatis* ne razlikuju u profilu proteolize PARP-1 proteina (**Slika 4.1**). Kod obe grupe ćelija dominantnu formu PARP-1 činio je protein pune dužine (116 kDa), apoptotski fragment (85/89 kDa) bio je prisutan u maloj količini, dok nekrotski fragment (50 kDa) nije detektovan. Odsustvo programirane ćelijske smrti je potvrđeno i imunoblot analizom kojom je praćen nivo ekspresije prokaspaze 3 i aktivne forme kaspaze 3, glavnog efektor proteolize tokom apoptoze. Izostanak smanjenja nivoa prokaspaze 3 i odsustvo aktivne kaspaze 3 nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* takođe ukazuju na visoku vijabilnost inficiranih HCjE ćelija.

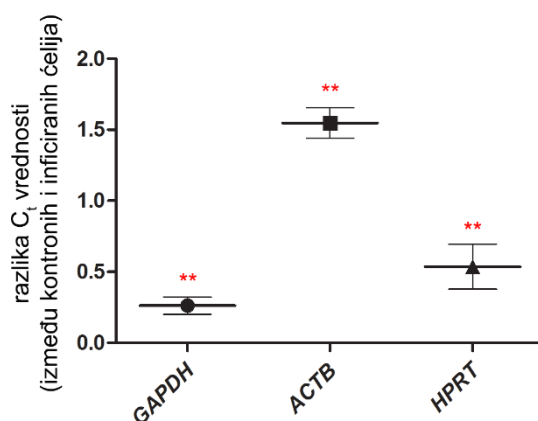




**Slika 4.1. Odsustvo apoptoze HCjE ćelija 72 h nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis*.** Prikazana je imunoblot analiza proteina uključenih u apoptozu ćelija (PARP-1, prokaspaza 3 i aktivna kaspaza 3) i GAPDH koji služi kao interna kontrola, u kontrolnim (K) i HCjE ćelijama nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* (Ct) iz tri nezavisna eksperimenta.

#### 4.1.2. Određivanje adekvatnog referentnog gena za RT-qPCR analizu

Važan deo RT-qPCR analiza podrazumeva odabir odgovarajućeg referentnog gena koji je stabilno eksprimiran nezavisno od eksperimentalnih uslova i koji se transkribuje na sličnom nivou kao i geni od interesa. Da bi se u HCjE ćelijama identifikovao gen čija je ekspresija nezavisna od infekcije bakterijom *C. trachomatis* testiran je nivo iRNK *GAPDH* (engl. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), *ACTB* (engl. *beta-actin*) i *HPRT1* (engl. *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*) gena. Navedeni geni se često koriste za normalizaciju ekspresije targetnih gena, a zbog izbegavanja grešaka u interpretaciji rezultata dobijenih RT-qPCR analizom poreklom od razlika u početnoj količini uzoraka, kvalitetu RNK uzoraka, efikasnosti sinteze cDNK i same reakcije lančanog umnožavanja. Srednja vrednost razlike  $C_t$  (engl. *cycle threshold*) vrednosti za *GAPDH* između kontrolnih i HCjE ćelija inficiranih bakterijom *C. trachomatis* bila je 2 puta manja u odnosu na srednju vrednost razlike  $C_t$  vrednosti za *HPRT* i 6 puta manja u odnosu na srednju vrednost razlike  $C_t$  vrednosti za *ACTB*, sa najmanjom vrednošću SEM (**Slika 4.2**). Zbog toga je, iako je za svaki analizirani gen dobijena statistički značajna razlika u  $C_t$  vrednosti između kontrole i HCjE ćelija inficiranih bakterijom *C. trachomatis* ( $p=0,0002$  za *GAPDH*,  $p=0,00003$  za *ACTB*,  $p=0,003$  za *HPRT*), kao referentni gen za dalje RT-qPCR analize izabran *GAPDH*.

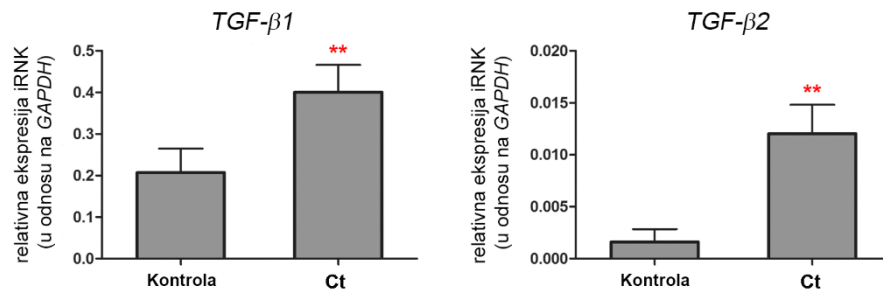


**Slika 4.2. Razlika  $C_t$  vrednosti između kontrolnih i HCjE ćelija inficiranih bakterijom *C. trachomatis* za *GAPDH*, *ACTB* i *HPRT*.** Rezultati su dobijeni RT-qPCR analizom i prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. \*\* $p \leq 0,01$ .

#### 4.1.3. Pokretanje signalnih puteva uključenih u proces EMT u odgovoru na infekciju HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis*

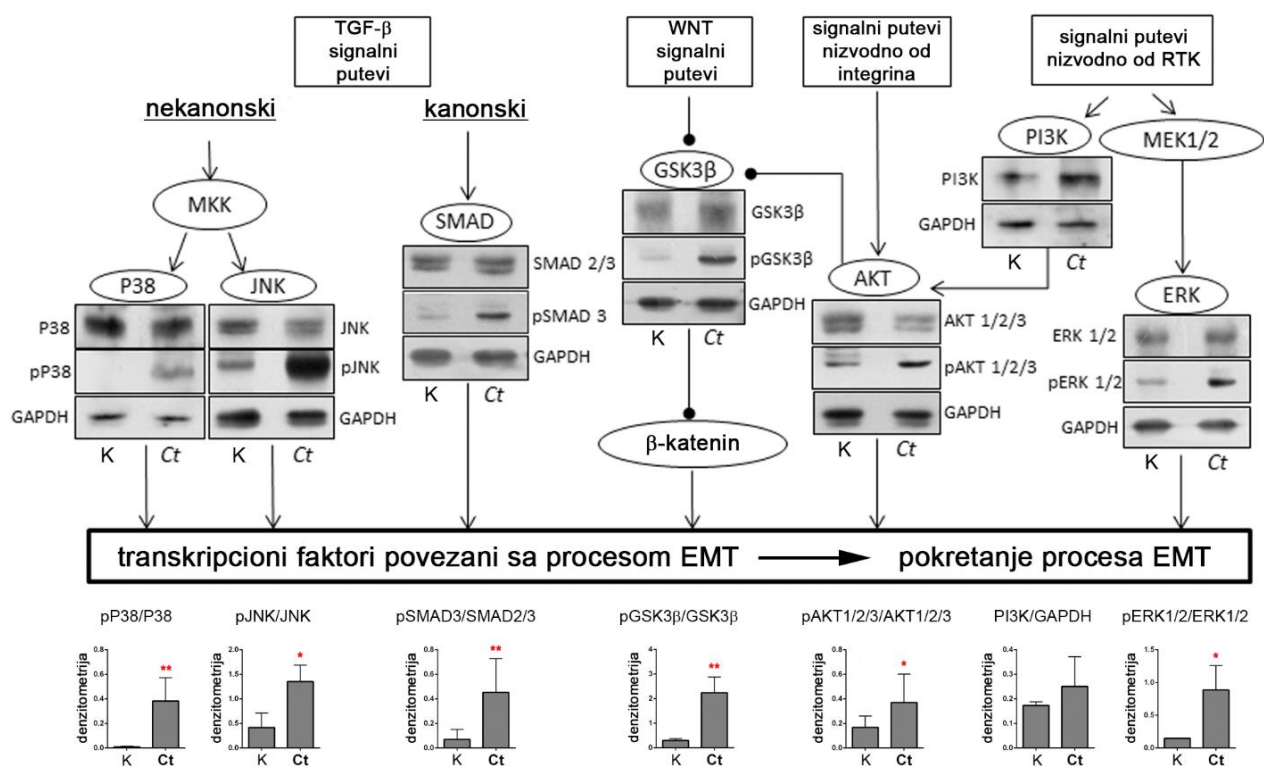
Tranzicija od epitelne morfologije ka morfologiji karakterističnoj za mezenhimski tip ćelija mora biti praćena pokretanjem različitih signalnih puteva unutar ćelije koji dovode do pokretanja procesa označenog kao EMT. Da bi se utvrdilo da li infekcija HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* pokreće EMT ćelija konjuktivalnog epitela i na taj način potencijalno doprinosi nastanku ožiljačnog tkiva u trahomu, metodom RT-qPCR i imunoblot analizom ispitana je aktivacija TGF- $\beta$ , WNT i integrinskog signalnog puta, kao i pokretanje signalnih puteva nizvodno od tirozin kinaznih receptora (**Slike 4.3-4.5**).

TGF- $\beta$  proteini smatraju se glavnim pokretačima procesa EMT, čija bi povećana ekspresija u HCjE ćelijama inficiranim bakterijom *C. trachomatis* ukazala na važan aspekt etiologije trahoma očit u pokretanju mehanizma autokrinog načina delovanja TGF- $\beta$  proteina. Ekspresija *TGF- $\beta$ 1* i *TGF- $\beta$ 2* gena je praćena metodom RT-qPCR, a dobijeni rezultati pokazali su da nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* dolazi do statistički značajno povećane ekspresije oba gena koji kodiraju za različite proteinske izoforme TGF- $\beta$  (**Slika 4.3**). Nivo ekspresije *TGF- $\beta$ 1* povećao se 2 puta ( $p=0,001$ ) u odnosu na nivo prisutan u kontrolnim HCjE ćelijama, dok je nivo *TGF- $\beta$ 2* 7 puta ( $p=0,002$ ) veći nego u kontroli.



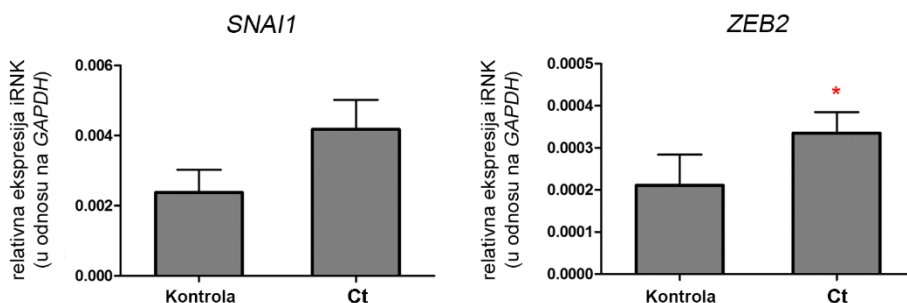
**Slika 4.3. Povećanje ekspresije glavnih induktora procesa EMT 72 h nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis*.** Prikazan je nivo ekspresije *TGF- $\beta$ 1* i *TGF- $\beta$ 2* u kontrolnim i HCjE ćelijama nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* (Ct) dobijen RT-qPCR analizom i izražen relativno u odnosu na nivo *GAPDH*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD. \*\* $p \leq 0,01$ .

Osim na nivou iRNK, aktivacija TGF- $\beta$  signalnog puta je praćena i na proteinskom nivou korišćenjem imunoblot analize (**Slika 4.4**). Kvantifikacijom blotova je dobijeno statistički značajno povećanje fosforilisanе forme SMAD2/3 proteina u inficiranim HCjE ćelijama 6,4 puta ( $p=0,008$ ) u odnosu na kontrolu, što je ukazalo na aktivaciju kanonskog TGF- $\beta$  signalnog puta, dok je statistički značajno povećanje fosforilacije p38 40,1 puta ( $p=0,007$ ) i JNK 3 puta ( $p=0,022$ ) u odnosu na neinficirane HCjE ćelije moguća posledica pokretanja drugih signalnih puteva nizvodno od TGF- $\beta$  receptora. Poznato je da proces EMT osim TGF- $\beta$  proteina mogu pokrenuti i drugi stimulusi. Zbog toga je imunoblot analizom određivano prisustvo i/ili aktivacija različitih nizvodnih faktora koji sačinjavaju razgranatu signalnu mrežu čije angažovanje za posledicu dovodi do tranzicije epitelnih ćelija (**Slika 4.4**). Osim pokretanjem nekanonskog TGF- $\beta$  puta, do statistički značajne aktivacije MAP kinaza dolazi i nizvodno od tirozin kinaznih receptora što se u HCjE ćelijama inficiranim bakterijom *C. trachomatis* ogleda u povećanoj fosforilaciji ERK1/2 6,1 puta ( $p=0,026$ ) u odnosu na kontrolne HCjE ćelije. U inficiranim HCjE ćelijama detektovano je i povećanje nivoa PI3K 1,45 puta u odnosu na kontrolu, što takođe može predstavljati posledicu vezivanja liganada i dimerizacije tirozin kinaznih receptora. PI3K horizontalno povezuje različite signalne kaskade u ćeliji jer fosforiliše i na taj način aktivira AKT1/2/3 koja predstavlja faktor uključen, između ostalih, i u signalni put nizvodno od integrina. AKT1/2/3 sa druge strane može uvesti inhibitornu fosforilaciju na GSK3 $\beta$  koja je jedan od članova kompleksa za destrukciju  $\beta$ -katenina, efektora kanonskog WNT signalnog puta. Značajno povećanje nivoa aktivirajuće fosforilacije AKT1/2/3 2 puta ( $p=0,038$ ) i značajno povećanje nivoa inhibitorne fosforilacije GSK3 $\beta$  7 puta ( $p=0,001$ ) u odnosu na kontrolne uslove je u manjoj meri ukazalo na aktivaciju integrinskog signalnog puta, kao i u većoj meri na aktivaciju WNT/ $\beta$ -katenin signalnog puta u HCjE ćelijama u odgovoru na infekciju bakterijom *C. trachomatis*.



**Slika 4.4. Aktivacija najvažnijih komponenti signalnih puteva uključenih u pokretanje procesa EMT 72 h nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis*.** Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i rezultati kvantitativne analize imunoblotova dobijenih iz najmanje tri nezavisna eksperimenta za kontrolne (K) i HCjE ćelije inficirane bakterijom *C. trachomatis* (Ct). Na graficima je prikazana relativna promena nivoa fosforilisanе forme u odnosu na nefosforilisanu formu proteina, nakon normalizacije u odnosu na nivo GAPDH. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD. \*p ≤ 0,05; \*\*p ≤ 0,01.

Kako je poznato da različiti signali koji pokreću proces EMT konvergiraju ka istom specifičnom setu transkripcionih faktora, ispitan je i uticaj infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* na ekspresiju *SNAIL1* i *ZEB2* gena (Slika 4.5). Povećanje ekspresije *SNAIL1* 1,57 puta i statistički značajno povećanje ekspresije *ZEB2* 1,63 puta (p=0,043) u odnosu na nivo prisutan u kontrolnim HCjE ćelijama, potvrdilo je da nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* u HCjE ćelijama dolazi do pokretanja signalnih puteva koji mogu da indukuju proces EMT.



**Slika 4.5. Povećanje ekspresije transkripcionih faktora uključenih u pokretanje procesa EMT 72 h nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis*.** Prikazan je nivo ekspresije *SNAIL1* i *ZEB2* u kontrolnim i HCjE ćelijama nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* (Ct) dobijen RT-qPCR analizom i izražen relativno u odnosu na nivo *GAPDH*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD. \*p ≤ 0,05.

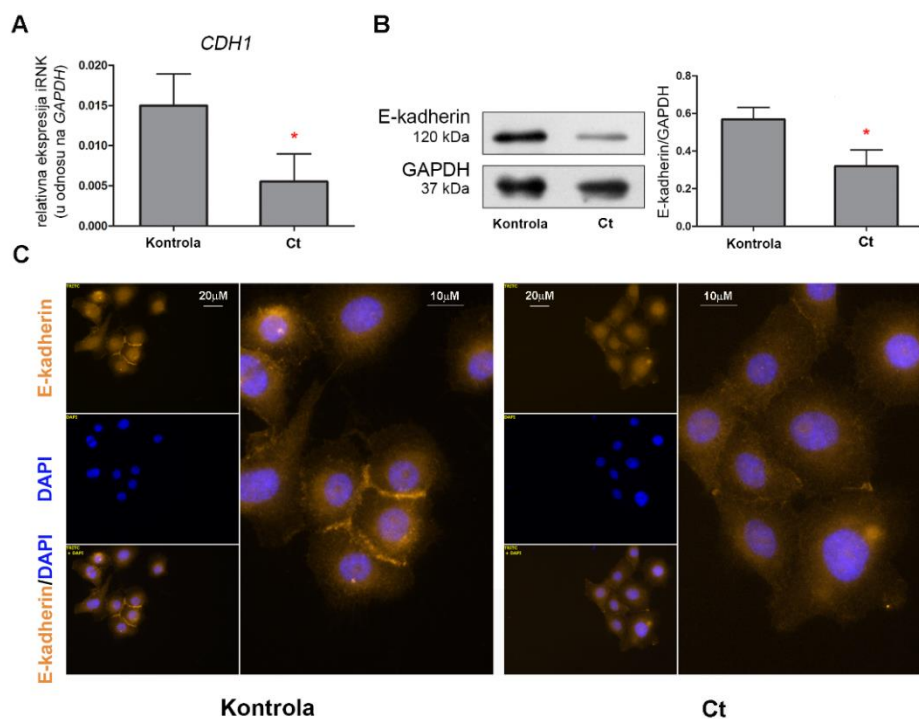
#### 4.1.4. Markeri procesa EMT u HCjE ćelijama inficiranim bakterijom *C. trachomatis*

##### 4.1.4.1. Profil ekspresije markera procesa EMT nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis*

S' obzirom da su dobijeni rezultati pokazali da 72 h nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* dolazi do aktivacije signalnih puteva koji pokreću proces EMT, sledeći cilj istraživanja je bio ispitivanje nivoa ekspresije markera karakterističnih za određeni fenotip ćelije (**Slike 4.6-4.8**).

##### 4.1.4.1.1. Profil ekspresije markera epitelnih ćelija E-kadherina nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis*

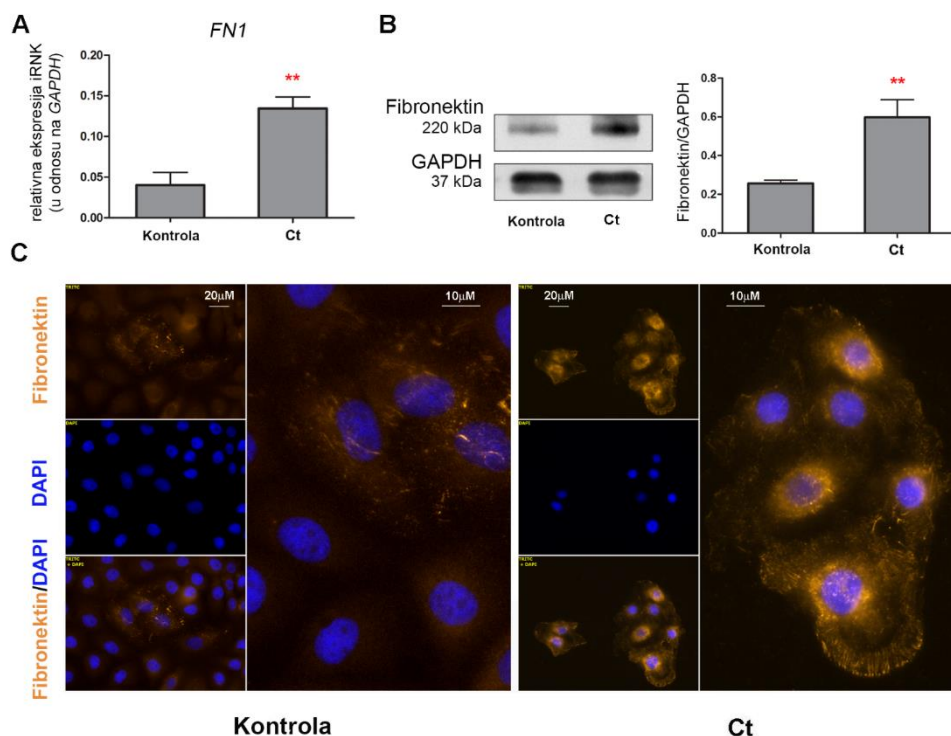
E-kadherin predstavlja protein koji učestvuje u formiranju adherentnih veza između ćelija koje su karakteristika epitelnih tkiva. Iz navedenih razloga E-kadherin je izabran kao marker epitelnog fenotipa i nivo njegove ekspresije na nivou iRNK i proteina je ispitivan nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* (**Slika 4.6**). Pokazano je da infekcija bakterijom *C. trachomatis* dovodi do statistički značajnog smanjenja ekspresije *CDH1* u HCjE ćelijama 2,6 puta ( $p=0,011$ ) u odnosu na neinficirane HCjE ćelije (**Slika 4.6A**). U skladu sa rezultatima dobijenim RT-qPCR analizom, kvantifikacija imunoblot analize je potvrdila statistički značajno smanjenje nivoa E-kadherina 2,3 puta ( $p=0,031$ ) nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* (**Slika 4.6B**). Smanjenje ekspresije E-kadherina je vizualizovano i potvrđeno imunocitohemijskim fluorescentnim bojenjem (**Slika 4.6C**). Plava boja na mikrografijama potiče od vezivanja 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) boje za dvolančani molekul DNK u jedru, dok je narandžastom bojom obojen E-kadherin prisutan u ćelijskoj membrani. Preklopljene mikrografije ukazuju na značajan gubitak ekspresije epitelnog markera u regionima međućelijskih kontakata u grupi HCjE ćelija inficiranih bakterijom *C. trachomatis* u poređenju sa količinom E-kadherina prisutnom u kontrolnim HCjE ćelijama.



**Slika 4.6. Smanjenje ekspresije E-kadherina 72 h nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis*.** (A) Nivo ekspresije *CDH1* u kontrolnim i HCjE ćelijama nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* (Ct) dobijen RT-qPCR analizom i izražen relativno u odnosu na *GAPDH*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD. \* $p \leq 0,05$ . (B) Nivo E-kadherina u kontrolnim i HCjE ćelijama nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* (Ct) određen imunoblot analizom. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i rezultati kvantifikacije izraženi kao relativni nivo ekspresije E-kadherina u odnosu na *GAPDH*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD. \* $p \leq 0,05$ . (C) Imunofluorescentna detekcija prisustva E-kadherina (narandžasta fluorescencija) u kontrolnim i HCjE ćelijama nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* (Ct). Jedra u ćelijama su obojena DAPI bojom (plava fluorescencija).

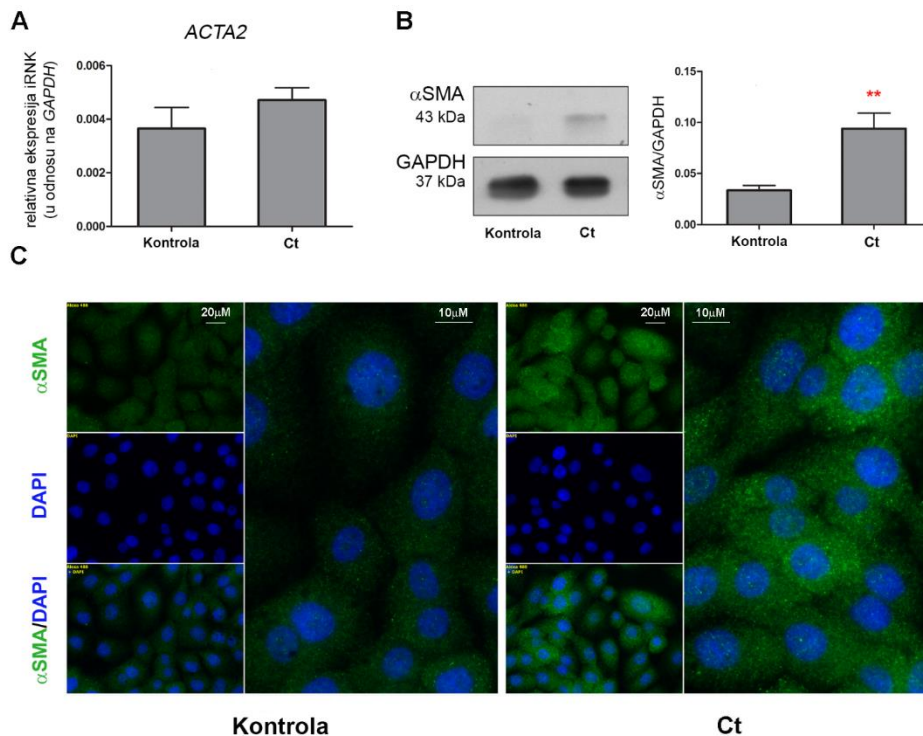
#### 4.1.4.1.2. Profili ekspresije markera mezenhimskih ćelija fibronektina i $\alpha$ -SMA nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis*

Osim markera epitelnih ćelija, za dobijanje potpunije slike o stepenu tranzicije HCjE ćelija nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis*, sledeći korak je bio ispitati profil ekspresije dva mezenhimska markera, fibronektina i  $\alpha$ -SMA (Slike 4.7 i 4.8). Dobijeni rezultati su pokazali da je nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* došlo do statistički značajnog porasta nivoa iRNK gena koji kodira za fibronektin (*FN1*) 3,3 puta ( $p=0,001$ ), dok je nivo iRNK gena koji kodira za  $\alpha$ -SMA (*ACTA2*) povećan 1,3 puta ( $p=0,057$ ) u odnosu na nivo prisutan u kontrolnim HCjE ćelijama (Slike 4.7A i 4.8A). Kvantifikacijom rezultata imunoblot analize je dobijeno statistički značajno povećanje ekspresije fibronektina 2,3 puta ( $p=0,006$ ) i  $\alpha$ -SMA 2,8 puta ( $p=0,006$ ) u HCjE ćelijama inficiranim bakterijom *C. trachomatis* (Slike 4.7B i 4.8B), dok je imunocitohemijsko bojenje anti-fibronektin i anti- $\alpha$ -SMA antitelima potvrdilo povećano prisustvo oba mezenhimska marker proteina (Slike 4.7C i 4.8C). Na mikrografijama su molekuli DNK u HCjE ćelijama obojeni plavom fluorescentom DAPI bojom, fibronektin narandžastom, dok je  $\alpha$ -SMA zelene boje. Izrazito povećanje količine fibronektina u vidu razgranate mreže unutar ćelija i u međućelijskom prostoru, kao i pojava  $\alpha$ -SMA proteina u citoplazmi ukazuje da HCjE ćelije nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* počinju da manifestuju određene osobine karakteristične za mezenhimski fenotip.





**Slika 4.7. Povećanje ekspresije fibronektina 72 h nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis*.** (A) Nivo ekspresije *FN1* u kontrolnim i HCjE ćelijama nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* (Ct) dobijen RT-qPCR analizom i izražen relativno u odnosu na *GAPDH*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD. **\*\*p  $\leq$  0,01.** (B) Nivo fibronektina u kontrolnim i HCjE ćelijama nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* (Ct) određen imunoblot analizom. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i rezultati kvantifikacije izraženi kao relativni nivo ekspresije fibronektina u odnosu na *GAPDH*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD. **\*\*p  $\leq$  0,01.** (C) Imunofluorescentna detekcija prisustva fibronektina (narandžasta fluorescencija) u kontrolnim i HCjE ćelijama nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* (Ct). Jedra u ćelijama su obojena DAPI bojom (plava fluorescencija).



**Slika 4.7. Povećanje ekspresije  $\alpha$ -SMA nakon 72 h infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis*.** (A) Nivo ekspresije *ACTA2* u kontrolnim i HCjE ćelijama nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* (Ct) dobijen RT-qPCR analizom i izražen relativno u odnosu na *GAPDH*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD. (B) Nivo  $\alpha$ -SMA u kontrolnim i HCjE ćelijama nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* (Ct) određen imunoblot analizom. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i rezultati kvantifikacije izraženi kao relativan nivo ekspresije  $\alpha$ -SMA u odnosu na *GAPDH*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD. **\*\*p  $\leq$  0,01.** (C) Imunofluorescentna detekcija prisustva  $\alpha$ -SMA (zelena fluorescencija) u kontrolnim i HCjE ćelijama nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* (Ct). Jedra u ćelijama su obojena DAPI bojom (plava fluorescencija).

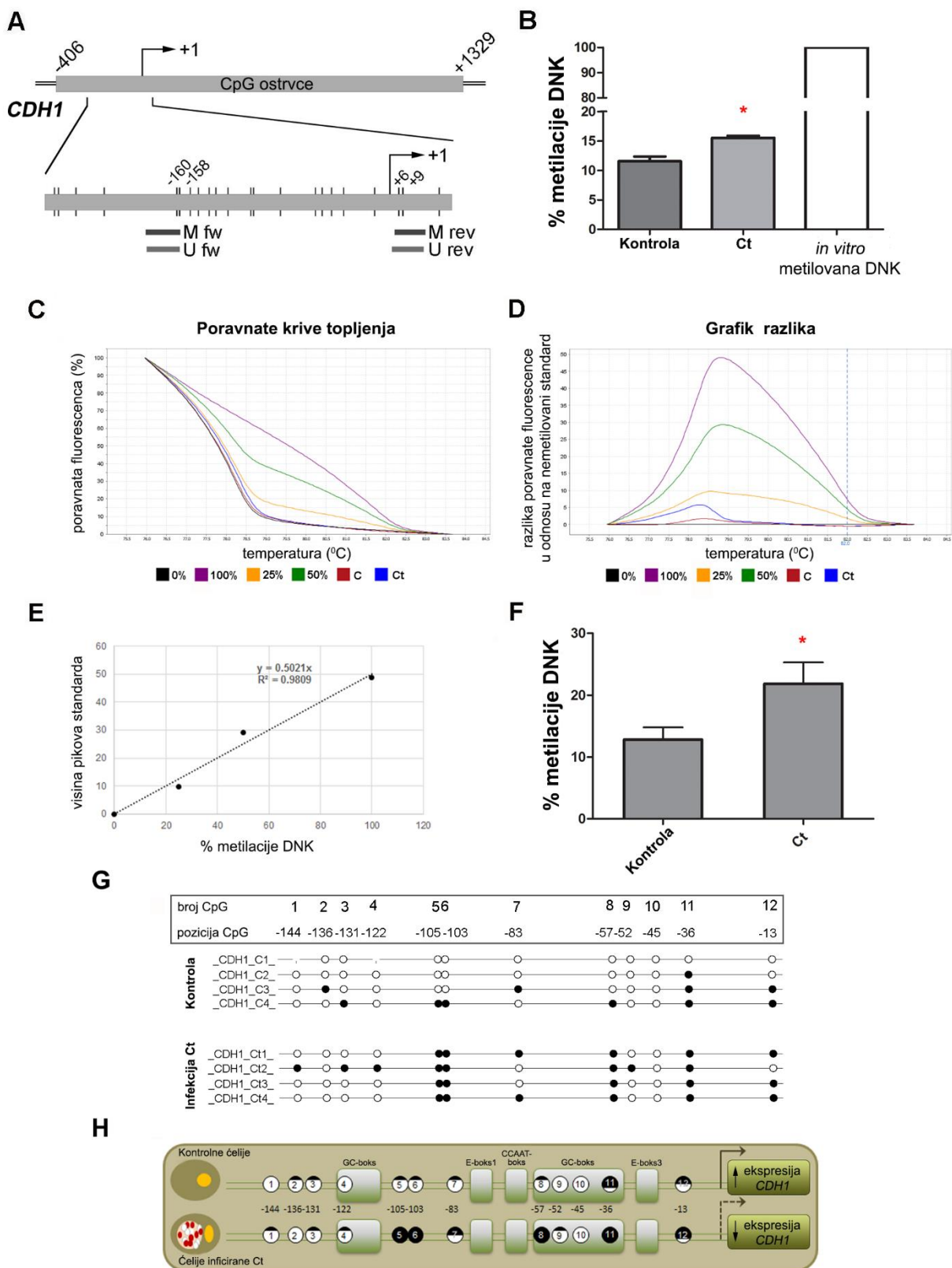
#### 4.1.4.2. Metilacioni status gena markera procesa EMT nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis*

Iz literature je poznato da ekspresija gena može biti regulisana na različitim nivoima, uključujući i epigenetički nivo. Ukoliko se nalazi u promotoru gena, metilacija DNK smatra se važnim mehanizmom represije gena jer dovodi do inhibicije transkripcije, dok u kodirajućem regionu može imati i stimulatorni efekat na transkripciju. Da bi se utvrdilo da li su dobijene razlike između kontrolnih i HCjE ćelija inficiranih bakterijom *C. trachomatis* u nivou ekspresije izabranih gena markera procesa EMT u korelaciji sa promenom u nivou metilacije DNK, analiziran je

metilacioni status izabranih regiona u promotorima i kodirajućim regionima *CDH1*, *FN1* i *ACTA2* gena primenom MSP i HRM analiza i bisulfitnog sekvenciranja (**Slike 4.9-4.11**).

#### 4.1.4.2.1. Metilacioni status markera epitelnih ćelija *CDH1* nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis*

Gen koji kodira za E-kadherin (*CDH1*) sadrži jedno veliko (1735 bp) CpG ostrvce koje pokriva region od -406 do +1329 u odnosu na poziciju TSS označenu kao +1. Region izabran za metilacionu analizu DNK je obuhvatao promotor i TSS, i njegova pozicija u genomu (od pozicije -183 do +29 u odnosu na TSS), kao i pozicija prajmera korišćenih u analizi prikazani su na **Slici 4.9A**. MSP analizom je pokazano da infekcija HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* dovodi do statistički značajnog ( $p=0,014$ ) porasta u nivou metilacije DNK, od 11,5% u kontroli do 15,5% u inficiranim ćelijama (**Slika 4.9B**). Relativan nivo metilovanog produkta dobijenog nakon MSP analize izražen je u odnosu na *in vitro* metilovanu DNK za koju se uzima da je 100% metilovana. Na ovaj način je dobijena informacija samo o metilacionom statusu CpG dinukleotida koji se nalaze unutar sekvence komplementarne sekvenci prajmera (citozini na pozicijama -160, -158, +6 i +9). Da bi se dobila informacija o ukupnoj promeni u metilaciji DNK izabranog regiona, koji sadrži 17 CpG dinukleotida, urađena je HRM analiza korišćenjem istog seta prajmera. Na **Slikama 4.9C i 4.9D** vizualizovane su poravnate krive topljenja (engl. *aligned melt curves*) i grafici razlika (engl. *difference plot*) dobijene HRM analizom. U regionu između standarda sa 0% metilacije i standarda sa 25% metilacije primećen je porast nivoa metilacije DNK u inficiranim HCjE ćelijama u odnosu na kontrolu. Pikovi kriva topljenja standarda očitani sa grafika razlika korišćeni su za konstruisanje standardne krive, nakon čega je iz jednačine linearne regresije izračunat nivo metilacije DNK svakog uzorka (**Slika 4.9E**). Podaci dobijeni HRM analizom utvrdili su statistički značajan ( $p=0,026$ ) porast nivoa metilacije DNK od 12,8% koliko je detektovano u kontrolnim HCjE ćelijama do 21,8% nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* (**Slika 4.9F**). Navedeni rezultati ukazali su da u regionu promotora *CDH1* dolazi do promena u profilu metilacije DNK kao rezultat infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis*. Za precizno mapiranje diferencijalno metilovanih CpG dinukleotida dati region je bilo neophodno analizirati metodom bisulfitnog sekvenciranja. Na **Slici 4.9G** prikazan je metilacioni profil 4 uzorka kontrolnih i 4 uzorka inficiranih HCjE ćelija nakon bisulfitnog sekvenciranja. Sekvencirani region obuhvata 12 CpG dinukleotida, od kojih je 9 CpG parova pokazalo povećanje nivoa metilacije DNK nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis*. Takođe, procenat metilacije citozina na pozicijama -57, -103 i -105 je sa 25% u kontrolnim HCjE ćelijama porastao na 100% nakon infekcije. Sa ciljem dobijanja potpunije slike o značaju metilacije DNK, na **Slici 4.9H** prikazane su pozicije i metilacioni status analiziranih CpG parova u kontekstu regulatornih elemenata prisutnih u regionu promotora *CDH1*. Regulatorni elementi prisutni u analiziranom regionu promotora *CDH1* poznati su iz literature i uključuju CCAAT-boks, GC-boks i dva E-boksa (Behrens i sar., 1991; Bussemakers i sar., 1994; Hennig i sar., 1996; Faraldo i sar., 1997; Giroldi i sar., 1997; Comijn i sar., 2001). Zanimljivo zapažanje predstavlja informacija da citozin na poziciji -57, koji se nakon infekcije potpuno metiluje, ulazi u sastav GC-boksa (GGGCGG) čija je sekvenca mesto prepoznavanja i vezivanja važnih regulatornih proteina.



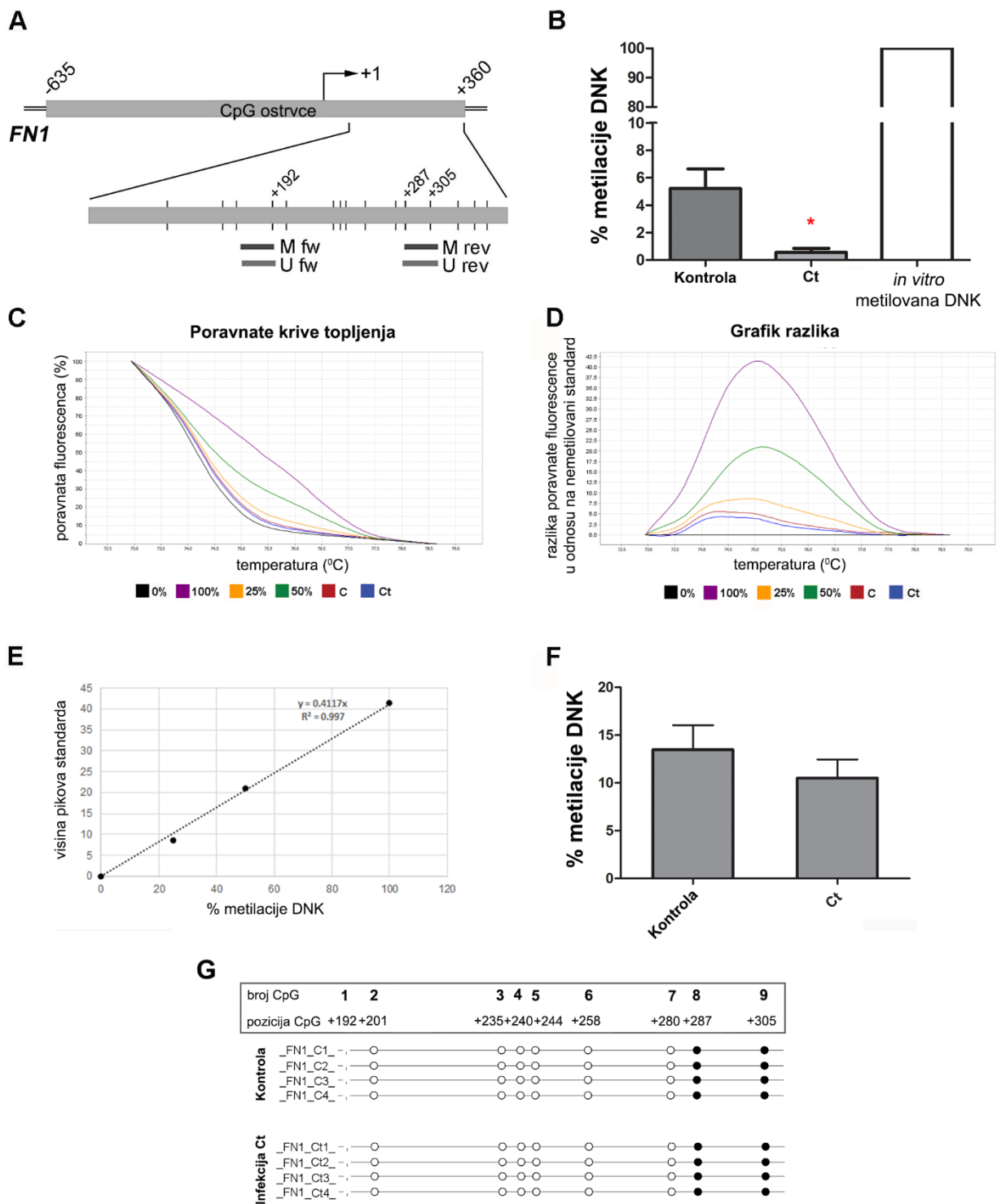
**Slika 4.9.** Nivo metilacije DNK analiziranog regiona promotora *CDH1* nakon 72 h infekcije HCJE ćelija bakterijom *C. trachomatis*. (A) Shematski prikaz dela *CDH1* koji obuhvata CpG ostrvce (NCBI ref. sekvenca NG\_008021.1; pozicija CpG ostrvca od 4595 do 6329 bp). Na shemi je sa +1 obeležen TSS, dok su u uvećanom regionu prikazane pozicije prajmera korišćenih u analizi metilacije DNK i CpG dinukleotida (kratke



vertikalne linije). **(B)** Relativni nivo % metilacije DNK analiziranog regiona promotora *CDH1* u odnosu na *in vitro* metilovanu DNK (100% metilovana DNK) u kontrolnim i HCjE ćelijama nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* (Ct) dobijen MSP analizom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD. \* $p \leq 0,05$ . **(C-F)** Nivo metilacije DNK analiziranog regiona promotora *CDH1* u kontrolnim (C) i HCjE ćelijama inficiranim bakterijom *C. trachomatis* (Ct) dobijen HRM analizom. Prikazane reprezentativne poravnate krive topljenja **(C)** i grafik razlika **(D)** prikazuju poziciju kriva topljenja C i Ct uzoraka u odnosu na standarde sa 0%, 25%, 50% i 100% metilacije DNK. **(E)** Na standardnoj krivi prikazana je visina pikova u odnosu na % metilacije DNK korišćenih stiarda pomoću koje je izračunat % metilacije DNK u kontrolnim i Ct uzorcima **(F)**. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD. \* $p \leq 0,05$ . **(G)** Metilacioni status CpG dinukleotida prikazan u formi lolipop dijagrama u okviru analiziranog regiona promotora *CDH1* u kontrolnim i HCjE ćelijama inficiranim bakterijom *C. trachomatis* dobijen nakon bisulfitnog sekvenciranja, na četiri uzorka. Analizirani CpG dinukleotidi su obeleženi brojevima od 1 do 12 i prikazane su njihove pozicije u odnosu na TSS. Beli i crni kružići označavaju nemetilovane i metilovane CpG dinukleotide, respektivno. **(H)** Pozicije i metilacioni status CpG dinukleotida prikazani u kontekstu regulatornih elemenata prisutnih u promotoru *CDH1*. Preuzeto i modifikovano iz (Van Roy i Berx, 2008).

#### 4.1.4.2.2. Metilacioni status markera mezenhimskih ćelija *FN1* i *ACTA2* nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis*

Analizom gena koji kodira za fibronektin (*FN1*) ustanovljeno je da sadrži jedno CpG ostrvce (1403 bp) na poziciji od -635 do +360 u odnosu na TSS. Pozicije analiziranog regiona (od pozicije +168 do +311 u odnosu na TSS) i prajmera korišćenih za metilacionu analizu DNK prikazane su na **Slici 4.10A** i nalaze se u okviru kodirajućeg regiona *FN1*, u prvom egzonu. MSP analiza pokazala je da je oko 5% DNA iz kontrolnih HCjE ćelija metilovano na CpG pozicijama lokalizovanim unutar sekvenci komplementarnim sekvencama prajmera, dok nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* isti CpG dinukleotidi postaju gotovo potpuno nemetilovani (0,5% metilacije). Statistički značajan ( $p=0,013$ ) pad u relativnom nivou metilovanog produkta nakon infekcije HCjE ćelija izražen je u odnosu na *in vitro* 100% metilovanu DNK (**Slika 4.10B**). HRM analizom, kojom je obuhvaćeno svih 9 CpG dinukleotida u okviru odabrane sekvence, pokazan je isti trend vizuelizovan preko poravnatih kriva topljenja i grafika razlika na **Slikama 4.10C** i **4.10D**. Nakon normalizacije visine pikova u odnosu na nemetilovani standard (0%) dobijena je jednačina linearne regresije nakon čega je bilo moguće kvantitativno izraziti procenat metilacije DNK u analiziranom regionu (**Slika 4.10E**). Detektovan je viši nivo metilacije u svim uzorcima u odnosu na MSP analizu, kao i smanjenje metilacije DNK od 3% u HCjE ćelijama inficiranim bakterijom *C. trachomatis* u odnosu na kontrolne ćelije, koje nije bilo statistički značajno ( $p=0,067$ ) (**Slika 4.10F**). Ipak, bisulfitnim sekvenciranjem nije ustanovljena razlika u nivou metilacije DNK analiziranog regiona *FN1* između kontrolnih i HCjE ćelija inficiranih bakterijom *C. trachomatis*. Pokazano je da su jedini metilovani CpG dinukleotidi pozicionirani u okviru sekvenci komplementarnim sekvencama prajmera, dok su ostali CpG parovi potpuno nemetilovani i u kontrolnim i u inficiranim HCjE ćelijama (**Slika 4.10G**). S' obzirom da je za bisulfitno sekvenciranje korišćen set prajmera koji se specifično vezuje za metilovanu DNK, iz dobijenih podataka nameće se zaključak da rezultati dobijeni MSP analizom reflektuju preciznu kvantifikaciju promena u nivou metilacije citozina na pozicijama +192, +287 i +305. Na osnovu podataka dobijenih MSP i HRM analizom, dolazi se do podatka da infekciju HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* prati suptilna demetilacija DNK od 3%-4% u okviru analiziranog regiona *FN1*.

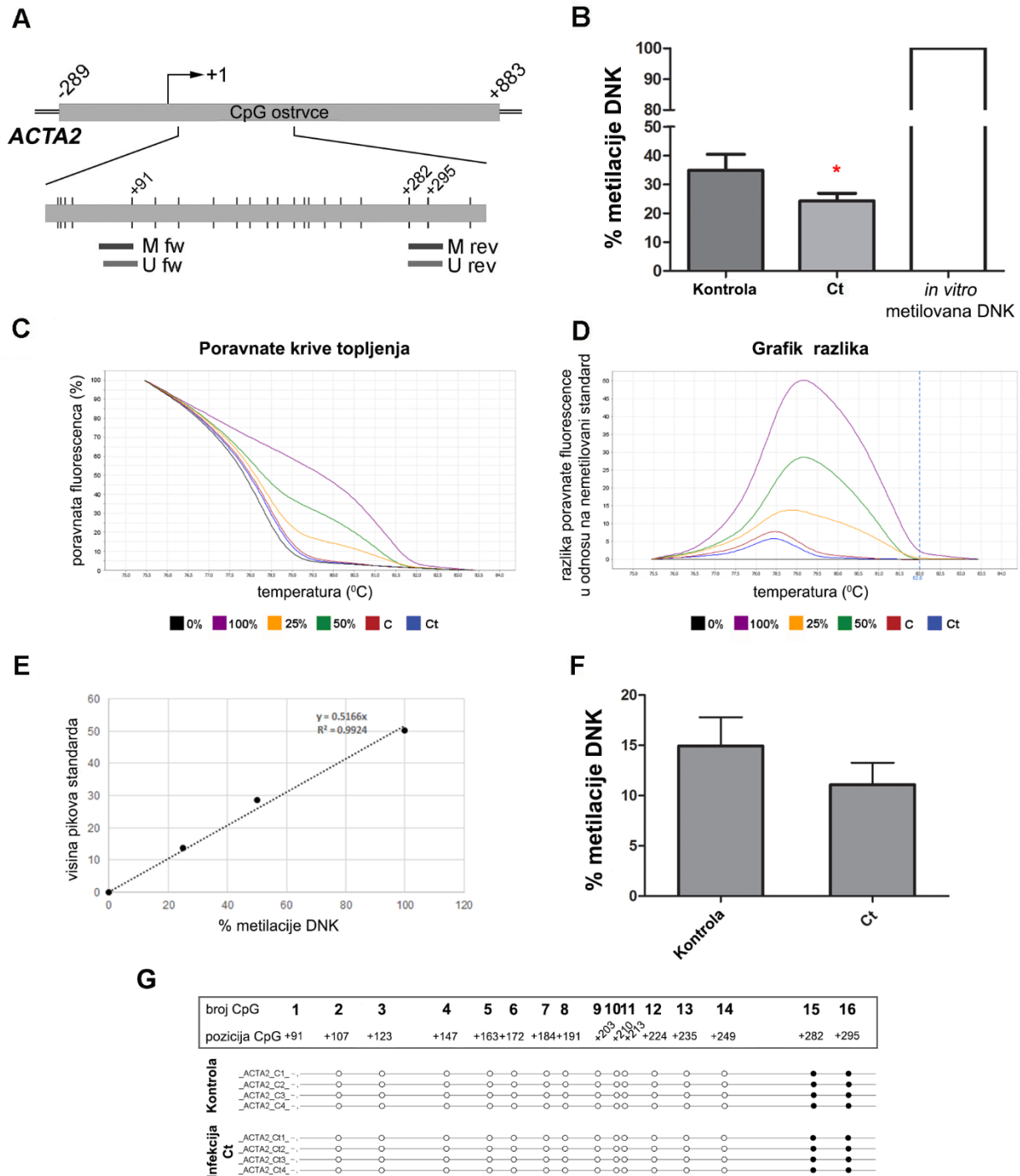


**Slika 4.10. Nivo metilacije DNK analiziranog regiona prvog egzona FN1 nakon 72 h od infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis*. (A) Shematski prikaz dela FN1 koji obuhvata CpG ostrvrce (NCBI ref. sekvenca NG\_012196.1; pozicija CpG ostrvrca od 4366 do 5360 bp). Na shemi je sa +1 obeležen TSS, dok su u uvećanom regionu prikazane pozicije prajmera korišćenih u analizi metilacije DNK i CpG dinukleotida (kratke vertikalne linije). (B) Relativni nivo % metilacije DNK analiziranog regiona prvog egzona FN1 u odnosu na *in vitro* metilovanu DNK (100% metilovana DNK) u kontrolnim i HCjE ćelijama nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* (Ct) dobijen MSP analizom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$ . (C-F) Nivo metilacije DNK analiziranog regiona prvog egzona FN1 u kontrolnim (C) i HCjE ćelijama**

inficiranim bakterijom *C. trachomatis* (Ct) dobijen HRM analizom. Prikazane reprezentativne poravnate krive topljenja **(C)** i grafik razlika **(D)** prikazuju poziciju kriva topljenja C i Ct uzoraka u odnosu na standarde sa 0%, 25%, 50% i 100% metilacije DNK. **(E)** Na standardnoj krivi prikazana je visina pikova u odnosu na % metilacije DNK korišćenih stiarda pomoću koje je izračunat % metilacije DNK u kontrolnim i Ct uzorcima **(F)**. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD. **(G)** Metilacioni status CpG dinukleotida prikazan u formi lolipop dijagrama u okviru analiziranog regiona prvog egzona *FN1* u kontrolnim i HCjE ćelijama inficiranim bakterijom *C. trachomatis* dobijen nakon bisulfitnog sekvenciranja, na četiri uzorka. Analizirani CpG dinukleotidi su obeleženi brojevima od 1 do 9 i prikazane su njihove pozicije u odnosu na TSS. Beli i crni kružići označavaju nemetilovane i metilovane CpG dinukleotide, respektivno.

U genu koji kodira za  $\alpha$ -SMA (*ACTA2*) nalazi se jedno CpG ostrvce koje se proteže od pozicije -289 do pozicije +883 u odnosu na TSS. Region odabran za analizu metilacije DNK lokalizovan je u kodirajućem regionu (od pozicije +67 do pozicije +306 u odnosu na TSS), u prvom egzonu *ACTA2*, što je, uz pozicije prajmera, i prikazano na **Slici 4.11A**. Nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* dolazi do statistički značajne ( $p=0,042$ ) demetilacije DNK od 10% na CpG pozicijama lokalizovanim u okviru pozicija komplementarnim pozicijama prajmera, sa 34,9% u kontroli na 24,3% u inficiranim HCjE ćelijama. Relativan nivo metilovanog produkta u kontrolnim i inficiranim HCjE ćelijama izražen je u odnosu na *in vitro* metilovanu DNK i prikazan na **Slici 4.11B**. HRM analiza čitavog regiona koji obuhvata 16 CpG dinukleotida, potvrdila je da infekcija HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* dovodi do smanjenja nivoa metilacije *ACTA2* (**Slike 4.11C i 4.11D**), ali da gubitak metilacije DNK sa 15% u kontroli do 11% metilacije DNK u HCjE ćelijama inficiranim bakterijom *C. trachomatis* nije statistički značajan ( $p=0,082$ ) (**Slike 4.11E i 4.11F**). Bisulfitno sekvenciranje je pokazalo da je čitav analiziran region, izuzev citozina na pozicijama +91, +282 i +295 koje su obuhvaćene prajmerima, bez promene u nivou metilacije DNK nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* (**Slika 4.11G**), što ukazuje da rezultati dobijeni MSP analizom daju adekvatnu procenu nivoa metilacije DNK izabranog regiona *ACTA2*.

Dobijeni rezultati pokazali su da infekcija HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* ima potencijal da pokrene promene karakteristične za proces EMT, što dalje ukazuje na mogućnost da ćelije konjunktive zahvaćene procesom EMT učestvuju u formiranju fibroznog tkiva u trahomu. Takođe, analiza metilacionog statusa gena koji kodiraju za markere epitelnih i mezenhimskih ćelija je pokazala da bi jedan od puteva kojim infekcija HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* dovodi do fenotipskih promena epitelnih ćelija mogao ići preko modulacije epigenetičkih mehanizama, prvenstveno metilacije DNK u promotoru *CDH1*. S' obzirom da EMT predstavlja reverzibilan proces, pronalaženje ključnih molekula uključenih u ovaj proces omogućilo bi njegovu kontrolu, bilo u smislu zaustavljanja, bilo u smislu reverzije, sa ciljem tretmana fibroznih stanja uključujući i trahom. Neophodan segment u razumevanju etiologije trahoma i drugih očnih bolesti tokom kojih tranzicija epitelnih ćelija konjunktive doprinosi nastanku patologije, predstavlja bolje upoznavanje činilaca uključenih u pokretanje i regulaciju procesa EMT. Da bi se rasvetlili mehanizmi koji leže u osnovi odigravanja procesa EMT u HCjE ćelijama i identifikovali ključni akteri odgovorni za tranziciju, kao i dublje rasvetlio značaj epigenetičkih modifikacija, bilo je potrebno uspostaviti *in vitro* model procesa EMT. Prvi korak u uspostavljanju ovog modela je podrazumevao ispitivanje sposobnosti različitih izoformi TGF- $\beta$  proteina (TGF- $\beta$ 1 i TGF- $\beta$ 2), kao glavnih induktora EMT, da pokrenu proces tranzicije u HCjE ćelijama.



**Slika 4.11. Nivo metilacije DNK analiziranog regiona prvog egzona *ACTA2* nakon 72 h od infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis*. (A) Shematski prikaz dela *ACTA2* gena koji obuhvata CpG ostrvrce (NCBI ref. sekvenca NG\_011541.1; pozicija CpG ostrvrca od 4712 do 5883 bp). Na shemi je sa +1 obeležen TSS, dok su u uvećanom regionu prikazane pozicije prajmera korišćenih u analizi metilacije DNK i CpG dinukleotida (kratke vertikalne linije). (B) Relativni nivo % metilacije DNK analiziranog regiona prvog egzona *ACTA2* u odnosu na *in vitro* metilovanu DNK (100% metilovana DNK) u kontrolnim i HCjE ćelijama nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* (Ct) dobijen MSP analizom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$ . (C-F) Nivo metilacije DNK analiziranog regiona prvog egzona *ACTA2* u kontrolnim**

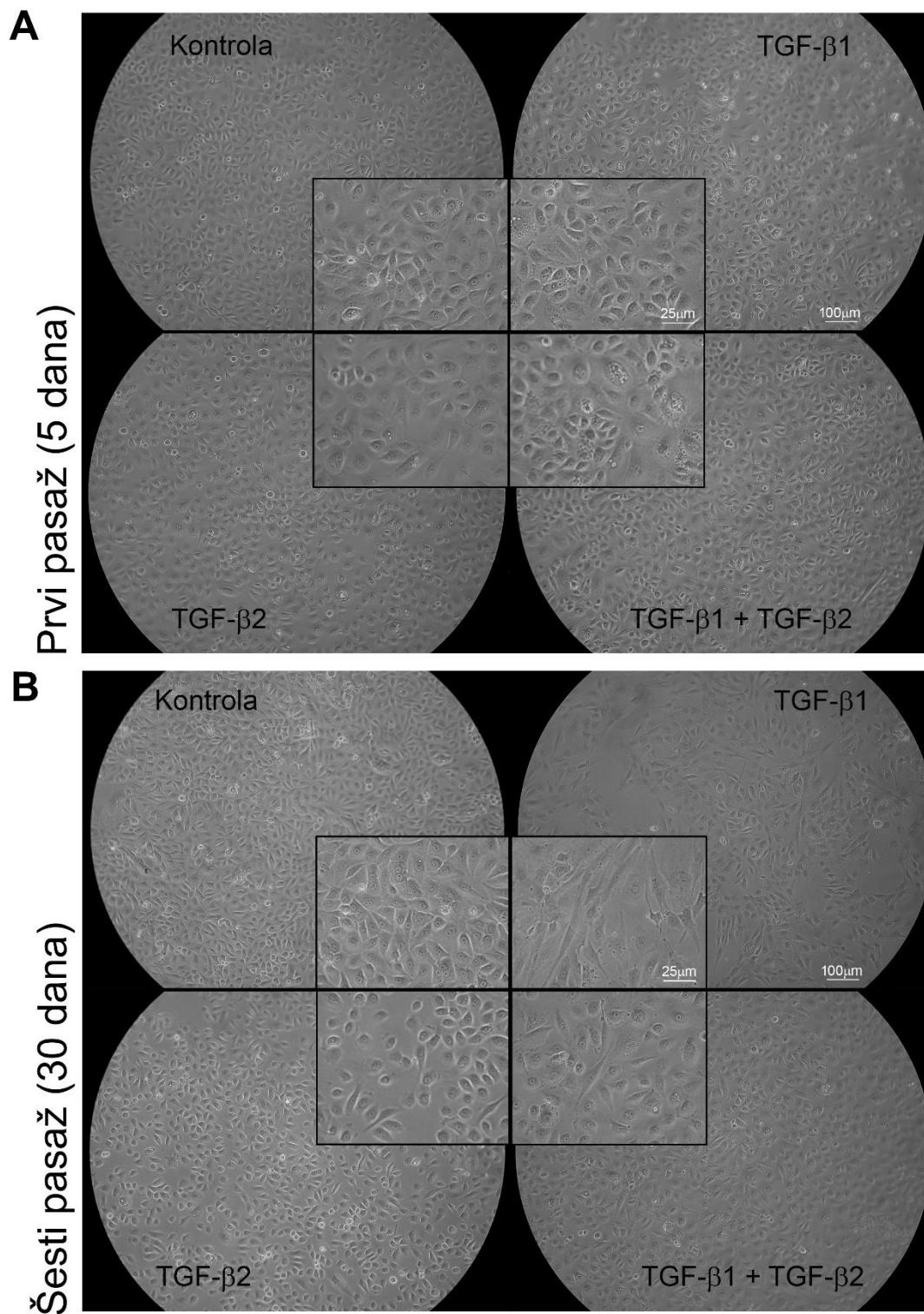
(C) i HCjE ćelijama inficiranim bakterijom *C. trachomatis* (Ct) dobijen HRM analizom. Prikazane reprezentativne poravnate krive topljenja (C) i grafik razlika (D) prikazuju poziciju kriva topljenja C i Ct uzoraka u odnosu na standarde sa 0%, 25%, 50% i 100% metilacije DNK. (E) Na standardnoj krivi prikazana je visina pikova u odnosu na % metilacije DNK korišćenih standarda pomoću koje je izračunat % metilacije DNK u kontrolnim i Ct uzorcima (F). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD. (G) Metilacioni status CpG dinukleotida prikazan u formi lolipop u okviru analiziranog regiona prvog egzona *ACTA2* u kontrolnim i HCjE ćelijama inficiranim bakterijom *C. trachomatis* dobijen nakon bisulfitnog sekvenciranja, na četiri uzorka. Analizirani CpG dinukleotidi su obeleženi brojevima od 1 do 16 i prikazane su njihove pozicije u odnosu na TSS. Beli i crni kružići označavaju nemetilovane i metilovane CpG dinukleotide, respektivno.

## 4.2. Karakterizacija procesa EMT i identifikacija ključnih molekula odgovornih za pokretanje tranzicije HCjE ćelija

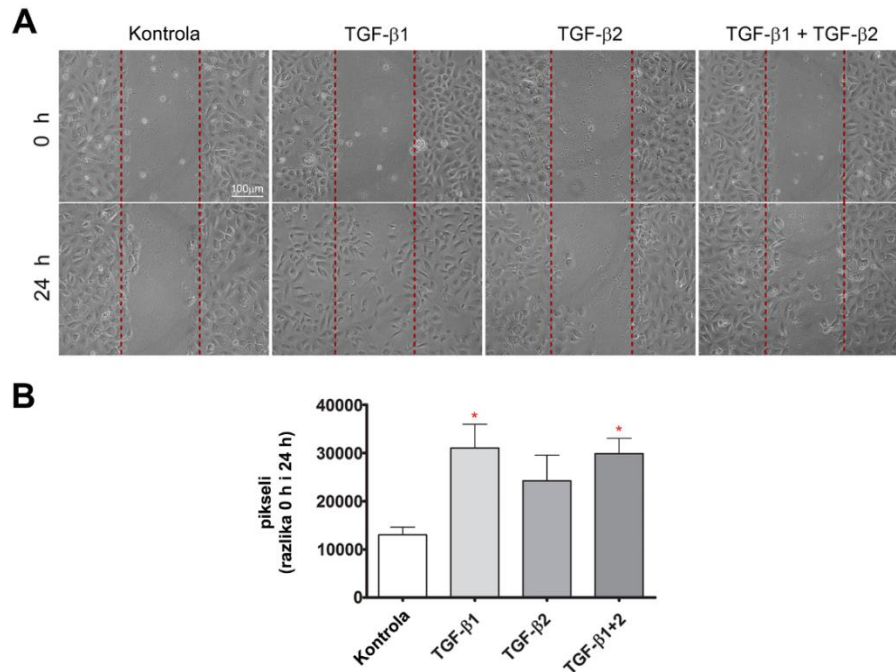
### 4.2.1. Sposobnost različitih izoformi TGF- $\beta$ proteina za pokretanje procesa EMT u HCjE ćelijama

Tokom uspostavljanja *in vitro* modela procesa EMT HCjE ćelije su tokom šest pasaža (oko 30 dana) u kontinuitetu tretirane TGF- $\beta$ 1 i TGF- $\beta$ 2 proteinima odvojeno (u koncentraciji od 10 ng/ml) i u kombinaciji (po 5 ng/ml). Izlaganje HCjE ćelija ovakvim tretmanima imalo je za cilj kreiranje uslova koji donekle podražavaju stanje hronične inflamacije koje prethodi razvijanju fibroznih promena u tkivu. Praćenje morfologije HCjE ćelija tokom tretmana pokazalo je da izlaganje TGF- $\beta$ 1 dovodi do najizraženijih efekata. Već neposredno pre prvog pasaža (nakon 5 dana) primećen je gubitak čvrstih kontakata između epitelnih ćelija i promene poligonalnog oblika (Slika 4.12A), dok je sa protokom vremena (neposredno pre šestog pasaža, 30 dana) sve veći broj ćelija postepeno zadobijao vretenastu morfologiju karakterističnu za fenotip mezenhimskih ćelija (Slika 4.12B). Kombinacija TGF- $\beta$ 1 i TGF- $\beta$ 2 proteina dovela je do sličnih morfoloških promena HCjE ćelija kao i samostalan tretman TGF- $\beta$ 1, dok je tretman TGF- $\beta$ 2 prouzrokovao samo manje poremećaje u međućelijskoj adheziji HCjE ćelija uz sporadično prisustvo izduženih ćelija (Slike 4.12A i 4.12B).

Osim morfoloških promena, korišćenjem *in vitro* testa zarastanja povrede (engl. *scratch assay*) praćena je i promena sposobnosti migracije HCjE ćelija nakon tretmana TGF- $\beta$  proteinima (Slika 4.13A). Merenje tzv. „open wound area”, odnosno prostora bez ćelija između dva konfluentna fronta ćelija sa obe strane povrede, pokazalo je da dolazi do smanjenja površine „čistog” prostora u uzorcima ćelija koje su tretirane TGF- $\beta$  proteinima, odnosno do povećanja razlike između vrednosti dobijenih za 0 h i nakon 24 h, izraženih u pikselima (Slika 4.13B). Do statistički značajnog smanjenja površine „čistog” prostora, odnosno do najveće pokretljivosti HCjE ćelija je došlo nakon tretmana ćelija TGF- $\beta$ 1 ( $p=0,029$ ) i kombinacijom TGF- $\beta$  proteina ( $p=0,043$ ), 2,4 i 2,3 puta, respektivno, dok je nakon 24 h tretman TGF- $\beta$ 2 proteinima doveo do smanjenja „čistog” prostora 1,9 puta u odnosu na kontrolu.



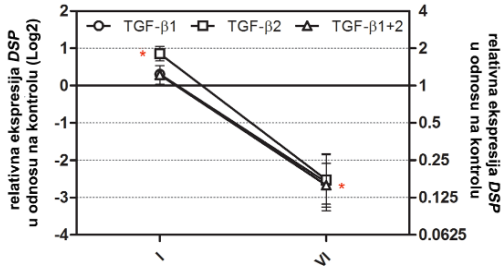
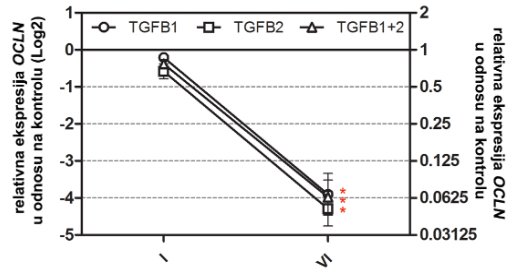
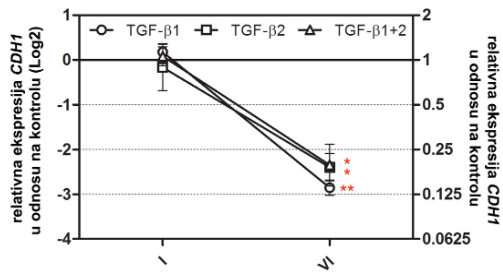
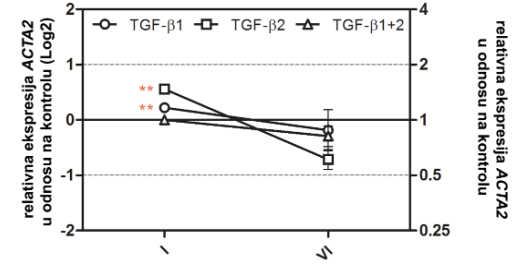
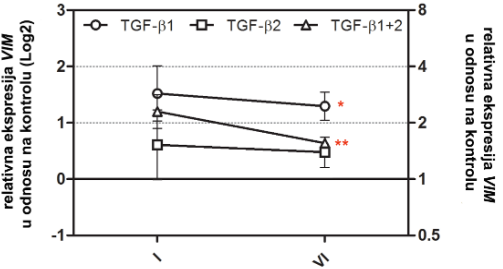
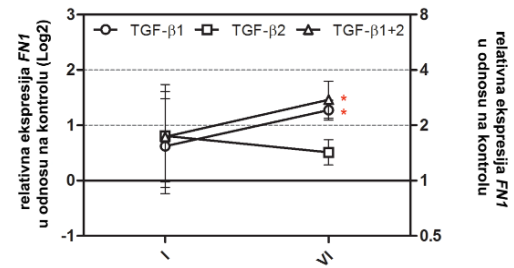
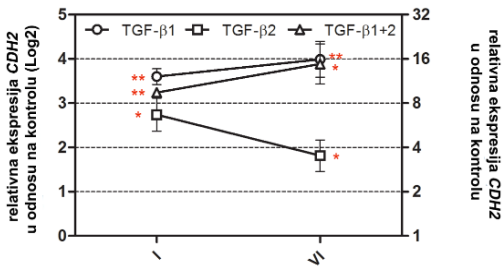
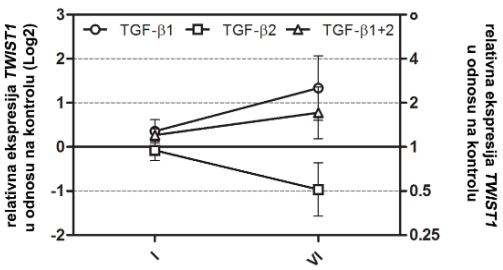
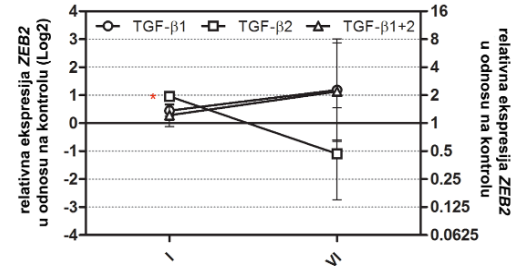
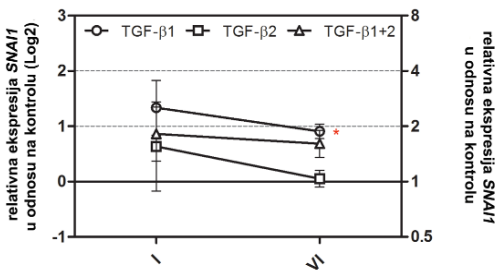
**Slika 4.12.** Efekti različitih izoformi TGF- $\beta$  proteina na morfološke promene HCJE ćelija. Na fotografijama su prikazane morfološke promene kontrolnih i HCJE ćelija tretiranih TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 i kombinacijom TGF- $\beta$  proteina (TGF- $\beta$ 1 + TGF- $\beta$ 2) pre prvog (5 dana od početka tretmana) **(A)** i šestog (30 dana od početka tretmana) **(B)** pasaža. Ćelije su fotografisane na uvećanju svetlosnog mikroskopa od 10 i 20 puta.



**Slika 4.13. Efekti različitih izoformi TGF- $\beta$  proteina na pokretljivost HCjE ćelija. (A)** Prikazane su reprezentativne fotografije *in vitro* testa zarastanja povrede, rađenog nakon 30 dana tretmana, neposredno po nanošenju povrede (0 h) i nakon 24 h. **(B)** Vrednosti prikazane na grafiku predstavljaju površinu (u pikselima) prekrivenu ćelijama nakon 24 h od nanošenja povrede u kontrolnim i HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 i kombinacijom TGF- $\beta$  proteina (TGF- $\beta$ 1 + TGF- $\beta$ 2). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. \* $p \leq 0,05$  u poređenju sa kontrolom.

Da bi se procenio efekat primenjenih tretmana TGF- $\beta$  proteinima na pokretanje procesa EMT u HCjE ćelijama, osim praćenja morfologije i pokretljivosti, bilo je značajno odrediti stepen tranzicije putem kvantifikacije ekspresije više različitih epitelnih i mezenhimskih markera. Nakon prvog i šestog, finalnog pasaža, metodom RT-qPCR je određivan nivo ekspresije nekoliko gena markera. E-kadherin (*CDH1*), okludin (*OCLN*) i dezmozoplakin (*DSP*) su izabrani kao tipični markeri epitelnih ćelija čija se ekspresija gubi tokom procesa EMT, dok su N-kadherin (*CDH2*), vimentin (*VIM*), fibronektin (*FN1*) i  $\alpha$ -SMA (*ACTA2*) korišćeni kao tipični mezenhimski markeri koje ćelija stiće kako proces EMT odmiče. Pored gena markera, određivan je i nivo ekspresije tri ključna transkripciona faktora *SNAI1* (*SNAI1*), *ZEB2* (*ZEB2*) i *TWIST1* (*TWIST1*), koji predstavljaju tačke konvergencije mnogih signalnih puteva pokrenutih tokom procesa EMT i ključne regulatorne faktore odgovorne za ekspresiju gore pomenutih gena. Nivoi ekspresije gena u kontrolnim i HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$  proteinima prikazani su na **Slici 4.14** pri čemu je kontrolni nivo ekspresije ispitivanih gena na log2 skali (leva y-osa) označen nulom, a na linearnoj skali (desna y-osa) jedinicom.



**A****B****C**



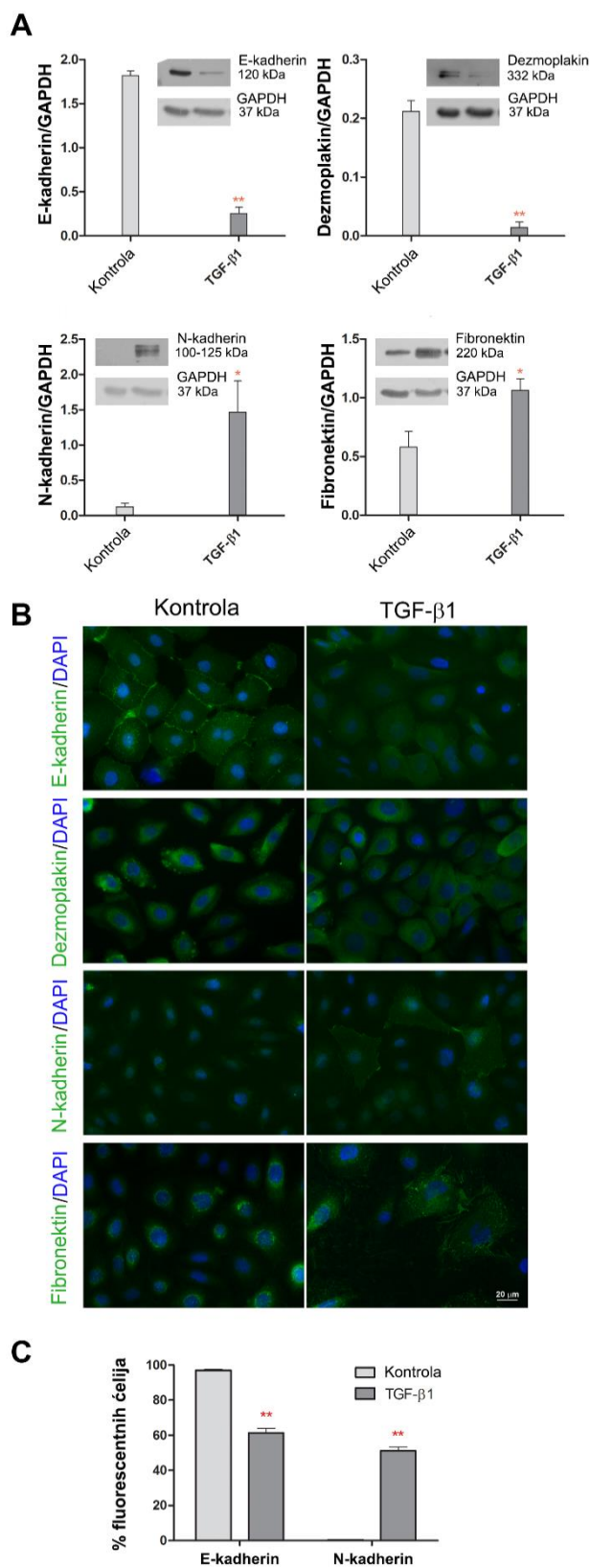
**Slika 4.13. Efekat različitih TGF- $\beta$  izoformi na nivoe ekspresije gena karakterističnih za epitelni i mezenhimski fenotip u HCjE ćelijama posle prvog i šestog pasaža.** Prikazan je relativan nivo ekspresije gena markera (A) epitelnih, (B) mezenhimskih ćelija i (C) transkripcionih faktora uključenih u pokretanje procesa EMT u HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 i kombinacijom TGF- $\beta$  proteina (TGF- $\beta$ 1 + TGF- $\beta$ 2) u odnosu na kontrolu, nakon normalizacije u odnosu na GAPDH, dobijen RT-qPCR analizom. Na levoj y-osi prikazane su srednje vrednosti  $\pm$  SEM na log2 skali, pri čemu vrednosti veće od 0 označavaju povećanje ekspresije u tretiranim ćelijama u odnosu na kontrolu, dok negativne vrednosti označavaju smanjenje nivoa ekspresije u tretiranim ćelijama u odnosu na kontrolu. Na desnoj y-osi prikazana je ekvivalentna linearna skala. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$  u odnosu na kontrolu.

RT-qPCR analiza nakon prvog pasaža pokazala je da u svim tretiranim grupama ekspresija *CDH1* i *OCN* ostaje gotovo na nivou prisutnom u kontrolnim HCjE ćelijama. Tako je u slučaju *CDH1* došlo do povećanja ekspresije 1,1 put u grupi ćelija tretiranih TGF- $\beta$ 1 i kombinacijom TGF- $\beta$  proteina i do smanjenja ekspresije 1,1 put u grupi ćelija tretiranih TGF- $\beta$ 2 u odnosu na kontrolu. U slučaju *OCN* tretman TGF- $\beta$ 1 doveo je do smanjenja ekspresije od 1,1 put, tretman TGF- $\beta$ 2 1,5 puta, dok je tretman kombinacijom TGF- $\beta$  proteina smanjio ekspresiju *OCN* 1,3 puta u odnosu na nivo prisutan u kontroli. Na kraju šestog pasaža je primećeno statistički značajno smanjenje ekspresije *CDH1* od 7,2 puta u tretmanu TGF- $\beta$ 1 ( $p=0,003$ ), 5,3 puta u tretmanu TGF- $\beta$ 2 ( $p=0,016$ ) i 5,1 puta kod ćelija tretiranih kombinacijom TGF- $\beta$  proteina ( $p=0,037$ ) u odnosu na kontrolu. Takođe, statistički značajno niža ekspresija na kraju eksperimenta u odnosu na kontrolni nivo pokazana je i u slučaju *OCN*, pa je tako nivo iRNK *OCN* bio 14,9 puta niži u ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1 ( $p=0,02$ ), 19,6 puta niži u tretmanu TGF- $\beta$ 2 ( $p=0,011$ ) i 15,7 puta niži u grupi ćelija tretiranim kombinacijom TGF- $\beta$  proteina ( $p=0,013$ ). Izuzev nakon prvog pasaža gde je došlo do malog ali statistički značajnog ( $p=0,049$ ) povećanja (1,8 puta) ekspresije u grupi ćelija tretiranih TGF- $\beta$ 2 u odnosu na kontrolu, sličan trend je uočen i u profilu ekspresije *DSP*. Uprkos sniženoj ekspresiji *DSP* od 6 puta u grupi tretiranoj TGF- $\beta$ 1, 5,7 puta u grupi tretiranoj TGF- $\beta$ 2 i 6,4 puta u grupi tretiranoj kombinacijom TGF- $\beta$  proteina nakon šestog pasaža, statistički značajan pad u odnosu na kontrolu je detektovan samo kod HCjE ćelija tretiranih kombinacijom TGF- $\beta$  proteina ( $p=0,045$ ).

Za razliku od epitelnih markera, nivo ekspresije mezenhimskih marker gena je već nakon prvog pasaža porastao u odnosu na nivo prisutan u kontrolnim HCjE ćelijama, dok je nivo ekspresije u šestom pasažu pratio različitu kinetiku u zavisnosti od primenjenog tretmana. Najveće promene u nivou ekspresije svih mezenhimskih marker gena i transkripcionih faktora uključenih u pokretanje procesa EMT uočene su nakon tretmana TGF- $\beta$ 1 izoformom. Rezultati RT-qPCR su pokazali da je nakon prvog pasaža u grupi ćelija tretiranoj TGF- $\beta$ 1 došlo do statistički značajnog povećanja nivoa ekspresije *CDH2* ( $p=0,002$ ) i *ACTA2* ( $p=0,00008$ ), 12,1 i 1,2 puta, respektivno. Povećanje ekspresije *FN1* 1,5 puta, *VIM* 2,9 puta, *SNAI1* 2,5 puta, *ZEB2* 1,4 i *TWIST1* 1,3 nije pokazalo statističku značajnost u odnosu na nivo prisutan u kontroli. Na kraju tretmana u ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1 dolazi do statistički značajnog povećanja nivoa *CDH2* čak 15,9 puta ( $p=0,01$ ), *FN1* 2,4 puta ( $p=0,019$ ), *VIM* 2,5 puta ( $p=0,035$ ), *SNAI1* 1,9 puta ( $p=0,021$ ), dok povećanje ekspresije *ZEB2* 2,3 puta i *TWIST1* 2,5 puta i smanjenje ekspresije *ACTA2* 1,1 puta u odnosu na kontrolne HCjE ćelije nije bilo statistički značajno. Kao i tretman TGF- $\beta$ 1, kombinacija TGF- $\beta$  proteina je pokrenula slične promene u nivou ekspresije analiziranih gena, iako je detektovani porast bio nižeg nivoa. Nakon prvog pasaža jedino je nivo ekspresije *CDH2* statistički značajno porastao 9,4 puta ( $p=0,001$ ) u odnosu na kontrolu, dok povećanje ekspresije *FN1* 1,7 puta, *VIM* 2,3 puta, *SNAI1* 1,8 puta, *ZEB2* 1,2 puta i *TWIST1* 1,2 puta u odnosu na netretirane HCjE ćelije nije bilo statistički značajno. Takođe, nivo ekspresije *ACTA2* nije se razlikovao od nivoa detektovanog u kontrolnim HCjE ćelijama. Nakon šestog pasaža u ćelijama tretiranim kombinacijom TGF- $\beta$

proteina nivo ekspresije *CDH2* u odnosu na kontrolu statistički značajno je porastao 14,8 puta ( $p=0,013$ ), *FN1* 2,7 puta ( $p=0,049$ ), *VIM* 1,5 puta ( $p=0,005$ ) u odnosu na nivo prisutan u kontroli. I ekspresija transkripcionih faktora *SNAI1*, *ZEB2* i *TWIST1*, porasla je 1,6, 2,2 i 1,7 puta, respektivno, iako statistička značajnost nije dobijena, dok je nivo ekspresije *ACTA2* bio 1,2 puta niži u odnosu na kontrolni nivo. U HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 2 nije došlo do značajnog porasta ekspresije *SNAI1*, *ZEB2* i *TWIST1* u odnosu na nivo prisutan u kontrolnim ćelijama, dok je ekspresija ostalih analiziranih gena tokom čitavog trajanja tretmana bila značajno manja u poređenju sa nivoom ekspresije u HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1. Samo u slučaju *CDH2* nivo ekspresije nakon šestog pasaža u ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 2 je bio 3,5 puta veći nego u kontrolnim HCjE ćelijama, dok se ekspresija ostalih gena povećala za manje od 50% u odnosu na kontrolni nivo. Tako je nakon prvog pasaža detektovan samo statistički značajan porast ekspresije *CDH2* 6,7 puta ( $p=0,018$ ) i *ACTA2* 1,5 ( $p=0,001$ ) u odnosu na netretirane HCjE ćelije. Sa druge strane, nivo ekspresije *FN1* porastao je 1,7 puta, *VIM* 1,5 puta, *SNAI1* 1,5 puta i *ZEB2* 1,9 puta, dok nivo ekspresije *TWIST1* nije promjenjen u odnosu na kontrolni nivo. Na kraju tretmana samo je porast ekspresije *CDH2* 3,5 puta ( $p=0,036$ ) u odnosu na kontrolu pokazao statističku značajnost, dok povećanje nivoa *FN1* 1,4 puta, *VIM* 1,4 puta i *SNAI1* 1,1 puta i smanjenje nivoa ekspresije *ZEB2* 2,1 puta, *TWIST1* 1,9 puta i *ACTA2* 1,6 puta u odnosu na kontrolne HCjE ćelije nije bilo statistički značajno. Imajući u vidu stepen morfoloških promena, sposobnost migracije, kao i promene u profilu ekspresije epitelnih i mezenhimalnih marker gena, može se zaključiti da TGF- $\beta$ 1 poseduje najveći potencijal za pokretanje procesa EMT u HCjE ćelijama.

Nakon određivanja nivoa iRNK odabranih gena urađena je imunoblot analiza dva epitelna (E-kadherin i dezmozoplakin) i dva mezenhimalna markera (N-kadherin i fibronektin) sa ciljem da se ispita da li se značajne promene u ekspresiji iRNK nakon tretmana TGF- $\beta$ 1 odražavaju i na proteinskom nivou, što bi predstavljalo korak bliže funkcionalnoj potvrdi odigravanja procesa EMT u HCjE ćelijama. Kvantifikacijom rezultata imunoblot analize pokazano je da tretman TGF- $\beta$ 1 nakon šest pasaža dovodi do statistički značajnog smanjenja ekspresije E-kadherina 7 puta ( $p=0,000001$ ) i dezmozoplakina 14,2 puta ( $p=0,000054$ ), kao i do statistički značajnog povećanja prisustva N-kadherina 11,3 puta ( $p=0,023$ ) i fibronektina 1,8 puta ( $p=0,023$ ) u tretiranim ćelijama u poređenju sa kontrolnim HCjE ćelijama (**Slika 4.15A**). Ovaj rezultat je potvrđen i primenom imunocitohemijskog fluorescentnog bojenja (**Slika 4.15B**). Nakon završetka tretmana TGF- $\beta$ 1 proteinima, u HCjE ćelijama je primećen nestanak diskretnih klastera pozitivnih na dezmozoplakin (zeleno), inače lokalizovanih na periferiji epitelnih ćelija, kao i pojava intenzivne fibronektinske mreže vlakana oko ćelija (zeleno). Takođe, u HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1 uočen je potpuni gubitak međućelijskih kontakata i E-kadherina (zeleno), praćen pojavom N-kadherina (zeleno). „Promena“ E-kadherina N-kadherinom (engl. *E/N-kadherin switch*) u tretiranim HCjE ćelijama kvantifikovana protočnom citofluorimetrijom, potvrdila je da su HCjE ćelije nakon izlaganja TGF- $\beta$ 1 proteinima podložne tranziciji u pravcu mezenhimalnog fenotipa (**Slika 4.15C**). Naime, dok je očekivano gotovo 100% HCjE ćelija u kontrolnoj grupi pokazalo pozitivno bojenje na E-kadherin, u grupi tretiranoj TGF- $\beta$ 1 proteinima procenat obojenih ćelija je pao na 61,4% ( $p=0,000182$ ). Takođe, u kontroli je u potpunosti izostalo bojenje ćelija N-kadherinom, dok je u grupi tretiranoj TGF- $\beta$ 1 51,1% HCjE ćelija bilo pozitivno na prisustvo N-kadherina ( $p=0,000021$ ).



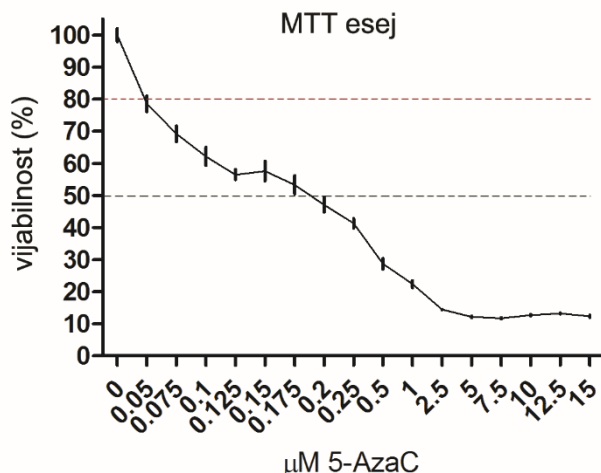
**Slika 4.14. Efekat TGF- $\beta$ 1 proteinske izoforme na ekspresiju proteina karakterističnih za epitelne i mezenhimske ćelije u HCjE ćelijama nakon šestog pasaža. (A)** Nivo epitelnih (E-kadherin i dezmozoplakin) i mezenhimskih (N-kadherin i fibronektin) proteina markera u kontrolnim i HCjE ćelijama

tretiranim TGF- $\beta$ 1 proteinskom izoformom određen imunoblot analizom. Prikazani su reprezentativni imunoblots i rezultati kvantifikacije izraženi kao relativan nivo ekspresije proteina markera u odnosu na GAPDH. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$  u odnosu na kontrolu. **(B)** Imunofluorescentna detekcija prisustva epitelnih (E-kadherin i dezmozoplakin) i mezenhimskih (N-kadherin i fibronektin) proteina markera u kontrolnim i HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1 proteinskom izoformom (zelena fluorescencija). Jedra u ćelijama su obojena DAPI bojom (plava fluorescencija). **(C)** Nivo promene E-kadherina u N-kadherin u HCjE ćelijama nakon tretmana TGF- $\beta$ 1 proteinskom izoformom detektovan protočnom citometrijom. Rezultati su prikazani kao % ćelija pozitivnih na E-kadherin i N-kadherin i izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. \*\* $p \leq 0,01$  u odnosu na kontrolu.

Na osnovu morfololoških promena HCjE ćelija, analize migracije, nivoa ekspresije iRNK marker gena, analize nivoa proteina korišćenjem imunoblot analize, imunocitohemije i citofluorimetrije ustanovljeno je da zasebno primenjen TGF- $\beta$ 1 poseduje najveću sposobnost za pokretanja procesa EMT u HCjE ćelijama. Imajući ovo u vidu, tretman HCjE ćelija TGF- $\beta$ 1 proteinom (u koncentraciji 10 ng/ml) u trajanju od 6 pasaža (30 dana) je izabran i korišćen kao model EMT u narednim ispitivanjima mehanizama odgovornih za tranziciju epitelnih ćelija ka mezenhimskom fenotipu.

#### **4.2.2. Potencijal DNK demetilujućeg agensa 5-AzaC za zaustavljanje i/ili reverziju procesa EMT u HCjE ćelijama**

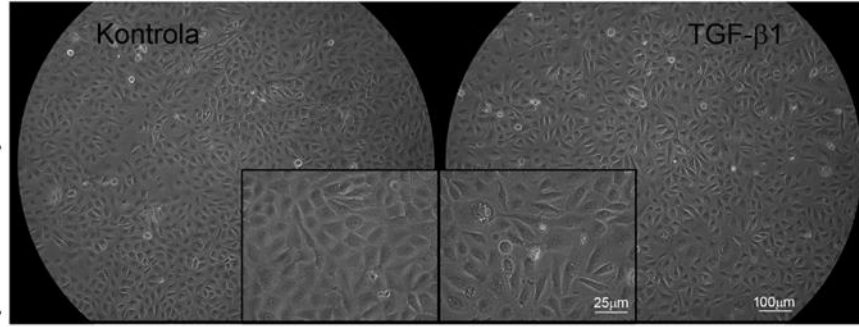
Poslednjih godina je pokazano da do aberantne metilacije DNK dolazi kod nekoliko očnih bolesti u kojima je prisutan proces EMT tranzicije. Pored toga, prethodni rezultati dobijeni analizom metilacionih profila HCjE ćelija inficiranih bakterijom *C. trachomatis* su ukazali na mogućnost da metilacija DNK predstavlja mehanizam koji doprinosi regulaciji ekspresije epitelnih/mezenhimskih markera. Da bi se rasvetlila uloga metilacije DNK u *in vitro* modelu EMT pokrenutom tretmanom humanih epitelnih ćelija konjunktive TGF- $\beta$ 1 proteinima, HCjE ćelije su tretirane 5-Azacidinom (5-AzaC). 5-AzaC je nukleozidni analog citidina koji se inkorporira u genomsku DNK tokom S-faze ćelijskog ciklusa, dovodeći do inhibicije enzima DNMT i posledično do demetilacije DNK. Za ispitivanje efekata tretmana DNK demetilujućim agensom 5-AzaC nakon većeg broja uzastopnih ćelijskih deoba, HCjE ćelije tretirane TGF- $\beta$ 1 kotretirane su 5-AzaC tokom perioda između drugog i trećeg pasaža (u trajanju od 5 dana), a potom gajene samo u prisustvu TGF- $\beta$ 1 do kraja eksperimenta. Uzorak tretiran na ovaj način označen je kao 5-AzaC sa periodom oporavka (engl. *recovery*) (5-AzaC R). Za ispitivanje neposrednih efekata 5-AzaC nakon manjeg broja uzastopnih ćelijskih deoba, HCjE ćelije tretirane TGF- $\beta$ 1 kotretirane su 5-AzaC između petog i šestog, poslednjeg, pasaža. Uzorak tretiran na ovaj način obeležen je kao 5-AzaC bez perioda oporavka (5-AzaC). Tretmanom HCjE ćelija DNK demetilujućim agensom 5-AzaC u dve različite vremenske tačke, dobijena je informacija o genima koji su preko uzvodnih regulatornih proteina na posredan način regulisani metilacijom DNK (5-AzaC R) i o genima koji su na direktan način regulisani metilacijom DNK (5-AzaC) tokom procesa EMT. Da bi se odredila doza 5-AzaC kojom će u eksperimentima biti tretirane HCjE ćelije, ispitana je vijabilnost ćelija u zavisnosti od primenjene koncentracije 5-AzaC MTT testom (**Slika 4.16**). Test vijabilnosti ćelija je pokazao da su HCjE ćelije izuzetno osetljive na tretman 5-AzaC s' obzirom da je dobijena vrednost IC<sub>50</sub> iznosila 0,175  $\mu$ M. S' obzirom da visoke koncentracije 5-AzaC dovode do citotoksičnosti i inhibicije ćelijske proliferacije, dok do demetilacije DNK dolazi samo ako je 5-AzaC primenjena u nižim koncentracijama, doza od 0,05  $\mu$ M, koja odgovara IC<sub>80</sub>, korišćena je u kotretmanima HCjE ćelija.



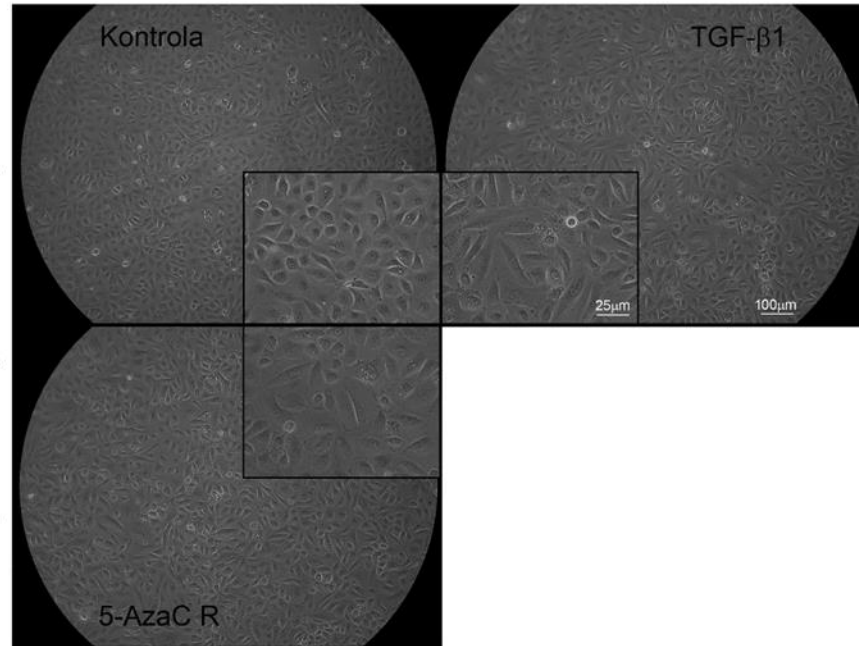
**Slika 4.16. Citotoksični efekat DNK demetilujućeg agensa na HCjE ćelije.** MTT esej vijabilnosti HCjE ćelija tretiranih rastućim koncentracijama 5-AzaC svakog dana u periodu od 72 h. Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM.

Praćenje efekata tretmana 5-AzaC sa i bez perioda oporavka na morfologiju HCjE ćelija pokazalo je da oba kotretmana dovode do smanjenja broja vretenastih ćelija u odnosu na grupu HCjE ćelija tretiranih samo TGF- $\beta$ 1 (**Slika 4.17**). Najizraženije promene morfologije uočene su nakon šestog pasaža u uzorku 5-AzaC R u kome su HCjE ćelije bez obzira na tridesetodnevnu izloženost TGF- $\beta$ 1 proteinima, nakon kotretmana 5-AzaC sa periodom oporavka, ponovo zadobile poligonalan oblik tipičan za epitelne ćelije. U uzorku 5-AzaC R nakon trećeg pasaža, kao i u uzorku 5-AzaC nakon šestog pasaža, HCjE ćelije su u najvećoj meri zadržale vretenast oblik, iako je primetan nešto veći broj ćelija sa poligonalnim oblikom nego u grupi ćelija tretiranoj samo TGF- $\beta$ 1 proteinom.

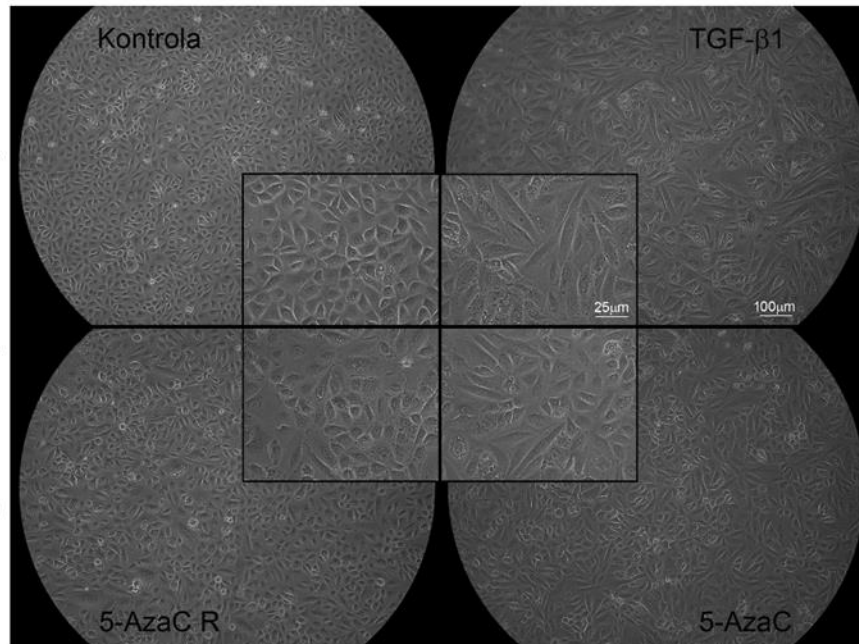
Za ispitivanje uticaja kotretmana DNK demetilujućim agensom 5-AzaC na sposobnost migracije HCjE ćelija tretiranih TGF- $\beta$ 1 korišćen je *in vitro* test zarastanja povrede (**Slika 4.18A**) koji je potvrdio da nakon tretmana HCjE ćelija TGF- $\beta$ 1 proteinima dolazi do statistički značajnog ( $p=0,001$ ) povećanja razlike u površini „čistog” prostora između 0 h i 24 h, izraženog u pikselima, odnosno do najveće sposobnosti migracije ćelija koja je bila 2,8 puta veća u odnosu na kontrolni nivo (**Slika 4.18B**). Analiza testa pokazala je da je u grupi HCjE ćelija tretiranih 5-AzaC sa periodom oporavka došlo do statistički značajnog ( $p=0,00017$ ) smanjenja ćelijske pokretljivosti 4,7 puta u odnosu na HCjE ćelije tretirane samo TGF- $\beta$ 1. Smanjenje pokretljivosti u odnosu na HCjE ćelije tretirane samo TGF- $\beta$ 1 primećeno je i u grupi HCjE ćelija tretiranih 5-AzaC bez perioda oporavka (1,3 puta), ali je stepen pokretljivosti ipak bio 2,2 puta i 3,6 puta statistički značajno viši nego u kontroli ( $p=0,043$ ) i 5-AzaC R grupi ( $p=0,006$ ), respektivno. Navedeni rezultati pokazuju da se, praćeno na nivou morfologije HCjE ćelija i sposobnosti njihove migracije, 5-AzaC tretman sa periodom oporavka pokazao uspešnijim u reverziji procesa EMT pokrenutog tretmanom TGF- $\beta$ 1 proteinima.

**A**Prvi pasaž  
(5 dana)**B**

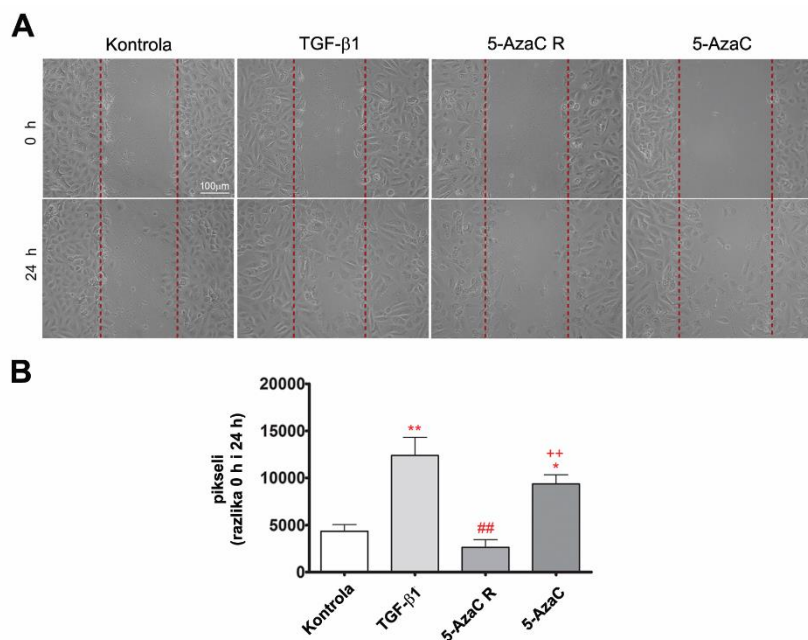
Treći pasaž (15 dana)

**C**

Šesti pasaž (30 dana)



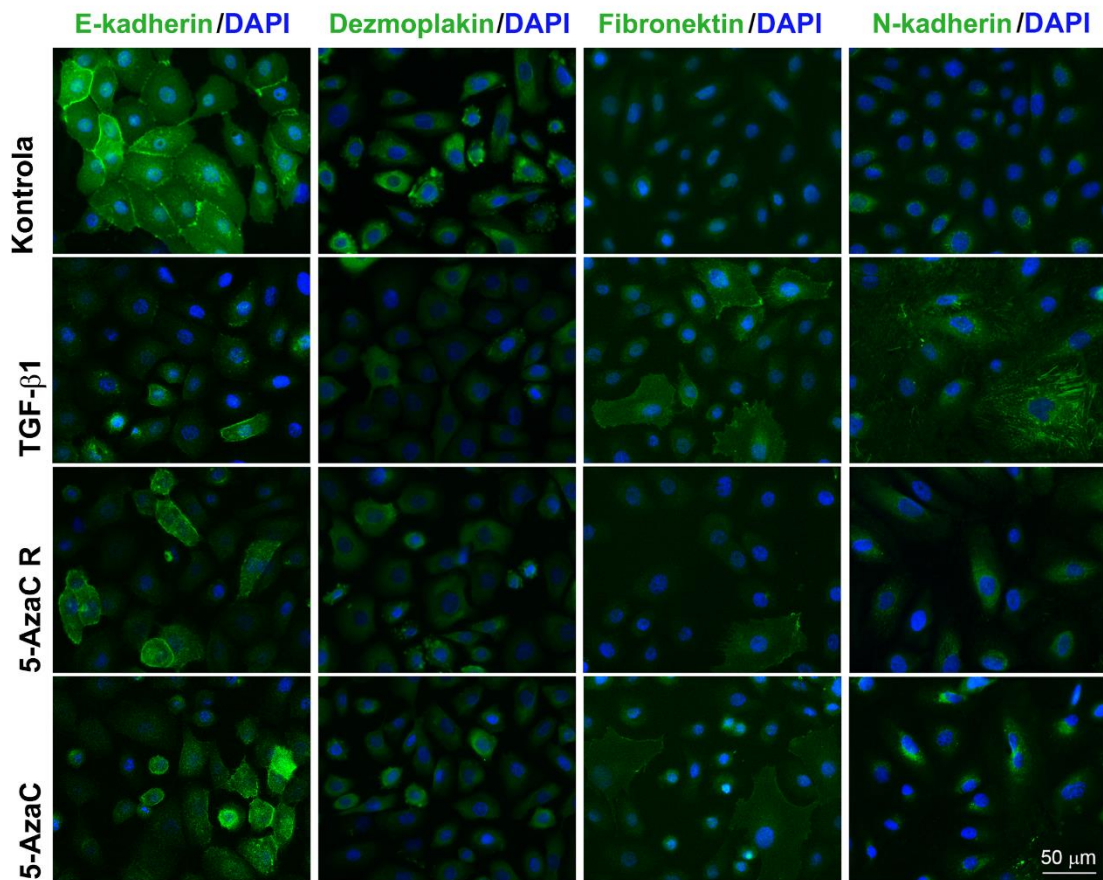
**Slika 4.17. Efekti DNK demetilujućeg agensa na morfologiju HCjE ćelija.** Morfološke promene kontrolnih, HCjE ćelija tretiranih TGF- $\beta$ 1 proteinima i ćelija kotretiranih TGF- $\beta$ 1 i 5-AzaC sa (5-AzaC R) i bez (5-AzaC) perioda oporavka u različitim vremenskim tačkama. **(A)** Morfologija ćelija pre prvog pasaža (5 dana od početka tretmana), **(B)** pre trećeg pasaža (15 dana od početka tretmana) i **(C)** pre šestog pasaža (30 dana od početka tretmana). Ćelije su fotografisane na uvećanju svetlosnog mikroskopa od 10 i 20 puta.



**Slika 4.18. Efekti DNK demetilujućeg agensa na pokretljivost HCjE ćelija.** **(A)** Prikazane su reprezentativne fotografije *in vitro* testa zarastanja povrede kontrolnih, HCjE ćelija tretiranih TGF- $\beta$ 1 proteinima i HCjE ćelija kotretiranih TGF- $\beta$ 1 proteinima i 5-AzaC sa (5-AzaC R) i bez (5-AzaC) perioda oporavka, rađenog nakon 30 dana tretmana, neposredno po nanošenju povrede (0 h) i nakon 24 h. **(B)** Vrednosti prikazane na grafiku predstavljaju površinu (u pikselima) prekrivenu ćelijama nakon 24 h od nanošenja povrede. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$  u poređenju sa kontrolom; ## $p \leq 0,01$  u poređenju sa HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1; ++ $p \leq 0,01$  u poređenju sa HCjE ćelijama tretiranim 5-AzaC R.

S' obzirom da je prethodnim eksperimentima pokazano da kotretmani DNK demetilujućim agensom 5-AzaC dovode do promena u izgledu i migraciji HCjE ćelija tretiranih TGF- $\beta$ 1, sledeći cilj je bio ispitati uticaj kotretmana ovim agensom na ekspresiju specifičnih proteina čiji se nivo menja tokom procesa EMT. Praćenje dva epitelnog (E-kadherin i dezmozoplakin) i dva mezenhimska (N-kadherin i fibronektin) markera fluorescentnom imunocitohemijom potvrdilo je pozitivan uticaj oba kotretmana 5-AzaC na očuvanje epitelnog fenotipa (**Slika 4.19**). Tretman HCjE ćelija TGF- $\beta$ 1 proteinima doveo je do gotovo potpunog gubitka E-kadherina (zeleno) i dezmozoplakina (zeleno) u poređenju sa kontrolnim ćelijama, dok su kotretmani 5-AzaC delimično povratili njihovu ekspresiju. Istovremeno, nivoi ekspresije N-kadherina (zeleno) i fibronektina (zeleno) u HCjE ćelijama značajno su se smanjili nakon izloženosti 5-AzaC u poređenju sa ćelijama tretiranim isključivo TGF- $\beta$ 1. Uticaj 5-AzaC je bio posebno izražen u slučaju fibronektina čiji se nivo ekspresije smanjio gotovo do nivoa prisutnog u kontrolnim ćelijama nakon oba kotretmana 5-AzaC. S' obzirom da je pokazano da DNK demetilujući agens 5-AzaC ima sposobnost da zaustavi promene koje dovode do tranzicije i da delimično revertuje stečeni mezenhimijski fenotip u pravcu tipične epitelnog morfološke HCjE ćelija, može se zaključiti da metilacija DNK igra važnu ulogu u procesu EMT u humanim epitelnim ćelijama konjunktive.





**Slika 4.19. Efekti DNK demetilujućeg agensa na ekspresiju proteina karakterističnih za epitelne i mezenhimske ćelije.** Imunofluorescentna detekcija prisustva epitelnih (E-kadherin i dezmozoplakin) i mezenhimalnih (N-kadherin i fibronektin) proteina markera nakon 30 dana tretmana u kontrolnim, HCjE ćelijama tretiranim TGF-β1 proteinima i HCjE ćelijama kotretiranim TGF-β1 proteinima i 5-AzaC sa (5-AzaC R) i bez (5-AzaC) perioda oporavka (zelena fluorescencija). Jedra u ćelijama su obojena DAPI bojom (plava fluorescencija).

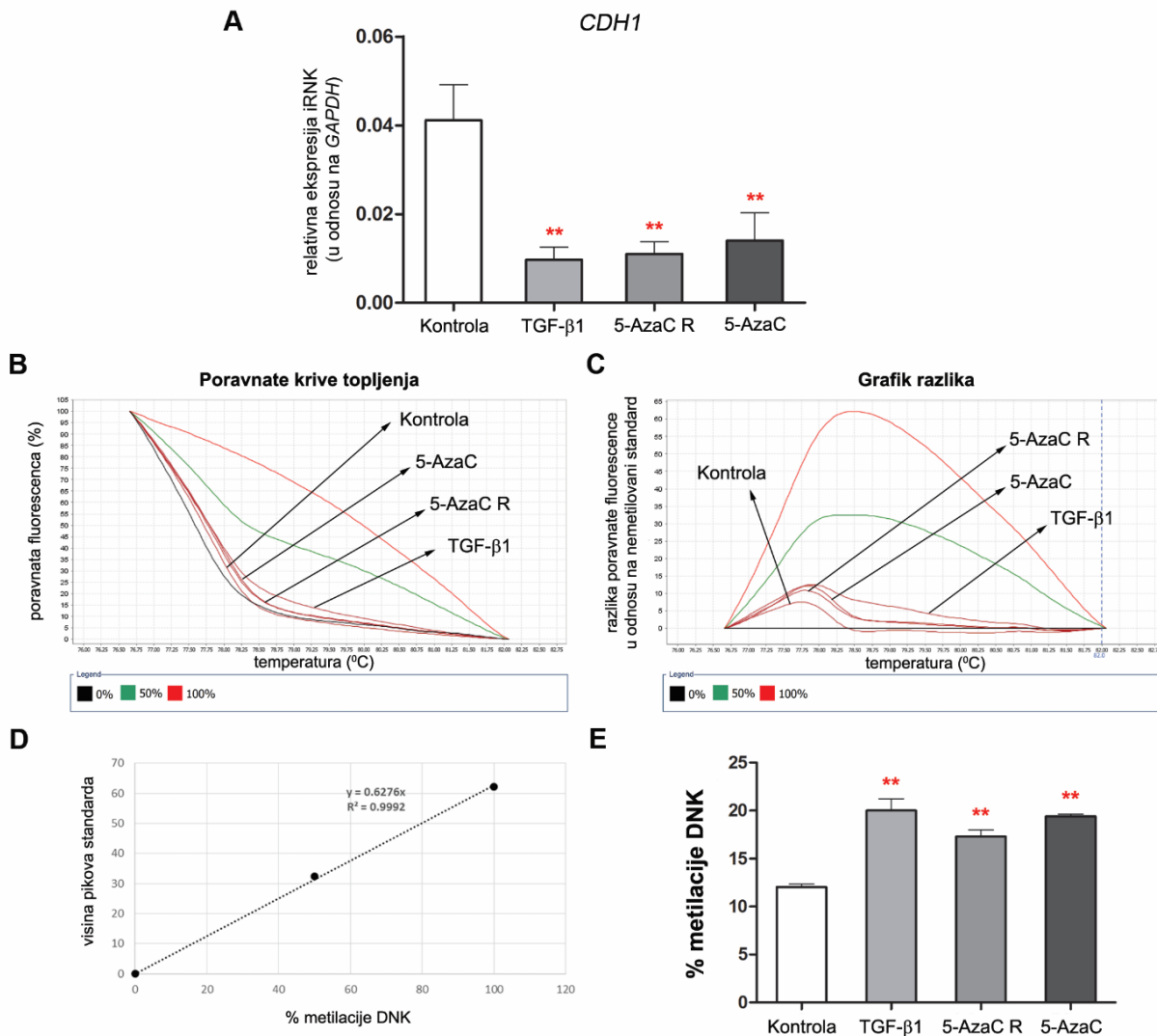
#### 4.2.3. Promene metilacionih obrazaca u promotoru *CDH1* tokom procesa EMT i nakon tretmana 5-AzaC

Kao što je prethodno pokazano, značajan mehanizam koji doprinosi pokretanju procesa EMT u HCjE ćelijama nakon infekcije *C. trachomatis* predstavlja metilacija DNK u promotoru *CDH1*. Nakon uspostavljanja *in vitro* modela procesa EMT, pokrenutog tretmanom HCjE ćelija TGF-β1 proteinima, bilo je neophodno ispitati da li isti mehanizmi leže u osnovi uočene tranzicije u modelu indukovano EMT i nakon infekcije HCjE ćelija *C. trachomatis*. *In vitro* model EMT, osim za trahom, predstavlja model i drugih bolesti oka u kojima proces tranzicije igra značajnu ulogu u razviću fibroze konjunktive. Primena agensa 5-AzaC bi putem demetilacije DNK i ponovnog uspostavljanja ekspresije gena za koga/koje je utvrđeno da je hipermetilacija odgovorna za utišavanje njihove ekspresije tokom tranzicije, mogla dovesti do reverzije procesa EMT. Kako je prethodno pokazano, u HCjE ćelijama inficiranim bakterijom *C. trachomatis* dolazi do pokretanja procesa EMT praćenog povećanjem nivoa metilacije u regionu promotora *CDH1*. Potencijalna uloga metilacije DNK u regulaciji ekspresije gena za E-kadherin tokom tranzicije mogla bi definisati pravac kojim bi se, putem demetilacije gena za marker epitelnih ćelija, moglo kretati u cilju reverzije procesa EMT u ćelijama konjunktive. Imajući navedeno u vidu, sledeći cilj istraživanja obuhvatao je ispitivanje



obrazaca ekspresije i metilacije *CDH1* u HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1, kao i praćenje posledica primene 5-AzaC na ekspresiju i metilaciju *CDH1*.

RT-qPCR analizom uzoraka dobijenih nakon indukcije EMT je pokazano da nakon tretmana HCjE ćelija TGF- $\beta$ 1 dolazi do statistički značajnog ( $p=0,001$ ) smanjenja ekspresije *CDH1* 4,25 puta u poređenju sa kontrolnim ćelijama, dok izlaganje HCjE ćelija 5-AzaC sa odloženim i neposrednim efektima dovodi do blagog povećanja ekspresije *CDH1* 1,14 i 1,45 puta, respektivno, u odnosu na ćelije tretirane samo TGF- $\beta$ 1 proteinima (**Slika 4.20A**). Na **Slikama 4.20B-D** vizualizovane su poravnate krive topljenja, grafici razlika i standardna kriva dobijeni HRM analizom. HRM analiza, kojom je obuhvaćeno 17 CpG dinukleotida, pokazala je da tretman HCjE ćelija TGF- $\beta$ 1 proteinima dovodi do statistički značajnog ( $p=0,00025$ ) porasta u nivou metilacije DNK za 8% u promotoru *CDH1* u odnosu na kontrolu, sa 12% na 20%, kao i u slučaju oba kotretmana (5-AzaC R ( $p=0,004$ ); 5-AzaC ( $p=0,0004$ )), ali da nijedan od dva kotretmana 5-AzaC ne dovodi do statistički značajnog pada u procentu metilacije u odnosu na ćelije tretirane samo TGF- $\beta$ 1 proteinima (**Slika 4.20E**). U promotoru *CDH1* procenat metilacije DNK pada za 0,6% u ćelijama izloženim 5-AzaC tretmanu bez perioda oporavka, dok je 5-AzaC tretman sa periodom oporavka dejstvom indukovao smanjenje metilacije DNK za 2,6% u odnosu na HCjE ćelije tretirane samo TGF- $\beta$ 1.



**Slika 4.20. Efekat DNK demetilujućeg agensa na nivo ekspresije i metilacije DNK analiziranog regiona promotora *CDH1* u HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1 proteinima, nakon šestog pasaža. (A)** Relativan nivo ekspresije *CDH1* u kontrolnim, HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1 proteinima i HCjE ćelijama kotretiranim TGF- $\beta$ 1 proteinima i 5-AzaC sa (5-AzaC R) i bez (5-AzaC) perioda oporavka, dobijen RT-qPCR analizom i izražen relativno u odnosu na nivo *GAPDH*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. **\*\*p  $\leq$  0,01** u odnosu na kontrolu. **(B-E)** Nivo metilacije DNK analiziranog regiona promotora *CDH1* u kontrolnim, HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1 proteinima i HCjE ćelijama kotretiranim TGF- $\beta$ 1 proteinima i 5-AzaC sa (5-AzaC R) i bez (5-AzaC) perioda oporavka dobijen HRM analizom. Prikazane reprezentativne poravnate krive topljenja **(B)** i grafik razlika **(C)** prikazuju poziciju kriva topljenja svih uzoraka u odnosu na standarde sa 0%, 50% i 100% metilacije DNK. **(D)** Na standardnoj krivi prikazana je visina pikova u odnosu na % metilacije DNK korišćenih standarda pomoću koje je izračunat nivo metilacije DNK u svim uzorcima **(E)**. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. **\*\*p  $\leq$  0,01** u odnosu na kontrolu.

Iako je u HCjE ćelijama tretiranim DNK demetilujućim agensom 5-AzaC ustanovljen određen stepen demetilacije DNK praćen malim porastom nivoa ekspresije *CDH1*, ove promene teško mogu predstavljati glavni mehanizam koji bi objasnio detektovane razlike u fenotipu HCjE ćelija nakon tretmana ovim agensom, već se pre može pretpostaviti da je za zaustavljanje i delimičnu reverziju procesa EMT u HCjE ćelijama odgovorna sinergija većeg broja faktora ili faktori koji regulišu ekspresiju većeg broja gena i/ili proteina.

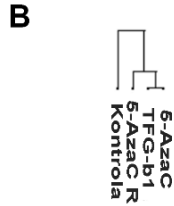
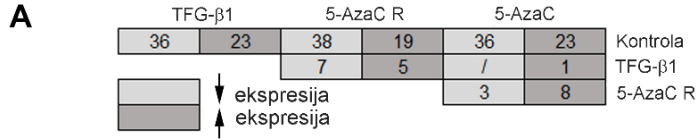
#### **4.2.4. Diferencijalna ekspresija gena uključenih u proces EMT nakon tretmana HCjE ćelija 5-AzaC**

Sa ciljem identifikacije većeg broja potencijalnih targeta čija promena u metilaciji DNK utiče na tok procesa EMT u HCjE ćelijama, nakon šestog pasaža korišćen je panel (*RT2 Profiler™ PCR Array*) pomoću koga se ispitivao nivo iRNK 84 gena za koje je poznato da imaju važnu ulogu u procesu EMT (**Slika 4.21**). Praćenje ekspresije gena obuhvatilo je kontrolne HCjE ćelije, ćelije tretirane TGF- $\beta$ 1 i ćelije kotretirane 5-AzaC pre trećeg i šestog pasaža. U skladu sa očekivanjima, rezultati analize su pokazali da je pokretanje procesa EMT u HCjE ćelijama praćeno velikim promenama u ekspresiji gena uključenih u proces EMT (**Slika 4.21A**). U HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1 došlo je do povećane ekspresije 23 gena i smanjene ekspresije 36 gena u poređenju sa kontrolnim ćelijama. 5-AzaC tretman bez perioda oporavka doveo je do istog odnosa broja gena sa povećanom i utišanom ekspresijom kao i kod TGF- $\beta$ 1, dok je 5-AzaC tretman sa periodom oporavka indukovao povećanje ekspresije 19 i smanjenje ekspresije 38 gena u poređenju sa kontrolnim HCjE ćelijama. Iako je detektovan sličan broj gena čiji se nivo ekspresije menja sa tretmanima, dalja analiza je pokazala da je kod HCjE ćelija u grupi 5-AzaC R došlo do promene u nivou ekspresije gena u odnosu na nivo prisutan u ćelijama tretiranim samo TGF- $\beta$ 1, ali i u poređenju sa 5-AzaC tretmanom bez perioda oporavka. Takođe, kod HCjE ćelija koje pripadaju 5-AzaC grupi došlo je do povećane ekspresije samo jednog gena u odnosu na ćelije izložene samo TGF- $\beta$ 1 proteinima. Klaster analiza vizualizovana u formi toplotne karte (engl. *heat map*) potvrdila je da je od svih tretmana profil ekspresije gena u HCjE ćelijama koje pripadaju 5-AzaC R grupi najbliži profilu ekspresije gena u kontrolnim ćelijama (**Slika 4.21B**). Među genima čiji se nivo ekspresije nakon 5-AzaC tretmana sa periodom oporavka približio nivou ekspresije prisutnom u kontrolnim HCjE ćelijama nalaze se *PDGFRB*, *CDH2*, *SNAI1*, *SNAI2*, *ITGA5*, *ZEB1*, *TGFB2*, *FN1*, *FOXC2*, *MMP2*, *RGS2*, *GEMIN2*, *PTP4A1*, geni koji imaju važnu ulogu u pokretanju procesa EMT.

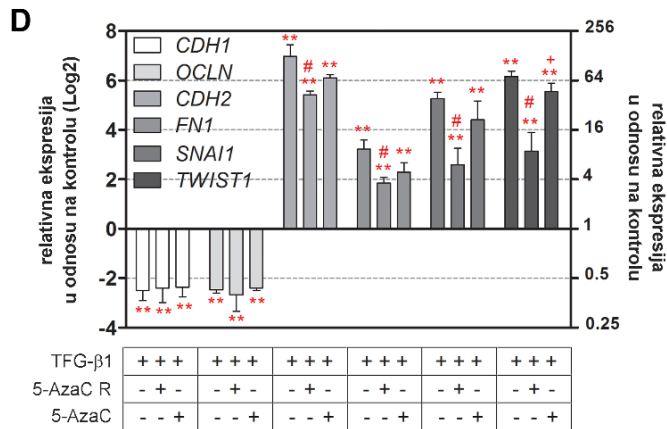
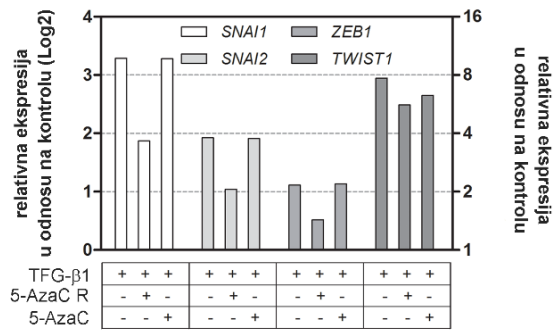
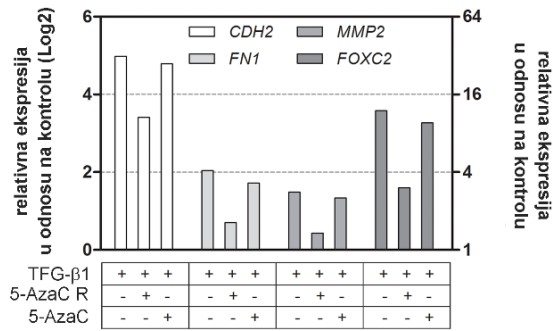
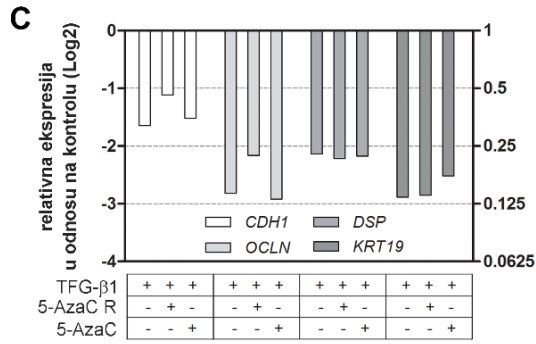
Nivoi ekspresije pojedinih gena karakterističnih za epitelne, odnosno mezenhimske ćelije, a koji su dobijeni korišćenjem panela, prikazani su na **Slici 4.21C**. Zbog mehanizma delovanja DNK demetilujućeg agensa 5-AzaC i uloge metilacije DNK u ekspresiji gena moglo bi se očekivati da nakon tretmana HCjE ćelija ovim agensom i demetilacije DNK, glavni efekat bude povećana

ekspresija gena. Ipak, dobijeni rezultati pokazuju da nakon oba kotretmana 5-AzaC u većoj meri dolazi do utišavanja ekspresije gena u odnosu na nivo ekspresije prisutan u HCjE ćelijama tretiranim samo TGF- $\beta$ 1 proteinima. Takođe, većina utišanih gena pripadaju genima koji imaju ulogu u uspostavljanju i održavanju mezenhinskog fenotipa, dok su na genima eksprimiranim u epitelnim ćelijama efekti demetilacije DNK slabije uočljivi. Stepem promena u nivou ekspresije mezenhinskih gena posebno je izražen u tretmanu 5-AzaC sa periodom oporavka, za razliku od 5-AzaC grupe kod koje je nivo ekspresija bliži nivou prisutnom u HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1. Osnovna posledica tretmana HCjE ćelija 5-AzaC sa periodom oporavka je modulacija ekspresije mezenhinskih marker gena kao što su *CDH2* i *FN1*, kao i gena koji kodiraju za transkripcione faktore uključene u pokretanje procesa EMT (*SNAI*, *ZEB*, *TWIST*, *FOXC2*). U poređenju sa HCjE ćelijama tretiranim samo TGF- $\beta$ 1 proteinima, tretman 5-AzaC sa periodom oporavka dovodi do pada ekspresije ove grupe gena, približavajući nivoe ekspresije nivou prisutnom u kontrolnim ćelijama, i ukazujući da uočene promene u ekspresiji nisu posledica direktne demetilacije DNK nijednog od ovih gena.

Rezultati dobijeni korišćenjem panela validirani su korišćenjem RT-qPCR analize za pojedinačne odabrane gene, pri čemu je pokazana konzistentnost u smeru promena nivoa ekspresije (**Slika 4.21D**). Sve tretirane grupe HCjE ćelija statistički su se značajno razlikovale od kontrole, pri čemu su epitelni markeri *CDH1* i *OCN* pokazali smanjenje ekspresije, a mezenhinski markeri *CDH2* i *FN1* i regulatorni proteini *SNAI1* i *TWIST1* povećanje nivoa ekspresije u odnosu na nivo iRNK detektovan u kontrolnim HCjE ćelijama. Tako je nivo ekspresije *CDH1* u poređenju sa kontrolom smanjen 5,6 puta ( $p=0,0001$ ) u HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1, 5,3 puta ( $p=0,0046$ ) u tretmanu 5-AzaC sa periodom oporavka i 5,2 puta ( $p=0,0085$ ) u tretmanu 5-azaC bez perioda oporavka. Takođe, nivo ekspresije *OCN* je 5,5 puta ( $p=0,0007E-02$ ) manji u ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1, 6,4 puta ( $p=0,0071$ ) u tretmanu 5-AzaC sa periodom oporavka i 5,3 puta ( $p=0,0017E-02$ ) u tretmanu 5-azaC bez perioda oporavka u poređenju sa nivoom prisutnim u kontrolnim HCjE ćelijama. Sa druge strane nivo iRNK *CDH2* je 125,2 puta ( $p=0,0013E-04$ ) povećan u tretmanu TGF- $\beta$ 1 proteinima u odnosu na kontrolu, 42,9 puta ( $p=0,0027E-04$ ) u grupi 5-AzaC R i 68,6 puta ( $p=0,0012E-04$ ) u grupi 5-AzaC. Nivo *FN1* pokazuje manji stepen promena ali je i u njegovom slučaju nivo ekspresije 9,3 puta ( $p=0,0051E-02$ ) viši u ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1, 3,6 puta ( $p=0,0005$ ) u tretmanu 5-AzaC sa periodom oporavka i 4,9 puta ( $p=0,0006$ ) u tretmanu 5-azaC bez perioda oporavka u poređenju sa netretiranim HCjE ćelijama. Tretman HCjE ćelija TGF- $\beta$ 1 dovodi do povećane ekspresije *SNAI1* 38,6 puta ( $p=0,0005E-02$ ) u odnosu na kontrolu, dok kotretmani 5-AzaC sa i bez perioda oporavka dovode do porasta nivoa *SNAI1* 6 puta ( $p=0,0083$ ) i 21,2 puta ( $p=0,0022$ ), respektivno, u odnosu na nivo prisutan u kontrolnim ćelijama. Detektovan je i porast nivoa ekspresije *TWIST1* 71,2 puta ( $p=0,0036E-06$ ) u odnosu na kontrolu nakon tretmana TGF- $\beta$ 1, 8,8 puta ( $p=0,0055$ ) nakon tretmana 5-AzaC sa periodom oporavka i 46,7 puta ( $p=0,0005$ ) nakon kotretmana 5-AzaC bez perioda oporavka. Takođe, iz navedenih rezultata može se uočiti da je u ćelijama izloženim 5-AzaC tretmanu sa periodom oporavka došlo do statistički značajnog (*CDH2*  $p=0,027$ ; *FN1*  $p=0,042$ ; *SNAI1*  $p=0,017$ ; *TWIST1*  $p=0,001$ ) smanjenja ekspresije svih gena specifičnih za mezenhinski tip ćelija u poređenju sa HCjE ćelijama tretiranim samo TGF- $\beta$ 1. Nakon statističke analize dobijena je i statistički značajna razlika u nivou ekspresije *TWIST1* u grupi 5-AzaC u poređenju sa grupom 5-AzaC R ( $p=0,022$ ).



- opseg ekspresije gena
- min avg max
- MMP3
  - TMEM132A
  - CAMK2N1
  - STEAP1
  - COL1A2
  - VCAH1
  - F3LR
  - IGFBP4
  - RAC1
  - CTNHB1
  - SPP1
  - TWIST1
  - TMEFF1
  - WNT5B
  - MMP9
  - ITGB1
  - SERPINE1
  - PDGFRB
  - CDH2
  - SNAI1
  - SNAI2
  - ITGA5
  - ZEB1
  - PTK2
  - TGFB2
  - FN1
  - FOXC2
  - MMP2
  - BMP1
  - SPARC
  - ITGAV
  - COL5A2
  - ILK
  - MAP1B
  - VIM
  - IL1RN
  - MSN
  - VPS13A
  - TSPAN13
  - JAG1
  - SMAD2
  - CALD1
  - ZEB2
  - TCF4
  - SOX10
  - WNT11
  - ESR1
  - GSK3B
  - TCF3
  - COL3A1
  - ERBB3
  - KRT19
  - KRT7
  - SNAI3
  - DSP
  - FZD7
  - DSC2
  - AHNAK
  - BMP7
  - GSC
  - EGFR
  - CAV2
  - TGFB1
  - RG52
  - GEMIN2
  - NOTCH1
  - PLEK2
  - PTP4A1
  - WNT5A
  - STAT3
  - GNG11
  - DESIL
  - CDH1
  - FGFBP1
  - AKT1
  - NUDT13
  - BMP2
  - TFPI2
  - TIMP1
  - KRT14
  - MST1R
  - OCLN
  - NODAL
  - TGFB3



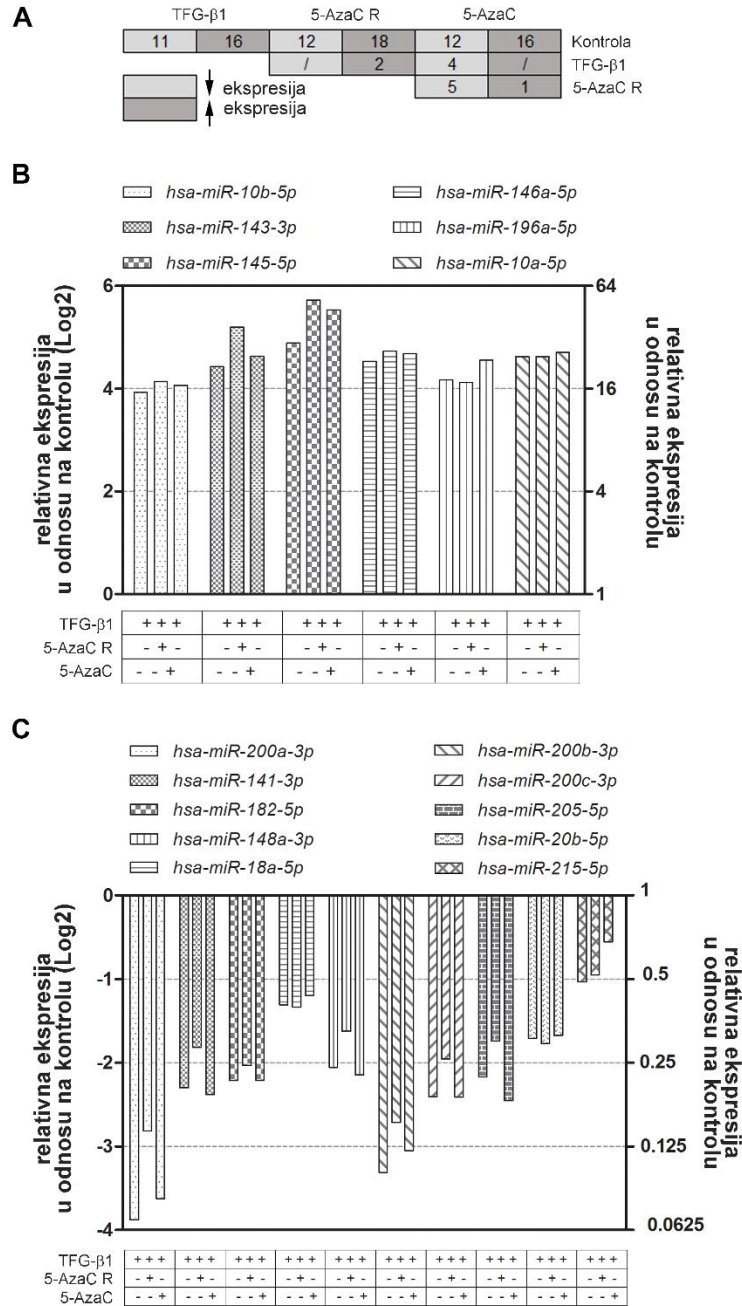
**Slika 4.21. Efekat DNK demetilujućeg agensa na ekspresiju gena povezanih sa procesom EMT u HCjE ćelijama tretiranim TGF-β1 proteinima, nakon šestog pasaža.** Prikazan je broj diferencijalno eksprimiranih gena (najmanje 2 puta veći ili manji) **(A)** i klaster analiza vizualizovana u formi toplotne karte **(B)** u kontrolnim, HCjE ćelijama tretiranim TGF-β1 proteinima i HCjE ćelijama kotretiranim TGF-β1 proteinima i 5-AzaC sa (5-AzaC R) i bez (5-AzaC) perioda oporavka, dobijeni korišćenjem panela baziranog na primeni RT-qPCR metode. **(C)** Relativan nivo ekspresije gena u kontrolnim, HCjE ćelijama tretiranim TGF-β1 proteinima i HCjE ćelijama kotretiranim TGF-β1 proteinima i 5-AzaC sa (5-AzaC R) i bez (5-AzaC) perioda oporavka u odnosu na kontrolu, nakon normalizacije u odnosu na pet referentnih gena, dobijen korišćenjem panela baziranog na primeni RT-qPCR metode. Na levoj y-osi prikazane su dobijene vrednosti na log<sub>2</sub> skali, pri čemu vrednosti veće od 0 označavaju povećanje ekspresije u tretiranim ćelijama u odnosu na kontrolu, dok negativne vrednosti označavaju smanjenje nivoa ekspresije u tretiranim ćelijama u odnosu na kontrolu. Na desnoj y-osi prikazana je ekvivalentna linearna skala. **(D)** Validacija nivoa ekspresije nekoliko gena koji kodiraju za markere epitelnih i mezenhimskih ćelija u kontrolnim, HCjE ćelijama tretiranim TGF-β1 proteinima i HCjE ćelijama kotretiranim TGF-β1 proteinima i 5-AzaC sa (5-AzaC R) i bez (5-AzaC) perioda oporavka. Prikazan je relativan nivo ekspresije u odnosu na kontrolu, nakon normalizacije u odnosu na *GAPDH*, dobijen RT-qPCR analizom. Na levoj y-osi prikazane su srednje vrednosti ± SEM na log<sub>2</sub> skali, pri čemu vrednosti veće od 0 označavaju povećanje ekspresije u tretiranim ćelijama u odnosu na kontrolu, dok negativne vrednosti označavaju smanjenje nivoa ekspresije u tretiranim ćelijama u odnosu na kontrolu. Na desnoj y-osi prikazana je ekvivalentna linearna skala.\*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01 u odnosu na kontrolu; #p ≤ 0,05 u odnosu na HCjE ćelije tretirane TGF-β1 proteinima; +p ≤ 0,05 u odnosu na ćelije tretirane 5-AzaC R.

Rezultati dobijeni u ovom eksperimentu ukazali su na dva zaključka. Pre svega, uočene su velike razlike u efektima dva različita kotretmana 5-AzaC, pri čemu je 5-AzaC tretman sa periodom oporavka doveo do značajnih promena u nivou ekspresije testiranih gena koje su rezultovale zaustavljanjem i reverzijom procesa EMT. Pored toga, svi prethodno navedeni podaci ukazuju da je glavni efekat kotretmana HCjE ćelija 5-AzaC sa periodom oporavka postignut demetilacijom DNK nekih od uzvodnih regulatornih faktora, pre nego direktnom demetilacijom DNK gena čiji je nivo ekspresije iRNK testiran korišćenjem panela.

### 4.3. Uloga miRNA u procesu EMT u HCjE ćelijama

#### 4.3.1. Uticaj procesa EMT i tretmana 5-AzaC na profil ekspresije miRNA u HCjE ćelijama

Profili ekspresije dobijeni nakon analize nivoa iRNK u HCjE ćelijama kod kojih je pokrenut EMT i HCjE ćelijama koje su podvrgnute demetilaciji DNK ukazuju da uzvodni regulatorni faktori, za koje se pretpostavlja da koordinišu ekspresiju većeg broja gena, moraju svoju aktivnost ispoljavati kao negativni regulatori ekspresije gena. Sa 38589 sekvenci pre-miRNK i 48860 sekvenci zrelih miRNK iz 271 različite vrste unetih u bazu miRNK (miRBase v22) (Kozomara i sar., 2018), odnosno sa više od 38000 unosa u bazi humanih miRNK ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)) (decembar 2019. godine), za miRNK se smatra da predstavljaju značajnu klasu represora ekspresije gena zahvaljujući njihovoj brojnosti, specifičnosti i mehanizmu delovanja. Sa ciljem utvrđivanja potencijalne uloge miRNK u procesu EMT u HCjE ćelijama, ispitani su ekspresioni profili 84 odabrane miRNK u kontrolnim, u HCjE ćelijama nakon pokretanja tranzicije, kao i nakon 5-AzaC tretmana sa i bez perioda oporavka, nakon šestog pasaža, korišćenjem panela (*miRCURY LNA™ miRNA Human Cancer Focus PCR Panel*) (**Slika 4.22**).



**Slika 4.22. Efekat DNK demetilujućeg agensa na ekspresiju miRNK povezanih sa procesom EMT u HCJE ćelijama tretiranim TGF-β1 proteinima, nakon šestog pasaža. (A)** Prikazan je broj diferencijalno eksprimiranih miRNK (najmanje 2 puta veći ili manji) između kontrolnih, HCJE ćelija tretiranih TGF-β1 proteinima i HCJE ćelija kotretiranih TGF-β1 proteinima i 5-AzaC sa (5-AzaC R) i bez (5-AzaC) perioda oporavka, dobijen korišćenjem panela baziranog na primeni RT-qPCR metode. **(B-C)** Relativan nivo ekspresije miRNK u HCJE ćelijama tretiranim TGF-β1 proteinima i HCJE ćelijama kotretiranim TGF-β1 proteinima i 5-AzaC sa (5-AzaC R) i bez (5-AzaC) perioda oporavka u odnosu na kontrolu, nakon normalizacije u odnosu na deset referentnih miRNK, dobijen korišćenjem panela baziranog na primeni RT-qPCR metode. Na levoj y-osi prikazane su dobijene vrednosti na log2 skali, pri čemu vrednosti veće od 0 označavaju povećanje ekspresije u tretiranim ćelijama u odnosu na kontrolu, dok negativne vrednosti označavaju smanjenje nivoa ekspresije u tretiranim ćelijama u odnosu na kontrolu. Na desnoj y-osi prikazana je ekvivalentna linearna skala.

Analiza prikupljenih podataka je pokazala da u HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1 dolazi do povećanja ekspresije 16 miRNK i smanjenja ekspresije 11 miRNK u poređenju sa kontrolom. 5-AzaC tretman sa periodom oporavka povećao je ekspresiju 18 i smanjio ekspresiju 12 miRNK, dok je 5-AzaC tretman bez perioda oporavka pojačao ekspresiju 16 a utišao ekspresiju 12 miRNK u poređenju sa nivoom ekspresije u kontrolnim HCjE ćelijama (**Slika 4.22A**). Grupi miRNK čija je ekspresija porasla za više od 10 puta u odnosu na kontrolu pripadaju miR-10b-5p (15,2 puta), miR-143-3p (21,6 puta), miR-145-5p (29,7 puta), miR-146a-5p (23,1 puta), miR-196a-5p (18 puta) i miR-10a-5p (24,7 puta) (**Slika 4.22B**). Među navedenim miRNK, rast nivoa ekspresije nakon oba kotretmana 5-AzaC u odnosu na HCjE ćelije tretirane samo TGF- $\beta$ 1 detektovan kod miR-143-3p (1,7 puta u 5-AzaC R grupi i 1,1 puta u 5-AzaC grupi) i miR-145-5p (1,8 puta u 5-AzaC R grupi i 1,6 puta u 5-AzaC grupi) ukazuje na moguću uključenost metilacije DNK u regulaciji njihove ekspresije.

Najizraženije smanjenje nivoa ekspresije nakon pokretanja procesa EMT u odnosu na kontrolu detektovano je kod članova miR-200 familije miRNK, miR-200a-3p (14,7 puta), miR-200b-3p (9,9 puta), miR-141-3p (4,9 puta) i miR-200c-3p (5,3 puta) (**Slika 4.22C**). Osim pomenutih miRNK, tretman HCjE ćelija TGF- $\beta$ 1 dovodi i do smanjene ekspresije miR-182-5p (4,6 puta), miR-18a-5p (2,5 puta), miR-148a-3p (4,2 puta), miR-205-5p (4,5 puta), miR-20b-5p (3,3 puta) i miR-215-5p (2 puta) u odnosu na kontrolne HCjE ćelije. Značajanu informaciju predstavlja zapažanje da 5-AzaC tretman sa periodom oporavka rezultira porastom nivoa ekspresije članova miR-200 familije i miR-205 ka nivou ekspresije zabeleženom u kontroli. Tako je pokazano da je 5-AzaC tretman sa periodom oporavka indukovao porast ekspresije miR-200a-3p 2,1 put, miR-141-3p 1,4 puta, miR-200b-3p 1,5 puta, miR-200c-3p 1,4 puta i miR-205-5p 1,3 puta u odnosu na HCjE ćelije tretirane samo TGF- $\beta$ 1 proteinima. Istovremeno, 5-AzaC tretman bez perioda oporavka nije imao značajnog efekta na nivo ekspresije testiranih miRNK.

Uticaj različitih kotretmana 5-AzaC na nivo ekspresije članova miR-200 familije miRNA mogao bi objasniti veću efikasnost 5-AzaC tretmana sa periodom oporavka u odnosu na 5-AzaC tretman bez perioda oporavka u zaustavljanju i reverziji procesa EMT u HCjE ćelijama, zabeleženu u prethodnim eksperimentima.

#### **4.3.2. Promene u metilacionom statusu miR-200 klastera tokom procesa EMT i nakon 5-AzaC tretmana sa periodom oporavka**

Prethodni rezultati, ali i literaturni podaci, ukazuju na značaj metilacije DNK u regulaciji ekspresije članova miR-200 familije. Da bi se ispitalo da li su uočene promene u nivoima ekspresije članova miR-200 familije posledica promene u profilima metilacije DNK, metilacioni status oba miR-200 lokusa je ispitan u kontrolnim HCjE ćelijama, HCjE ćelijama nakon pokretanja EMT i ćelijama tretiranim 5-AzaC sa periodom oporavka nakon šestog pasaža (**Slike 4.23 i 4.24**).

Gen koji kodira za klaster u okviru koga se nalaze miR-200a, miR-200b i miR-429 sadrži 2946 bp dugačko CpG ostrvce koje se proteže od pozicije -378 do pozicije +2568 u odnosu na TSS. Region odabran za analizu metilacije miR-200a/b/429 klastera je lokalizovan unutar CpG ostrvca i sadrži promotorsku sekvencu i TSS. HRM analiza miR-200a/b/429 lokusa obuhvatila je 18 CpG dinukleotida smeštenih u regionu između pozicija -41 i +208, dok je region podvrgnut bisulfitnom sekvenciranju obuhvatao širu sekvencu, od pozicije -118 do pozicije +208 u odnosu na mesto TSS (**Slika 4.23A**). Na **Slikama 4.23B-D** prikazane su poravnate krive topljenja i grafici razlika svakog standarda sa poznatim nivoom metilacije DNK dobijeni HRM analizom, kao i na osnovu njih konstruisana standardna kriva pomoću koje je izračunat procenat metilacije u uzorcima (**Slika 4.23E**). Rezultati HRM analize su pokazali da je tretman HCjE ćelija TGF- $\beta$ 1 proteinima doveo do

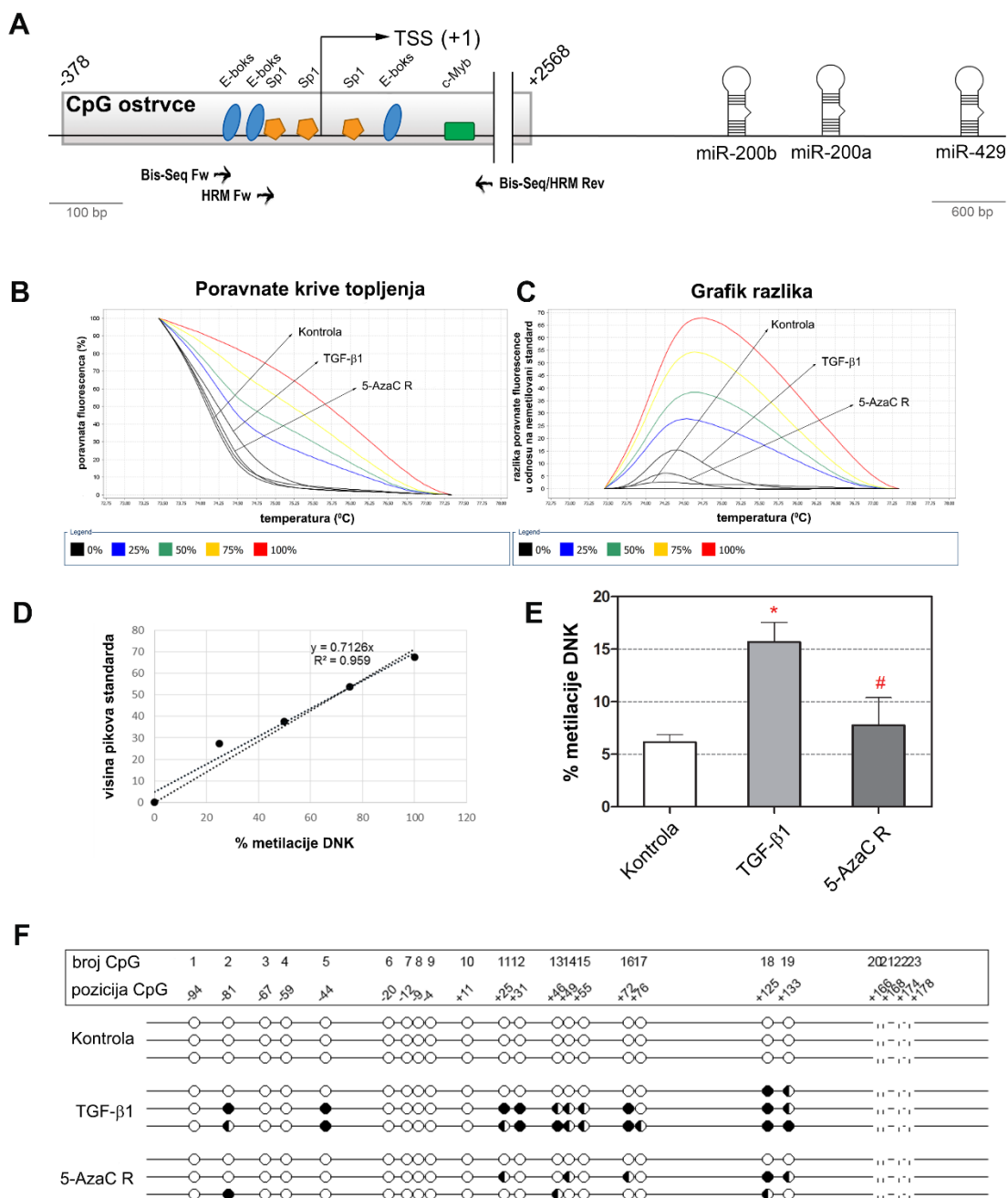


statistički značajnog ( $p=0,014$ ) povećanja metilacije DNK sa 6,2% u kontroli na 15,7% u odabranom regionu miR-200a/b/429 klastera. Kotretman 5-AzaC sa periodom oporavka je u poređenju sa nivoom metilacije prisutnim u HCjE ćelijama tretiranim isključivo TGF- $\beta$ 1, doveo do statistički značajnog ( $p=0,028$ ) smanjenja nivoa metilacije DNK, gotovo do nivoa detektovanog u kontroli (7,7%). Rezultati bisulfitnog sekvenciranja (**Slika 4.23F**), koje je dalo informaciju i o metilacionom statusu dodatnih 5 CpG, su pokazali da su svi analizirani CpG parovi u kontroli potpuno nemetilovani i potvrdili da je tretman HCjE ćelija TGF- $\beta$ 1 proteinima doveo do povećanja nivoa metilacije odabranog regiona miR-200a/b/429 klastera. U segmentu DNK nizvodno od TSS došlo je do metilacije citozina u okviru 9 CpG dinukleotida, dok su u uzvodnom regionu samo 2 CpG dinukleotida (na pozicijama citozina -44 i -81) pokazala promenu u metilacionom profilu u odnosu na potpuno nemetilovane CpG parove u kontroli. Kotretman 5-AzaC sa periodom oporavka je doveo do delimične ili potpune demetilacije svih 11 CpG dinukleotida koji su se metilovali nakon tretmana HCjE ćelija TGF- $\beta$ 1.

miR-200c i miR-141 se nalaze u okviru klastera koji u svom promotoru sadrži CpG ostrvce dugo 425 bp na poziciji od -377 do +48 u odnosu na TSS. Za HRM analizu i bisulfitno sekvenciranje miR-200c/141 klastera korišćen je identičan set prajmera koji obuhvata region sa 11 CpG parova unutar CpG ostrvca od pozicije -76 do -264 u odnosu na TSS (**Slika 4.24A**). Na **Slikama 4.24B i 4.23C** prikazane su poravnate krive topljenja i grafici razlika dobijeni HRM analizom na kojima je jasno uočljivo da u 5-AzaC R uzorku dolazi do pada nivoa metilacije s' obzirom da je pik krive topljenja bliži standardu za koji je poznato da je metilovan 25% nego standardu sa 50% metilacije kao što je slučaj sa uzorcima ćelija tretiranih samo sa TGF- $\beta$ 1. Na osnovu standarda sa poznatom količinom metilacije DNK je konstruisana standardna kriva pomoću koje je izračunat procenat metilacije DNK uzoraka (**Slike 4.24D i 4.24E**). HRM analiza pokazala je da kao rezultat tretmana HCjE ćelija TGF- $\beta$ 1 proteinima dolazi do statistički značajnog ( $p= 0.000007$ ) povećanja metilacije od kontrolnih 9% na 43%. Za razliku od efekata 5-AzaC primećenih prilikom analize metilacije DNK u okviru miR-200a/b/429 klastera, 5-AzaC tretman sa periodom oporavka nije uspeo da u promotoru miR-200c/141 klastera demetiluje DNK do kontrolnog nivoa jer je detektovan nivo metilacije od 28,9%. Ipak pad u procentu metilacije DNK se pokazao statistički značajan u odnosu na nivo metilacije prisutan i u kontrolnim HCjE ćelijama ( $p=0,001$ ) i nakon tretmana TGF- $\beta$ 1 proteinima ( $p=0,016$ ). Bisulfitno sekvenciranje je potvrdilo prethodne rezultate s' obzirom da je utvrđeno da su gotovo svi analizirani CpG parovi promenili metilacioni status (**Slika 4.24F**). Nakon tretmana HCjE ćelija TGF- $\beta$ 1, u okviru 8 CpG dinukleotida došlo je do povećanja metilacije DNK u odnosu na kontrolni nivo, dok je nakon 5-AzaC tretmana sa periodom oporavka primećen pad nivoa metilacije ka nivou prisutnom u kontroli.

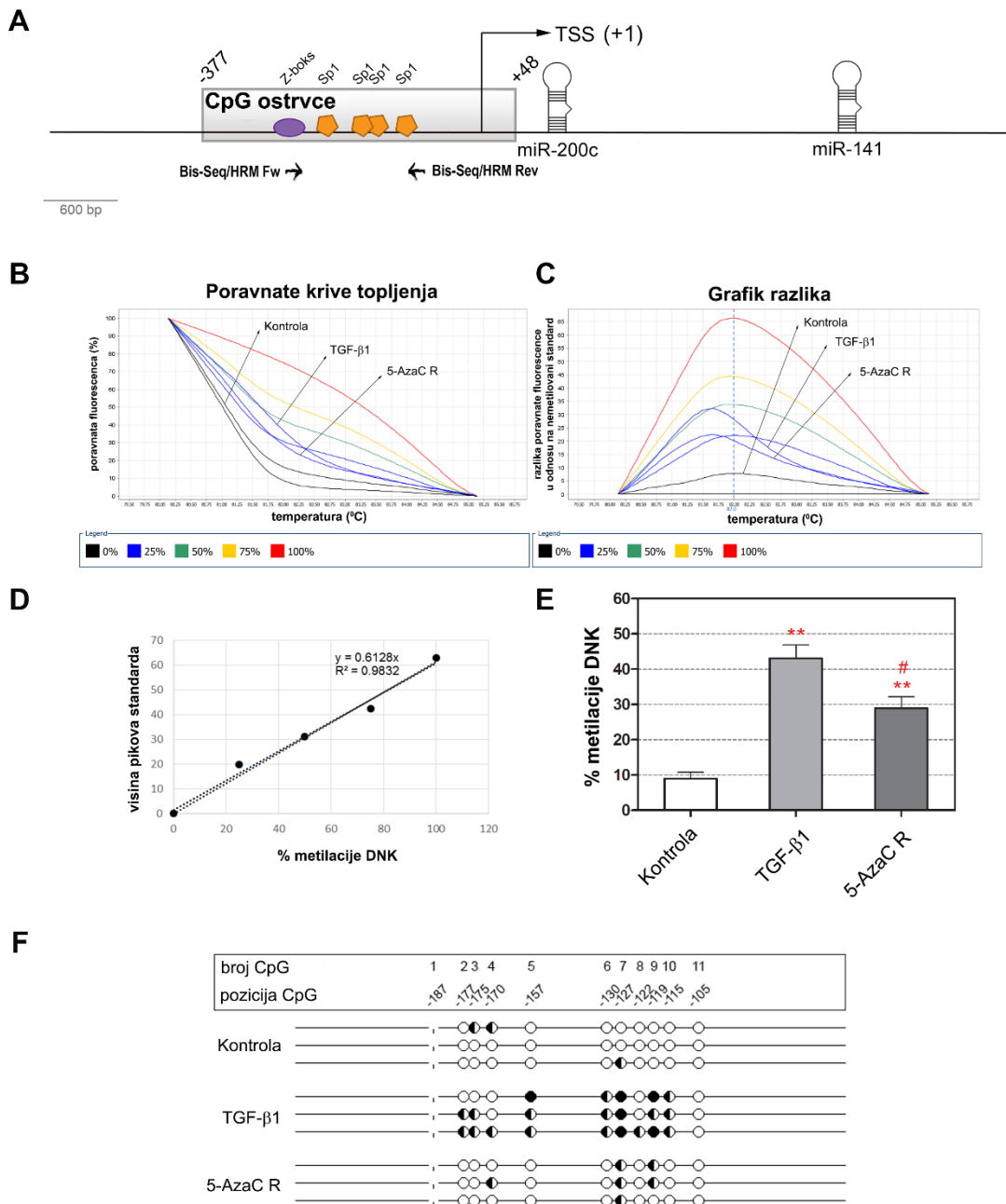
Korišćenjem besplatno dostupnog *on-line* Match™ softvera i standardnih parametara, urađena je predikcija mesta vezivanja transkripcionih faktora u okviru sekvence promotora oba klastera miR-200. Analiza je pokazala da region miR-200a/b/429 klastera prethodno podvrgnut analizi metilacije, pored tri mesta poznata iz literature za koja se vezuju ZEB proteini (Bracken i sar., 2008), sadrži i tri mesta vezivanja SP1 i jedno mesto vezivanja c-MYB proteina (**Slika 4.23A**). Za sekvencu miR-200c/141 klastera čiji je metilacioni status određivan prethodnim analizama, ustanovljeno je da obuhvata jedno mesto vezivanja ZEB (Burk i sar., 2008) i četiri mesta vezivanja SP1 proteina (**Slika 4.24A**). Postojanje sekvenci u promotorima miR-200a/b/429 i miR-200c/141 klastera, koje predstavljaju mesta prepoznavanja važnih regulatornih proteina, ukazuje da bi detektovane promene u nivou metilacije DNK ovih regiona, kroz modulaciju dostupnosti mesta vezivanja različitih transkripcionih faktora, mogle biti odgovorne za regulaciju ekspresije oba klastera miR-200.





**Slika 4.23. Uticaj tretmana DNK demetilujućim agensom 5-AzaC sa periodom oporavka na DNK metilacioni status klastera miR-200b/a/429 u HCjE ćelijama tretiranim TGF-β1 proteinima nakon šestog pasaža.** (A) Shematski prikaz genomskeg lokusa miR-200b/a/429 (NCBI ref. sekvenca NC\_000001.11; pozicija CpG ostrvca od 1162498 do 1165443 bp). Na shemi su obeleženi CpG ostrvce, TSS (+1), potencijalna mesta vezivanja regulatornih proteina i pozicije prajmera korišćenih u analizi metilacije DNK. (B-E) Nivo metilacije DNK analiziranog regiona lokusa miR-200b/a/429 u kontrolnim, HCjE ćelijama tretiranim TGF-β1 proteinima i HCjE ćelijama kotretiranim TGF-β1 proteinima i 5-AzaC sa periodom oporavka (5-AzaC R) dobijen HRM analizom. Prikazane reprezentativne poravnate krive topljenja (B) i grafik razlika (C) prikazuju poziciju kriva topljenja svih uzoraka u odnosu na standarde sa 0%, 25%, 50%, 75% i 100% metilacije DNK. (D) Na standardnoj krivi prikazana je visina pikova u odnosu na % metilacije DNK korišćenih standarda pomoću koje je izračunat % metilacije DNK u svim uzorcima (E). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM. \*p ≤ 0,05 u poređenju sa kontrolom; #p < 0,05 u poređenju sa HCjE ćelijama tretiranim TGF-β1 proteinima. (F) Metilacioni status CpG dinukleotida prikazan u formi lolipop

dijagrama u okviru analiziranog regiona lokusa miR-200b/a/429 u kontrolnim i HCjE ćelijama tretiranim TGF-β1 proteinima i HCjE ćelijama kotretiranim TGF-β1 proteinima i 5-AzaC sa periodom oporavka (5-AzaC R) dobijen nakon bisulfitnog sekvenciranja, na tri uzorka. Analizirani CpG dinukleotidi su obeleženi brojevima od 1 do 23 i prikazane su njihove pozicije u odnosu na TSS. Beli i crni kružići označavaju nemetilovane i metilovane CpG dinukleotide, respektivno.



**Slika 4.24. Uticaj tretmana DNK demetilujućim agensom 5-AzaC sa periodom oporavka na DNK metilacioni status klastera miR-200c/141 u HCjE ćelijama tretiranim TGF-β1 proteinima nakon šestog pasaža. (A)** Shematski prikaz genomske lokusa miR-200c/141 (NCBI ref. sekvenca NC\_000012.12; pozicija CpG ostrvca od 6963229 do 6963653 bp). Na shemi su obeleženi CpG ostrvce, TSS (+1), potencijalna mesta vezivanja regulatornih proteina i pozicije prajmera korišćenih u analizi metilacije DNK. **(B-E)** Nivo metilacije DNK analiziranog regiona lokusa miR-200c/141 u kontrolnim, HCjE ćelijama tretiranim TGF-β1 proteinima i HCjE ćelijama kotretiranim TGF-β1 proteinima i 5-AzaC sa periodom oporavka (5-AzaC R)

dobijen HRM analizom. Prikazane reprezentativne poravnate krive topljenja **(B)** i grafik razlika **(C)** prikazuju poziciju kriva topljenja svih uzoraka u odnosu na standarde sa 0%, 25%, 50%, 75% i 100% metilacije DNK. **(D)** Na standardnoj krivi prikazana je visina pikova u odnosu na % metilacije DNK korišćenih standarda pomoću koje je izračunat % metilacije DNK u svim uzorcima **(E)**. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM.  $**p \leq 0,01$  u poređenju sa kontrolom;  $\#p < 0,05$  u poređenju sa HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1 proteinima. **(F)** Metilacioni status CpG dinukleotida prikazan u formi lolipop dijagrama u okviru analiziranog regiona lokusa miR-200c/141 u kontrolnim i HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1 proteinima i HCjE ćelijama kotretiranim TGF- $\beta$ 1 proteinima i 5-AzaC sa periodom oporavka (5-AzaC R) dobijen nakon bisulfitnog sekvenciranja, na tri uzorka. Analizirani CpG dinukleotidi su obeleženi brojevima od 1 do 11 i prikazane su njihove pozicije u odnosu na TSS. Beli i crni kružići označavaju nemetilovane i metilovane CpG dinukleotide, respektivno.

---

## 5. DISKUSIJA

---

Proces EMT se javlja kao nezaobilazan deo gotovo svakog fibroznog procesa pa ne iznenađuje i veliki broj radova koji su ukazali na značajnu ulogu tranzicije epitelnih u ćelije sa mezenhimskim fenotipom u bolestima oka povezanim sa fibrozom. Pokazano je da epitelne ćelije prisutne u različitim delovima oka mogu predstavljati lokalne prekursore miofibroblasta (Hinz, 2015a). Tako je u studiji rađenoj na modelu zečjeg limbalnog eksplanta utvrđeno da tokom regeneracije rožnjače može doći do tranzicije i invazije **limbalnih epitelnih stem ćelija rožnjače** u stromu čime bi se mogao objasniti fenomen njihove deficijencije i nastanka subepitelne fibroze koja je primećena kod obolelih od Stevens-Johnsonovog sindroma, OCP ili nakon hemijskih opekotina rožnjače (Kawakita i sar., 2005). Takođe, na humanim uzorcima je pokazano da, nakon što dođe do deficijencije limbalnih epitelnih stem ćelija rožnjače, i **bazalne epitelne ćelije rožnjače** mogu ući u proces EMT i doprineti patologiji navedenih stanja (Kawashima i sar., 2010). Sa druge strane, pokazano je da sočivo predstavlja naročito interesantan deo oka sa aspekta tranzicije, s' obzirom da je ono jedino tkivo u kome svi detektovani miofibroblasti nastali tokom formiranja primarne i sekundarne katarakte potiču od **epitelnih ćelija sočiva** (Saika i sar., 2008), pa se zbog toga ove ćelije i tkivo često koriste u različitim *in vitro* i *in vivo* modelima procesa EMT (de Jongh i sar., 2005). Osim anteriornog dela, studije su pokazale da i u posteriornom delu oka **ćelije pigmentnog epitela mrežnjače** (engl. *retinal pigment epithelium* - RPE) imaju sposobnost ulaska u proces EMT nakon rupture neurosenzornog dela mrežnjače i prelaska na epiretinalnu stranu (Tamiya i Kaplan, 2016) predstavljajući ključnog činioca koji doprinosi razvoju fibroznog tkiva na mrežnjači (Saika i sar., 2009). Iako je dugo bilo poznato da ćelije RPE *in vitro* mogu zadobiti fenotip miofibroblasta, prva studija koja je pratila koekspresiju epitelnih i mezenhimskih markera u epiretinalnim fibroznim membranama pacijenata sa PVR je potvrdila da više od polovine miofibroblasta koji ekspimiraju  $\alpha$ -SMA potiče od RPE ćelija pozitivnih i na marker epitelnih ćelija citokeratin 18 (Feist i sar., 2014). Proces EMT zauzima važno mesto i u etiologiji različitih bolesti povezanih sa fibrozom konjunktive. Naime, pokazano je da **bazalne epitelne ćelije konjunktive** tokom nastanka pterigijuma poprimaju ponašanje karakteristično za ćelije u tranziciji. Tako, ove ćelije formiraju citoplazmatične nastavke koji se pružaju u stromu rožnjače, odvajaju se od epitelnog sloja i migriraju u grupacijama, što je praćeno smanjenjem ekspresije E-kadherina, prelaskom  $\beta$ -katenina u jedro i istovremenom ekspresijom epitelnog markera citokeratina 14 i mezenhimskih markera  $\alpha$ -SMA, vimentina, SNAI1 i SNAI2 (Kato i sar., 2007; Kato i Shimmura, 2008). Takođe, i tokom cGVHD bazalne epitelne ćelije konjunktive i **mioepitelne ćelije suznih žlezda** stiču mezenhimski fenotip i sposobnost da migriraju u subepitelnu stromu konjunktive pri čemu produkuju veliku količinu kolagena doprinoseći nastanku fibroze kod obolelih osoba (Ogawa i sar., 2009). Zbog velikog broja očnih bolesti u kojima proces EMT ima značajnu ulogu u nastanku fibroznog tkiva, zaustavljanje i/ili reverzija ovog procesa mogli bi predstavljati pogodan pristup za lečenje bolesti oka povezanih sa fibrozom. Kako su geni specifični za određeni tip ćelije ili stanje, a čijom bi se modulacijom postigli takvi rezultati, i dalje nedefinisani (He i sar., 2013), i imajući u vidu da infekcije, inflamacija i mehanički stres konjunktive često mogu prouzrokovati fibrozu, koja, ako je ozbiljna, može dovesti do narušavanja vida (Friedlander, 2007), eksperimenti urađeni u okviru ove doktorske disertacije pokušali su da doprinesu razjašnjanju višeslojnih regulatornih mehanizama koji pokreću proces EMT u humanim epitelnim ćelijama konjunktive (HCjE).

Pored uloge u prethodno navedenim bolestima konjunktive povezanim sa fibrozom, *in vitro* studije su pokazale da epitelne ćelije inficirane bakterijom *C. trachomatis* kao medijatori urođenog imuniteta mogu imati važnu ulogu u usmeravanju imunog odgovora domaćina, ali i da mogu učestvovati u održavanju niskog nivoa hronične inflamacije u konjunktivi (Rasmussen i sar., 1997; Stephens, 2003; Porcella i sar., 2015), ukazujući da putem produkcije različitih medijatora potencijalno mogu pokrenuti proces EMT i na taj način doprineti i patologiji trahoma. Takođe, na tu mogućnost ukazale su i *in vivo* studije koje su pokazale da kod pacijenata sa ožiljcima na konjunktivi dolazi do istovremenog povećanja ekspresije proinflamatornih, hemotaktičkih i antimikrobijalnih medijatora, ali i faktora koji doprinose remodelovanju ECM i gena uključenih u signalne puteve koji promovišu fibrogenezu kao što su TGF- $\beta$  i WNT (Burton i sar., 2011b, 2012, 2015; Hu i sar., 2012; Derrick i sar., 2016a). Osim toga, na važnost procesa EMT u nastajanju ožiljačnog tkiva u trahomu ukazuju i istraživanja koja su pokazala da je i faza trahoma tokom koje još uvek nije došlo do nastanka fibroznih promena na konjunktivi povezana sa povećanom ekspresijom proinflamatornih i profibrotičnih citokina i faktora rasta, kao što su IL-1 $\beta$ , IL-17A, CTGF i MMP9 (Abu El-Asrar i sar., 2000; Burton i sar., 2004, 2011a), a koji tako predstavljaju važnu sponu između inflamatornog odgovora domaćina na infekciju i nastanka ožiljaka. Ovi molekuli su poznati po svojoj sposobnosti da pokrenu proces EMT i doprinesu nastanku fibroze, pri čemu im funkcije i/ili regulacija u značajnoj meri zavise od prisustva TGF- $\beta$  proteina (Kolb i sar., 2001; Lee i sar., 2006; Gieling i sar., 2009; Zheng i sar., 2009; Phanish i sar., 2010; Vittal i sar., 2013; Krstic i Santibanez, 2014; Wang i sar., 2017), arhetipskog pro-fibroznog molekula i glavnog pokretača procesa EMT (Xu i sar., 2009). Imajući u vidu da su pojedine studije pokazale da tokom konjunktivalne (Ramadhani i sar., 2017) i genitalne (Igietseme i sar., 2015) infekcije bakterijom *C. trachomatis* dolazi do promene u nivou ekspresije markera procesa EMT, a da istovremeno druge studije nisu uspele da pokažu da u konjunktivi osoba sa trahomom dolazi do pokretanja procesa EMT (Derrick i sar., 2016a), prvi cilj ove doktorske disertacije je bio razjasniti da li *in vitro* infekcija bakterijom *C. trachomatis* dovodi do pokretanja tranzicije HCjE ćelija.

Uloga TGF- $\beta$  proteina, u nastajanju ožiljačnog tkiva u trahomu je i dalje nerazjašnjena. Tako, Burton i sar. nisu uspeali da detektuju ekspresiju *TGF- $\beta$ 1* gena u konjunktivi, dok između pacijenata obolelih od trahoma i kontrola nije bilo razlike u nivou ekspresije *TGF- $\beta$ 2* gena (Burton i sar., 2004). Takođe, u drugoj studiji je pokazano malo veće prisustvo TGF- $\beta$ 2 izoforme kod zdravih osoba, pri čemu sami autori ističu da antitelo korišćeno za imunohistohemijsko bojenje detektuje samo latentnu formu proteina, i da zbog toga postoji mogućnost da je kod obolelih od trahoma došlo do aktivacije i oslobađanja TGF- $\beta$ 2 proteina koje nije detektovano (Derrick i sar., 2016a). Zbog složene post-translacione regulacije TGF- $\beta$  proteina ispitivanje njihove ekspresije nije jednostavno, pa negativni rezultati ipak ne isključuju ulogu TGF- $\beta$  proteina u patogenezi ožiljačnog trahoma na šta ukazuje i studija koja je pokazala povećanje aktivnosti, ali ne i nivoa iRNK, TGF- $\beta$ 1 i TGF- $\beta$ 2 proteina u plućima miša inficiranog bakterijom *C. trachomatis* (*C. muridarum*) (Williams i sar., 1996). Sa druge strane u okviru ove teze je pokazano da HCjE ćelije nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* značajno povećavaju ekspresiju gena koji kodiraju za TGF- $\beta$  proteine, posebno gena koji kodira za TGF- $\beta$ 2 izoformu, što je u skladu sa nekoliko studija u kojima su korišćene različite epitelne ćelijske linije inficirane genitalnim serovarima bakterije *C. trachomatis* (Boiko i sar., 2015; Porcella i sar., 2015; Ziklo i sar., 2019), kao i sa istraživanjima koja su potvrdila da u konjunktivi pacijenata sa trahomom dolazi do povećane ekspresije *TGF- $\beta$ 1* gena (Bobo i sar., 1996; Ramadhani i sar., 2017). Osim toga, u prilog dobijenim rezultatima u ovoj tezi ide i saznanje da lipopolisaharidi (LPS), prisutni u membrani Gram negativnih bakterija u koje spada i *C. trachomatis*, mogu povećati ekspresiju TGF- $\beta$ 1 i SMAD2/3, i na nivou iRNK i na nivou proteina, i posledično pokrenuti proces EMT humanih intrahepatičnih epitelih ćelija žučnih kanala (Zhao i sar., 2011). Takođe, i za

različite virusne infekcije epitelnih ćelija je pokazano da rezultuju povećanom produkcijom TGF- $\beta$ 1 (Dosanjh, 2006; Denney i sar., 2018), čak i da dovode do pokretanja procesa EMT (Bose i sar., 2012; Park i sar., 2014), što ukazuje da pokretanje ekspresije TGF- $\beta$ 1 predstavlja uobičajeni odgovor epitelnih ćelija na infekciju. Tako bi sama nekonzistencija u podacima koji govore o nivou ekspresije TGF- $\beta$  u trahomu možda mogla biti objašnjena prisustvom ili odsustvom infektivnog agensa, s' obzirom da je aktivni trahom pre povezan sa pratećom inflamacijom, nego sa samom infekcijom, dok se prisustvo bakterije *C. trachomatis* u kasnijim fazama trahoma tokom kojih nastaju ožiljci najčešće ni ne detektuje (Burton i sar., 2003; Wright i Taylor, 2005). Ovoj hipotezi ide u prilog i prethodno navedena studija Ramadhani i sar. koja je pokazala povećanu ekspresiju TGF- $\beta$ 1 gena samo u konjunktivi pacijenata kod kojih je prisutna infekcija bakterijom *C. trachomatis* (Ramadhani i sar., 2017). Zanimljivo je istaći, iako to nije ispitivano u ovoj tezi, i da bi već pomenuti proinflamatorni faktori IL-1 $\beta$  i IL-17A čiji je povećan nivo detektovan tokom aktivnog trahoma (Abu El-Asrar i sar., 2000; Burton i sar., 2004, 2011a), a za koje je poznato da mogu biti produkovani od strane epitelnih ćelija (Reynolds i sar., 2010; Rasmussen i sar., 1997), potencijalno mogli učestvovati u pokretanju procesa EMT nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* preko uticaja na povećanje ekspresije TGF- $\beta$  gena (Lee i sar., 2006; Vittal i sar., 2013; Wang i sar., 2017).

Osim stimulacije ekspresije TGF- $\beta$  gena, infekcija HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* pokreće aktivaciju brojnih signalnih puteva koji se takođe, mada ne i isključivo, nalaze nizvodno od glavnih pokretača procesa EMT. U ovoj tezi je pokazano da nakon infekcije dolazi do aktivacije TGF- $\beta$  kanonskog signalnog puta u HCjE ćelijama što je u saglasnosti sa rezultatima studije koja je pokazala povećanje nivoa SMAD2, SMAD3 i SMAD4 proteina, kao i fosforilisane forme SMAD2/3, nakon infekcije ćelijske linije mišjih epitelnih ćelija jajnika *C. muridarum* (Igietseme i sar., 2020), pri čemu inhibitor kinazne aktivnosti TGF $\beta$ -RI dovodi do povećane ekspresije E-kadherina i zaustavljanja procesa EMT nakon infekcije. Takođe, brojne druge studije potvrđuju da infekcija bakterijom *C. trachomatis* dovodi do pokretanja PI3K/AKT, MAPK i WNT signalnih puteva čija aktivacija je detektovana i u ovoj tezi. Tako je aktivacija PI3K signalnog puta i posledična fosforilacija AKT uključena u mehanizam koji štiti inficiranu ćeliju od apoptoze putem inaktivacije proapoptotskog Bad proteina ili stabilizacijom antiapoptotskog proteina Mcl-1, dok je za aktivaciju MEK/ERK signalnog puta pokazano da dovodi do povećane ekspresije antiapoptotskog proteina Mcl-1 (Verbeke i sar., 2006; Rajalingam i sar., 2008). Takođe, ista studija koja je ukazala na značaj TGF- $\beta$  kanonskog signalnog puta u pokretanju procesa EMT nakon infekcije, istovremeno je istakla i značaj tirozin kinaznog receptora za EGF i signalnog puta nizvodno od MEK1 (Igietseme i sar., 2020). Osim toga, i globalna analiza fosfoproteoma i transkriptoma epitelnih ćelija ektocerviksa inficiranih bakterijom *C. trachomatis* potvrdila je dominantnu aktivaciju MAPK signalnih puteva, posebno ERK1/2, tokom odigravanja procesa EMT u ovim ćelijama (Zadora i sar., 2019). Dodatno, studije proteoma su pokazale i da je aktivnost p38 i JNK kinaza važna za razviće bakterije *C. trachomatis* u ćeliji domaćina (Olive i sar., 2014), dok je aktivacija WNT signalnog puta, preko inaktivacije GSK-3 $\beta$  i posledične redistribucije  $\beta$ -katenina iz ćelijske membrane u bakterijske inkluzije, opisana u inficiranim epitelnim ćelijama cerviksa i jajnika (Prozialeck i sar., 2002; Kessler i sar., 2012). S' obzirom na povećanje ekspresije TGF- $\beta$  nakon infekcije HCjE ćelija detektovano u ovoj tezi, posebno bi se mogao istaći značaj aktivacije kanonskog i nekanonskih MAPK signalnih puteva, za koje je poznato da mogu biti pokrenuti TGF- $\beta$  proteinima (Miyazono, 2009), u tranziciji HCjE ćelija. Međutim, nijedan od signalnih puteva za koje je pokazano da se aktiviraju u HCjE ćelijama nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* nije specifičan i isključivo povezan sa odigravanjem procesa EMT. Kao najverovatnije objašnjenje nameće se da udruženo delovanje svih ispitanih signalnih puteva aktiviranih nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C.*



*trachomatis* dovodi do detektovanog povećanja nivoa ekspresije *SNAI1* i *ZEB2* gena koji kodiraju za transkripcione faktore uključene u pokretanje procesa EMT i posledično rezultuje u promeni profila ekspresije koji prati ovaj proces.

U ovoj tezi proces EMT pokrenut nakon 72 h od infekcije bakterijom *C. trachomatis* pokazao se samo kao parcijalan, s' obzirom da nije doveo do morfoloških promena HCjE ćelija u pravcu zadobijanja morfologije karakteristične za mezenhimski tip ćelija. Sa druge strane, iako postoji nekoliko studija koje tvrde da gubitak E-kadherina nije uzrok niti neophodan događaj za odigravanje tranzicije (Hollestelle i sar., 2013; Chen i sar., 2014; Nilsson i sar., 2014), većina rezultata ukazuje da smanjenje ili gubitak ekspresije E-kadherina predstavlja zaštitni znak procesa EMT (Kalluri i Neilson, 2003; Zeisberg i Neilson, 2009; Lee i Nelson, 2012; Serrano-Gomez i sar., 2016). U skladu sa preovlađujućim podacima, i u ovoj disertaciji ključan dokaz gubitka osobina specifičnih za normalne epitelne ćelije i započinjanja procesa EMT u HCjE ćelijama obezbeđuje primećeno smanjenje ekspresije E-kadherina, i na transkripcionom i na proteinskom nivou, nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis*. Istovremeno, infekcija bakterijom *C. trachomatis* pokreće i ekspresiju fibronektina i  $\alpha$ -SMA, ukazujući da se HCjE ćelije kreću ka fenotipu karakterističnom za mezenhimske ćelije. Primećeno povećanje produkcije fibronektina je od posebnog značaja s' obzirom da je utvrđeno da fibronektin može funkcionisati kao pokretač tranzicije. Naime, pokazano je da epitelne ćelije koje rastu u prisustvu fibronektina spontano ulaze u proces EMT zbog integrinima posredovane aktivacije endogenog TGF- $\beta$ 1 proteina (Kevin K. Kim i sar., 2006), koji se zapravo nalazi vezan za fibronektin i uskladišten u latentnoj formi u ECM (Munger i sar., 1999; Fontana i sar., 2005). Dodatno, povećana depozicija fibronektina u ECM stimuliše i aktivaciju signalnih puteva nizvodno od integrina koji mogu dovesti do promovisanja procesa EMT, kao i do stimulanja fibrilogeneze fibronektina (Huveneers i sar., 2008; Huveneers i Danen, 2009; Xu i sar., 2009). Osim toga, pokazano je da do oslobađanja TGF- $\beta$ 1 iz latentnog kompleksa dolazi i zbog kontrakcija ćelije nastalih delovanjem  $\alpha$ -SMA stres vlakana (Annes i sar., 2004; Dong i sar., 2017). Oslobođeni TGF- $\beta$ 1, sa druge strane, reguiše ekspresiju fibronektina (Hallgren i sar., 2012), dok istovremeno promovise ekspresiju  $\alpha$ -SMA i formiranje stres vlakana (Dugina i sar., 2001; Xu i sar., 2009; Carthy i sar., 2015; Khalil i sar., 2017; Li i sar., 2018; Zent i Guo, 2018). Tako, pored već povećane ekspresije TGF- $\beta$ 1, primećen rast u produkciji fibronektina, ali i  $\alpha$ -SMA, i stvaranje pozitivnih povratnih sprega koje prenose mehaničke i biohemijske signale od ECM u ćeliju i nazad, mogu predstavljati dodatan okidač pokretanja procesa EMT u HCjE ćelijama inficiranim bakterijom *C. trachomatis*. Sveukupno, detektovana sposobnost bakterije *C. trachomatis* da u epitelnim ćelijama konjunktive pokrene promene u ekspresiji gena karakteristične za odigravanje procesa tranzicije nalazi se u saglasnosti sa otkrićem da infekcija genitalnim serovarima ove bakterije može pokrenuti proces EMT u humanim epitelnim ćelijama cerviksa što se manifestuje smanjenom ekspresijom epitelnog markera E-kadherina, povećanom ekspresijom mezenhimskih markera N-kadherina i *SNAI1*, reorganizacijom aktinskog citoskeleta i povećanom invazivnošću ćelija (Zadora i sar., 2019). Isti slučaj je i sa mišjim epitelnim ćelijama jajnika, koje nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* smanjuju ekspresiju E-kadherina, okcludina i  $\beta$ -katenina i povećavaju ekspresiju  $\alpha$ -SMA, fibronektina, kolagena I i III, MMP9, T-kadherina, *Snai1/2*, *Zeb1* (Igietseme i sar., 2015, 2018). Dodatno, autori su pronašli dokaze koji idu u prilog *in vivo* pokretanju procesa EMT nakon infekcije ovom bakterijom (Igietseme i sar., 2015), što bi moglo da ukaže i na povezanost između nastanka ožiljačkog tkiva u trahomu i procesa EMT pokrenutim infekcijom konjunktive bakterijom *C. trachomatis*. Tako su u *in vivo* studiji Ramadhani i sar. detektovali statistički značajno povećanje ekspresije mezenhimskih markera *VIM* i *ACTA2* i statistički značajno smanjenje ekspresije epitelnog markera *CDH1* u konjunktivi osoba sa trahomom (Ramadhani i sar., 2017), dok Derrick i sar. nisu našli dokaze o pokretanju procesa EMT, iako je detektovano malo povećanje

mezenhinskog markera vimentina (Derrick i sar., 2016a). Kako su u prvoj studiji opisane promene u ekspresiji gena markera procesa EMT pokazane kod pacijenata kod kojih je bila prisutna infekcija nasuprot pacijenata u drugoj studiji kod kojih u trenutku ispitivanja najverovatnije nije bila prisutna infekcija, ponovo se može pretpostaviti da je prisustvo same infekcije bakterijom *C. trachomatis* neophodno za pokretanje tranzicije *in vivo*.

Smanjenje ekspresije E-kadherina detektovano nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis*, najverovatnije se odigrava na složen način s' obzirom da je poznato da utišavanje *CDH1* gena uključuje transkripcionu represiju i metilaciju njegovog promotora (Strathdee, 2002). Osim toga, metilacija CpG dinukleotida je povezana i sa regrutovanjem proteina koji se vezuju za 5mC i posledičnim vezivanjem histonskih deacetilaza, koje dovode do deacetilacije na H3K4, kao i histonskih metiltransferaza koje dovode do metilacije na H3K9 čime je omogućen nastanak inaktivnog stanja hromatina i utišavanje transkripcije gena za E-kadherin (Koizume, 2002). U pogledu procesa EMT, analiza 27 humanih ćelijskih linija karcinoma dojke i ćelijskih linija poreklom iz normalnog tkiva dojke, u kojima su prisutni različiti mehanizmi inaktivacije E-kadherina, ukazuju da je hipermetilacija *CDH1* neophodna za odigravanje procesa EMT koji dovodi do nastanka ćelija karcinoma dojke sa agresivnijim fenotipom (Lombaerts i sar., 2006). U okviru ove teze analiziran je metilacioni status DNK sekvence dela promotora *CDH1* gena lokalizovane u neposrednoj blizini mesta početka transkripcije, s' obzirom da je pokazano da se metilacija ovog regiona nalazi u direktnoj korelaciji sa ekspresijom gena koji kodira za E-kadherin (Reinhold i sar., 2007). Dobijeno povećanje nivoa metilacije DNK sa 12,8% u kontrolnim HCjE ćelijama do 21,8% nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* može biti odgovorno za smanjen nivo ekspresije E-kadherina u inficiranim HCjE ćelijama, s' obzirom da su Reinhold i sar. pokazali da već nakon metilacije promotora od 15% dolazi do oštrog pada u nivou ekspresije *CDH1* gena (Reinhold i sar., 2007). Osim toga, detektovano povećanje metilacije DNK kao posledica infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* je u saglasnosti sa rezultatima koji pokazuju da smanjenje ekspresije i hipermetilacija promotora *CDH1* gena predstavljaju čest događaj kod pacijenata sa hroničnim gastritisom i gastričnim karcinomom kod kojih je prisutna infekcija bakterijom *Helicobacter pylori* (Kague i sar., 2010; Bahnassy i sar., 2018), ali i kod osoba sa različitim virusnim infekcijama koje takođe mogu dovesti do nastanka karcinoma (Tsai i sar., 2002; Lee i sar., 2005; Arora i sar., 2008). Takođe, bisulfitno sekvenciranje urađeno tokom izrade ove disertacije preciznije je pokazalo da dolazi do potpune metilacije citozina u okviru CpG dinukleotida na pozicijama -57, -103, -105 u odnosu na TSS nakon infekcije HCjE ćelija. Ovi rezultati ukazuju da bi ti citozini mogli biti prva mesta koja se metiluju u odgovoru na infekciju bakterijom *C. trachomatis*, ali i posebno značajni za ekspresiju *CDH1* gena zbog njihove pozicije u kontekstu regulatornih elemenata u promotoru. Poznato je da region humanog promotora *CDH1* gena, u okviru sekvence odabrane za analizu u ovoj disertaciji, sadrži konzervirane pozitivne regulatorne elemente kao što su CCAAT-boks koje prepoznaju proteini koji se specifično vezuju za CAAT sekvencu, i GC-boks koga prepoznaju konstitutivno eksprimirani AP-2 i SP1 transkripcioni faktori uključeni u održavanje bazalnog nivoa ekspresije E-kadherina (Behrens i sar., 1991; Bussemakers i sar., 1994; Hennig i sar., 1996; Faraldo i sar., 1997; Comijn i sar., 2001). Jedna od potpuno metilovanih CpG pozicija (pozicija -57) nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* nalazi se u okviru GC boksa, pa bi metilacija tog citozina mogla interferirati sa vezivanjem transkripcionih aktivatora i na taj način dovesti do inhibicije transkripcije *CDH1* gena u inficiranim HCjE ćelijama. Sa druge strane, region promotora *CDH1* gena čiji je nivo metilacije analiziran u ovoj tezi sadrži i dva konzervirana E-boksa neophodna za aktivnu supresiju ekspresije E-kadherina (Bussemakers i sar., 1994; Girolodi i sar., 1997; Comijn i sar., 2001; Van Roy i Berx, 2008), za koje se vezuju transkripcioni faktori uključeni u pokretanje procesa EMT, kao što su ZEB1/2, TWIST, SNAI1/2 (Thiery i sar., 2009). Ovi transkripcioni represori takođe imaju



sposobnost regrutovanja različitih histonskih metiltransferaza, deacetilaza i demetilaza od kojih svaka uvodi specifičnu modifikaciju histona koje dovode do formiranja zatvorenog heterohromatina (Serrano-Gomez i sar., 2016). Osim toga, pokazano je da SNAI, preko histonskih metiltransferaza, i ZEB1, preko kompleksa za remodelovanje i deacetilaciju nukleozoma, kooperiraju sa DNK metiltransferazama (Lin i sar., 2014; Fukagawa i sar., 2015), regrutujući ih na promotor i dovodeći do finalnog utišavanja *CDH1* gena putem metilacije DNK. Opisane interakcije transkripcionih faktora uključenih u pokretanje procesa EMT sa enzimima koji uvode epigenetičke modifikacije mogle bi predstavljati neposredan uzrok povećane metilacije CpG dinukleotida u okolini E-boksova. Sveukupno, rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju da metilacija DNK može predstavljati jedan od mehanizama koji doprinosi transkripcionoj represiji E-kadherina nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis*.

Iako je široko prihvaćeno da metilacija DNK u regionu promotora najviše koreliše sa represijom transkripcije, pokazano je i da je metilacija DNK nizvodno od TSS, posebno u prvom egzonu, nezavisno od tipa ćelija najkritičnija za transkripciono utišavanje (Brenet i sar., 2011). U pogledu mezenhimskih markera odabranih za analizu nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis*, iz literature je poznato da se povećana metilacija DNK u kodirajućem regionu *ACTA2* gena kod pacova nalazi u korelaciji sa transkripcionom represijom ovog gena, dok nivo metilacije regiona promotora nije pokazao varijacije između ćelija koje eksprimiraju i ne eksprimiraju  $\alpha$ -SMA (B. Hu i sar., 2010). Zbog navedenih studija, za analizu metilacije DNK mezenhimskih markera, u ovoj tezi su odabrane sekvence u okviru prvog egzona *ACTA2* i *FN1* gena. Dobijeni rezultati su pokazali da nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* dolazi do smanjenja u nivou metilacije *ACTA2* gena od 4% i 10% u zavisnosti od primenjene metodologije, pri čemu su jedini metilovani CpG dinukleotidi lokalizovani u okviru sekvenci prajmera korišćenih za analize. Zbog toga, dobijeni rezultati ne mogu sa sigurnošću ukazati da smanjenje u nivou metilacije *ACTA2* gena značajno doprinosi primećenom povećanju ekspresije  $\alpha$ -SMA na nivou iRNK i proteina, makar u odnosu na eksperimentalnu postavku korišćenu u ovoj tezi. Takođe, ni za povećanje ekspresije fibronektina na nivou iRNK i proteina nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* ne može se sa sigurnošću tvrditi da predstavlja posledicu smanjenja nivoa metilacije *FN1* gena. Iako je korišćenjem MSP i HRM analiza nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis* detektovano malo smanjenje nivoa metilacije *FN1* gena od 3% i 4% respektivno, bisulfitno sekvenciranje je pokazalo da je odabrani region kompletno nemetilovan u inficiranim HCjE ćelijama, što je u skladu sa studijom koja nije našla dokaze o metilaciji *FN1* gena u okviru dva CpG ostrvca uzvodno i nizvodno od TSS u uslovima niskog nivoa ekspresije fibronektina (Kicic i sar., 2010).

Rezultati dobijeni u okviru ove disertacije ukazuju da proces EMT može predstavljati dodatan mehanizam koji leži u osnovi nastanka fibroznih procesa u trahomi. Korišćenjem *in vitro* modela konjunktivalne infekcije bakterijom *C. trachomatis* tokom 72 h, detektovani su najraniji događaji vezani za pokretanje procesa EMT, kao što su aktivacija signalnih puteva uključenih u tranziciju praćena povećanom i smanjenom ekspresijom specifičnih markera procesa EMT. Ipak, u primenjenom *in vitro* modelu, kompletna tranzicija HCjE ćelija ka mezenhimskom fenotipu, uključujući i morfološke promene, nije primećena, moguće zbog kratkog vremenskog perioda od infekcije do analize. Zbog toga bi kao nastavak eksperimenata započetih u okviru ove disertacije, *in vitro* eksperiment sa dugotrajnom primenom antibiotika nakon 72 h od infekcije bakterijom *C. trachomatis*, mogao omogućiti produžetak životnog veka HCjE ćelija i tako obezbediti vreme neophodno za analizu pokrenutih fenotipskih promena i njihovog prenošenja kroz generacije. Takođe, rezultati dobijeni u ovoj tezi predstavljaju čvrstu osnovu za dalje funkcionalne analize metilacije DNK nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis*, s' obzirom da je ovo prvo istraživanje

koje je povezalo infekciju bakterijom *C. trachomatis* sa modulacijom metilacionog statusa domaćina. Ovi rezultati zapravo ne predstavljaju veliko iznenađenje, s' obzirom da je nekoliko studija ukazalo na direktnu vezu između infekcije bakterijom *C. trachomatis* i spektra epigenetičkih promena (Pennini i sar., 2010; Derrick i sar., 2013, 2016b; Igietseme i sar., 2015), uključujući i promene u metilaciji DNK u genomu domaćina nakon infekcije drugom bakterijom iz roda *Chlamydia*, *Chlamydia psittaci* (Lee i sar., 2014). Osim toga, interesantna skorašnja studija Kessler i sar. je pokazala i da hronična infekcija organoida sačinjenih od humanih primarnih epitelih ćelija jajnika genitalnim serovarima bakterije *C. trachomatis* dovodi do hipermetilacije određenih regiona genoma čak i kada je infekcija izlečena (Kessler i sar., 2019). Saznanje da infekcija bakterijom *C. trachomatis* može pokrenuti tranziciju humanih epitelih ćelija konjunktive preko promena u nivou metilacije DNK može igrati posebno važnu ulogu u razvijanju novih vidova terapija u tretmanu trahoma, baziranih na reverzibilnosti i procesa EMT i metilacije DNK. Korišćenje ciljane demetilacije DNK i aktivacija gena koji kodira za E-kadherin, molekul esencijalan za održanje identiteta epitelih ćelija, potencijalno bi predstavljao obećavajući pristup u lečenju trahoma zbog toga što bi omogućio reverziju ili barem zaustavljanje napredovanja okularne infekcije bakterijom *C. trachomatis*. Ipak, u drugim bolestima konjunktive povezanim sa procesom EMT i razvijanjem fibroznih promena, u kojima nije prisutna bakterijska infekcija epitelih ćelija, moguće je da *CDH1* ne bi predstavljao odgovarajući ciljni gen čijom bi se modulacijom metilacije DNK i posledično ekspresije postigli zadovoljavajući rezultati. Zbog toga se u okviru ove teze nastavilo sa istraživanjima sa ciljem identifikacije mehanizama uključenih u tranziciju humanih epitelih ćelija konjunktive, uspostavljanjem *in vitro* modela procesa EMT tretmanom HCjE ćelija TGF- $\beta$  proteinima.

Prvi korak u uspostavljanju *in vitro* modela procesa EMT uključivao je tretman HCjE ćelija različitim izoformama TGF- $\beta$  proteina ili njihovom kombinacijom, s' obzirom da se ovi proteini smatraju glavnim induktorima tranzicije u različitim tkivima, sposobnim da pokrenu brojne nizvodne signalne puteve u ćeliji koji kao krajnju posledicu dovode do aktivacije transkripcionih faktora povezanih sa pokretanjem procesa EMT (Miyazono, 2009). U pogledu oka, dosadašnja istraživanja su ukazala na heterogenu distribuciju različitih izoformi TGF- $\beta$  proteina u anteriornom delu oka (Pasquale i sar., 1993; Saika i sar., 2001). Tako su Pasquale i sar. imunohistohemijskim bojenjem detektovali TGF- $\beta$ 1 izoformu u površinskom sloju limbalnog epitela, proksimalnom delu cilijarnih nastavaka i zidu krvnih sudova unutar cilijarnog tela. TGF- $\beta$ 2 detektovali su u limbalnom epitelu, stromi konjunktive, mišiću i stromi cilijarnog tela i u ćelijama koje nalikuju fibroblastima u cilijarnim nastavcima, dok imunoobeležavanje TGF- $\beta$ 3 nije uočeno ni u jednoj strukturi anteriornog dela oka (Pasquale i sar., 1993). Sa druge strane, Saika i sar. su pokazali da je TGF- $\beta$ 1 izoforma eksprimirana u svim slojevima epitela konjunktive i rožnjače, fibroblastima/keratocitima i subkonjunktivalnom tkivu, TGF- $\beta$ 2 u bazalnim epitelih ćelijama i fibroblastima/keratocitima, dok je imunoobeležavanje TGF- $\beta$ 3 izoforme pokazalo njegovo slabo prisustvo u epitelu konjunktive i rožnjače (Saika i sar., 2001). Iako izgleda da epitelne ćelije površine oka proizvode sve tri izoforme TGF- $\beta$  (Saika i sar., 2001), potencijal određene izoforme TGF- $\beta$  da pokrene EMT u ćelijama konjunktive nije poznat. Zbog činjenice da veliki broj humanih ćelijskih linija sa epitelnom morfologijom, poreklom iz različitih organa, ne ulazi u proces EMT nakon kratkotrajnog tretmana TGF- $\beta$  proteinima, a da do morfoloških promena linije humanih epitelih ćelija dojke MCF10A dolazi tek nakon produžetka tretmana (Brown i sar., 2004), HCjE ćelije su u eksperimentima urađenim tokom izrade ove disertacije tretirane TGF- $\beta$  proteinima u periodu od 30 dana. Na ovaj način simulirani su uslovi koji nalikuju dugotrajnoj izloženosti ćelija profibrogenim stimulusima prisutnim tokom hronične inflamacije. Dobijeni rezultati pokazali su da tretman HCjE ćelija TGF- $\beta$ 1 proteinima u trajanju od 30 dana ima najveći potencijal za

pokretanje EMT u poređenju sa tretmanom TGF- $\beta$ 2 izoformom ili čak u poređenju sa kombinacijom TGF- $\beta$  proteina. Takođe, pokazano je da HCjE ćelije u normalnim uslovima eksprimiraju znatno veću količinu TGF- $\beta$ 1 u odnosu na nivo ekspresije TGF- $\beta$ 2 proteina, što je u saglasnosti sa odnosom sekrecije TGF- $\beta$  proteina i u drugoj ćelijskoj liniji humanih epitelnih ćelija konjunktive IOBA-NHC (Benito i sar., 2013). Ovi rezultati su donekle iznenađujući s' obzirom da se TGF- $\beta$ 2 smatra dominantnom izoformom TGF- $\beta$  proteina u zdravom oku, kao i tokom zarastanja konjunktive (Cordeiro, 2003). Ključna uloga TGF- $\beta$ 2 u morfogenezi oka potvrđena je studijama u kojima je pokazano da kod embriona miševa kod kojih su utišana oba alela za *TGF- $\beta$ 2* (TGF- $\beta$ 2<sup>-/-</sup>), ali ne i kod TGF- $\beta$ 1<sup>-/-</sup> ili TGF- $\beta$ 3<sup>-/-</sup>, dolazi do nastanka višestrukih abnormalnosti oka kao što su gubitak endotela i strome rožnjače, anteriorne komore oka i hipercelularnosti mrežnjače i staklastog tela (Sanford i sar., 1997; Saika i sar., 2001). Takođe, brojne studije su pokazale da je TGF- $\beta$ 2 dominantna izoforma prisutna u normalnoj očnoj vodici (Jampel i sar., 1990; Cousins i sar., 1991; Tosi i sar., 2018), mada se u svežoj očnoj vodici zdravog oka najčešće nalazi u latentnom obliku (Taylor, 2016). Tako su rezultati jedne studije pokazali da TGF- $\beta$ 2 čini 70% od ukupne koncentracije aktivnog TGF- $\beta$  u zdravom oku, TGF- $\beta$ 3 28,5%, dok je udeo TGF- $\beta$ 1 manji od 1,6% (Tosi i sar., 2018). Značaj TGF- $\beta$ 2 izoforme u nastajanju ožiljačnog tkiva u konjunktivi je ispitivana korišćenjem antisens oligonukleotida i neutrališućih monoklonalnih antitela specifičnih isključivo za TGF- $\beta$ 2. Tako su Cordeiro i sar. na modelu agresivnog subkonjuktivalnog ožiljavanja nakon filtracione operacije glaukoma kod zečeva pokazali da jedna subkonjuktivalna aplikacija antisens oligonukleotida specifičnih za TGF- $\beta$ 2 u trenutku hiruškog zahvata dovodi do formiranja manje količine ožiljaka u konjunktivi u odnosu na kontrolu i tretman antisens oligonukleotidima specifičnim za TGF- $\beta$ 1 (Cordeiro i sar., 2003). Takođe, dve studije rađene na istom modelu su utvrdile i da je neutralizacija aktivne forme TGF- $\beta$ 2 proteina primenom više doza rekombinovanog humanog monoklalnog anti-TGF- $\beta$ 2 antitela povezana sa boljim ishodom filtracione operacije zbog nastanka manje količine ožiljačnog tkiva u subkonjunktivi na mestu povrede (Cordeiro i sar., 1999; Mead i sar., 2003). Rezultati prethodnih studija kojima je utvrđena netoksičnost i delotvornost anti-TGF- $\beta$ 2 antitela u sprečavanju nastanka konjuktivalne fibroze kod zečeva dovele su do pokretanja kliničkih ispitivanja u kojima je ispitivana njegova efikasnost na ljudima. Tako je u prvoj fazi kliničkog ispitivanja potvrđeno da je primena anti-TGF- $\beta$ 2 antitela bezbedna i da, u odnosu na grupu koja je primala placebo, u tretiranoj grupi dovodi do statistički značajnog pada IOP nakon 3 i 6 meseci od operacije glaukoma. Takođe, uočen je i jak trend ka manjem broju naknadnih operacija ili manjoj primeni antiglaukomatoznih medikamenata 3 godine nakon intervencije (Siriwardena i sar., 2002). Iako je ovo istraživanje pokazalo obećavajuće rezultate i sami autori studije ukazali su da je mogućnost studije da uoči razlike između grupa ograničena malim brojem učesnika. Na osnovu prethodnih saznanja, u treću fazu kliničkih ispitivanja anti-TGF- $\beta$ 2 antitela je uključeno 343 pacijenata koji su podvrgnuti filtracionoj operaciji glaukoma (Khaw i sar., 2007). Ipak, bez obzira na veliki broj učesnika, ova studija nije uspela da pokaže statistički značajnu razliku u uspehu trabekulektomije nakon neutralizacije TGF- $\beta$ 2 izoforme u poređenju sa kontrolnom grupom, bez obzira što je jačina studije bila dovoljna da sa 90% sigurnosti detektuje 20% razlike u uspešnosti tretmana (Grehn i sar., 2007; Khaw i sar., 2007). Jedno od mogućih objašnjenja za neuspeh navedenih kliničkih studija verovatno leži u zanemarivanju značaja koji TGF- $\beta$ 1 izoforma ima u nastanku ožiljačnog tkiva u konjunktivi (Schlunck i sar., 2016). U skladu sa tom pretpostavkom su i rezultati koji su pokazali da je TGF- $\beta$ 1, osim što je prisutan u epitelu i stromi konjunktive, glavni član familije koji se deponuje u lokalnom ECM oko rezervoara formiranog filtracionom operacijom glaukoma, dok ECM u regionu rezervoara ne pokazuje imunohistohemijsko bojenje specifično za TGF- $\beta$ 2 i TGF- $\beta$ 3 (Saika i sar., 2001). Takođe, jedna studija rađena na eksperimentalnom modelu filtracione operacije glaukoma kod

pasa je pokazala da subkonjunktivalna implantacija želatinoznog hidrogela sa anti-TGF- $\beta$ 1-2 antitelom sprečava nastanak ožiljačnog tkiva u konjunktivi (Maeda i sar., 2017), pa ne iznenađuje da neki autori smatraju da bi istovremena neutralizacija TGF- $\beta$ 1 mogla da prevaziđe neuspeh samostalne neutralizacije TGF- $\beta$ 2 u sprečavanju stvaranja ožiljaka na konjunktivi (Saika i sar., 2009; Zada i sar., 2018). U skladu sa pomenutim podacima, rezultati dobijeni u ovoj tezi ukazuju da TGF- $\beta$ 2 nije efikasan u pokretanju ekspresije transkripcionih faktora povezanih sa EMT *SNAI1*, *ZEB2* i *TWIST1*, što za posledicu ima da ćelije tretirane TGF- $\beta$ 2 pokazuju manje povećanje ekspresije mezenhimskih markera naročito nakon šestog pasaža, slabije izražene morfološke promene u pravcu mezenhimskog fenotipa i smanjenu mobilnost u odnosu HCjE ćelije tretirane TGF- $\beta$ 1 proteinima. U prilog važne uloge TGF- $\beta$ 1 govore i podaci da nakon trabekulektomije kod zečeva dolazi do pojačane proteinske ekspresije TGF- $\beta$ 1 u konjunktivalnom i subkonjunktivalnom tkivu, ali i do gubitka epitelnog i sticanja mezenhimskog fenotipa ćelija prisutnih u bazalnom sloju epitela konjunktive (Park i sar., 2013). Poslednji podaci, kao i rezultati prikazani u ovoj tezi upućuju na pretpostavku da je važnost procesa EMT potcenjena u prethodno navedenim kliničkim studijama, pa u skladu sa tim visok potencijal TGF- $\beta$ 1 proteina za pokretanje tranzicije HCjE ćelija ukazuje da bi ova izoforma TGF- $\beta$  proteina mogla biti glavni pokretač fibroze konjunktive.

Rezultati dobijeni nakon tretmana HCjE ćelija TGF- $\beta$ 1 proteinima ukazuju na zanimljivu kinetiku ekspresije markera i transkripcionih faktora uključenih u proces EMT. Naime, nakon prvog pasaža od početka tretmana (5 dana), HCjE ćelije pokazuju promene u morfologiji i povećanu ekspresiju mezenhimskih markera (*CDH2*, *FN1*, *VIM*) i transkripcionog faktora *SNAI1*, dok je ekspresija epitelnih markera (*CDH1*, *OCLN*, *DSP*) i transkripcionih faktora *ZEB2* i *TWIST1* i dalje u velikoj meri nepromenjena u odnosu na kontrolni nivo. Iako ovi rezultati na prvi pogled deluju kontradiktorno, podaci iz literature sugerišu da za morfološke promene epitelnih ćelija, koje uključuju reorganizaciju aktinskog citoskeleta i narušavanje međućelijskih veza, promena iz E-kadherina u N-kadherin nije neophodna, već da zamena kadherina ima ulogu u povećanju pokretljivosti (Maeda et al. 2005). Tome u prilog idu i nalazi dobijeni u ovoj tezi koji pokazuju da smanjenje ekspresije E-kadherina i zamena kadherina uočena nakon šest pasaža (30 dana) korelira sa većom sposobnošću migracije HCjE ćelija tretiranih TGF- $\beta$ 1 u odnosu na kontrolu. Sličan profil ekspresije marker gena uočen je i nakon tretmana TGF- $\beta$ 1 proteinima mišje linije epitelnih ćelija dojke NMuMG/E9 koji je doveo do morfoloških promena i povećane ekspresije N-kadherina i fibronektina već nakon 24 h tretmana, dok je E-kadherin ostao funkcionalan, lokalizovan na ćelijskoj membrani i u kompleksu sa  $\alpha$ - i  $\beta$ -kateninima neko vreme nakon morfološke promene, pri čemu je nivo njegove ekspresije počeo da opada tek nakon četiri dana (Maeda et al. 2005). Sa druge strane, pokazano je da se promena kadherina u humanoj liniji epitelnih ćelija dojke MCF10A nakon tretmana TGF- $\beta$ 1 odigrava brže nego kod NMuMG/E9 (Maeda et al. 2005), pa je moguće da smanjenje ekspresije E-kadherina u odgovoru na tretman TGF- $\beta$ 1 zavisi od tipa ćelije i eksperimentane postavke. Takođe, visok nivo N-kadherina detektovan tokom čitavog trajanja tretmana HCjE ćelija TGF- $\beta$ 1 proteinima mogao bi biti uzrok niskog nivoa ekspresije E-kadherina nakon šestog pasaža, ali i kontinuirano povišene ekspresije *FN1* i *VIM* u tretiranim ćelijama. Naime, u istraživanju Wang i sar. stabilna transdukcija dve linije humanih epitelnih ćelija kancera prostate retroviralnim vektorima koji su omogućili povećanu ekspresiju N-kadherina u tim ćelijama, dovela je do pokretanja procesa EMT što se ogledalo u smanjenoj ekspresiji E-kadherina i povećanoj ekspresiji fibronektina i vimentina (Wang i sar., 2016).

Osim ekspresije epitelnih i mezenhimskih markera, i ekspresija *SNAI1*, *ZEB2* i *TWIST1* nakon pokretanja procesa EMT u HCjE ćelijama pokazuje različitu kinetiku. Literaturni podaci ukazuju da bi transkripcioni faktori povezani sa procesom EMT mogli imati različite uloge tokom

odigravanja tranzicije. Naime, u početnim koracima tranzicije visoka ekspresija *SNAI1* mogla bi dovesti do brzog i efikasnog započinjanja procesa, dok bi se funkcija *ZEB2* i *TWIST1* mogla zasnivati na održavanju zadobijenih mezenhimskih osobina (Tran i sar., 2011; Lee i Nelson, 2012), što bi moglo objasniti najvišu vrednost *SNAI1* nakon prvog pasaža i postepeni porast ekspresije *ZEB2* i *TWIST1* do kraja tretmana HCjE ćelija u eksperimentima urađenim u ovoj tezi. Takođe, i međusobna regulacija transkripcionih faktora uključenih u pokretanje procesa EMT u delimičnoj je saglasnosti sa njihovom kinetikom ekspresije detektovanom u model sistemu korišćenom tokom izrade ove disertacije. Sa jedne strane, iako je pokazano da je *SNAI1* direktan transkripcioni aktivator *ZEB1* (Wu i sar., 2017), druge studije su pokazale da *SNAI1* reguliše ekspresiju *ZEB2* na post-transkripcionom nivou. *SNAI1* ovo dejstvo ostvaruje ulogom u epigenetičkom utišavanju članova familije miR-200 (Díaz-López i sar., 2015) koje predstavljaju negativne regulatore *ZEB2* (Christoffersen i sar., 2007; Gregory i sar., 2008a; Korpai i sar., 2008; Park i sar., 2008). Pored toga, pokazano je da *SNAI1* dovodi do pokretanja ekspresije prirodnog antisens transkripta koji ometa alternativnu obradu iRNK *ZEB2* i obezbeđuje zadržavanje introna u 5' UTR iRNK *ZEB2* koji sadrži unutrašnje mesto za započinjanje translacije (Beltran i sar., 2008). Navedene studije idu u prilog podacima dobijenim u ovoj tezi s' obzirom da povećanje ekspresije *SNAI1* i potencijalno povećana količina *SNAI1* nakon prvog pasaža ne dovodi do porasta nivoa ekspresije *ZEB2* na transkripcionom nivou, već se povećanje ekspresije *ZEB2* detektuje tek nakon šestog pasaža. S' obzirom da dobijeni rezultati ne govore ništa o nivou ekspresije *ZEB2* proteina, o uticaju *SNAI1* na nivo *ZEB2* u HCjE ćelijama tokom tretmana TGF- $\beta$ 1 moglo bi se samo nagađati. Osim navedenog, nekoliko studija je pokazalo međusobnu zavisnost ekspresije *SNAI1* i *TWIST1* transkripcionih faktora. Dok je *Twist1* potreban ali nedovoljan za aktivaciju ekspresije *Snai1* na nivou iRNK i proteina, tretman TGF- $\beta$  proteinima mišje linije epitelnih ćelija dojke NMuMG dovodi do inhibicije ekspresije *Twist1*, ukoliko je korišćenjem interferirajućih RNK suprimirana ekspresija *Snai1*. Takođe, pokazano je da u ovim ćelijama *Snai1* dovodi do brzog povećanja nivoa *Twist1* proteina i sporijeg povećanja ekspresije njegove iRNK, dok u humanim ćelijskim linijama adenokarcinoma *SNAI1* dovodi samo do povećanja nivoa proteinske ekspresije *TWIST1* (Dave i sar., 2011b). Dok se o post-transkripcionoj regulaciji ovih proteina ne može ništa reći na osnovu rezultata dobijenih u ovoj disertaciji, eksperimenti rađeni na mišjim ćelijama govore u prilog mogućnosti da povećana ekspresija *SNAI1* dovodi do postepenog povećanja nivoa iRNK *TWIST1* u HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1 do nivoa detektovanog nakon šestog pasaža.

Proces EMT je regulisan na više nivoa, pri čemu brojne studije sve više ukazuju na značaj epigenetičke kontrole ekspresije različitih faktora uključenih u tranziciju. Tako je pokazano da promene u metilaciji DNK prate očne bolesti povezane sa procesom EMT, kao što su pterigijum i različiti oblici katarakte (Riau i sar., 2011; Wang i Guan, 2017). U tkivu pterigijuma dolazi do promene u metilaciji DNK i posledično u ekspresiji gena uključenih u adheziju i pokretljivost ćelija i remodelovanje ECM, što potencijalno može doprineti započinjanju procesa EMT i dovesti do razvijanja fibroznih i neovaskularnih promena i nastanka pterigijuma. (Riau i sar., 2011). Osim toga, pokazano je da je kod osoba sa katarakom prisutna hipermetilacija i posledično smanjena ekspresije gena za  $\alpha$ A-kristalin čija je aktivnost ključna za očuvanje transparentnosti sočiva (Zhou i sar., 2012; X. J. Zhu i sar., 2015). Takođe, rezultati brojnih istraživanja su ukazali da starenje i različiti stresori dovode do promena u profilu metilacije gena važnih za remodelovanje ECM, zaštitu ćelije od oksidativnog stresa i popravku DNK, i čija poremećena regulacija može dovesti do pokretanja procesa EMT u epitelnim ćelijama sočiva (Palsamy i sar., 2012, 2014; Li i sar., 2014, 2016; Gao i sar., 2015; Jin i sar., 2015; Wang i sar., 2015, 2016; X. Zhu i sar., 2015; Ye i sar., 2015).

S' obzirom na činjenicu da metilacija DNK predstavlja reverzibilan fenomen, demetilacija DNK pojavila se kao efikasan pristup za zaustavljanje procesa EMT u različitim ćelijskim linijama, posebno u ćelijama kancera (Gong i sar., 2017; Galle i sar., 2020), a sve sa ciljem lečenja različitih bolesti. Tako je u jednoj zanimljivoj studiji primenom 5-aza-2'-deoksicitidina (5-aza-dC ili decitabin) i reverzijom procesa EMT utvrđena uzročna veza između promena u metilaciji DNK i ulaska ćelija u tranziciju i sticanja rezistencije na različite terapeutike koji se koriste u tretmanu kancera. Na taj način ukazano je da bi manipulacija metilacijom DNK mogla predstavljati obećavajuću strategiju, ako ne u direktnom lečenju, onda u povećanju senzitivnosti ćelija kancera na različite terapeutike inhibicijom procesa EMT (Galle i sar., 2020). Takođe, pokazano je da demetilacija DNK može čak dovesti i do indukcije MET, kao što je to slučaj sa humanom ćelijskom linijom HTR8/SVneo poreklom od ekstravilusnog trofoblasta koji inače nastaje procesom EMT tokom implantacije embriona i ima ulogu u invaziji i povezivanju placente i uterusa. (Chen i sar., 2013). Sa druge strane, demetilacija DNK pokazala se neefikasna u zaustavljanju ili reverziji procesa EMT u pojedinim ćelijskim linijama (Chen i sar., 2004), ili čak sposobna da pokrene tranziciju humanih ćelijskih linija kancera dojke i prostate (Ateeq i sar., 2008; Lee i sar., 2016; Dudzik i sar., 2019). Pored toga, pokazano je i da injeciranje ćelija kancera prostate pretretiranih 5-azacitidinom (5-azaC ili azacitidin) u miša dovodi do značajnog rasta tumora i veće diseminacije tumorskih ćelija u poređenju sa injeciranjem netretiranih ćelija (Lee i sar., 2016), dok injeciranje kancer ćelija dojke pretretiranih 5-aza-dC smanjuje rast tumora *in vivo*, ali i dovodi do povećane ekspresije mnogih prometastatskih gena čija aktivnost tokom vremena može dovesti do nastanka metastaza na udaljenim lokacijama (Ateeq i sar., 2008).

Efekte koje demetilacija DNK ostvaruje u odnosu na zaustavljanje ili pokretanje procesa EMT tokom fibrotičnih promena u oku potvrdili su njenu dvojnju prirodu. Tako je u jednoj studiji pokazano da hipometilacija izazvana tretmanom primarne kulture humanih fibroblasta Tenonove kapsule 5-aza-dC dovodi do istih posledica kao i tretman ovih ćelija TGF- $\beta$ 1 proteinima. Naime, i 5-aza-dC i TGF- $\beta$ 1 dovode do povećane ekspresije profibrotičnih proteina ( $\alpha$ -SMA, FN, Col1A1 i TGF $\beta$ -R) i povećavaju sposobnost migracije humanih fibroblasta Tenonove kapsule dovodeći do njihove diferencijacije u miofibroblaste koji doprinose nastanku subkonjunktivalne fibroze nakon filtracione operacije glaukoma (Fu i sar., 2017). Sa druge strane, zebularin, drugi DNK demetilujući agens je u *in vitro* uslovima pokazao sposobnost inhibicije ključnih događaja koji doprinose nastanku sekundarne katarakte, a koji uključuju migraciju i kačenje epitelnih ćelija sočiva za površinu posteriorne kapsule i njihovu sledstvenu proliferaciju. Takođe, pokazano je i da zebularin, preko smanjenja ekspresije MeCP2 (engl. *methyl CpG binding protein 2*), utiče na smanjenje ekspresije  $\alpha$ -SMA i supresiju procesa EMT pokrenutog tretmanom ćelijske linije humanih epitelnih ćelija sočiva TGF- $\beta$  proteinima. Do smanjenja nivoa MeCP2 i nekoliko markera mezenhimskih ćelija, kao i do inhibicije migracije, dolazi i posle tretmana humanih ćelija RPE 5-Aza-dC nakon njihovog izlaganja TGF- $\beta$  proteinima, čime je pokazan pozitivan efekat primene demetilujućeg agensa u sprečavanju tranzicije ćelija RPE i nastanka fibroznih promena na mrežnjači (He i sar., 2015).

Na osnovu prethodno navedenih podataka iz literature koji ukazuju da je proces EMT praćen promenama u metilaciji DNK različitih gena, u ovoj tezi ispitani su efekti demetilujućeg agensa 5-AzaC na morfologiju, pokretljivost i nivo ekspresije većeg broja gena uključenih u proces EMT u HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1 proteinima. Osnovni cilj primene 5-AzaC na *in vitro* model EMT uspostavljen u ovoj tezi ogledao se u razjašnjavanju mehanizama koji dovode do promena HCjE ćelija u pravcu mezenhimskog fenotipa i zaustavljanju ili reverziji tranzicije. Na početku tretmana pažljivo je odabrana koncentracija 5-AzaC koja će biti korišćena u eksperimentima, s'

obzirom da različite epitelne ćelije oka pokazuju različitu osjetljivost na izlaganje demetilujućim agensima. Tako je pokazano da izlaganje linije humanih epitelnih sočiva SRA01/04 10  $\mu\text{M}$  5-Aza-dC u trajanju od 7 dana dovodi do umiranja dve trećine tretiranih ćelija i velike produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (Palsamy i sar., 2012), dok su sa druge strane humane polarizovane ćelije RPE pokazale veliku rezistenciju na citotoksične efekte 5-Aza-dC koncentracije 6  $\mu\text{M}$  nakon izlaganja ovom agensu u trajanju od 72 h (He i sar., 2015). Iako su Riau i sar. tretirali liniju humanih epitelnih ćelija konjunktive IOBA-NHC 3 mM 5-Aza-dC, HCjE ćelije pokazale su se osjetljivim na tretman 5-azaC (Riau i sar., 2011). Zbog toga je za tretmane HCjE ćelija 5-AzaC u trajanju od 5 dana, odabrana koncentracija 5-azaC od 0,05  $\mu\text{M}$  koja obezbeđuje preživljavanje 80% HCjE ćelija nakon izlaganja agensu u periodu od 72 h. HCjE ćelije su tretirane 5-azaC u dva vremenska perioda: (i) između petog i šestog pasaža, da bi se ispitali neposredni efekti 5-AzaC na ekspresiju gena i (ii) između drugog i trećeg pasaža nakon čega su ćelije do šestog pasaža gajene samo u prisustvu TGF- $\beta$ 1 (period oporavka), da bi se ispitali produženi efekti ovog agensa prisutni i nakon 15 dana od tretmana 5-AzaC. U prilog ispitivanju produženih efekata 5-AzaC u okviru ove teze govore studije koje su pokazale da kratkotrajno izlaganje demetilujućim agensima dovodi do dugotrajnih promena i nekog vida „memorije” u tretiranim ćelijama. Dve ranije pomenute studije pokazale su da ekspresija gena pokrenuta četvorodnevnom tretmanom 5-AzaC ili sedmodnevnom tretmanom 5-Aza-dC opstaje čak 28 i 42 dana, respektivno, nakon inokulacije tretiranih ćelija u *in vivo* model (Ateeq i sar., 2008; Lee i sar., 2016). Slično tome, pokazano je i da trodnevni tretman četiri humane epitelne ćelijske linije kancera nanomolarnim koncentracijama 5-Aza-dC i 5-AzaC (dva i deset puta većim nego što je to slučaj u ovoj tezi, respektivno), praćen subkutanom injeciranjem pretretiranih ćelija u miša, nakon 7-14 dana značajno smanjuje veličinu ksenografta koja opstaje i u serijski transplantiranim sekundarnim ksenograftima (Tsai i sar., 2012). Takođe, i *in vitro* studije ukazuju da kratkotrajni tretman ćelija 5-Aza-dC pokazuje prolongirane efekte koji se odražavaju na nivo metilacije i ekspresije različitih gena u trajanju od 30 i 42 dana (Yang i sar., 2014; Ramos i sar., 2015).

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji pokazali su da je 5-AzaC sposobna da zaustavi morfološke promene pokrenute tretmanom TGF- $\beta$ 1 i smanji sposobnost migracije HCjE ćelija, ukazujući na važnost metilacije DNK u procesu EMT. Takođe, tretman 5-AzaC sa periodom oporavka pokazao se efikasnijim u poređenju sa tretmanom 5-AzaC bez perioda oporavka, ukazujući da se jači uticaj demetilacije DNK može videti nakon određenog vremenskog perioda ili/i nakon višestrukih ćelijskih deoba i/ili da specifični geni ostaju demetilovani duži vremenski period dovodeći do izrazitijih fenotipskih promena HCjE ćelija. Isti ishod bio je očigledan i nakon praćenja ekspresije gena povezanih sa procesom EMT koje je potvrdilo da tretman HCjE ćelija 5-AzaC bez perioda oporavka dovodi do manjeg pada, dok tretman HCjE ćelija 5-AzaC sa periodom oporavka dovodi do većeg smanjenja ekspresije mezenhimskih marker gena u poređenju sa ćelijama tretiranim samo TGF- $\beta$ 1. Ovaj rezultat je bio praćen samo malim povećanjem ekspresije epitelnih marker gena, što predstavlja interesantan rezultat s’ obzirom da hipermetilacija promotora *CDH1* gena predstavlja važan mehanizam koji dovodi do gubitka ekspresije E-kadherina tokom progresije kancera (Lombaerts i sar., 2006; Berx i van Roy, 2009). Takođe, pokazano je i da tretman 5-AzaC dovodi do ponovne ekspresije E-kadherina i očuvanja epitelne morfologije kod velikog broja različitih humanih ćelijskih linija kancera (Graff i sar., 1995; Yoshiura i sar., 1995; Nam i sar., 2004). Izuzev kod kancera, pokazano je i da je hipermetilacija promotora E-kadherina uključena u smanjenje ekspresije ovog proteina i u razviću pterigijuma (Young i sar., 2010). Tako je hipermetilacija promotora *CDH1* gena detektovana kod 26,7% uzoraka tkiva pterigijuma, od kojih kod 65,6% nije detektovana proteinska ekspresija E-kadherina. Osim toga, rezultati dobijeni u okviru ove teze pokazali su da nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* dolazi do

smanjene ekspresije E-kadherina koja se nalazi u korelaciji sa povećanim nivoom metilacije promotora *CDH1*, čime je i trahom potencijalno postao očna bolest za koju je pokazano da hipermetilacija gena za E-kadherin ima ulogu u nastanku patologije.

Zbog brojnih podataka iz literature koji ukazuju na značaj metilacije gena za E-kadherin u pokretanju procesa EMT, kao i s' obzirom na to da su tretmani HCjE ćelija 5-AzaC doveli do malog povećanja njegove ekspresije u odnosu na nivo prisutan u ćelijama tretiranim samo TGF- $\beta$ 1, određen je i procenat metilacije *CDH1* u ovim uzorcima. HRM analiza je pokazala da nakon tretmana ćelija TGF- $\beta$ 1 proteinima dolazi do značajnog porasta metilacije DNK analiziranog regiona promotora *CDH1* što je u korelaciji sa detektovanim smanjenjem nivoa njegove ekspresije, ali da tretmani HCjE ćelija 5-AzaC ne dovode do značajnih promena u nivou metilacije DNK i ekspresije *CDH1*. Iako ovo naizgled predstavlja neočekivan rezultat, Fukagawa i sar. su pokazali da je gen za E-kadherin, iako je u njegovom promotoru prisutna metilacija, otporan na tretman 5-Aza-dC. Tako, tretman humane ćelijske linije agresivnog karcinoma dojke demetilujućim agensom 5-Aza-dC nije imao uticaja na ekspresiju *CDH1*, zahvaljujući interakciji ZEB1 sa enzimom DNMT1 koji održava metilaciju DNK *CDH1*, pri čemu je povećana ekspresija E-kadherina primećena samo kada su ćelije tretirane 5-Aza-dC u odsustvu ZEB1 proteina (Fukagawa i sar., 2015). Takođe, Sproul i sar. su pokazali da manje od 10% gena koji su reprimirani kod kancera dojke, a među koje spada i *CDH1*, koji se metiluju tokom gubitka multipotentnosti i diferencijacije ćelija, može biti ponovo aktivirano tretmanom 5-Aza-dC (Sproul i sar., 2011). Navedeni podaci ukazuju na neke mehanizme koji bi potencijalno mogli da objasne rezultate dobijene u ovoj disertaciji. Moguće je da gen za E-kadherin nakon tretmana HCjE ćelija TGF- $\beta$ 1 proteinima delimično postaje otporan na demetilaciju, kao i da su u regulaciji ekspresije *CDH1* gena uključeni i drugi epigenetički mehanizmi, pre svega metilacija i acetilacija histona, čija bi modulacija nakon tretmana 5-AzaC bila odgovorna za mali porast ekspresije E-kadherina. Iako je tretman 5-AzaC sa periodom oporavka doveo do jako malog povećanja u nivou E-kadherina, teško bi se moglo pretpostaviti da bi toliki porast ekspresije *CDH1* mogao biti odgovoran za zaustavljenje i delimičnu reverziju procesa EMT.

Sa druge strane, najuočljiviji efekat tretmana 5-AzaC sa periodom oporavka bio je smanjenje nivoa ekspresije brojnih gena uključenih u očuvanje mezenhinskog fenotipa, iako bi se pre moglo očekivati da se glavni efekat demetilacije DNK manifestuje u povećanoj ekspresiji gena, i na osnovu same uloge DNK metilacije u regulaciji genske ekspresije, ali i na osnovu literaturnih i prethodno dobijenih rezultata u ovoj tezi. Povećanje ekspresije epitelnih marker gena, pre svega E-kadherina, indukovano demetilacijom DNK bilo bi značajno u svetlu potencijala ovakvog tretmana za reverziju procesa EMT, kao što je i nagovešteno eksperimentima urađenim nakon infekcije HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis*. Ipak, neočekivan i selektivan efekat tretmana 5-AzaC sa periodom oporavka, detektovan kao smanjenje ekspresije mezenhinskih marker gena, ukazuje da nijedan od ispitivanih gena markera najverovatnije nije direktan target 5-AzaC. Upravo ovakva specifičnost efekata DNA demetilujućeg agensa na HCjE ćelije kod kojih je pokrenut EMT proces ukazala je na scenario po kome 5-AzaC ostvaruje svoje dejstvo demetilacijom uzvodnih represora transkripcije. Imajući u vidu značaj miRNK za regulaciju procesa EMT, efekti 5-AzaC su pripisani demetilaciji DNK gena za miRNK, dobro opisanoj klasi transkripcionih represora. Brojne eksperimentalne studije su pokazale da miRNK učestvuju u regulisanju homeostaze svih tipova ćelija, dok su poremećaji u nivou njihove ekspresije uključeni u etiologiju velikog broja patoloških procesa u organizmu. Tako je pokazano da miRNK regulišu i proces EMT preko interakcije sa pulom važnih molekula uključenih u tranziciju, modulišući njihovu ekspresiju i posledično njihovu funkciju. Zbog složenosti samog procesa EMT, i molekuli regulisani od strane miRNK su brojni i raznovrsni, i uključuju mezenhimske proteine N-kadherin, fibronektin i vimentin, citoskeletne i



proteine koji učestvuju u formiranju epitelnih međucelijskih veza kao što su E-kadherin i okcludin, i što je najvažnije, transkripcione faktore sa centralnom ulogom u odigravanju procesa EMT (Abba i sar., 2016; Expósito-Villén i sar., 2018). Pokazano je da se poremećena ekspresija različitih miRNK nalazi u korelaciji i sa različitim bolestima oka povezanim sa procesom EMT (Raghunath i Perumal, 2015). Tako je u epitelnim ćelijama sočiva tokom procesa formiranja primarne katarakte kod pacova ustanovljena smanjena ekspresija nekoliko miRNK koje potencijalno mogu učestvovati u regulaciji gena povezanih sa genima koji kodiraju proteine ECM i signalnim putevima faktora rasta uključujući i signalne puteve pokrenute TGF- $\beta$  proteinima (Kubo i sar., 2013). Osim toga, tokom nastanka sekundarne karatrate kod čoveka je pokazana značajno niža ekspresija miRNK za koje je poznato da dovode do smanjene ekspresije SMAD4 proteina, pri čemu ponovna ekspresija ovih miRNK u primarnim epitelnim ćelijama sočiva sa kataraktom i liniji epitelnih ćelija sočiva tretiranim TGF- $\beta$  dovodi do reverzije procesa EMT (Wang i sar., 2013; Dong i sar., 2014). Takođe, istraživanja su pokazala da su miRNK domaćina uključene i u patogenezu i progresiju trahoma, a samim tim potencijalno i u pokretanje procesa EMT u konjuktivi (Derrick i sar., 2013, 2016b, 2017). Jedna studija je identifikovala miRNK čiji se nivo ekspresije nalazi u direktnoj vezi sa stepenom kliničke inflamacije kod pacijenata sa folikularnim trahomom u ranoj fazi bolesti. S' obzirom da je poznato da ove miRNK imaju ulogu u regulaciji imunskog odgovora domaćina ili učestvuju u zarastanju rana u odgovoru na povredu epitela oka, smatra se da njihova poremećena ekspresija kod pacijenata sa TF može dovesti do uspostavljanja hronične inflamacije i produženog zarastanja koji mogu biti povezani sa nastankom ožiljačnog tkiva na konjuktivi (Derrick i sar., 2016b). U drugoj studiji u kojoj je praćena diferencijalna ekspresija miRNK kod pacijenata sa već formiranim ožiljcima na konjuktivi i zdravih osoba, pokazano je da dolazi do poremećene ekspresije miRNK čiji su potencijalni ciljni geni uključeni u signalne puteve važne za diferencijaciju epitelnih ćelija i nastanak fibroze, među kojima se nalaze i TGF- $\beta$  i WNT signalni putevi (Derrick i sar., 2013). Takođe, i na *in vivo* modelu genitalne infekcije miša bakterijom *C. trachomatis*, utvrđeno je da infekcija dovodi do smanjene ekspresije miRNK uključenih u održavanje funkcionalnog integriteta epitelnih ćelija i povećane ekspresije miRNK za koje je poznato da stimulišu proces EMT, fibrozu i nastanak tumora (Igietseme i sar., 2015), pri čemu je detaljna bioinformatička analiza potvrdila da ove miRNK mogu učestvovati u regulaciji molekula kao što su TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$ R1, Smad3, Smad2, Snail2, E-kadherin i kolagen I, III i IV (Igietseme i sar., 2018).

Iako je ključna uloga miRNK u regulaciji procesa EMT već utvrđena u različitim model sistemima (Abba i sar., 2016; Expósito-Villén i sar., 2018), kao i u pojedinim bolestima oka, uključujući i infekciju bakterijom *C. trachomatis*, podaci o obrascu promene ekspresije miRNK povezanih sa EMT i regulaciji njihove ekspresije u ćelijama konjunktive i dalje nisu potpuni. Zbog toga je u ovoj tezi ispitan ekspresioni profil 84 odabrane miRNK u HCjE ćelijama nakon pokretanja procesa EMT dugotrajnim tretmanom TGF- $\beta$ 1 proteinima. Osim toga, ispitan je i nivo ekspresije ovih miRNK u HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1 proteinima nakon tretmana 5-AzaC sa i bez perioda oporavka koje je omogućilo identifikaciju onih miRNK koje su istovremeno uključene u pokretanje procesa EMT i čija je ekspresija regulisana metilacijom DNK. Među miRNK čija ekspresija se uvećala više od deset puta nakon indukcije EMT u HCjE ćelijama u odnosu na kontrolni nivo (miR-10a, miR-10b, miR-143, miR-145, miR-146a i miR-196a), za bicistronski gen koji kodira za miR-143 i miR-145 je poznato da se nalazi pod direktnom transkripcionom kontrolom TGF- $\beta$ 1 (Long i Miano, 2011), što može objasniti veliko povećanje ekspresije ovih miRNK u HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1 proteinima. Ipak, iako mezotelijalne ćelije nakon izlaganja TGF- $\beta$ 1 povećavaju ekspresiju miR-145 koja promovira proces EMT i učestvuje u razvijanju peritonealne fibroze (Wu i sar., 2019), što je u skladu sa indukcijom ekspresije detektovanim u ovoj tezi, brojne studije ukazuju da ekspresija miR-145 dovodi do inhibicije proliferacije, migracije, invazije i tranzicije

različitih ćelija kancera (Zhai i sar., 2016; Chang i sar., 2017; Lei i sar., 2017; Mei i sar., 2017; Tang i sar., 2019; Chen i sar., 2020). Ni u tkivu konjunktive još uvek nije jasno definisana precizna uloga miR-143 i miR-145. Ispitivanje nivoa miR-145 u tkivu pterigijuma kod 253 pacijenata je pokazala negativnu korelaciju između ozbiljnosti pterigijuma i nivoa ekspresije miR-145, što je u saglasnosti sa predloženom ulogom ove miRNK u tumor-supresorskoj aktivnosti (Chien i sar., 2013). Sa druge strane, Teng i sar. su pokazali da je nivo ekspresije miR-143 i miR-145 u primarnom pterigijumu značajno viši u poređenju sa nivoom detektovanim u kontrolnoj konjunktivi, ukazujući da bi ekspresija klastera miR-143/145 mogla biti pokrenuta u patološkim stanjima (Teng i sar., 2018). U saglasnosti sa tim rezultatima, u ovoj tezi je pokazano da je pokretanje procesa EMT u HCjE ćelijama povezano sa povećanom ekspresijom klastera miR-143/145. Ipak moguće je i da u eksperimentalnom modelu korišćenom u ovoj tezi miR-143 i miR-145 funkcionišu kao tumor-supresori ali da njihova povećana ekspresija u HCjE ćelijama nakon tretmana TGF- $\beta$ 1 nije bila dovoljna za zaustavljanje procesa tranzicije. Naime, Teng i sar. su nakon utvrđivanja precizne lokalizacije u tkivu pterigijuma, pokazali da se klaster miR-143/145 dominantno eksprimira u bazalnom epitelu konjunktive, gde ove miRNK dovode do suprimiranja ekspresije onkogenog proteina MDM2 i, preko tumor-supresorskog proteina p53, do aktivacije apoptotskih gena (Teng i sar., 2018). Tretmani 5-AzaC, posebno tretman 5-AzaC sa periodom oporavka, dovele su do daljeg povećanja u ekspresiji miR-143 i miR-145 u HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1, potvrđujući prethodna zapažanja da se stepen metilacije DNK promotorskog regiona klastera miR-143/145 nalazi u korelaciji sa njihovom ekspresijom kod nekoliko humanih ćelijskih linija karcinoma, kao i u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama (Xia i sar., 2015; Zhang i sar., 2016; Gao i sar., 2019). Inače, moglo bi se reći da efekti tretmana 5-AzaC predstavljaju ukupan zbir efekata proistekao iz supresije i aktivacije brojnih gena čija je ekspresija regulisana metilacijom DNK. U eksperimentima rađenim u okviru ove teze, nakon pokretanja procesa EMT u HCjE ćelijama, ukupan efekat demetilacije DNK odrazio se na zaustavljanje tranzicije, čak i uprkos činjenici da postoji mogućnost da je u odnosu na nivo ekspresije miR-143 i miR-145 tretman 5-AzaC pomerio ravnotežu ka odigravanju procesa EMT.

Sa druge strane, miR-200a, miR-141, miR-182, miR-148a, miR-18a, miR-200b, miR-200c, miR-205, miR-20b i miR-215 predstavljaju miRNK čiji nivo ekspresije više nego dvostruko pada nakon tretmana HCjE ćelija TGF- $\beta$ 1 proteinima i pokretanja procesa EMT u odnosu na nivo prisutan u kontrolnim HCjE ćelijama. Među prethodno nabrojanim miRNK najizraženiji pad je primećen u nivou ekspresije članova familije miR-200 i miR-205 što ne predstavlja iznenađenje s' obzirom da se ove miRNK smatraju čuvarima epitelnog fenotipa i jednim od ključnih regulatora procesa EMT, uključene u njegovu supresiju (Christoffersen i sar., 2007; Bracken i sar., 2008; Burk i sar., 2008; Gregory i sar., 2008a; Korpala i sar., 2008; Park i sar., 2008). Osim što se povećano eksprimiraju u tkivima adulta sa visokim udelom epitelnih ćelija, istraživanja rađena na embrionima različitih kičmenjaka pokazala su da se ekspresija familije miR-200 i miR-205 pokreće rano tokom embriogeneze u endodermu i ektodermu, dok njihova ekspresija izostaje u mezodermu koji se formira procesom EMT (Wienholds i sar., 2005; Darnell i sar., 2006; Yi i sar., 2006; Landgraf i sar., 2007; Gregory i sar., 2008a). Inače, od ukupno 84 analizirane miRNK tokom izrade ove teze, HCjE ćelije u normalnim uslovima pokazuju najvišu ekspresiju miR-205, miR-200c i miR-141, što je u saglasnosti i sa studijom Derrick i sar., koji su među 853 detektovane miRNK u HCjE ćelijama ustanovili veoma visoku ekspresiju istih miRNK (Derrick i sar., 2016b), čime je dodatno potvrđena njihova ekspresija specifična za epitelne ćelije. I ispitivanje ekspresionih profila miRNK u 60 ćelijskih linija kancera i kod pacijenata sa kancerom ovarijuma identifikovala su familiju miR-200 kao zajednički marker za ćelije sa epitelnim karakteristikama (pozitivne na E-kadherin i negativne na vimentin) (Park i sar., 2008). Takođe, u skladu sa rezultatima dobijenim u

ovoj tezi, eksperimenti rađeni na različitim ćelijskim linijama pokazali su da do smanjene ekspresije članova miR-200 familije i miR-205 dolazi nakon tretmana TGF- $\beta$ 1 proteinima i pokretanja procesa EMT (Gregory i sar., 2008b; Korpala i sar., 2008; Duan i Chen, 2016; Sun i sar., 2019). Članovi familije miR-200 i miR-205 omogućavaju očuvanje epitelnog fenotipa putem direktnog targetovanja iRNK transkripcionih faktora uključenih u proces EMT (Christoffersen i sar., 2007; Gregory i sar., 2008b; Korpala i sar., 2008). Naime, u 3' UTR iRNK *ZEB1* i *ZEB2* gena identifikovano je više vezivnih mesta za miR-200a, miR-141, miR-200b, miR-200c i miR-205 pri čemu je pokazano da ove miRNK kooperativno regulišu ekspresiju *ZEB1* i *ZEB2* ostvarujući na taj način ključnu ulogu u odigravanju metastatskog procesa i progresiji tumora (Gregory i sar., 2008b). Takođe, pokazano je i da u tkivu pterigijuma dolazi do smanjene ekspresije članova familije miR-200, miR-200a, miR-200b, miR-141 i miR-429 u poređenju sa normalnom konjunktivom (Engelsvold i sar., 2013). Dodatna istraživanja rađena na primarnim ćelijama pterigijuma su ukazala da mehanizam koji leži u osnovi nastanka pterigijuma uključuje inaktivaciju proteina p53 koja dovodi do smanjenog nivoa miR-200a i do posledično povećane ekspresije proteina *ZEB1* i *ZEB2* koji pokreću proces EMT (Wu i sar., 2016). Prisustvo zajedničkih mehanizama koji dovode do pokretanja procesa EMT u pterigijumu i tokom formiranja metastaza ne predstavlja veliko iznenađenje, s' obzirom da se pterigijum smatra stanjem koga karakteriše poremećena ekspresija proteina p53 i nekancerogena, ali nekontrolisana proliferacija ćelija konjunktive (Chui i sar., 2011). Iako je u ovoj disertaciji pokazano da infekcija HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* dovodi do pokretanja procesa EMT, promene u nivou ekspresije miRNK nisu ispitivane. Zbog toga su zanimljivi podaci iz literature koji ukazuju na smanjenu ekspresiju pojedinih članova familije miR-200 u *in vivo* modelu genitalne infekcije miša *C. trachomatis* (Igietseme i sar., 2015) ili *C. muridarum* (Yeruva i sar., 2017), kao i podaci koji, na osnovu diferencijalno ekspimiranih gena kod zdravih i obolelih osoba, ukazuju da bi miR-200b, miR-200c i miR-429 mogle biti povezane sa trahomom (Natividad i sar., 2010; Burton i sar., 2011b; Derrick i sar., 2015). U ovoj tezi je pokazano da pokretanje procesa EMT u HCjE ćelijama nakon dugotrajnog tretmana TGF- $\beta$ 1 proteinima među ispitivanim miRNK, dovodi do najvećeg smanjenja ekspresije članova familije miR-200 kao što je to zabeleženo i u slučaju različitih kancera, pterigijuma i nakon genitalne infekcije *C. trachomatis*. Osim familije miR-200 opisane su i brojne druge miRNK važne za pokretanje procesa EMT (Abba i sar., 2016; Expósito-Villén i sar., 2018). Ipak, rezultati dobijeni u okviru ove teze ukazuju da je familija miR-200, posebno miR-200a i miR-200b, glavni faktor koji održava epitelni fenotip humanih ćelija konjunktive, s' obzirom da se smanjena ekspresija ovih miRNK nalazi u korelaciji sa tranzicijom HCjE ćelija u mezenhimski fenotip.

Ekspresija familije miR-200 regulisana je na više nivoa. Tako je pokazano da *ZEB1* vezivanjem za odgovarajuće sekvence u okviru promotorskog regiona direktno suprimira transkripciju miR-200c i miR-141, dok vezivanje *ZEB1* i *ZEB2* dovodi do transkripcione represije miR-200b, miR-200a i miR-429, ukazujući na dvostruku negativnu povratnu spregu između članova familije miR-200 i proteina *ZEB* važnu za regulaciju procesa EMT (Bracken i sar., 2008; Burk i sar., 2008). Dodatan nivo regulacije ekspresije familije miR-200 odigrava se putem metilacije DNK. Određivanje nivoa metilacije DNK u ćelijskim linijama koje predstavljaju najčešće humane tipove tumora je ustanovilo prisustvo negativne korelacije između nivoa metilacije DNK promotora oba lokusa miR-200 i nivoa ekspresije odgovarajućih članova familije miR-200 (Davalos i sar., 2012). Naime, u brojnim ćelijskim linijama kancera sa mezenhimskim, agresivnim i invazivnim fenotipom promotori lokusa miR-200 su gotovo ili potpuno metilovani i te ćelije ne ekspimiraju članove familije miR-200, dok je u ćelijskim linijama kancera sa epitelnim fenotipom situacija obrnuta (Ceppi i sar., 2010; Neves i sar., 2010; Vrba i sar., 2010; Wiklund i sar., 2011;

Davalos i sar., 2012). Takođe, u normalnoj mukozi kolona CpG ostrvca oba lokusa miR-200 u epitelnim ćelijama Liberkinovih kolorektalnih kripti su nemetilovana i te ćelije eksprimiraju odgovarajuće transkripte, dok mezenhimske stromalne ćelije lamine proprije ne eksprimiraju članove miR-200 familije i kod njih je prisutna hipermetilacija promotora oba lokusa miR-200 (Davalos i sar., 2012). U skladu sa navedenim podacima, u ovoj tezi je pokazano da tretman HCjE ćelija 5-AzaC sa periodom oporavka vraća ekspresiju članova familije miR-200 ka nivou prisutnom u kontroli, potvrđujući uključenost metilacije DNK u regulaciju njihove ekspresije u ćelijama konjunktive. HRM i bisulfitno sekvenciranje su potvrdili da je proces EMT pokrenut dugotrajnim tretmanom HCjE ćelija TGF- $\beta$ 1 proteinima praćen povećanjem nivoa metilacije DNK u okviru promotora oba lokusa miR-200. Iako tretman TGF- $\beta$ 1 nije doveo do potpune metilacije u okviru analiziranih regiona promotora ova dva lokusa, podaci iz literature govore da se efikasno utišavanje ekspresije miR-200c/141 postiže već sa srednjim nivoom metilacije DNK (Neves i sar., 2010). Takođe, u ovoj disertaciji je pokazano i da tretman 5-AzaC sa periodom oporavka demetiluje analizirane regione promotora oba lokusa miR-200, s' obzirom da je pokazano da procenat metilovanih CpG dinukleotida nakon tretmana pada gotovo na kontrolni nivo. Iz navedenih rezultata može se zaključiti da se nivo ekspresije oba lokusa miR-200 nalazi u korelaciji sa metilacionim statusom njihovih promotora, kao i u asocijaciji sa epitelnim ili mezenhimijskim stanjem HCjE ćelija.

Funkcionalne implikacije detektovanih promena u metilacionom statusu analiziranih CpG dinukleotida mogle bi se ogledati u modifikaciji sposobnosti vezivanja transkripcionih faktora za različito metilovanu DNK. Iz literature je poznato da se u analiziranom regionu promotora lokusa miR-200a/b/429 nalaze tri vezujuća mesta za ZEB proteine (Bracken i sar., 2008), dok se u analiziranom segmentu promotora lokusa miR-200c/141 nalazi jedno vezujuće mesto za ZEB proteine (Burk i sar., 2008). Predikcija mesta vezivanja transkripcionih faktora korišćenjem Match<sup>TM</sup> softvera je pokazala da odabrani regioni lokusa miR-200a/b/429 sadrže, između ostalih, i tri vezujuća mesta za SP1 i jedno vezujuće mesto za c-MYB, dok analizirana sekvenca promotora lokusa miR-200c/141 sadrži četiri SP1 vezujuća mesta. Kao što je prethodno pomenuto, ZEB proteini su dobro poznati represori, dok SP1 i c-MYB funkcionišu kao aktivatori transkripcije familije miR-200 (Pieraccioli i sar., 2013; Kolesnikoff i sar., 2014). Takođe je utvrđeno da krajnji efekat vezivanja transkripcionih faktora za promotore oba lokusa familije miR-200, a koji može dovesti do inhibicije ili aktivacije ekspresije familije miR-200, zavisi od prisustva transkripcionog faktora ZEB1. Naime, i za SP1 i za c-MYB je pokazano da učestvuju u održavanju epitelnog fenotipa putem aktivacije ekspresije familije miR-200, dok pojava ZEB1 nakon pokretanja procesa EMT sprečava njihovo vezivanje za odgovarajuće sekvence u okviru promotora, tako da represija preteže nad aktivacijom transkripcije (Pieraccioli i sar., 2013; Kolesnikoff i sar., 2014). Uzimajući u obzir da neki od diferencijalno metilovanih CpG dinukleotida u analiziranim promotorskim regionima lokusa miR-200 pripadaju vezujućim mestima za proteine SP1 i C-MYB, može se pretpostaviti da povećanje metilacije DNK u HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1 narušava vezivanje aktivatora i zajedno sa istovremenom pojavom transkripcionih represora ZEB posledično dovodi do smanjene ekspresije članova familije miR-200 što za uzvrat omogućava tranziciju HCjE ćelija ka mezenhimijskom fenotipu.

Rezultati dobijeni tokom izrade ove disertacije ukazuju da se stepen metilacije DNK u okviru analiziranih regiona promotora oba lokusa miR-200 nalazi u negativnoj korelaciji sa nivoom njihove ekspresije u HCjE ćelijama, i da s' toga može predstavljati odlučujući mehanizam u odlučivanju sudbine ovih ćelija u kontekstu započinjanja procesa EMT. U ovoj eksperimentalnoj postavci, neposredni uzrok primećenih promena u obrascu metilacije lokusa miR-200 tokom

odigravanja procesa EMT može biti tretman HCjE ćelija TGF- $\beta$ 1 proteinima. Prethodne studije su pokazale širok spektar efekata koji tretman TGF- $\beta$ 1 ostvaruje na profil metilacije DNK, u zavisnosti od tipa ćelija i eksperimentalnog modela, od odsustva bilo kakvih primećenih promena (McDonald i sar., 2011) do reverzibilne hipermetilacije (Cardenas i sar., 2014; Carmona i sar., 2014). Ipak, čini se da dugotrajno izlaganja ćelija TGF- $\beta$ 1 proteinima dovodi do metilacije CpG dinukleotida, s' obzirom da tretman ćelija u trajanju od 36 h nije doveo do promena u nivou metilacije DNK (McDonald i sar., 2011), dok je porast metilacije 441010 CpG dinukleotida raspoređenih u okviru sekvenci promotora, introna i egzona, povezan sa transkripcionom regulacijom gena uključenih u odigravanje procesa EMT, detektovan nakon 30 dana tretmana (Carmona i sar., 2014). Takođe, Gregory i sar. su pokazali da se metilacija DNK u okviru promotora oba lokusa miR-200 progresivno povećava sa trajanjem tretmana TGF- $\beta$ 1 pri čemu je to povećanje praćeno progresivnim smanjenjem ekspresije članova familije miR-200 (Gregory i sar., 2011), što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovoj tezi. Osim toga, i povećana ekspresija i aktivnost enzima DNMT je povezana sa hipermetilacijom miR-200 lokusa i pokretanjem procesa EMT (Pistore i sar., 2017; Luo i sar., 2019), pri čemu tokom izrade ove disertacije nije utvrđeno koja je grupa enzima DNMT uključena u hipermetilaciju lokusa miR-200 u HCjE ćelijama.

Brojni, već pomenuti, podaci iz literature pokazuju da ekspresija familije miR-200 inhibira proces EMT u ćelijama poreklom iz različitih tkiva i organa. U ovoj doktorskoj disertaciji članovi familije miR-200 su identifikovani kao ključni molekuli uključeni u pokretanje procesa EMT nakon tretmana HCjE ćelija TGF- $\beta$ 1 proteinima, a koji bi potencijalno mogli da predstavljaju specifične targete prilikom tretmana bolesti konjunktive povezanim sa procesom tranzicije. Takođe, pokazano je i da je ekspresija ovih miRNK regulisana metilacijom DNK, što ukazuje na značaj epigenetičke regulacije procesa EMT u humanim epitelnim ćelijama konjunktive. Sa druge strane, za model procesa EMT pokrenut infekcijom HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis*, tek ostaje da se utvdi značaj ekspresije članova miR-200 familije i metilacije njihovih gena. Identifikacija familije miR-200 kao targeta za potencijalni terapijski tretman je od posebnog značaja, s' obzirom da nedostatak specifičnih gena predstavlja osnovni problem za primenu epigenetičkih agenasa u terapiji bolesti oka (He i sar., 2013). Polje epigenetike se neprekidno širi i napredak u tehnologiji već dozvoljava ciljanu demetilaciju korišćenjem epigenetičkih alata baziranih na CRISPR/Cas9 tehnologiji (Choudhury i sar., 2016; Xu i sar., 2018), dok dostupnost oka omogućava lokalnu aplikaciju robusnih alata za editovanje gena čime bi se izbegli neželjeni sporedni efekti povezani sa sistemskom primenom nespecifičnog demetilujućeg agensa kao što je 5-AzaC. Kako su članovi familije miR-200 organizovani u klastere, targetovana demetilacija jednog promotora obezbedila bi ekspresiju svih članova klastera. S' toga, uzimajući u obzir sve nabrojane benefite, rezultati dobijeni u ovoj tezi ukazuju da bi direktna demetilacija promotora familije miR-200 mogla predstavljati novu terapijsku strategiju u tretmanu onih bolesti konjunktive u kojima proces EMT ima značajnu ulogu.

---

## 6. ZAKLJUČCI

---

Shodno postavljenim ciljevima eksperimenata urađenih u okviru ove doktorske disertacije, dobijeni i prikazani rezultati upućuju na sledeće zaključke:

1. Infekcija bakterijom *Chlamydia trachomatis* dovodi do pokretanja procesa EMT u ćelijskoj liniji humanih epitelnih ćelija konjunktive (HCjE), što je zaključeno na osnovu:
  - Povećanja ekspresije glavnih induktora procesa EMT, TGF- $\beta$ 1 i TGF- $\beta$ 2 proteina, na nivou iRNK
  - Aktivacije signalnih puteva uključenih u pokretanje procesa EMT (TGF- $\beta$  i WNT signalnih puteva i signalnih puteva nizvodno od integrina i receptora sa tirozin kinaznom aktivnošću)
  - Povećanja ekspresije transkripcionih faktora uključenih u pokretanje procesa EMT, SNAI1 i ZEB2, na nivou iRNK
  - Smanjenja ekspresije markera epitelnih ćelija E-kadherina i povećanja ekspresije markera mezenhimskih ćelija fibronektina i  $\alpha$ -SMA na nivou iRNK i proteina
2. Infekcija HCjE ćelija bakterijom *C. trachomatis* dovodi do promena u metilacionim profilima gena koji kodiraju za markere epitelnih i mezenhimskih ćelija, pri čemu dolazi do:
  - Statistički značajnog povećanja nivoa metilacije DNK u okviru promotora *CDH1* gena praćenog statistički značajnim smanjenjem ekspresije markera epitelnih ćelija E-kadherina na nivou iRNK i proteina, sugerišući ulogu metilacije DNK u regulaciji ekspresije gena koji kodira za E-kadherin u HCjE ćelijama nakon infekcije bakterijom *C. trachomatis*
  - Neznatnog smanjenja nivoa metilacije DNK u prvom egzonu *FN1* i *ACTA2* gena praćenog statistički značajnim povećanjem ekspresije markera mezenhimskih ćelija fibronektina i  $\alpha$ -SMA na nivou iRNK i proteina, sugerišući značaj drugih mehanizama u regulaciji ekspresije gena koji kodiraju za fibronektin i  $\alpha$ -SMA
3. HCjE ćelije poseduju sposobnost da uđu u proces EMT nakon dugotrajnog tretmana TGF- $\beta$  proteinima, pri čemu TGF- $\beta$ 1 izoforma ima najveći potencijal za pokretanje ovog procesa , što je zaključeno na osnovu:
  - Promene morfologije HCjE ćelija u pravcu fenotipa karakterističnog za mezenhimske ćelije
  - Povećanja pokretljivosti HCjE ćelija
  - Smanjenja ekspresije epitelnih markera (E-kadherina, okcludina i dezmozoplakina) na nivou iRNK
  - Povećanja ekspresije mezenhimskih markera (N-kadherina, fibronektina, vimentina i  $\alpha$ -SMA) na nivou iRNK

- Povećanja ekspresije transkripcijskih faktora uključenih u pokretanje procesa EMT (SNAI1, ZEB2 i TWIST1) na nivou iRNK
  - Smanjenja ekspresije epitelnih markera (E-kadherina i dezmozoplakina) i povećanja ekspresije mezenhimskih markera (N-kadherina i fibronektina) na proteinskom nivou
4. Metilacija DNK ima važnu ulogu u pokretanju i reverziji procesa EMT u HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1 proteinima, što je zaključeno na osnovu:
- Reverzije morfoloških promena HCjE ćelija ka fenotipu karakterističnom za epitelne ćelije nakon primene demetilujućeg DNK agensa
  - Smanjenja pokretljivosti HCjE ćelija nakon primene demetilujućeg DNK agensa
  - Povećanja ekspresije proteina specifičnih za epitelni (E-kadherina i dezmozoplakina) i smanjenja ekspresije proteina specifičnih za mezenhimski tip ćelija (N-kadherina i fibronektina) nakon primene demetilujućeg DNK agensa
5. Selektivni efekti primene demetilujućeg DNK agensa se, preko uticaja na nivo ekspresije različitih miRNK, manifestuju u smanjenju ekspresije većeg broja gena koji kodiraju za proteine markere mezenhimskih ćelija i transkripcijske faktore uključene u pokretanje procesa EMT u HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1 proteinima, što je zaključeno na osnovu:
- Promena u profilu ekspresije 84 gena koji kodiraju za proteine koji definišu epitelni/mezenhimski fenotip, a koji su uključeni u proces EMT, nakon primene demetilujućeg DNK agensa
  - Promena u profilu ekspresije 84 gena koji kodiraju za miRNK uključene u proces EMT nakon primene demetilujućeg DNK agensa
6. Promena profila metilacije DNK u okviru gena koji kodiraju za članove familije miR-200 ima ključnu ulogu u pokretanju i reverziji procesa EMT u HCjE ćelijama tretiranim TGF- $\beta$ 1 proteinima, što je zaključeno na osnovu:
- Statistički značajnog povećanja nivoa metilacije DNK u okviru promotorskih regiona dva miR-200 lokusa praćenog smanjenjem ekspresije članova familije miR-200 i promenama HCjE ćelija u pravcu mezenhimskog fenotipa nakon tretmana TGF- $\beta$ 1 proteinima
  - Statistički značajnog smanjenja nivoa metilacije DNK u okviru promotorskih regiona dva miR-200 lokusa praćenog povećanjem ekspresije članova familije miR-200 i promenama HCjE ćelija tretiranih TGF- $\beta$ 1 proteinima u pravcu epitelnog fenotipa nakon primene demetilujućeg DNK agensa sa periodom oporavka
7. Na osnovu prethodno iznetih zaključaka, demetilacija DNK u okviru promotora miR-200 lokusa mogla bi predstavljati novu terapijsku strategiju u tretmanu onih bolesti konjunktive u čijoj etiologiji proces EMT igra značajnu ulogu.

---

## 7. LITERATURA

---

- Abba, M., Patil, N., Leupold, J. and Allgayer, H. (2016) MicroRNA Regulation of Epithelial to Mesenchymal Transition. *Journal of Clinical Medicine*, 5(1), 8.
- AbdelRahman, Y. M. and Belland, R. J. (2005) The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiology Reviews*, 949–959.
- Abu El-Asrar, A. M., Geboes, K., Al-Kharashi, S. A., Tabbara, K. F. and Missotten, L. (1998) Collagen content and types in trachomatous conjunctivitis. *Eye*, 12(4), 735–739.
- Abu El-Asrar, A. M., Geboes, K., Tabbara, K. F., *et al.* (1998) Immunopathogenesis of conjunctival scarring in trachoma. *Eye (Basingstoke)*, 12(3), 453–460.
- Abu El-Asrar, A. M. *et al.* (2000) Expression of gelatinase B in trachomatous conjunctivitis. *British Journal of Ophthalmology*, 84(1), 85–91.
- Abu El-Asrar, A. M., Geboes, K. and Missotten, L. (2001) Immunology of trachomatous conjunctivitis. *Bulletin de la Societe belge d'ophtalmologie*, (280), 73–96.
- Abu El-Asrar, M. A. *et al.* (1989) Immunopathology of trachomatous conjunctivitis. *British Journal of Ophthalmology*, 73(4), 276–282.
- Acloque, H., Adams, M. S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M. and Nieto, M. A. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions: The importance of changing cell state in development and disease. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1438–1449.
- Acun, T., Oztas, E., Yagci, T. and Yakicier, M. C. (2011) SIP1 is downregulated in hepatocellular carcinoma by promoter hypermethylation. *BMC Cancer*, 11(1), 223.
- Ahmed, N. *et al.* (2006) Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 290(6), C1532-42.
- Akpek, E. K. and Gottsch, J. D. (2003) Immune of defense at the ocular surface. *Eye*, 17(8), 949–956.
- Al-Rajhi, A. A., Hidayat, A., Nasr, A. and Al-Faran, M. (1993) The Histopathology and the Mechanism of Entropion in Patients with Trachoma. *Ophthalmology*, 100(9), 1293–1296.
- Annes, J. P., Chen, Y., Munger, J. S. and Rifkin, D. B. (2004) Integrin alphaVbeta6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1. *The Journal of cell biology*, 165(5), 723–34.
- Antequera, F. and Bird, A. (1993) CpG islands. *EXS*, 169–185.
- Arora, P., Kim, E. O., Jung, J. K. and Jang, K. L. (2008) Hepatitis C virus core protein downregulates E-cadherin expression via activation of DNA methyltransferase 1 and 3b. *Cancer Letters*, 261(2), 244–252.
- Ateeq, B., Unterberger, A., Szyf, M. and Rabbani, S. A. (2008) Pharmacological inhibition of DNA methylation induces proinvasive and prometastatic genes in vitro and in vivo. *Neoplasia*, 10(3), 266–278.
- Attwood, J. T., Yung, R. L. and Richardson, B. C. (2002) DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 241–257.
- Awasthi, N., Guo, S. and Wagner, B. J. (2009) Posterior capsular opacification: A problem reduced but not yet eradicated. *Archives of Ophthalmology*, 555–562.
- Bahnassy, A. A. *et al.* (2018) The role of E-cadherin and Runx3 in Helicobacter Pylori – Associated gastric carcinoma is achieved through regulating P21waf and P27 expression. *Cancer Genetics*, 228–229, 64–72.
- Bailey, R., Duong, T., Carpenter, R., Whittle, H. and Mabey, D. (1999) The duration of human ocular



- Chlamydia trachomatis infection is age dependent. *Epidemiology and Infection*, 123(3), 479–486.
- Bailey, R. L., Kajbaf, M., Whittle, H. C., Ward, M. E. and Mabey, D. C. W. (1993) The influence of local antichlamydial antibody on the acquisition and persistence of human ocular chlamydial infection: IgG antibodies are not protective. *Epidemiology and Infection*, 111(2), 315–324.
- Bailey, R. L., Holland, M. J., Whittle, H. C. and Mabey, D. C. (1995) Subjects recovering from human ocular chlamydial infection have enhanced lymphoproliferative responses to chlamydial antigens compared with those of persistently diseased controls. *Infection and immunity*, 63(2), 389–92.
- Ball, M. P. *et al.* (2009) Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nature Biotechnology*, 27(4), 361–368.
- Bannister, A. J. and Kouzarides, T. (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 381–395.
- Barrallo-Gimeno, A. and Nieto, M. A. (2005) The Snail genes as inducers of cell movement and survival: Implications in development and cancer. *Development*, 3151–3161.
- Bartel, D. P. (2009) MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 215–233.
- Bax, N. A. M. *et al.* (2011) Epithelial-to-mesenchymal transformation alters electrical conductivity of human epicardial cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(12), 2675–2683.
- Beatty, W. L. (2007) Lysosome repair enables host cell survival and bacterial persistence following Chlamydia trachomatis infection. *Cellular Microbiology*, 9(9), 2141–2152.
- Behrens, J., Lowrick, O., Klein-Hitpass, L. and Birchmeier, W. (1991) The E-cadherin promoter: Functional analysis of a G·C-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(24), 11495–11499.
- Beltran, M. *et al.* (2008) A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Genes and Development*, 22(6), 756–769.
- Bender, C. M. *et al.* (1999) Roles of Cell Division and Gene Transcription in the Methylation of CpG Islands. *Molecular and Cellular Biology*, 19(10), 6690–6698.
- Benito, M. J. *et al.* (2013) Effect of TGF- $\beta$  on ocular surface epithelial cells. *Experimental Eye Research*, 107, 88–100.
- Berx, G. and van Roy, F. (2009) Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1, a003129.
- Bestor, T. H. (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Human Molecular Genetics*, 9(16), 2395–2402.
- Bird, A., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O. J. and Macleod, D. (1985) A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell*, 40(1), 91–99.
- Bird, A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Development*, 6–21.
- Bird, A. P. and Taggart, M. H. (1980) Variable patterns of total DNA and rDNA methylation in animals. *Nucleic Acids Research*, 8(7), 1485–1497
- Bloom, K. and Joglekar, A. (2010) Towards building a chromosome segregation machine. *Nature*, 446–456.
- Bobo, L. *et al.* (1996) Evidence for a predominant proinflammatory conjunctival cytokine response in individuals with trachoma. *Infection and Immunity*, 64(8), 3273–3279.
- Boiko, E. *et al.* (2015) Infection of human retinal pigment epithelium with chlamydia trachomatis. *PLoS ONE*, 10(11), e0141754.
- Bonasio, R., Tu, S. and Reinberg, D. (2010) Molecular signals of epigenetic states. *Science*, 330(6004), 612–616.

- Bose, S. K., Meyer, K., Di Bisceglie, A. M., Ray, R. B. and Ray, R. (2012) Hepatitis C Virus Induces Epithelial-Mesenchymal Transition in Primary Human Hepatocytes. *Journal of Virology*, 86(24), 13621–13628.
- Boulding, T., Wu, F., Zafar, A. and Rao, S. (2015) Multi-Layered Epigenetic Regulatory Mechanisms Mediate Epithelial to Mesenchymal Transition in Cancer. *Journal of Neonatal Biology*, 3(127).
- Bracken, C. P. *et al.* (2008) A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Research*, 68(19), 7846–7854.
- Bratton, D. L. and Henson, P. M. (2011) Neutrophil clearance: When the party is over, clean-up begins. *Trends in Immunology*, 350–357.
- Brenet, F. *et al.* (2011) DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PloS one*, 6(1), e14524.
- Broderick, J. A., Salomon, W. E., Ryder, S. P., Aronin, N. and Zamore, P. D. (2011) Argonaute protein identity and pairing geometry determine cooperativity in mammalian RNA silencing. *RNA*, 17(10), 1858–1869.
- Brown, K. A. *et al.* (2004) Induction by transforming growth factor- $\beta$ 1 of epithelial to mesenchymal transition is a rare event in vitro. *Breast Cancer Research*, 6(3), R215-31.
- Burk, U. *et al.* (2008) A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Reports*, 9(6), 582–589.
- Burton, M. J. *et al.* (2003) Which members of a community need antibiotics to control trachoma? Conjunctival Chlamydia trachomatis infection load in Gambian villages. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(10), 4215–4222.
- Burton, M. J., Bailey, R. L., Jeffries, D., Mabey, D. C. W. and Holland, M. J. (2004) Cytokine and fibrogenic gene expression in the conjunctivas of subjects from a Gambian community where trachoma is endemic. *Infection and Immunity*, 72(12), 7352–7356.
- Burton, M. J. (2007) Trachoma: An overview. *British Medical Bulletin*, 99–116.
- Burton, M. J., Ramadhani, A., *et al.* (2011a) Active trachoma is associated with increased conjunctival expression of IL17A and profibrotic cytokines. *Infection and Immunity*, 79(12), 4977–4983.
- Burton, M. J., Rajak, S. N., *et al.* (2011b) Conjunctival transcriptome in scarring trachoma. *Infection and Immunity*, 79(1), 499–511.
- Burton, M. J. *et al.* (2012) Post-Operative Recurrent Trichomatous Trichiasis Is Associated with Increased Conjunctival Expression of S100A7 (Psoriasin). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(12), e1985.
- Burton, M. J. *et al.* (2015) Pathogenesis of Progressive Scarring Trachoma in Ethiopia and Tanzania and Its Implications for Disease Control: Two Cohort Studies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(5), 1–23.
- Bussemakers, M. J. G., Giroldi, L. A., Van Bokhoven, A. and Schalken, J. A. (1994) Transcriptional regulation of the human E-cadherin gene in human prostate cancer cell lines: Characterization of the human E-cadherin gene promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 203(2), 1284–1290.
- Cai, X., Hagedorn, C. H. and Cullen, B. R. (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 10(12), 1957–1966.
- Caldwell, H. D., Kromhout, J. and Schachter, J. (1981) Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis. *Infection and Immunity*, 31(3), 1161–1176.

- Caley, M. P., Martins, V. L. C. and O'Toole, E. A. (2015) Metalloproteinases and Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 4(4), 225–234.
- Cañedo-Dorantes, L. and Cañedo-Ayala, M. (2019) Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. *International Journal of Inflammation*, 2019, 1–15.
- Cardenas, H. *et al.* (2014) TGF- $\beta$  induces global changes in DNA methylation during the epithelial-to-mesenchymal transition in ovarian cancer cells. *Epigenetics*, 9(11), 1461–1472.
- Di Carlo, S. E. and Peduto, L. (2018) The perivascular origin of pathological fibroblasts. *Journal of Clinical Investigation*, 128(1), 54–63.
- Carmona, F. J. *et al.* (2014) A comprehensive DNA methylation profile of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Research*, 74(19), 5608–5619.
- Carthy, J. M. *et al.* (2015) Tamoxifen Inhibits TGF- $\beta$ -Mediated Activation of Myofibroblasts by Blocking Non-Smad Signaling Through ERK1/2. *Journal of Cellular Physiology*, 230(12), 3084–3092.
- Carver, E. A., Jiang, R., Lan, Y., Oram, K. F. and Gridley, T. (2001) The Mouse Snail Gene Encodes a Key Regulator of the Epithelial-Mesenchymal Transition. *Molecular and Cellular Biology*, 21(23), 8184–8188.
- Ceppi, P. *et al.* (2010) Loss of miR-200c expression induces an aggressive, invasive, and chemoresistant phenotype in non-small cell lung cancer. *Molecular Cancer Research*, 8(9), 1207–1216.
- Chang, J. H. and McCluskey, P. J. (2005) Ocular cicatricial pemphigoid: Manifestations and management. *Current Allergy and Asthma Reports*, 333–338.
- Chang, Y. *et al.* (2017) miR-145-5p inhibits epithelial-mesenchymal transition via the JNK signaling pathway by targeting MAP3K1 in non-small cell lung cancer cells. *Oncology Letters*, 14(6), 6923–6928.
- Chaudhury, A. *et al.* (2010) TGF-beta-mediated phosphorylation of hnRNP E1 induces EMT via transcript-selective translational induction of Dab2 and ILEI. *Nature cell biology*, 12(3), 286–93.
- Chen, A. *et al.* (2014) E-cadherin loss alters cytoskeletal organization and adhesion in non-malignant breast cells but is insufficient to induce an epithelial-mesenchymal transition. *BMC Cancer*, 14(1), 552.
- Chen, C.-R. R., Kang, Y., Siegel, P. M. and Massagué, J. (2002) E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGF $\beta$  receptor to c-myc repression. *Cell*, 110(1), 19–32.
- Chen, D. *et al.* (2015) MiR-373 drives the epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis via the miR-373-TXNIP-HIF1a-TWIST signaling axis in breast cancer. *Oncotarget*, 6(32), 32701–32712.
- Chen, Q., Lipkina, G., Song, Q. and Kramer, R. H. (2004) Promoter methylation regulates cadherin switching in squamous cell carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315(4), 850–856.
- Chen, Q., Zhou, L., Ye, X., Tao, M. and Wu, J. (2020) miR-145-5p suppresses proliferation, metastasis and EMT of colorectal cancer by targeting CDCA3. *Pathology Research and Practice*, 216(4), 152872.
- Chen, Y., Wang, K., Qian, C. N. and Leach, R. (2013) DNA methylation is associated with transcription of Snail and Slug genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430(3), 1083–1090.
- Chien, K. H. *et al.* (2013) Correlation of MicroRNA-145 levels and clinical severity of pterygia. *Ocular Surface*, 11(2), 133–138.
- Choi, S. K. *et al.* (2017) Epigenetic landscape change analysis during human EMT sheds light on a

- key EMT mediator TRIM29. *Oncotarget*, 8(58), 98322–98335.
- Chou, C.-H. *et al.* (2018) miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic acids research*, 46(D1), D296–D302.
- Choudhury, S. R., Cui, Y., Lubecka, K., Stefanska, B. and Irudayaraj, J. (2016) CRISPR-dCas9 mediated TET1 targeting for selective DNA demethylation at BRCA1 promoter. *Oncotarget*, 7(29), 46545–46556.
- Christoffersen, N. R., Silaharoglu, A., Ørom, U. A., Kauppinen, S. and Lund, A. H. (2007) miR-200b mediates post-transcriptional repression of ZFX1B. *RNA*, 13(8), 1172–1178.
- Chui, J. *et al.* (2011) Ophthalmic pterygium: A stem cell disorder with premalignant features. *American Journal of Pathology*, 178(2), 817–827.
- Coles, C. L. *et al.* (2013) Mass distribution of azithromycin for trachoma control is associated with increased risk of azithromycin-resistant streptococcus pneumoniae carriage in young children 6 months after treatment. *Clinical Infectious Diseases*, 56(11), 1519–1526.
- Comijn, J. *et al.* (2001) The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Molecular Cell*. Cell Press, 7(6), 1267–1278.
- Congdon, N., West, S., Vitale, S., Katala, S. and Mmbaga, B. B. O. (1993) Exposure to children and risk of active trachoma in tanzanian women. *American Journal of Epidemiology*, 137(3), 366–372.
- Cooper, D. N. and Krawczak, M. (1989) Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes. *Human Genetics*, 83(2), 181–188.
- Cordeiro, M. F. *et al.* (2003) Novel antisense oligonucleotides targeting TGF- $\beta$  inhibit in vivo scarring and improve surgical outcome. *Gene Therapy*, 59–71.
- Cordeiro, M. F. (2003) Role of transforming growth factor  $\beta$  in conjunctival scarring. in *Clinical Science*, 181–187.
- Cordeiro, M. F., Gay, J. A. and Khaw, P. T. (1999) A New Glaucoma Anti-Scarring Agent. *Ophthalmology & Visual Science*, 40(10), 2225–2234.
- Cousins, S., McCabe, M., Danielpour, D. and Streilein, J. (1991) Identification of transforming growth factor-beta as an immunosuppressive factor in aqueous humor. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 32, 2201–2211.
- de Craene, B. and Berx, G. (2013) Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature reviews. Cancer*, 13(2), 97–110.
- Craig, A. P. *et al.* (2015) Is it time to switch to doxycycline from azithromycin for treating genital chlamydial infections in women? Modelling the impact of autoinoculation from the gastrointestinal tract to the genital tract. *BMC Infectious Diseases*, 15(1), 200.
- Cromwell, E. A. *et al.* (2009) The excess burden of trachomatous trichiasis in women: a systematic review and meta-analysis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.
- D'Amato, N. C., Howe, E. N. and Richer, J. K. (2013) MicroRNA regulation of epithelial plasticity in cancer. *Cancer Letters*, 46–55.
- Darby, I. A., Laverdet, B., Bonté, F. and Desmoulière, A. (2014) Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology Dovepress Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 7–301.
- Darby, I. A. and Hewitson, T. D. (2007) Fibroblast Differentiation in Wound Healing and Fibrosis. *International Review of Cytology*, 257(07), 143–179.
- Darnell, D. K. *et al.* (2006) MicroRNA expression during chick embryo development. *Developmental Dynamics*, 235(11), 3156–3165.
- Dartt, D. A. (1992) Physiology of Tear Production. in *The Dry Eye*, 65–99.

- Das, P. M. and Singal, R. (2004) DNA methylation and cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 4632–4642.
- Davalos, V. *et al.* (2012) Dynamic epigenetic regulation of the microRNA-200 family mediates epithelial and mesenchymal transitions in human tumorigenesis. *Oncogene*, 31(16), 2062–2074.
- Dave, N. *et al.* (2011) Functional cooperation between snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition. *Journal of Biological Chemistry*, 286(14), 12024–12032.
- Dawson, C. *et al.* (1966) Experimental inclusion conjunctivitis in man. *American Journal of Epidemiology*, 84(3), 411–425.
- Deaton, A. M. and Bird, A. (2011) CpG islands and the regulation of transcription. *Genes and Development*, 25(10), 1010–1022.
- Denney, L., Branchett, W., Gregory, L. G., Oliver, R. A. and Lloyd, C. M. (2018) Epithelial-derived TGF- $\beta$ 1 acts as a pro-viral factor in the lung during influenza A infection. *Mucosal Immunology*, 11(2), 523–535.
- Derrick, T. *et al.* (2013) Conjunctival MicroRNA Expression in Inflammatory Trachomatous Scarring. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(3), e2117.
- Derrick, T., Roberts, C. H., Last, A. R., Burr, S. E. and Holland, M. J. (2015) Trachoma and Ocular Chlamydial Infection in the Era of Genomics. *Mediators of Inflammation*, 2015, 791847.
- Derrick, T., Luthert, P. J., *et al.* (2016a) Increased Epithelial Expression of CTGF and S100A7 with Elevated Subepithelial Expression of IL-1 $\beta$  in Trachomatous Trichiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(6), e0004752.
- Derrick, T., Last, A. R., *et al.* (2016b) Inverse relationship between microRNA-155 and -184 expression with increasing conjunctival inflammation during ocular Chlamydia trachomatis infection. *BMC Infectious Diseases*, 16(1), 1–11.
- Derrick, T. *et al.* (2017) miRNAs that associate with conjunctival inflammation and ocular Chlamydia trachomatis infection do not predict progressive disease. *Pathogens and Disease*. Oxford University Press, 75(2), 1–5.
- Derynck, R. and Zhang, Y. E. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. *Nature*, 425(6958), 577–84.
- Desmoulière, A., Chaponnier, C. and Gabbiani, G. (2005) Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair and Regeneration*, 13(1), 7–12.
- Dessus-Babus, S., Darville, T. L., Cuozzo, F. P., Ferguson, K. and Wyrick, P. B. (2002) Differences in innate immune responses (in vitro) to HeLa cells infected with nondisseminating serovar E and disseminating serovar L2 of Chlamydia trachomatis. *Infection and immunity*, 70(6), 3234–48.
- Díaz-López, A. *et al.* (2015) Zeb1 and Snail1 engage miR-200f transcriptional and epigenetic regulation during EMT. *International Journal of Cancer*, 136(4), E62–E73.
- Díaz-López, A., Moreno-Bueno, G. and Cano, A. (2014) Role of microRNA in epithelial to mesenchymal transition and metastasis and clinical perspectives. *Cancer Management and Research*, 205–216.
- Diepenbruck, M. *et al.* (2017) MIR-1199-5p and Zeb1 function in a double-negative feedback loop potentially coordinating EMT and tumour metastasis. *Nature Communications*, 8(1), 1168.
- Ding, X., Park, S. I., McCauley, L. K. and Wang, C. Y. (2013) Signaling between transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and transcription factor SNAI2 represses expression of microRNA mir-203 to promote epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis. *Journal of Biological Chemistry*, 288(15), 10241–10253.

- Distler, J. H. W. *et al.* (2019) Shared and distinct mechanisms of fibrosis. *Nature Reviews Rheumatology*, 15(12), 705–730.
- Dolin, P. J. *et al.* (1998) Trachoma in the Gambia. *British Journal of Ophthalmology*, 82(8), 930–933.
- Dong, N., Xu, B., Benya, S. R. and Tang, X. (2014) MiRNA-26b inhibits the proliferation, migration, and epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 396(1–2), 229–238.
- Dong, X. *et al.* (2017) Force interacts with macromolecular structure in activation of TGF- $\beta$ . *Nature*. Nature Publishing Group, 542(7639), 55–59.
- Dongre, A. and Weinberg, R. A. (2019) New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(2), 69–84.
- Dosanji, A. (2006) Transforming growth factor- $\beta$  expression induced by rhinovirus infection in respiratory epithelial cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 38(12), 911–914.
- Duan, Y. and Chen, Q. (2016) TGF- $\beta$ 1 regulating MIR-205/MIR-195 expression affects the TGF- $\beta$  signal pathway by respectively targeting SMAD2/SMAD7. *Oncology Reports*, 36(4), 1837–1844.
- Dudzic, P. *et al.* (2019) The epigenetic modifier 5-Aza-2-deoxycytidine triggers the expression of CD146 gene in prostate cancer cells. *Anticancer Research*, 39(5), 2395–2403.
- Dugina, V., Fontao, L., Chaponnier, C., Vasiliev, J. and Gabbiani, G. (2001) Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors. *Journal of Cell Science*, 114(18), 3285–3296.
- Ehrlich, M. *et al.* (1982) Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Research*, 10(8), 2709–2721.
- Ellenrieder, V. (2008) TGF $\beta$ -regulated gene expression by Smads and Sp1/KLF-like transcription factors in cancer. *Anticancer Research*, 28(3 A), 1531–1539.
- Elwell, C., Mirrashidi, K. and Engel, J. (2016) Chlamydia cell biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 14(6), 385–400.
- Engelsvold, D. H. *et al.* (2013) MiRNA and mRNA expression profiling identifies members of the miR-200 family as potential regulators of epithelial-mesenchymal transition in pterygium. *Experimental Eye Research*, 115, 189–198.
- Enoch, S. and Leaper, D. J. (2008) Basic science of wound healing. *Surgery*, 31–37.
- Espada, J. *et al.* (2011) Regulation of SNAIL1 and E-cadherin function by DNMT1 in a DNA methylation-independent context. *Nucleic acids research*, 39(21), 9194–205.
- Esteller, M. (2011) Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics*, 861–874.
- Expósito-Villén, A., E Aránega, A., Franco, D., Aránega, A. E. and Franco, D. (2018) Functional role of non-coding RNAs during epithelial-to-mesenchymal transition. *Non-coding RNA*, 4(2), 1–28.
- Faraj, H. G. and Hoang-Xuan, T. (2001) Chronic cicatrizing conjunctivitis. *Current Opinion in Ophthalmology*, 250–257.
- Faraldo, M. L. M., Rodrigo, I., Behrens, J., Birchmeier, W. and Cano, A. (1997) Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in murine keratinocyte cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis. *Molecular Carcinogenesis*, 20(1), 33–47.
- Faris, R. *et al.* (2019) Chlamydia trachomatis Serovars Drive Differential Production of Proinflammatory Cytokines and Chemokines Depending on the Type of Cell Infected. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(November), 1–14.
- Feist, R. M., King, J. L., Morris, R., Witherspoon, C. D. and Guidry, C. (2014) Myofibroblast and extracellular matrix origins in proliferative vitreoretinopathy. *Graefe's Archive for Clinical*

- and *Experimental Ophthalmology*, 252(2), 347–357.
- Feng, X.-H. and Derynck, R. (2005) Specificity and versatility in TGF- $\beta$  signaling through Smads. *Annual review of cell and developmental biology*, 21, 659–93.
- Findlay, V. J. *et al.* (2014) SNAI2 modulates colorectal cancer 5-fluorouracil sensitivity through miR145 repression. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(11), 2713–2726.
- Fintha, A., Gasparics, Á., Rosivall, L. and Sebe, A. (2019) Therapeutic targeting of fibrotic epithelial-mesenchymal transition—an outstanding challenge. *Frontiers in Pharmacology*, 10(388).
- Flaxman, S. R. *et al.* (2017) Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*, 5(12), e1221–e1234.
- Fontana, L. *et al.* (2005) Fibronectin is required for integrin  $\alpha\beta 6$ -mediated activation of latent TGF- $\beta$  complexes containing LTBP-1. *The FASEB Journal*, 19(13), 1798–1808.
- Frick, K. D. *et al.* (2003a) Estimating the burden and economic impact of trachomatous visual loss. *Evidence-Based Eye Care*, 4(4), 210–211.
- Frick, K. D., Hanson, C. L. and Jacobson, G. A. (2003b) Global burden of trachoma and economics of the disease. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 69(5 Suppl), 1–10.
- Friedlander, M. (2007) Fibrosis and diseases of the eye. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(3), 576–586.
- Friedman, R. C., Farh, K. K. H., Burge, C. B. and Bartel, D. P. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19(1), 92–105.
- Fu, S. *et al.* (2017) 5-Aza-2'-deoxycytidine induces human Tenon's capsule fibroblasts differentiation and fibrosis by up-regulating TGF- $\beta$  type I receptor. *Experimental Eye Research*, 165, 47–58.
- Fukagawa, A., Ishii, H., Miyazawa, K. and Saitoh, M. (2015)  $\delta$ EF1 associates with DNMT1 and maintains DNA methylation of the E-cadherin promoter in breast cancer cells. *Cancer Medicine*, 4(1), 125–135.
- Fukao, A. *et al.* (2014) MicroRNAs trigger dissociation of eIF4A1 and eIF4AII from target mRNAs in humans. *Molecular Cell*. Cell Press, 56(1), 79–89.
- Gabbiani, G. (2003) The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *Journal of Pathology*, 200(4), 500–503.
- Galle, E. *et al.* (2020) DNA methylation-driven EMT is a common mechanism of resistance to various therapeutic agents in cancer. *Clinical Epigenetics*, 12(1), 27.
- Galván, J. A. *et al.* (2015) TWIST1 and TWIST2 promoter methylation and protein expression in tumor stroma influence the epithelial-mesenchymal transition-like tumor budding phenotype in colorectal cancer. *Oncotarget*, 6(2), 874–885.
- Gao, W. *et al.* (2019) Promoter Methylation-Regulated miR-145-5p Inhibits Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Progression by Targeting FSCN1. *Molecular Therapy*, 27(2), 365–379.
- Gao, Y., Yan, Y. and Huang, T. (2015) Human aged-related cataracts: Epigenetic suppression of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2-mediated antioxidant system. *Molecular Medicine Reports*, 11(2), 1442–1447.
- Gardiner-Garden, M. and Frommer, M. (1987) CpG Islands in vertebrate genomes. *Journal of Molecular Biology*, 196(2), 261–282.
- Gebert, L. F. R. and MacRae, I. J. (2019) Regulation of microRNA function in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21–37.
- Gehring, M., Reik, W. and Henikoff, S. (2009) DNA demethylation by DNA repair. *Trends in Genetics*, 82–90.
- Gelfman, S., Cohen, N., Yearim, A. and Ast, G. (2013) DNA-methylation effect on cotranscriptional splicing is dependent on GC architecture of the exon-intron structure. *Genome Research*,

23(5), 789–799.

- Gheldof, A. and Berx, G. (2013) Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 317–336.
- Gieling, R. G., Wallace, K. and Han, Y. P. (2009) Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(6).
- Gipson, I. K. *et al.* (2003) Mucin gene expression in immortalized human corneal-limbal and conjunctival epithelial cell lines. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(6), 2496–2506.
- Gipson, I. K. and Argüeso, P. (2003) Role of mucins in the function of the corneal and conjunctival epithelia. *International Review of Cytology*, 231, 1–49.
- Di Girolamo, N., Chui, J., Coroneo, M. T. and Wakefield, D. (2004) Pathogenesis of pterygia: Role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. *Progress in Retinal and Eye Research*, 195–228.
- Giroldi, L. A. *et al.* (1997) Role of E boxes in the repression of E-cadherin expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 241(2), 453–458.
- Goldberg, A. D., Allis, C. D. and Bernstein, E. (2007) Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell*, 635–638.
- Gomez, E. W., Chen, Q. K., Gjorevski, N. and Nelson, C. M. (2010) Tissue geometry patterns epithelial-mesenchymal transition via intercellular mechanotransduction. *Journal of Cellular Biochemistry*, 110(1), 44–51.
- Gong, F. *et al.* (2017) Epigenetic silencing of TET2 and TET3 induces an EMT-like process in melanoma. *Oncotarget*, 8(1), 315–328.
- Gonzalez, A. C. D. O., Andrade, Z. D. A., Costa, T. F. and Medrado, A. R. A. P. (2016) Wound healing - A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 91(5), 614–620.
- Graff, J. R. *et al.* (1995) E-Cadherin Expression Is Silenced by DNA Hypermethylation in Human Breast and Prostate Carcinomas. *Molecular Endocrinology*, 7(2), 5195–5199.
- Grande, M. T. *et al.* (2015) Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nature Medicine*, 21(9), 989–997.
- Grassly, N. C., Ward, M. E., Ferris, S., Mabey, D. C. and Bailey, R. L. (2008) The Natural History of Trachoma Infection and Disease in a Gambian Cohort with Frequent Follow-Up. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Edited by J. Schachter, 2(12), e341.
- Graw, J. (2010) Eye development. in *Current Topics in Developmental Biology*. Academic Press Inc., 343–386.
- Grayston, J. T., Wang, S. -p., Yeh, L. -j. and Kuo, C. -c. (1985) Importance of Reinfection in the Pathogenesis of Trachoma. *Clinical Infectious Diseases*, 7(6), 717–725.
- Greenberg, M. V. C. and Bourc'his, D. (2019) The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 590–607.
- Gregory, P. A., Bracken, C. P., Bert, A. G. and Goodall, G. J. (2008a) MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle*, 7(20), 3112–3117.
- Gregory, P. A., Bert, A. G., *et al.* (2008b) The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature Cell Biology*, 10(5), 593–601.
- Gregory, P. A. *et al.* (2011) An autocrine TGF- $\beta$ /ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition. *Molecular Biology of the Cell*, 22(10), 1686–1698.
- Gregory, R. I. *et al.* (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*,



432(7014), 235–240.

- Grehn, F. *et al.* (2007) Factors Affecting the Outcome of Trabeculectomy. An Analysis Based on Combined Data from Two Phase III Studies of an Antibody to Transforming Growth Factor  $\beta$ 2, CAT-152. *Ophthalmology*, 114(10), 1831–8.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., Van Dongen, S. and Enright, A. J. (2008) miRBase: Tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, 36.
- Grigore, A., Jolly, M., Jia, D., Farach-Carson, M. and Levine, H. (2016) Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. *Journal of Clinical Medicine*, 5(5), 51.
- Grimes, H. L., Chan, T. O., Zweidler-McKay, P. A., Tong, B. and Tschlis, P. N. (1996) The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Molecular and Cellular Biology*, 16(11), 6263–6272.
- Guarino, M., Tosoni, A. and Nebuloni, M. (2009) Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition. *Human Pathology*, 40(10), 1365–1376.
- Guo, S. and DiPietro, L. A. (2010) Critical review in oral biology & medicine: Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, 89(3), 219–229.
- Ha, M. and Kim, V. N. (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 509–524.
- Hackett, T. L. *et al.* (2009) Induction of epithelial-mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor- $\beta$ 1. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 180(2), 122–133.
- Hafner, L. M. (2015) Pathogenesis of fallopian tube damage caused by Chlamydia trachomatis infections. *Contraception*, 108–115.
- Hallgren, O. *et al.* (2012) Splicosomal and serine and arginine-rich splicing factors as targets for TGF- $\beta$ . *Fibrogenesis and Tissue Repair*, 5(1), 6.
- Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R. and Hannon, G. J. (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, 293(5532), 1146–1150.
- Hamrah, P. and Sahin, A. (2013) Limbus and Corneal Epithelium. in Holland, E., Mannis, M., and Lee, B. (eds) *Ocular Surface Disease: Cornea, Conjunctiva and Tear Film*. London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sidney, Toronto: Elsevier Inc., 29–34.
- Han, J. *et al.* (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes and Development*, 18(24), 3016–3027.
- Harvey, T., Alzaga Fernandez, A., Patel, R., Goldman D. and J., C. (2013) Conjunctival Anatomy and Physiology. in Holland, E., Mannis, M., and Lee, B. (eds) *Ocular Surface Disease: Cornea, Conjunctiva and Tear Film*. London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sidney, Toronto: Elsevier Inc., 23–27.
- Hatton, M. P. and Rubin, P. A. D. (2005) Conjunctival regeneration. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 94, 125–140.
- Hay, E. D. (1995) An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta anatomica*, 154(1), 8–20.
- Hay, E. D. (2005) EMT Concept and Examples from the Vertebrate Embryo. in Savagner, P. (ed.) *Rise and fall of epithelial phenotype: concepts of epithelial-mesenchymal transition*. Berlin: Springer, 1–11.
- He, S., Li, X., Chan, N. and Hinton, D. R. (2013) Review: Epigenetic mechanisms in ocular disease. *Molecular Vision*, 19(September 2012), 665–674.
- He, S. *et al.* (2015) Inhibition of DNA methylation and methyl-CpG-binding protein 2 suppresses RPE transdifferentiation: Relevance to proliferative vitreoretinopathy. *Investigative*

- Ophthalmology and Visual Science*, 56(9), 5579–5589.
- Heldin, C.-H. and Moustakas, A. (2012) Role of Smads in TGF $\beta$  signaling. *Cell and tissue research*, 347(1), 21–36.
- Hemavathy, K., Guru, S. C., Harris, J., Chen, J. D. and Ip, Y. T. (2000) Human Slug Is a Repressor That Localizes to Sites of Active Transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 20(14), 5087–5095.
- Hennig, G., Lowrick, O., Birchmeier, W. and Behrens, J. (1996) Mechanisms identified in the transcriptional control of epithelial gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 271(1), 595–602.
- Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J. J., Gabbiani, G. and Chaponnier, C. (2001a) Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Molecular Biology of the Cell*, 12(9), 2730–2741.
- Hinz, Boris, Mastrangelo, D., Iselin, C. E., Chaponnier, C. and Gabbiani, G. (2001b) Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *American Journal of Pathology*, 159(3), 1009–1020.
- Hinz, B., Pittet, P., Smith-Clerc, J., Chaponnier, C. and Meister, J.-J. (2004) Myofibroblast development is characterized by specific cell-cell adherens junctions. *Molecular biology of the cell*, 15(9), 4310–20.
- Hinz, B. (2007) Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(3), 526–537.
- Hinz, B. *et al.* (2007) The myofibroblast: One function, multiple origins. *American Journal of Pathology*, 170(6), 1807–1816.
- Hinz, B. *et al.* (2012) Recent developments in myofibroblast biology: Paradigms for connective tissue remodeling. *American Journal of Pathology*, 180(4), 1340–1355.
- Hinz, B. (2015a) Myofibroblasts. *Experimental Eye Research*, 142, 56–70.
- Hinz, B. (2015b) The extracellular matrix and transforming growth factor- $\beta$ 1: Tale of a strained relationship. *Matrix Biology*, 54–65.
- Hinz, B. and Gabbiani, G. (2003) Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Current Opinion in Biotechnology*, 538–546.
- Hoerster, R. *et al.* (2014) Upregulation of TGF- $\beta$ 1 in experimental proliferative vitreoretinopathy is accompanied by epithelial to mesenchymal transition. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 252(1), 11–16.
- Hogan, R. J., Mathews, S. A., Mukhopadhyay, S., Summersgill, J. T. and Timms, P. (2004) Chlamydial Persistence: Beyond the Biphasic Paradigm. *Infection and Immunity*, 1843–1855.
- Holland, M. J. *et al.* (1996) T helper type-1 (Th1)/Th2 profiles of peripheral blood mononuclear cells (PBMC); responses to antigens of Chlamydia trachomatis in subjects with severe trachomatous scarring. *Clinical and Experimental Immunology*, 105(3), 429–436.
- Hollestelle, A. *et al.* (2013) Loss of E-cadherin is not a necessity for epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 138(1), 47–57.
- Holliday, R. and Grigg, G. W. (1993) DNA methylation and mutation. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 285(1), 61–67.
- Hong, J. *et al.* (2011) Phosphorylation of serine 68 of Twist1 by MAPKs stabilizes Twist1 protein and promotes breast cancer cell invasiveness. *Cancer Research*, 71(11), 3980–3990.
- Hou, L. K. *et al.* (2016) miR-340 and ZEB1 negative feedback loop regulates TGF- $\beta$ -mediated breast cancer progression. *Oncotarget*, 7(18), 26016–26026.
- Hu, B., Gharaee-Kermani, M., Wu, Z. and Phan, S. H. (2010) Epigenetic regulation of myofibroblast differentiation by DNA methylation. *American Journal of Pathology*, 177(1), 21–28.

- Hu, H. Y. *et al.* (2009) Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics*, 10, 413.
- Hu, V. H. *et al.* (2010) Epidemiology and control of trachoma: Systematic review. *Tropical Medicine and International Health*, 673–691.
- Hu, V. H. *et al.* (2012) Innate immune responses and modified extracellular matrix regulation characterize bacterial infection and cellular/connective tissue changes in scarring trachoma. *Infection and Immunity*, 80(1), 121–130.
- Hu, V. H., Holland, M. J. and Burton, M. J. (2013) Trachoma: Protective and Pathogenic Ocular Immune Responses to *Chlamydia trachomatis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(2), e2020.
- Huang, R. Y. J. *et al.* (2013) An EMT spectrum defines an anoikis-resistant and spheroidogenic intermediate mesenchymal state that is sensitive to e-cadherin restoration by a src-kinase inhibitor, saracatinib (AZD0530). *Cell Death and Disease*, 4(11), e915–e915.
- Huang, R. Y. J., Guilford, P. and Thiery, J. P. (2012) Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cell Science*, 125(19), 4417–4422.
- Huntzinger, E. and Izaurralde, E. (2011) Gene silencing by microRNAs: Contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, 99–110.
- Huveneers, S., Truong, H., Fässler, R., Sonnenberg, A. and Danen, E. H. J. (2008) Binding of soluble fibronectin to integrin  $\alpha 5\beta 1$  - Link to focal adhesion redistribution and contractile shape. *Journal of Cell Science*, 121(15), 2452–2462.
- Huveneers, S. and Danen, E. H. J. (2009) Adhesion signaling - Crosstalk between integrins, Src and Rho. *Journal of Cell Science*, 1059–1069.
- Hybiske, K. and Stephens, R. S. (2007) Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(27), 11430–11435.
- Igietseme, J. U. *et al.* (2015) Role of Epithelial-Mesenchyme Transition in *Chlamydia* Pathogenesis. *PloS one*, 10(12), e0145198.
- Igietseme, J. U. *et al.* (2018) Molecular pathogenesis of *Chlamydia* disease complications: Epithelial-mesenchymal transition and fibrosis. *Infection and Immunity*, 86(1).
- Igietseme, J. U. *et al.* (2020) Epidermal Growth Factor Receptor and Transforming Growth Factor  $\beta$  Signaling Pathways Cooperate To Mediate *Chlamydia* Pathogenesis. *Infection and immunity*, 88(4).
- de Jongh, R. U., Wederell, E., Lovicu, F. J. and McAvoy, J. W. (2005) Transforming Growth Factor- $\beta$ -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in the Lens: A Model for Cataract Formation. *Cells Tissues Organs*, 179(1–2), 43–55.
- Irizarry, R. A. *et al.* (2009) Genome-wide methylation analysis of human colon cancer reveals similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nature genetics*, 41(2), 178.
- Jampel, H. D., Roche, N., Stark, W. J. and Roberts, A. B. (1990) Transforming growth factor-beta in human aqueous humor. *Current eye research*, 9(10), 963–9.
- Jia, D. *et al.* (2017) Distinguishing mechanisms underlying EMT tristability. *Cancer Convergence*, 1(1), 2.
- Jiang, C., Han, L., Su, B., Li, W.-H. and Zhao, Z. (2007) Features and trend of loss of promoter-associated CpG islands in the human and mouse genomes. *Molecular biology and evolution*, 24(9), 1991–2000.
- Jimenez, V., Gelderblom, H. C., Mann Flueckiger, R., Emerson, P. M. and Haddad, D. (2015) Mass Drug Administration for Trachoma: How Long Is Not Long Enough? *PLoS Neglected Tropical*

- Diseases*, 9(3), e0003610.
- Jin, S. S.-L. *et al.* (2015) Epigenetic changes of the Klotho gene in age-related cataracts. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19, 2544–2551.
- Jin, Z. and Liu, Y. (2018) DNA methylation in human diseases. *Genes and Diseases*, 1–8.
- Jo, M. H. *et al.* (2015) Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. *Molecular Cell*, 59(1), 117–124.
- Johansson, K. A. and Grapin-Botton, A. (2002) Development and diseases of the pancreas. *Clinical genetics*, 62(1), 14–23.
- Johnson, M. (2006) What controls aqueous humour outflow resistance? *Experimental Eye Research*, 545–557.
- Jolly, M. K. *et al.* (2015) Implications of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype in metastasis. *Frontiers in Oncology*, 5(JUN).
- Jolly, M. K. *et al.* (2016) Stability of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype. *Oncotarget*, 7(19), 27067–27084.
- Jolly, M. K. *et al.* (2019) Hybrid epithelial/mesenchymal phenotypes promote metastasis and therapy resistance across carcinomas. *Pharmacology and Therapeutics*, 161–184.
- Jonas, S. and Izaurralde, E. (2015) Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature Reviews Genetics*, 421–433.
- Jones, P. A. (1999) The DNA methylation paradox. *Trends in genetics*, 15(1), 34–7.
- Jones, P. A. (2012) Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 484–492.
- Jones, P. A. and Takai, D. (2001) The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, 1068–1070.
- Kague, E. *et al.* (2010) Methylation status of CDH1 gene in samples of gastric mucous from Brazilian patients with chronic gastritis infected by Helicobacter pylori. *Arquivos de Gastroenterologia*, 47(1), 7–12.
- Kalluri, R. and Neilson, E. G. (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1776–1784.
- Kalluri, R. and Weinberg, R. A. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1420–8.
- Kang, Y., Chen, C.-R. and Massagué, J. (2003) A self-enabling TGF $\beta$  response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Molecular cell*, 11(4), 915–26.
- Kato, N. *et al.* (2007)  $\beta$ -catenin activation and epithelial-mesenchymal transition in the pathogenesis of pterygium. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(4), 1511–1517.
- Kato, N. and Shimmura, S. (2008) Epithelial-mesenchymal transition and the pathogenesis of pterygium. *Inflammation and Regeneration*, 28(5), 434–439.
- Kawakita, T. *et al.* (2005) Intrastromal invasion by limbal epithelial cells is mediated by epithelial-mesenchymal transition activated by air exposure. *American Journal of Pathology*, 167(2), 381–393.
- Kawashima, M. *et al.* (2010) Subepithelial corneal fibrosis partially due to epithelial-mesenchymal transition of ocular surface epithelium. *Molecular Vision 2010*;, 16, 2727–2732.
- Ke, X. S. *et al.* (2010) Global profiling of histone and DNA methylation reveals epigenetic-based regulation of gene expression during epithelial to mesenchymal transition in prostate cells. *BMC Genomics*, 11(1).
- Kessler, M. *et al.* (2012) Chlamydia trachomatis disturbs epithelial tissue homeostasis in fallopian

- tubes via paracrine Wnt signaling. *American Journal of Pathology*, 180(1), 186–198.
- Kessler, M. *et al.* (2019) Chronic Chlamydia infection in human organoids increases stemness and promotes age-dependent CpG methylation. *Nature Communications*, 10(1), 1–14.
- Khalil, H. *et al.* (2017) Fibroblast-specific TGF- $\beta$ -Smad2/3 signaling underlies cardiac fibrosis. in *Journal of Clinical Investigation*, 3770–3783.
- Khaw, P., Grehn, F., Hollo, G., Overton, B., Wilson, R., Vogel, R., Smith, Z. and King, U. (2007) A phase III study of subconjunctival human anti-transforming growth factor beta(2) monoclonal antibody (CAT-152) to prevent scarring after first-time trabeculectomy. *Ophthalmology*, 114(10), 1822–1830.
- Khvorova, A., Reynolds, A. and Jayasena, S. D. (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115(2), 209–216.
- Kicic, A. *et al.* (2010) Decreased fibronectin production significantly contributes to dysregulated repair of asthmatic epithelium. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 181(9), 889–898.
- Kiesslich, T., Pichler, M. and Neureiter, D. (2013) Epigenetic control of epithelial-mesenchymal-transition in human cancer. *Molecular and clinical oncology*, 1(1), 3–11.
- Kim, J. H., Jiang, S., Elwell, C. A. and Engel, J. N. (2011) Chlamydia trachomatis Co-opts the FGF2 Signaling Pathway to Enhance Infection. *PLoS Pathogens*, 7(10), e1002285.
- Kim, K. K. *et al.* (2006) Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(35), 13180–13185.
- Kim, K. W. and Kim, J. C. (2018) Current approaches and future directions in the management of pterygium. *International Journal of Ophthalmology*, 11(5), 709–711.
- Kim, K. W., Park, S. H. and Kim, J. C. (2016) Fibroblast biology in pterygia. *Experimental Eye Research*, 142, 32–39.
- Kim, M. H. *et al.* (2008) Dynamics of neutrophil infiltration during cutaneous wound healing and infection using fluorescence imaging. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(7), 1812–1820.
- Kim, S. K. (2006) Update on ocular graft versus host disease. *Current Opinion in Ophthalmology*, 344–348.
- Kim, V. N. and Nam, J. W. (2006) Genomics of microRNA. *Trends in Genetics*, 165–173.
- Klingberg, F. *et al.* (2018) The fibronectin ED-A domain enhances recruitment of latent TGF- $\beta$ -binding protein-1 to the fibroblast matrix. *Journal of Cell Science*, 131(5).
- Klose, R. J. and Bird, A. P. (2006) Genomic DNA methylation: The mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences*, 89–97.
- Koizume, S. (2002) Heterogeneity in the modification and involvement of chromatin components of the CpG island of the silenced human CDH1 gene in cancer cells. *Nucleic Acids Research*, 30(21), 4770–4780.
- Kolb, M., Margetts, P. J., Anthony, D. C., Pitossi, F. and Gauldie, J. (2001) Transient expression of IL-1 $\beta$  induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 107(12), 1529–1536.
- Kolesnikoff, N. *et al.* (2014) Specificity protein 1 (Sp1) maintains basal epithelial expression of the mir-200 family: Implications for epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Biological Chemistry*, 289(16), 11194–11205.
- Korpal, M., Lee, E. S., Hu, G. and Kang, Y. (2008) The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *Journal of Biological Chemistry*, 283(22), 14910–

14914.

- Kozomara, A., Birgaoanu, M. and Griffiths-Jones, S. (2018) miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, 47, 155–162.
- Krstic, J. and Santibanez, J. F. (2014) Transforming Growth Factor-Beta and Matrix Metalloproteinases: Functional Interactions in Tumor Stroma-Infiltrating Myeloid Cells.
- Kubo, E., Hasanova, N., Sasaki, H. and Singh, D. P. (2013) Dynamic and differential regulation in the microRNA expression in the developing and mature cataractous rat lens. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(9), 1146–1159.
- Kumar, Y. and Valdivia, R. H. (2008) Actin and Intermediate Filaments Stabilize the Chlamydia trachomatis Vacuole by Forming Dynamic Structural Scaffolds. *Cell Host and Microbe*, 4(2), 159–169.
- Lamouille, S., Connolly, E., Smyth, J. W., Akhurst, R. J. and Derynck, R. (2012) TGF- $\beta$ -induced activation of mTOR complex 2 drives epithelial-mesenchymal transition and cell invasion. *Journal of cell science*, 125(Pt 5), 1259–73.
- Lamouille, S., Xu, J. and Derynck, R. (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(3), 178–96.
- Landgraf, P. *et al.* (2007) A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. *Cell*, 129(7), 1401–1414.
- Lang, G. K. and Lang, G. E. (2006) Conjunctiva. in Lang, G. K. (ed.) *Ophthalmology A Pocket Textbook Atlas*. 2nd edn. Stuttgart, New York: Thieme, 67–114.
- Larsen, F., Gundersen, G., Lopez, R. and Prydz, H. (1992) CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics*, 13(4), 1095–1107.
- Laurent, L. *et al.* (2010) Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Research*, 20(3), 320–331.
- Lawrence, M., Daujat, S. and Schneider, R. (2016) Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends in Genetics*, 42–56.
- Lech, M. and Anders, H. J. (2013) Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 989–997.
- Lee, E. *et al.* (2016) DNMT1 Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cells, Which Promotes Prostate Cancer Metastasis. *Neoplasia*, 18(9), 553–566.
- Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R. and Thompson, E. W. (2006) The epithelial-mesenchymal transition: New insights in signaling, development, and disease. *Journal of Cell Biology*, 172(7), 973–981.
- Lee, J. O. *et al.* (2005) Hepatitis B virus X protein represses E-cadherin expression via activation of DNA methyltransferase 1. *Oncogene*, 24(44), 6617–6625.
- Lee, K.-Y. *et al.* (2006) NF- $\kappa$ B and Activator Protein 1 Response Elements and the Role of Histone Modifications in IL-1 $\beta$ -Induced TGF- $\beta$ 1 Gene Transcription. *The Journal of Immunology*, 176(1), 603–615.
- Lee, K. A. and Nelson, C. M. (2012) New Insights into the Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition and Tissue Fibrosis. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 294, 171–221
- Lee, K. J., Lee, J. Y., Lee, S. H. and Choi, T. H. (2013) Accelerating repaired basement membrane after bevacizumab treatment on alkali-burned mouse cornea. *BMB Reports*, 46(4), 195–200.
- Lee, M. J. *et al.* (2014) Genome-wide DNA methylation profiles according to Chlamydomyces psittaci infection and the response to doxycycline treatment in ocular adnexal lymphoma. *Molecular Vision*, 20(July), 1037–1047.

- Lee, M. K. *et al.* (2007) TGF- $\beta$  activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO Journal*, 26(17), 3957–3967.
- Lee, Y. *et al.* (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415–419.
- Lee, Y. *et al.* (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO Journal*, 23(20), 4051–4060.
- Lei, C. *et al.* (2017) MIR-143 & MIR-145 inhibit gastric cancer cell migration & metastasis by suppressing MYO6. *Cell Death and Disease*, 8(10), e3101.
- Leonardi, A. (2013) Allergy and allergic mediators in tears. *Experimental Eye Research*, 117, 106–117.
- Leonardi, A., Motterle, L. and Bortolotti, M. (2008) Allergy and the eye. *Clinical and Experimental Immunology*, 17–21.
- Lewis, M. E. *et al.* (2014) Morphologic and molecular evaluation of Chlamydia trachomatis growth in human endocervix reveals distinct growth patterns. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(JUN), 71.
- Li, A. *et al.* (2010) Pancreatic cancers epigenetically silence SIP1 and hypomethylate and overexpress miR-200a/200b in association with elevated circulating miR-200a and miR-200b levels. *Cancer Research*, 70(13), 5226–5237.
- Li, B. *et al.* (2016) Relationship between the altered expression and epigenetics of GSTM3 and age-related cataract. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 57(11), 4721–4732.
- Li, E. and Zhang, Y. (2014) DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(5).
- Li, F. *et al.* (2014) Expression and methylation of DNA repair genes in lens epithelium cells of age-related cataract. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 766–767, 31–36.
- Li, S. *et al.* (2018) Inhibition of Raf1 ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis through attenuation of TGF- $\beta$ 1 signaling. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 315(2), L241–L247.
- Lim, S. O. *et al.* (2008) Epigenetic Changes Induced by Reactive Oxygen Species in Hepatocellular Carcinoma: Methylation of the E-cadherin Promoter. *Gastroenterology*, 135(6), 2128–40, 2140.e1–8.
- Lin, Y., Dong, C. and Zhou, B. P. (2014) Epigenetic regulation of EMT: the Snail story. *Current pharmaceutical design*, 20(11), 1698–705.
- Lin, Y. Te and Wu, K. J. (2020) Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition: Focusing on hypoxia and TGF- $\beta$  signaling. *Journal of Biomedical Science*, 39.
- Lindahl, T. (1982) DNA Repair Enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 51(1), 61–87.
- Lister, R. *et al.* (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 462(7271), 315–322.
- Little, K., Ma, J. H., Yang, N., Chen, M. and Xu, H. (2018) Myofibroblasts in macular fibrosis secondary to neovascular age-related macular degeneration - the potential sources and molecular cues for their recruitment and activation. *EBioMedicine*, 283–291.
- Liu, M. *et al.* (2018) Hypoxia-induced activation of Twist/miR-214/E-cadherin axis promotes renal tubular epithelial cell mesenchymal transition and renal fibrosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(3), 2324–2330.
- Liu, Y. N. *et al.* (2013) MiR-1 and miR-200 inhibit EMT via Slug-dependent and tumorigenesis via Slug-independent mechanisms. *Oncogene*, 32(3), 296–306.
- Liu, Z. *et al.* (2019) Analysis of genome-wide in cell free DNA methylation: Progress and prospect.

*Analyst*, 5912–5922.

- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 C T Method. *Methods*, 25, 402–408.
- Loh *et al.* (2019) The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells*, 8(10), 1118.
- Lombaerts, M. *et al.* (2006) E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *British Journal of Cancer*, 94(5), 661–671.
- Long, J., Zuo, D. and Park, M. (2005) Pc2-mediated Sumoylation of Smad-interacting Protein 1 Attenuates Transcriptional Repression of E-cadherin. *Journal of Biological Chemistry*, 280(42), 35477–35489.
- Long, X. and Miano, J. M. (2011) Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) utilizes distinct pathways for the transcriptional activation of microRNA 143/145 in human coronary artery smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 286(34), 30119–30129.
- López-Nouoa, J. M., Nieto, M. A., López-Nouoa, J. M. and Nieto, M. A. (2009) Inflammation and EMT: An alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Molecular Medicine*, 1(6–7), 303–314.
- Lovisa, S. *et al.* (2015) Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nature Medicine*, 21(9), 998–1009.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Lu, C. *et al.* (2019) Coordination between TGF- $\beta$  cellular signaling and epigenetic regulation during epithelial to mesenchymal transition. *Epigenetics and Chromatin*, 12(1), 11.
- Lu, M., Jolly, M. K., Levine, H., Onuchic, J. N. and Ben-Jacob, E. (2013) MicroRNA-based regulation of epithelial-hybrid-mesenchymal fate determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(45), 18144–18149.
- Lu, W. and Kang, Y. (2019) Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis. *Developmental Cell*, 49(3), 361–374.
- Lu, Z.-R., Vaidya, A., Wang, H. and Qian, V. (2019) Extradomain-B Fibronectin is a molecular marker of invasive breast cancer cells. *bioRxiv Cancer Biology*, 743500.
- Ludwig, N. *et al.* (2016) Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Research*, 44(8), 3865–3877.
- Luis Morgado-Pascual, J. *et al.* (2018) Epigenetic Modification Mechanisms Involved in Inflammation and Fibrosis in Renal Pathology. *Mediators Inflamm.*, 2018, 2931049.
- Lujambio, A. *et al.* (2007) Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Research*, 67(4), 1424–1429.
- Luo, G. *et al.* (2019) DNA methylation regulates corneal epithelial wound healing by targeting miR-200a and CDKN2B. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 60(2), 650–660.
- Lynch, M. D. and Watt, F. M. (2018) Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. *Journal of Clinical Investigation*, 128(1), 26–35.
- Ma, L. *et al.* (2010) MiR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nature Cell Biology*, 12(3), 247–256.
- Mabey, D. C. W., Hu, V., Bailey, R. L., Burton, M. J. and Holland, M. J. (2014) Towards a safe and effective chlamydial vaccine: Lessons from the eye. *Vaccine*, 32(14), 1572–1578.
- Mabey, D. C. W. *et al.* (1993) Conjunctival Scarring in Trachoma Is Associated with Depressed Cell-Mediated Immune Responses to Chlamydial Antigens. *Journal of Infectious Diseases*, 168(6), 1528–1531.



- MacLean, A. L., Hong, T. and Nie, Q. (2018) Exploring intermediate cell states through the lens of single cells. *Current Opinion in Systems Biology*, 9, 32–41.
- MacRae, I. J., Zhou, K. and Doudna, J. A. (2007) Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nature Structural and Molecular Biology*, 14(10), 934–940.
- Maeda, M. *et al.* (2017) Effects of Gelatin Hydrogel Containing Anti-Transforming Growth Factor- $\beta$  Antibody in a Canine Filtration Surgery Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 985.
- Maeda, M., Johnson, K. R. and Wheelock, M. J. (2005) Cadherin switching: Essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. *Journal of Cell Science*, 118(5), 873–887.
- Majewski, J. and Ott, J. (2002) Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome. *Genome Research*, 1827–1836.
- Malouf, G. G. *et al.* (2013) Architecture of epigenetic reprogramming following Twist1-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Genome Biology*, 14(12), R144.
- Mann, J. and Mann, D. A. (2013) Epigenetic regulation of wound healing and fibrosis. *Current Opinion in Rheumatology*, 25(1), 101–107.
- Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C. and Jaillon, S. (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 11, 519–531.
- Marić, V. (2015) Chlamydia trachomatis kao uzročnik trahoma. *Praxis medica*, 44(4), 55–60.
- Massagué, J. (2012) TGF $\beta$  signalling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, 616–630.
- Massagué, J., Seoane, J. and Wotton, D. (2005) Smad transcription factors. *Genes & development*, 19(23), 2783–810.
- Maunakea, A. K. *et al.* (2010) Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature*, 466(7303), 253–257.
- McDermott, A. M. (2013) Antimicrobial compounds in tears. *Experimental Eye Research*, 112, 53–61.
- McDonald, O. G., Wu, H., Timp, W., Doi, A. and Feinberg, A. P. (2011) Genome-scale epigenetic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature Structural and Molecular Biology*, 18(8), 867–874.
- Mead, A. L., Wong, T. T. L., Cordeiro, M. F., Anderson, I. K. and Khaw, P. T. (2003) Evaluation of anti-TGF- $\beta$ 2 antibody as a new postoperative anti-scarring agent in glaucoma surgery. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(8), 3394–3401.
- Medvedeva, Y. A. *et al.* (2010) Intergenic, gene terminal, and intragenic CpG islands in the human genome. *BMC Genomics*, 11(1), 48.
- Meek, K. M. and Knupp, C. (2015) Corneal structure and transparency. *Progress in Retinal and Eye Research*, 34, 1–16.
- Mei, L.-L. *et al.* (2017) miR-145-5p Suppresses Tumor Cell Migration, Invasion and Epithelial to Mesenchymal Transition by Regulating the Sp1/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1833.
- Meijer, H. A., Smith, E. M. and Bushell, M. (2014) Regulation of miRNA strand selection: Follow the leader? in *Biochemical Society Transactions*, 42, 1135–1140.
- Mendez, M. G., Kojima, S.-I. and Goldman, R. D. (2010) Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *The FASEB Journal*. FASEB, 24(6), 1838–1851.
- Micallef, L. *et al.* (2012) The myofibroblast, multiple origins for major roles in normal and pathological tissue repair. *Fibrogenesis and Tissue Repair*, 5(SUPPL.1), S5.
- Mittal, V. (2018) Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 13(1), 395–412.

- Miyairi, I., Mahdi, O. S., Ouellette, S. P., Belland, R. J. and Byrne, G. I. (2006) Different Growth Rates of Chlamydia trachomatis Biovars Reflect Pathotype. *The Journal of Infectious Diseases*, 194(3), 350–357.
- Miyazono, K. (2009) Transforming growth factor- $\beta$  signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, 85(8), 314–323.
- Moes, M. *et al.* (2012) A novel network integrating a mirna-203/snai1 feedback loop which regulates epithelial to mesenchymal transition. *PLoS ONE*, 7(4), e35440.
- Munger, J. S. *et al.* (1999) The integrin  $\alpha\beta 6$  binds and activates latent TGF $\beta$ 1: A mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell*, 96(3), 319–328.
- Nakajima, Y., Yamagishi, T., Hokari, S. and Nakamura, H. (2000) Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: roles of transforming growth factor (TGF)-beta and bone morphogenetic protein (BMP). *The Anatomical record*, 258(2), 119–27.
- Nam, J. S., Ino, Y., Kanai, Y., Sakamoto, M. and Hirohashi, S. (2004) 5-Aza-2'-deoxycytidine restores the E-cadherin system in E-cadherin-silenced cancer cells and reduces cancer metastasis. *Clinical and Experimental Metastasis*, 21(1), 49–56.
- Nanchahal, J. and Hinz, B. (2016) Strategies to overcome the hurdles to treat fibrosis, a major unmet clinical need. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(27), 7291–7293.
- Natividad, A. *et al.* (2010) Human conjunctival transcriptome analysis reveals the prominence of innate defense in Chlamydia trachomatis infection. *Infection and Immunity*, 78(11), 4895–4911.
- Neves, R. *et al.* (2010) Role of DNA methylation in miR-200c/141 cluster silencing in invasive breast cancer cells. *BMC Research Notes*, 3, 219.
- Niehrs, C. (2012) The complex world of WNT receptor signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(12), 767–79.
- Nieto, M. A., Sargent, M. G., Wilkinson, D. G. and Cooke, J. (1994) Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science*, 264(5160), 835–839.
- Nieto, M. A. (2009) Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: Old views and new perspectives. *International Journal of Developmental Biology*, 53(8–10), 1541–1547.
- Nieto, M. A. A., Huang, R. Y.-J. Y. J., Jackson, R. A. A. and Thiery, J. P. P. (2016) Emt: 2016. *Cell*, 166(1), 21–45.
- Nilsson, G. M. A., Akhtar, N., Kannius-Janson, M. and Baeckström, D. (2014) Loss of E-cadherin expression is not a prerequisite for c-erbB2-induced epithelial-mesenchymal transition. *International Journal of Oncology*, 45(1), 82–94.
- Nishimura, G. *et al.* (2006)  $\delta$ EF1 Mediates TGF- $\beta$  Signaling in Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation. *Developmental Cell*, 11(1), 93–104.
- Novak, M. L. and Koh, T. J. (2013) Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair. *American Journal of Pathology*, 1352–1363.
- Ogawa, Y. *et al.* (2009) Epithelial mesenchymal transition in human ocular chronic graft-versus-host disease. *American Journal of Pathology*, 175(6), 2372–2381.
- Oldenburg, C. E. (2019) Editorial: One size does not fit all: Achieving trachoma control by 2030. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1189–1190.
- Olena, A. F. and Patton, J. G. (2010) Genomic organization of microRNAs. *Journal of Cellular Physiology*, 540–545.
- Olive, A. J. *et al.* (2014) Chlamydia trachomatis-Induced Alterations in the Host Cell Proteome Are

- Required for Intracellular Growth. *Cell Host and Microbe*, 15, 113–124.
- Ono, S. J. and Abelson, M. B. (2005) Allergic conjunctivitis: Update on pathophysiology and prospects for future treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(1), 118–122.
- Pakshir, P. and Hinz, B. (2018) The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication. *Matrix Biology*, 81–93.
- Palsamy, P., Ayaki, M., Elanchezian, R. and Shinohara, T. (2012) Promoter demethylation of Keap1 gene in human diabetic cataractous lenses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 423(3), 542–548.
- Palsamy, P. *et al.* (2014) Methylglyoxal induces endoplasmic reticulum stress and DNA demethylation in the Keap1 promoter of human lens epithelial cells and age-related cataracts. *Free Radical Biology and Medicine*, 72, 134–148.
- Pankov, R. and Yamada, K. M. (2002) Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science*, 115(20), 3861–3863.
- Park, G. Bin *et al.* (2014) The epstein-barr virus causes epithelial-mesenchymal transition in human corneal epithelial cells Via Syk/Src and Akt/Erk signaling pathways. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 55(3), 1770–1779.
- Park, H. Y. L., Kim, J. H. and Park, C. K. (2013) VEGF induces TGF- $\beta$ 1 expression and myofibroblast transformation after glaucoma surgery. *American Journal of Pathology*, 182(6), 2147–2154.
- Park, S. M., Gaur, A. B., Lengyel, E. and Peter, M. E. (2008) The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes and Development*, 22(7), 894–907.
- Pasquale, L. R., Dorman-Pease, M. E., Luty, G. A., Quigley, H. A. and Jampel, H. D. (1993) Immunolocalization of TGF-beta 1, TGF-beta 2, and TGF-beta 3 in the anterior segment of the human eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science January*, 34, 23–30.
- Pei, H., Li, Y., Liu, M. and Chen, Y. (2017) Targeting Twist expression with small molecules. *MedChemComm*, 8(2), 268–275.
- Peinado, H., Olmeda, D. and Cano, A. (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews Cancer*, 7(6), 415–428.
- Pennini, M. E., Perrinet, S., Dautry-Varsat, A. and Subtil, A. (2010) Histone methylation by NUP, a novel nuclear effector of the intracellular pathogen Chlamydia trachomatis. *PLoS Pathogens*, 6(7), 1–12.
- Pérez-Pomares, J. M. and Muñoz-Chápuli, R. (2002) Epithelial-mesenchymal transitions: A mesodermal cell strategy for evolutive innovation in metazoans. *Anatomical Record*, 268(3), 343–351.
- Perez, V. L. *et al.* (2016) Novel Scoring Criteria for the Evaluation of Ocular Graft-versus-Host Disease in a Preclinical Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Animal Model. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 22(10), 1765–1772.
- Petrovay, F., Németh, I., Balázs, A. and Balla, E. (2015) Chlamydial conjunctivitis: Prevalence and serovar distribution of Chlamydia trachomatis in adults. *Journal of Medical Microbiology*, 64(9), 967–970.
- Phanish, M. K., Winn, S. K. K. and Dockrell, M. E. C. E. C. (2010) Connective tissue growth factor-(CTGF, CCN2) - A marker, mediator and therapeutic target for renal fibrosis. *Nephron - Experimental Nephrology*, 114(3), 83–92.
- Pieraccioni, M., Imbastari, F., Antonov, A., Melino, G. and Raschella, G. (2013) Activation of miR200 by c-Myb depends on ZEB1 expression and miR200 promoter methylation. *Cell Cycle*, 12(14), 2309–2320.
- Pijnenborg, R., Dixon, G., Robertson, W. B. and Brosens, I. (1980) Trophoblastic invasion of human

- decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. *Placenta*, 1(1), 3–19.
- Pistore, C. *et al.* (2017) DNA methylation variations are required for epithelial-to-mesenchymal transition induced by cancer-associated fibroblasts in prostate cancer cells. *Oncogene*, 36(40), 5551–5566.
- Porcella, S. F. *et al.* (2015) Transcriptional profiling of human epithelial cells infected with plasmid-bearing and plasmid-deficient *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity*, 83(2), 534–543.
- Postigo, A. A., Depp, J. L., Taylor, J. J. and Kroll, K. L. (2003) Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *The EMBO journal*, 22(10), 2453–62.
- Prendes, M. A., Harris, A., Wirostko, B. M., Gerber, A. L. and Siesky, B. (2013) The role of transforming growth factor  $\beta$  in glaucoma and the therapeutic implications. *British Journal of Ophthalmology*, 680–686.
- Prozialeck, W. C. *et al.* (2002) *Chlamydia trachomatis* disrupts N-cadherin-dependent cell-cell junctions and sequesters  $\beta$ -catenin in human cervical epithelial cells. *Infection and Immunity*, 70(5), 2605–2613.
- Puolakkainen, M., Kuo, C. C. and Campbell, L. A. (2005) *Chlamydia pneumoniae* uses the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor for infection of endothelial cells. *Infection and Immunity*, 73(8), 4620–4625.
- Quigley, H. A. (2011) Glaucoma. in *The Lancet*, 1367–1377.
- Raghunath, A. and Perumal, E. (2015) Micro-RNAs and their roles in eye disorders. *Ophthalmic Research*, 53(4), 169–186.
- Rajalingam, K. *et al.* (2008) Mcl-1 Is a Key Regulator of Apoptosis Resistance in *Chlamydia trachomatis*-Infected Cells. *PLoS ONE*, 3(9), e3102.
- Ramadhani, A. M. *et al.* (2017) Immunofibrogenic gene expression patterns in Tanzanian children with ocular *Chlamydia trachomatis* Infection, active trachoma and scarring: Baseline results of a 4-year longitudinal study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(SEP), 406.
- Ramadoss, S., Chen, X. and Wang, C. Y. (2012) Histone demethylase KDM6B promotes epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Biological Chemistry*, 287(53), 44508–44517.
- Ramos, M. P., Wijetunga, N. A., McLellan, A. S., Suzuki, M. and Grealley, J. M. (2015) DNA demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine is imprinted, targeted to euchromatin, and has limited transcriptional consequences. *Epigenetics and Chromatin*, 8(1), 11.
- Ramsey, K. H. and Rank, R. G. (1991) Resolution of chlamydial genital infection with antigen-specific T-lymphocyte lines. *Infection and immunity*, 59(3), 925–31.
- Rank, R. G., Batteiger, B. E. and Soderberg, L. S. (1988) Susceptibility to reinfection after a primary chlamydial genital infection. *Infection and immunity*, 56(9), 2243–9.
- Rank, R. G. and Yeruva, L. (2014) Hidden in plain sight: Chlamydial gastrointestinal infection and its relevance to persistence in human genital infection. *Infection and Immunity*, 1362–1371.
- Rasmussen, S. J. *et al.* (1997) Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to *Chlamydia* infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 99(1), 77–87.
- Reinhold, W. C. *et al.* (2007) Detailed DNA methylation profiles of the E-cadherin promoter in the NCI-60 cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(2), 391–403.
- Ren, D. *et al.* (2014) Double-negative feedback loop between ZEB2 and miR-145 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties in prostate cancer cells. *Cell and Tissue Research*, 358(3), 763–778.
- Ren, R., Horton, J. R., Zhang, X., Blumenthal, R. M. and Cheng, X. (2018) Detecting and interpreting

- DNA methylation marks. *Current Opinion in Structural Biology*. Elsevier Ltd, 88–99.
- Reynolds, J. M., Angkasekwinai, P. and Dong, C. (2010) IL-17 family member cytokines: regulation, and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 21(6), 413–423.
- Rheinwald, J. G. *et al.* (2002) A Two-Stage, p16INK4A- and p53-Dependent Keratinocyte Senescence Mechanism That Limits Replicative Potential Independent of Telomere Status. *Molecular and Cellular Biology*, 22(14), 5157–5172.
- Riau, A. K. *et al.* (2011) Aberrant DNA methylation of matrix remodeling and cell adhesion related genes in pterygium. *PLoS ONE*, 6(2), e14687.
- Ridiandries, A., Tan, J. T. M. and Bursill, C. A. (2018) The role of chemokines in wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 3217.
- de Rie, D. *et al.* (2017) An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nature Biotechnology*, 35(9), 872–878.
- Robertson, I. B. *et al.* (2015) Latent TGF- $\beta$ -binding proteins. *Matrix Biology*, 44–53.
- Robertson, I. B. and Rifkin, D. B. (2016) Regulation of the bioavailability of TGF- $\beta$  and TGF- $\beta$ -related proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(6).
- Robertson, K. D. (2005) DNA methylation and human disease. *Nature Reviews Genetics*, 597–610.
- Rocher, M., Robert, P. Y. and Desmoulière, A. (2019) The myofibroblast, biological activities and roles in eye repair and fibrosis. A focus on healing mechanisms in avascular cornea. *Eye (Basingstoke)*, 34, 232–240.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L. and Bradley, A. (2004) Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research*, 14(10 A), 1902–1910.
- Ross, S. and Hill, C. S. (2008) How the Smads regulate transcription. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(3), 383–408.
- Rours, I. G. I. J. G. *et al.* (2008) Chlamydia trachomatis as a cause of neonatal conjunctivitis in Dutch infants. *Pediatrics*, 121(2), e321-6.
- Rout-Pitt, N., Farrow, N., Parsons, D. and Donnelley, M. (2018) Epithelial mesenchymal transition (EMT): A universal process in lung diseases with implications for cystic fibrosis pathophysiology. *Respiratory Research*, 19(1), 1–10.
- van Roy, F. and Berx, G. (2008) The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer, 65(23), 3756–3788.
- Saika, S. *et al.* (2001) Accumulation of latent transforming growth factor- $\beta$  binding protein-1 and TGF $\beta$ 1 in extracellular matrix of filtering bleb and of cultured human subconjunctival fibroblasts. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 239(3), 234–241.
- Saika, S. *et al.* (2004) Role of p38 MAP Kinase in Regulation of Cell Migration and Proliferation in Healing Corneal Epithelium. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45(1), 100–109.
- Saika, S. (2006) TGF $\beta$  pathobiology in the eye. *Laboratory Investigation*, 86(2), 106–115.
- Saika, S., Yamanaka, O., Flanders, K. C., *et al.* (2008) Epithelial-Mesenchymal Transition as a Therapeutic Target for Prevention of Ocular Tissue Fibrosis. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*, 8(1), 69–76.
- Saika, S., Yamanaka, O., Sumioka, T., *et al.* (2008) Fibrotic disorders in the eye: targets of gene therapy. *Progress in retinal and eye research*, 27(2), 177–96.
- Saika, S. *et al.* (2009) TGF $\beta$  in fibroproliferative diseases in the eye. *Frontiers in Bioscience - Scholar*, 1 S(1), 376–390.
- Saika, S. S. *et al.* (2001) Tgf $\beta$ 2 in corneal morphogenesis during mouse embryonic development. *Developmental Biology*, 240(2), 419–432.
- Sanford, L. P. *et al.* (1997) TGF $\beta$ 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-

- overlapping with other TGF $\beta$  knockout phenotypes. *Development*, 124(13), 2659–2670.
- Schlunck, G., Meyer-ter-Vehn, T., Klink, T. and Grehn, F. (2016) Conjunctival fibrosis following filtering glaucoma surgery. *Experimental Eye Research*, 142, 76–82.
- Schneider, M. and Fuchshofer, R. (2015) The role of astrocytes in optic nerve head fibrosis in glaucoma. *Experimental Eye Research*, 49–55.
- Seibold, L. K., Sherwood, M. B. and Kahook, M. Y. (2012) Wound Modulation After Filtration Surgery. *Survey of Ophthalmology*, 530–550.
- Selbach, M. *et al.* (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 455(7209), 58–63.
- Serini, G. *et al.* (1998) The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor- $\beta$ 1. *The Journal of cell biology*, 142(3), 873–81.
- Serrano-Gomez, S. J., Maziveyi, M. and Alahari, S. K. (2016) Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. *Molecular Cancer*, 15(1), 1–14.
- Sha, Y. *et al.* (2019) Intermediate cell states in epithelial-to-mesenchymal transition. *Physical Biology*, 16(2).
- Shapiro, L. and Weis, W. I. (2009) Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*.
- Shayevitch, R., Askayo, D., Keydar, I. and Ast, G. (2018) The importance of DNA methylation of exons on alternative splicing. *RNA*, 24(10), 1351–1362.
- Shi, Y. *et al.* (1998) Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF- $\beta$  signaling. *Cell*, 94(5), 585–94.
- Shook, D. and Keller, R. (2003) Mechanisms, mechanics and function of epithelial–mesenchymal transitions in early development. *Mechanisms of Development*, 120(11), 1351–1383.
- Shu, D. Y. and Lovicu, F. J. (2017) Myofibroblast transdifferentiation: The dark force in ocular wound healing and fibrosis. *Progress in Retinal and Eye Research*, 60, 44–65.
- Shu, D. Y., Ong, K. and Lovicu, F. J. (2017) Histopathology of Subcapsular Cataract in a Patient with Atopic Dermatitis. in *Optometry and Vision Science*, 270–276.
- Shukla, S. *et al.* (2011) CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature*, 479(7371), 74–79.
- Siemens, H. *et al.* (2011) miR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions. *Cell Cycle*, 10(24), 4256–4271.
- Sindrilaru, A. *et al.* (2011) An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *Journal of Clinical Investigation*, 121(3), 985–997.
- Sindrilaru, A. and Scharffetter-Kochanek, K. (2013) Disclosure of the Culprits: Macrophages—Versatile Regulators of Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 2(7), 357–368.
- Siriwardena, D. *et al.* (2002) Human antitransforming growth factor  $\beta$ 2 monoclonal antibody - A new modulator of wound healing in trabeculectomy: A randomized placebo controlled clinical study. *Ophthalmology*, 109(3), 427–431.
- Skrypek, N., Goossens, S., De Smedt, E., Vandamme, N. and Berox, G. (2017) Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Epigenetic Reprogramming Driving Cellular Plasticity. *Trends in Genetics*, 943–959.
- Skwor, T. A. *et al.* (2008) Role of secreted conjunctival mucosal cytokine and chemokine proteins in different stages of trachomatous disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(7), e264.
- Smith, A. *et al.* (2001) OmpA genotypic evidence for persistent ocular Chlamydia trachomatis infection in Tanzanian village women. in *Ophthalmic Epidemiology*, 127–135.

- Soehnlein, O. and Lindbom, L. (2010) Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 427–439.
- Solomon, A. W. *et al.* (2003) Strategies for control of trachoma: Observational study with quantitative PCR. *Lancet*, 362(9379), 198–204.
- Song, Y. *et al.* (2012) Inverse Association between miR-194 Expression and Tumor Invasion in Gastric Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 19(S3), 509–517.
- Sorrentino, A. *et al.* (2008) The type I TGF- $\beta$  receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nature Cell Biology*, 10(10), 1199–1207.
- Sproul, D. *et al.* (2011) Transcriptionally repressed genes become aberrantly methylated and distinguish tumors of different lineages in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(11), 4364–4369.
- Stephens, R. S. (2003) The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 11(1), 44–51.
- Steven, P. and Gebert, A. (2009) Conjunctiva-associated lymphoid tissue- Current knowledge, animal models and experimental prospects. *Ophthalmic Research*, 2–8.
- Stone, R. C. *et al.* (2016) Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. *Cell and Tissue Research*, 495–506.
- Strathdee, G. (2002) Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. *Seminars in Cancer Biology*, 12(5), 373–379.
- Strutz, F. *et al.* (2002) Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney International*, 61(5), 1714–1728.
- Sun, B. *et al.* (2019) miR-205 Suppresses Pulmonary Fibrosis By Targeting GATA3 Through Inhibition Of Endoplasmic Reticulum Stress. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 21.
- Sun, K. H., Chang, Y., Reed, N. I. and Sheppard, D. (2016)  $\alpha$ -smooth muscle actin is an inconsistent marker of fibroblasts responsible for force-dependent TGF $\beta$  activation or collagen production across multiple models of organ fibrosis. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 310(9), L824–L836.
- Sun, L. and Fang, J. (2016) Epigenetic Regulation of Epithelia-Mesenchymal Transition. *Cell Mol Life Sci.*, 73(23), 4493–4515.
- Suriyamurthy, S., Baker, D., Ten Dijke, P. and Iyengar, P. V. (2019) Epigenetic reprogramming of TGF- $\beta$  signaling in breast cancer. *Cancers*, 11(5), 726.
- Takahashi, Y. *et al.* (2013) Anatomy of secretory glands in the eyelid and conjunctiva: A photographic review. *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery*, 215–219.
- Takai, D. and Jones, P. A. (2003) The CpG Island Searcher: A New WWW Resource. *In Silico Biology*, 3, 235–240.
- Tam, W. L. and Weinberg, R. A. (2013) The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nature Medicine*, 19(11), 1438–1449.
- Tamiya, S. and Kaplan, H. J. (2016) Role of epithelial - mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy. *Experimental Eye Research*, 142, 26–31.
- Tan, E. J., Olsson, A. K. and Moustakas, A. (2015) Reprogramming during epithelial to mesenchymal transition under the control of TGF $\beta$ . *Cell Adhesion and Migration*, 9(3), 233–246.
- Tang, W. *et al.* (2019) miR-145-5p Suppresses Breast Cancer Progression by Inhibiting SOX2. *Journal of Surgical Research*, 236, 278–287.
- Tanimizu, N. and Miyajima, A. (2007) Molecular mechanism of liver development and regeneration. *International review of cytology*, 259, 1–48.
- Tao, B. B. *et al.* (2017) Evidence for the association of chromatin and microRNA regulation in the human genome. *Oncotarget*, 8(41), 70958–70966.

- Taylor, A. W. (2016) Ocular Immune Privilege and Transplantation. *Frontiers in Immunology*, 7, 37.
- Taylor, H. R., Burton, M. J., Haddad, D., West, S. and Wright, H. (2014) Trachoma. *Lancet*, 384(9960), 2142–52.
- Teng, Y. *et al.* (2018) MicroRNA regulation of MDM2-p53 loop in pterygium. *Experimental Eye Research*, 169, 149–156.
- Tennakoon, A., Izawa, T., Kuwamura, M. and Yamate, J. (2015) Pathogenesis of Type 2 Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) in Renal and Hepatic Fibrosis. *Journal of Clinical Medicine*, 5(1), 4.
- Theveneau, E. and Mayor, R. (2012) Cadherins in collective cell migration of mesenchymal cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 677–684.
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J. and Nieto, M. A. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), 871–90.
- Thiery, J. P. and Sleeman, J. P. (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(2), 131–42.
- Thylefors, B., Dawson, C. R., Jones, B. R., West, S. K. and Taylor, H. R. (1987) A simple system for the assessment of trachoma and its complications. *Bulletin of the World Health Organization*, 65(4), 477–483.
- Tian, X. J., Zhang, H. and Xing, J. (2013) Coupled reversible and irreversible bistable switches underlying TGF $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition. *Biophysical Journal*, 105(4), 1079–1089.
- Tiwari, N. *et al.* (2013) Sox4 Is a Master Regulator of Epithelial-Mesenchymal Transition by Controlling Ezh2 Expression and Epigenetic Reprogramming. *Cancer Cell*, 23(6), 768–783.
- Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. and Brown, R. A. (2002) Myofibroblasts and mechano: Regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(5), 349–363.
- Tosi, G. M. *et al.* (2018) TGF- $\beta$  concentrations and activity are down-regulated in the aqueous humor of patients with neovascular age-related macular degeneration. *Scientific Reports*, 8(1).
- Tosi, G. M., Orlandini, M. and Galvagni, F. (2018) The controversial role of tgf- $\beta$  in neovascular age-related macular degeneration pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3363.
- Tran, D. D., Corsa, C. A. S., Biswas, H., Aft, R. L. and Longmore, G. D. (2011) Temporal and spatial cooperation of Snail1 and Twist1 during epithelial-mesenchymal transition predicts for human breast cancer recurrence. *Molecular Cancer Research*, 9(12), 1644–1657.
- Tremolada, G. *et al.* (2012) The Role of Angiogenesis in the Development of Proliferative Diabetic Retinopathy: Impact of Intravitreal Anti-VEGF Treatment. *Experimental Diabetes Research*, 2012, 728325.
- Tsai, C. N., Tsai, C. L., Tse, K. P., Chang, H. Y. and Chang, Y. S. (2002) The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the down-regulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(15), 10084–10089.
- Tsai, H. C. *et al.* (2012) Transient Low Doses of DNA-Demethylating Agents Exert Durable Antitumor Effects on Hematological and Epithelial Tumor Cells. *Cancer Cell*, 21(3), 430–446.
- Uhlmann, S. *et al.* (2012) Global microRNA level regulation of EGFR-driven cell-cycle protein network in breast cancer. *Molecular Systems Biology*, 8, 570.
- Vandewalle, C., Van Roy, F. and Berx, G. (2009) The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 773–787.



- Varley, K. E. *et al.* (2013) Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Research*, 23(3), 555–567.
- Verbeke, P. *et al.* (2006) Recruitment of BAD by the Chlamydia trachomatis vacuole correlates with host-cell survival. *PLoS Pathogens*, 2(5), 408–417.
- Vincent, T. *et al.* (2009) A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF- $\beta$  mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nature Cell Biology*, 11(8), 943–950.
- Vittal, R. *et al.* (2013) IL-17 induces type V collagen overexpression and EMT via TGF- $\beta$ -dependent pathways in obliterative bronchiolitis. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 304(6).
- Vrba, L. *et al.* (2010) Role for DNA Methylation in the Regulation of miR-200c and miR-141 Expression in Normal and Cancer Cells. *PLoS ONE*, 5(1), e8697.
- Wallace, D. M. and O'Brien, C. J. (2016) The role of lamina cribrosa cells in optic nerve head fibrosis in glaucoma. *Experimental Eye Research*, 102–109.
- Walraven, M. and Hinz, B. (2018) Therapeutic approaches to control tissue repair and fibrosis: Extracellular matrix as a game changer. *Matrix Biology*, 205–224.
- Wang, M. *et al.* (2016) N-cadherin promotes epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like traits via ErbB signaling in prostate cancer cells. *International Journal of Oncology*, 48(2), 595–606.
- Wang, S. P., Grayston, J. T. and Alexander, E. R. (1967) Trachoma vaccine studies in monkeys. *American Journal of Ophthalmology*, 63(5 PART 2), 1615–1630.
- Wang, T., Liu, Y., Zou, J. F. and Cheng, Z. S. (2017) Interleukin-17 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition via the TGF- $\beta$ 1 mediated Smad2/3 and ERK1/2 activation. *PLoS ONE*, 12(9).
- Wang, Y. *et al.* (2013) MicroRNA-204-5p regulates epithelial-to-mesenchymal transition during human posterior capsule opacification by targeting SMAD4. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 54(1), 323–332.
- Wang, Y. *et al.* (2015) Altered DNA Methylation and Expression Profiles of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase 1 in Lens Tissue from Age-related Cataract Patients. *Current Eye Research*, 40(8), 815–821.
- Wang, Y., Li, F., Zhang, G., Kang, L. and Guan, H. (2016) Ultraviolet-B induces ERCC6 repression in lens epithelium cells of age-related nuclear cataract through coordinated DNA hypermethylation and histone deacetylation. *Clinical Epigenetics*, 8(1), 62.
- Wang, Y. and Guan, H. (2017) The Role of DNA Methylation in Lens Development and Cataract Formation. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 37(6), 979–984.
- Weber, B., Stresemann, C., Brueckner, B. and Lyko, F. (2007) Methylation of human MicroRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle*, 1001–1005.
- Weber, M. *et al.* (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature Genetics*, 39(4), 457–466.
- Weinreb, R. N., Aung, T. and Medeiros, F. A. (2014) The pathophysiology and treatment of glaucoma: A review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 1901–1911.
- Weiss, G. and Schaible, U. E. (2015) Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunological Reviews*, 264(1), 182–203.
- Werner, S. and Grose, R. (2003) Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological Reviews*, 835–870.
- White, E. S. E., Baralle, F. E. and Muro, A. F. A. (2008) New insights into form and function of fibronectin splice variants, 216(1), 1–14.
- WHO (1997) *Future Approaches to Trachoma Control: Report of a Global Scientific Meeting, Geneva*,

- 17-20 June 1996. Geneva: World Health Organization. Available at: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/63413/1/WHO\\_PBL\\_96.56.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/63413/1/WHO_PBL_96.56.pdf). Accessed February 13, 2020.
- WHO (2019) Weekly Epidemiological Record. *Alliance for the Global Elimination of Trachoma by 2020: progress report on elimination of trachoma, 2018*, 92(29), 317–328. Available at: <https://www.who.int/wer/2019/wer9429/en/> Accessed February 13, 2020.
- Wienholds, E. *et al.* (2005) Cell biology: MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science*, 309(5732), 310–311.
- Wiklund, E. D. *et al.* (2011) Coordinated epigenetic repression of the miR-200 family and miR-205 in invasive bladder cancer. *International Journal of Cancer*, 128(6), 1327–1334.
- Williams, D. M., Grubbs, B. G., Park-Snyder, S., Rank, R. G. and Bonewald, L. F. (1996) Activation of latent transforming growth factor beta during chlamydia trachomatis -induced murine pneumonia. *Research in Microbiology*, 147(4), 251–262.
- Wolle, M. A., Muñoz, B. E., Mkocho, H. and West, S. K. (2009) Constant Ocular Infection with Chlamydia trachomatis Predicts Risk of Scarring in Children in Tanzania. *Ophthalmology*, 116(2), 243–247.
- Wright, H. R. and Taylor, H. R. (2005) Clinical examination and laboratory tests for estimation of trachoma prevalence in a remote setting: What are they really telling us? *Lancet Infectious Diseases*, 313–320.
- Wright, H. R., Turner, A. and Taylor, H. R. (2007) Trachoma Cause of Blindness. *Lancet*, 371, 1945–54.
- Wu, C. W. *et al.* (2016) Inactivation of p53 in pterygium influence miR-200a expression resulting in ZEB1/ZEB2 up-regulation and EMT processing. *Experimental Eye Research*, 146, 206–211.
- Wu, J. *et al.* (2019) MicroRNA-145 promotes the epithelial-mesenchymal transition in peritoneal dialysis-associated fibrosis by suppressing fibroblast growth factor 10. *Journal of Biological Chemistry*, 294(41), 15052–15067.
- Wu, W. S. *et al.* (2017) Snail collaborates with EGR-1 and SP-1 to directly activate transcription of MMP 9 and ZEB1. *Scientific Reports*, 7(1).
- Wu, X. and Zhang, Y. (2017) TET-mediated active DNA demethylation: Mechanism, function and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 517–534.
- Wynn, T. A. (2004) Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm. *Nature Reviews Immunology*, 4(8), 583–594.
- Wynn, T. A. and Ramalingam, T. R. (2012) Mechanisms of fibrosis: Therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature Medicine*, 1028–1040.
- Wynn, T. A. and Vannella, K. M. (2016) Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*, 450–462.
- Wyrick, P. B. (2010) Chlamydia trachomatis Persistence In Vitro: An Overview. *The Journal of Infectious Diseases*, 201(S2), 88–95.
- Xia, W. *et al.* (2015) DNA methylation mediated silencing of microRNA-145 is a potential prognostic marker in patients with lung adenocarcinoma. *Scientific Reports*, 5(June), 1–9.
- Xia, Y., Wu, Y., Liu, B., Wang, P. and Chen, Y. (2014) Downregulation of miR-638 promotes invasion and proliferation by regulating SOX2 and induces EMT in NSCLC. *FEBS Letters*, 588(14), 2238–2245.
- Xiao, W. *et al.* (2015) Quantitative analysis of injury-induced anterior subcapsular cataract in the mouse: A model of lens epithelial cells proliferation and epithelial-mesenchymal transition. *Scientific Reports*, 5.

- Xu, J., Lamouille, S. and Derynck, R. (2009) TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell research*, 19(2), 156–72.
- Xu, M. *et al.* (2018) MiR-22 suppresses epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer by inhibiting Snail and MAPK1/Slug/vimentin feedback loop. *Cell Death and Disease*, 9(2), 209.
- Xu, P., Liu, J. and Derynck, R. (2012) Post-translational regulation of TGF- $\beta$  receptor and Smad signaling. *FEBS Letters*, 586(14), 1871–1884.
- Xu, W., Lucas, A. S., Wang, Z. and Liu, Y. (2014) Identifying microRNA targets in different gene regions. *BMC Bioinformatics*, 15, S4.
- Xu, X. *et al.* (2018) High-fidelity CRISPR/Cas9- based gene-specific hydroxymethylation rescues gene expression and attenuates renal fibrosis. *Nature Communications*, 9(1), 1–15.
- Y Berhane, A Worku, A. B. (2006) National Survey on Blindness, Low Vision and Trachoma in Ethiopia. *Federal Ministry of Health of Ethiopia with support from and in collaboration with a consortium of NGOs*, Addis Ababa. Available at: <http://pbunion.org/Countriessurveyresults/Ethiopia/Ethiopian National Blindness and trachoma survey.pdf> Accessed February 13, 2020.
- Yang, X. *et al.* (2014) Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell*, 26(4), 577–590.
- Ye, H. *et al.* (2015) LOXL1 hypermethylation in pseudoexfoliation syndrome in the uighur population. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. Association for Research in Vision and Ophthalmology Inc., 56(10), 5838–5843.
- Yeruva, L. *et al.* (2017) MicroRNAs modulate pathogenesis resulting from chlamydial infection in mice. *Infection and Immunity*, 85(1).
- Yi, R. *et al.* (2006) Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nature Genetics*, 38(3), 356–362.
- Yin, Y. *et al.* (2017) Impact of cytosine methylation on DNA binding specificities of human transcription factors. *Science*, 356(6337).
- Yoder, J. A., Walsh, C. P. and Bestor, T. H. (1997) Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in Genetics*, 335–340.
- Yoshiura, K. *et al.* (1995) Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16), 7416–7419.
- Young, C.-H. *et al.* (2010) E-cadherin promoter hypermethylation may contribute to protein inactivation in pterygia. *Molecular Vision*, 16, 1047–1053.
- Yu-Wai-Man, C. and Khaw, P. T. (2015) Developing novel anti-fibrotic therapeutics to modulate post-surgical wound healing in glaucoma: Big potential for small molecules. *Expert Review of Ophthalmology*, 10(1), 65–76.
- Yu, Y. *et al.* (2015) Down-regulation of miR-129-5p via the Twist1-Snail feedback loop stimulates the epithelial-mesenchymal transition and is associated with poor prognosis in breast cancer. *Oncotarget*, 6(33), 34423–34436.
- Yuan, X. *et al.* (2009) Clustered microRNAs' coordination in regulating protein-protein interaction network. *BMC Systems Biology*, 3(1), 65.
- Zada, M., Pattamatta, U. and White, A. (2018) Modulation of Fibroblasts in Conjunctival Wound Healing. *Ophthalmology*, 125(2), 179–192.
- Zadora, P. K. *et al.* (2019) Integrated Phosphoproteome and Transcriptome Analysis Reveals Chlamydia-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Host Cells. *Cell Reports*, 26(5), 1286-1302.e8.
- Zadran, S., Arumugam, R., Herschman, H., Phelps, M. E. and Levine, R. D. (2014) Surprisal analysis

- characterizes the free energy time course of cancer cells undergoing epithelial-to-mesenchymal transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(36), 13235–13240.
- Zaravinos, A. (2015) The regulatory role of MicroRNAs in EMT and cancer. *Journal of Oncology*, 2015, 865816.
- Zeisberg, M. and Neilson, E. G. (2009) Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1429–1437.
- Zent, J. and Guo, L. W. (2018) Signaling mechanisms of myofibroblastic activation: Outside-in and inside-out. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 848–868.
- Zhai, L., Ma, C., Li, W., Yang, S. and Liu, Z. (2016) miR-143 suppresses epithelial–mesenchymal transition and inhibits tumor growth of breast cancer through down-regulation of ERK5. *Molecular Carcinogenesis*, 55(12), 1990–2000.
- Zhan, Y. *et al.* (2017) MicroRNA-182 drives colonization and macroscopic metastasis via targeting its suppressor SNAI1 in breast cancer. *Oncotarget*, 8(3), 4629–4641.
- Zhang, G. and Pradhan, S. (2014) Mammalian epigenetic mechanisms. *IUBMB Life*, 66(4), 240–256.
- Zhang, H. P. *et al.* (2016) A regulatory circuit involving miR-143 and DNMT3a mediates vascular smooth muscle cell proliferation induced by homocysteine. *Molecular Medicine Reports*, 13(1), 483–490.
- Zhang, J. *et al.* (2014) TGF- $\beta$ -induced epithelial-to-mesenchymal transition proceeds through stepwise activation of multiple feedback loops. *Science Signaling*, 7(345), ra91.
- Zhang, L. *et al.* (2015) MicroRNA-10b Triggers the Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) of Laryngeal Carcinoma Hep-2 Cells by Directly Targeting the E-cadherin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(1), 33–44.
- Zhang, L. *et al.* (2017) MicroRNA-30a Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition in Diabetic Cataracts Through Targeting SNAI1. *Scientific Reports*, 7(1), 1117.
- Zhang, Y. and Weinberg, R. A. (2018) Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Frontiers of Medicine*, 12(4), 361–373.
- Zhao, L. *et al.* (2011) LPS-induced epithelial-mesenchymal transition of intrahepatic biliary epithelial cells. *Journal of Surgical Research*, 171(2), 819–825.
- Zheng, G. *et al.* (2009) Disruption of E-cadherin by matrix metalloproteinase directly mediates epithelial-mesenchymal transition downstream of transforming growth factor- $\beta$ 1 in renal tubular epithelial cells. *American Journal of Pathology*, 175(2), 580–591.
- Zhou, B. P. *et al.* (2004) Dual regulation of Snail by GSK-3 $\beta$ -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Cell Biology*, 6(10), 931–940.
- Zhou, P., Luo, Y., Liu, X., Fan, L. and Lu, Y. (2012) Down-regulation and CpG island hypermethylation of CRYAA in age-related nuclear cataract. *The FASEB Journal*, 26(12), 4897–4902.
- Zhu, X., Zhang, G., Kang, L. and Guan, H. (2015) Epigenetic Regulation of Werner Syndrome Gene in Age-Related Cataract. *J Ophthalmol.*, 2015, 579695.
- Zhu, X. J., Zhang, K. K., Zhou, P., Jiang, C. H. and Lu, Y. (2015)  $\alpha$ A-crystallin gene CpG islands hypermethylation in nuclear cataract after pars plana vitrectomy. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 253(7), 1043–1051.
- Ziklo, N., Huston, W. M., Taing, K. and Timms, P. (2019) High Expression of IDO1 and TGF- $\beta$ 1 During Recurrence and Post Infection Clearance With Chlamydia Trachomatis, Are Independent of Host IFN- $\gamma$  Response. *BMC Infectious Diseases*, 19(1).

## Biografija

Jovana J. Rajić rođena je 22. decembra 1988. god. u Beogradu gde je i završila VI beogradsku gimnaziju. Osnovne studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, upisala je 2007. god., dok master studije na istom fakultetu, na modulu Humana molekularna biologija, upisuje 2013. god. Master rad, urađen na Odeljenju za molekularnu biologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Instituta od nacionalnog značaja za republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom dr Jelene Arambašić Jovanović i dr Dušanke Savić-Pavićević, pod naslovom „Analiza metilacionog profila promotora gena za CXCL12 u parodontopatiji i dijabetičnoj parodontopatiji”, odbranila je 2014. god. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Molekularna biologija eukariota, upisuje 2014. god. Od 2015. god. zaposlena je kao istraživač pripravnik, a od 2018. god. kao istraživač saradnik na Odeljenju za molekularnu biologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Instituta od nacionalnog značaja za republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta „Signalni molekuli u dijabetesu: identifikacija potencijalnih bioloških markera uključenih u modifikaciju i integraciju signalnih puteva u cilju predikcije i intervencije u dijabetesu” (#173020), potprojekat „Genetska predispozicija za razvoj dijabetesa tip 1 i novi pristupi u prevenciji disfunkcije beta ćelija u dijabetesu: izučavanje puteva prenosa signala posredovanih CXCL12” i Plana i programa rada Instituta za 2020. godinu (451-03-68/2020-14/200007), finansiranih od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Do danas je objavila 10 radova u časopisima međunarodnog značaja i ima 12 saopštenja na međunarodnim skupovima.